

AMANDA NATÁLIA LUCCHESI

Análise das Alterações Morfológicas e Ultraestruturais do Fígado de Ratos
Diabéticos Induzidos pela Aloxana.

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Bases Gerais da Cirurgia – Área de
Concentração em Agressão, Reparação,
Regeneração e Transplante de Tecidos e Órgãos, da
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, para
Obtenção do título de Doutor.**

Orientador - Prof. Titular: César Tadeu Spadella

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2014

AMANDA NATÁLIA LUCCHESI

**Análise das Alterações Morfológicas e Ultraestruturais do Fígado de Ratos
Diabéticos Induzidos pela Aloxana.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bases Gerais da Cirurgia – Área
de Concentração em Agressão, Reparação,
Regeneração e Transplante de Tecidos e Órgãos,
da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP,
para Obtenção do título de Doutor.**

Orientador - Prof. Titular : César Tadeu Spadella

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA
INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE
BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lucchesi, Amanda Natalia.

Análise das alterações morfológicas e ultraestruturais do fígado de ratos diabéticos induzidos pela aloxana. / Amanda Natalia Lucchesi. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: César Tadeu Spadella

Capes: 20603002

1. Diabetes. 2. Fígado - Doenças. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Aloxana. 5. Esteatose hepática. 6. Análise morfológica.

Palavras-chave: Aloxana; Análise morfológica; Análise ultraestrutural; Diabetes Mellitus; Esteatose hepática .

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais **Luiz Carlos Lucchesi e Lúcia de Fátima Maschieri Lucchesi**, pessoas a qual sempre irei me espelhar, agradeço por existirem em minha vida e me apoiarem em todos os momentos, me ajudando em oração para obter mais essa vitória em minha vida, pelo carinho, exemplo de vida e amor incondicional.

As minhas irmãs queridas, **Mirelle Natália Lucchesi e Letícia Natália Lucchesi**, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu esposo **Fernando Dias Fernandes**, pelo apoio e carinho concedidos.

Aos meus cunhados **Anselmo de Andrade Pereira e Marçal Cavalcante de Andrade Silva**, pela amizade e carinho.

Ao **Professor César Tadeu Spadella**, pessoa a qual levarei para sempre em meu coração com carinho, um segundo pai, que me deu a oportunidade de aprender e me abriu as portas para que eu pudesse obter conhecimento durante esses 9 anos.

Ao meu Pastor **Anderson e sua esposa Cristiane**, pelas orações.

HOMENAGENS

Aos meus Pais **Luiz e Lúcia**, pelas orações, apoio, amor e incentivo diário.

Ao meu **Senhor Jesus Cristo**, meu Deus, meu amigo e fiel protetor, por ter me concedido a oportunidade de iniciar e concluir este estudo, por sua fidelidade e pelo cumprimento de suas promessas em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que tiveram participação na realização deste trabalho. Em especial:

Aos funcionários do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, em especial ao Técnico Danilo Chaguri pela ajuda diária em todos os momentos do cronograma experimental deste trabalho.

Aos técnicos Ednelson Bianchi, Danilo Borsato, Luiz Carlos E. Bardella e Arlindo Sérgio Gabriel, pela ajuda e colaboração nos momentos experimentais.

Ao fisioterapeuta Lucas Langoni Cassettari, aluno do curso de Doutorado, pela ajuda nos momentos experimentais deste estudo, realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental, da Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP.

Aos funcionários da Secção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelas orientações e amizade durante esses anos.

Ao pessoal da secretaria do departamento de Cirurgia e Ortopedia, pela ajuda e atenção em todos os momentos necessários, em especial ao amigo **Douglas de Jesus Jacinto Pinto** pela ajuda na formatação desta tese.

A equipe Técnica do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências UNESP, em especial ao técnico Tiago dos Santos Tardivo, Lígia Barbosa Castro e Claudete dos Santos Tardivo.

Em especial aos **professores: Prof. Titular César Tadeu Spadella, Profa. Dra. Èrika Veruska Paiva Ortolan, Prof. Dr. Walmar Kerche de Oliveira, Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção, Prof. Dr. Cássio Vieira**

de Oliveira, Prof. Dr. Carlos Eduardo Brossi, Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz, Prof. Dr. Paulo Roberto Teixeira Michelone e ao Prof. Dr. Ludvig Hafner, que fizeram parte da Banca na Defesa desta Tese de Doutorado, meus sinceros agradecimentos pela participação neste momento especial.

Aos **médicos patologistas do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, Prof. Assist. Dr. Viciany Erique Fabris e a Profa. Assist. Dra. Kunie Iabuki Rabello Coelho** pelas orientações concedidas durante este estudo.

Aos **animais utilizados neste trabalho**, os quais foram sacrificados em favor da pesquisa científica.

A **Capes e Fapesp** pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

ARTIGO ORIGINAL

Análise das Alterações Morfológicas e Ultraestruturais do Fígado de Ratos Diabéticos Induzidos pela Aloxana

Amanda Natália Lucchesi¹, Lucas Langoni Cassettari², Natália Tavares de Freitas³, César Tadeu Spadella⁴

¹Mestre em Ciências, Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, Faculdade Medicina da UNESP de Botucatu (FM-Botucatu/UNESP), São Paulo, Brasil.

²Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, FM-Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil.

³Médica-Residente de Geriatria e Ex-bolsista do Programa CNPq/PIBIC, FM-Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil.

⁴Professor Titular, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, FM-Botucatu/UNESP, São Paulo, Brasil.

Pesquisa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Autor correspondente: César T. Spadella, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina, Campus UNESP, Distrito de Rubião Jr s/nº, CEP: 18618-970 Botucatu, SP, Brasil, telefone: +55(14) 3880-1441; e-mail: spadella@fmb.unesp.br

RESUMO

Bases científicas: Em contraste à atenção dada à ocorrência de degeneração gordurosa do fígado de etiologia não-alcoólica (DGFNA) em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), pouco se sabe sobre a evolução desta entidade anátomo-clínica em portadores de diabetes mellitus do tipo 1 (DM1).

Objetivo: Avaliar se o DM1 é capaz de provocar alterações morfológicas e ultraestruturais no fígado de ratos diabéticos induzidos pela aloxana (ALX), de modo a permitir caracterizar os efeitos desta droga e do diabetes, durante um longo período de seguimento. Esperamos que os resultados possam reproduzir um adequado modelo experimental de hepatopatia diabética crônica.

Método: Foram estudados 60 ratos machos, Wistar, com aproximadamente 250g, distribuídos por sorteio em 2 grupos experimentais, com 30 animais cada um: GN – Grupo Normal: constituído de 30 ratos controles, não-diabéticos; GD - Grupo Diabético: constituído de 30 ratos diabéticos, hiperglicêmicos, sem qualquer tratamento da doença. Cada um dos grupos experimentais foi posteriormente dividido em 3 subgrupos de ratos, com 10 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados, respectivamente, em 4 momentos do experimento, a saber: M_0 – animais dos 3 subgrupos, no momento inicial do experimento (2 semanas de seguimento normal ou de indução do diabetes), para obtenção apenas de parâmetros clínicos e laboratoriais; M_1 , M_2 , M_3 – animais sacrificados, respectivamente com 6, 14 e 26 semanas de seguimento normal ou diabetes. Parâmetros clínicos e laboratoriais, incluindo: avaliação do peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese e dosagens da glicose sangüínea de jejum, glicose urinária, hemoglobina glicosilada, insulina plasmática, bilirrubinas, aspartato amino transferase (AST), aspartato alanina transferase (ALT), fosfatase alcalina, γ - glutamil transferase (γ -GT), colesterol total, lipoproteínas de alta e baixa densidade, e triglicérides foram obtidos nos 4 momentos de avaliação do experimento. No sacrifício, foi realizada a necropsia com obtenção do peso fresco do fígado, da relação entre o peso fresco do órgão /peso corporal, e a coleta de espécimes para o estudo histopatológico do fígado à microscopia ótica (MO) e eletrônica de transmissão (ME).

Resultados: Ratos diabéticos, hiperglicêmicos, sem qualquer tipo de tratamento (GD) evoluíram com progressiva perda de peso corporal e aumento significativo da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparado com os animais do GN ($P < 0,01$). Neste grupo, animais diabéticos também apresentaram aumento significativo da glicose sangüínea, glicose urinária e da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA_{1C}), com níveis

significativamente baixos de insulina plasmática em relação aos ratos do GN. Observou-se que os níveis sanguíneos de AST e ALT foram significativamente elevados em ratos do GD, nas dosagens efetuadas com 2 semanas de seguimento, quando comparados com aqueles observados em animais do GN ($P < 0,001$). Entretanto, já a partir da 6ª semana de seguimento diabético os níveis da AST foram normais até o final do experimento, em contraste aos valores da ALT que permaneceram sempre elevados nas dosagens efetuadas com 6, 14 e 26 semanas de seguimento. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os 2 grupos experimentais nos valores dos demais testes da função hepática e nas dosagens de colesterol total, triglicérides e lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL; LDL), durante todo o experimento. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre o peso fresco do fígado de animais normais e diabéticos ao longo de todo o experimento. Porém, considerada a relação entre o peso fresco do fígado e o peso corporal, observou-se que o peso fresco do fígado de animais diabéticos foi significativamente maior que o observado em animais controles não-diabéticos, com 14 e 26 semanas de seguimento ($P < 0,001$). Animais do GD apresentaram alterações morfológicas hepáticas que tiveram estreita relação temporal com o tempo de seguimento diabético, caracterizadas por parênquima hepático constituído de hepatócitos contendo vacúolos gordurosos, focais ou generalizados, de aspecto micro ou macrovesicular, associados à presença de dilatação dos sinusóides e perda progressiva da estrutura geral do órgão. Alterações inflamatórias, compatíveis com esteatohepatite, representadas por infiltrado inflamatório mononuclear, de moderada intensidade, foram observadas nos espaços interlobulares e peri-portais, em 40% dos cortes histológicos analisados do fígado de animais sacrificados com 26 semanas de seguimento diabético. Fibrose hepática, de leve intensidade, circundando os vasos portais, também foi observada em 20% dos cortes analisados pelo *red* picrosirius nos animais deste subgrupo. Somente discreta degeneração gordurosa focal microvesicular foi observada no fígado de animais controles, não-diabéticos, sacrificados com 26 semanas de seguimento. Os achados ultraestruturais do fígado mostraram diferenças significativas entre animais do GN e GD, sendo a gravidade das lesões encontradas em ratos diabéticos também estreitamente relacionada com o tempo de seguimento experimental. Fígados de ratos diabéticos apresentaram progressiva desorganização da arquitetura estrutural, com hepatócitos mostrando aparente escassez no número de organelas intracitoplasmáticas, com progressiva degeneração gordurosa e vacuolização, de aspecto micro e macrovesicular, quando comparados com hepatócitos de ratos controles. Alterações degenerativas das mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso (RER) e núcleos também foram observadas em hepatócitos de ratos diabéticos, sacrificados

com 26 semanas de seguimento, caracterizadas por aparente edema e escassez de cristas mitocondriais, diminuição de cisternas do RER e condensação da heterocromatina nuclear.

Conclusões: O DM induzido pela ALX provoca alterações bioquímicas no sangue, e lesões morfológicas e ultraestruturais no fígado do rato, que muito se assemelham às aquelas encontradas no fígado do homem, e que incluem desde a esteatose, esteatohepatite até a fibrose hepática. A gravidade das lesões histopatológicas observadas no fígado guardou estreita relação com o tempo de seguimento diabético, sendo tanto mais graves quanto maior o tempo de seguimento experimental, especialmente em animais diabéticos com 26 semanas de diabetes, sem qualquer controle do estado hiperglicêmico. O modelo experimental de hepatopatia diabética crônica obtido pode servir de base para a realização de novas investigações, tendo-se o cuidado em correlacionar as lesões histológicas do fígado com a fase do experimento no qual elas foram observadas.

INTRODUÇÃO

A associação entre diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) e degeneração gordurosa do fígado de etiologia não-alcoólica (DGFNA), um termo utilizado para designar um amplo espectro de desordens hepáticas, que vai desde a esteatose até a cirrose, tem sido reconhecida de longa data por inúmeros pesquisadores¹⁻³. Todavia, em contraste à atenção dada a esta entidade em pacientes com DM2, pouco se sabe sobre a evolução das lesões hepáticas em portadores de diabetes mellitus do tipo 1 (DM1).

Modelos-animais de DM1, quimicamente induzidos pela aloxana (ALX) ou estreptozotocina (STZ), no entanto, poderiam prover informações valiosas sobre a história natural da DGFNA, ajudando a compreender melhor os mecanismos responsáveis por esta condição. Todavia, são escassos os estudos onde as lesões hepáticas tenham sido bem documentadas, no longo prazo⁴⁻⁶.

Em adição, pelo curto período de seguimento dos animais, grande parte das pesquisas experimentais publicadas em animais com DM1 tem alcance limitado para definir claramente se as lesões histopatológicas observadas no fígado são o resultado dos efeitos tóxicos da ALX ou STZ ou vinculadas ao estado diabético hiperglicêmico que elas provocam⁷⁻¹³.

Assim, o objetivo desta investigação foi avaliar se o DM1 é capaz de provocar alterações morfológicas e ultraestruturais no fígado de ratos diabéticos induzidos pela ALX, de modo a permitir caracterizar os efeitos desta droga e do diabetes, durante um longo período de seguimento. Esperamos que os resultados possam reproduzir um adequado modelo experimental de hepatopatia diabética crônica.

MATERIAL E MÉTODO

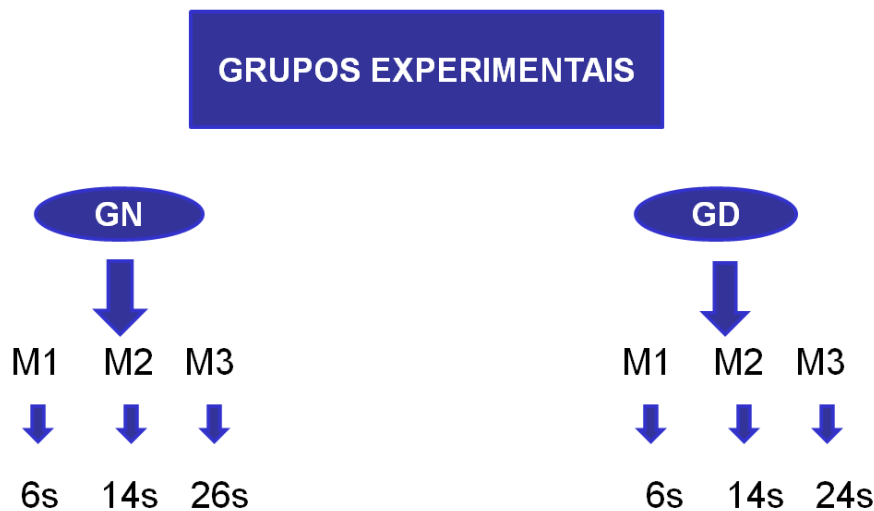
Animais e indução do diabetes

Neste experimento foram analisados 60 ratos machos, Wistar, com peso inicial de aproximadamente 250g. Durante o estudo os ratos foram acondicionados em caixas de poliuretano, colocadas em ambiente climatizado à 25° C, com exaustão e iluminação controladas, recebendo diariamente ração balanceada padrão para roedores e água *ad libidum*. O uso de animais neste estudo seguiu o código de ética para animais de experimentação do Conselho da Organização Internacional de Ciências Médicas (CIOMS) e foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da FM-Botucatu/UNESP.

O diabetes foi induzido pela ALX (Sigma Co, USA), administrada por via endovenosa, na dose única de 42mg/kg de peso corporal, utilizando uma das veias da cauda do animal. Neste experimento foram utilizados somente ratos com sinais clínicos de diabetes grave e glicemia ≥ 250 mg/dl, em duas determinações sucessivas, realizadas após a 1ª e 2ª semana de indução do diabetes. Animais diabéticos que foram a óbito no período pós-indução ou no seguimento foram repostos para não comprometer o número final de ratos da amostra.

Grupos experimentais e momentos de avaliação

Os animais foram distribuídos por sorteio em 2 grupos experimentais, com 30 animais cada um, assim designados: GN – Grupo Normal: constituído de 30 ratos controles, não-diabéticos; GD - Grupo Diabético: constituído de 30 ratos diabéticos, hiperglicêmicos, sem qualquer tratamento da doença. Cada um dos grupos experimentais foi posteriormente dividido em 3 subgrupos de ratos, com 10 animais cada um, para serem sacrificados, respectivamente, em 3 momentos do experimento (M_1 , M_2 , M_3) com 6, 14 e 26 semanas de seguimento. Animais dos 3 grupos experimentais foram avaliados após 2 semanas de seguimento normal ou de diabetes para obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais iniciais (M_0) e também precedendo os 3 períodos de sacrifício. A Figura 1 ilustra o fluxograma de distribuição dos grupos e subgrupos de estudo.



* M0- Somente para obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais iniciais após 2s de seguimento e nos períodos de sacrifício.

Figura 1 – Ilustra o fluxograma de distribuição dos grupos e subgrupos de estudo.

Parâmetros analisados

Nos momentos previamente mencionados foram avaliados parâmetros clínicos e laboratoriais dos animais, incluindo: medidas do peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, e dosagens da glicose sangüínea de jejum, glicose urinária, hemoglobina glicosilada, insulina plasmática, colesterol total e frações, triglicérides, bilirrubinas, aspartato amino transferase (AST), aspartato alanina transferase (ALT), fosfatase alcalina e γ -glutamil transferase (γ -GT).

No sacrifício foi realizada a necropsia de todos os animais, com ênfase ao aspecto, consistência, volume e peso fresco do fígado. À análise morfológica do fígado foram observados: arquitetura estrutural do órgão, dos hepatócitos, espaços porta e sinusóides; presença, característica e intensidade de eventuais infiltrados inflamatórios; presença, distribuição e intensidade da infiltração gordurosa hepática e presença eventual de fibrose e/ou cirrose hepática, e degeneração carcinomatosa. À análise ultraestrutural do parênquima hepático foi dada ênfase aos hepatócitos, núcleos, espaços porta, sinusóides e organelas intracitoplasmáticas.

Técnicas e métodos utilizados no experimento

a) Obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais

Duas semanas após a indução do diabetes ou de seguimento dos animais normais e, no dia anterior de cada um dos momentos definidos para o sacrifício, os animais foram colocados

em gaiolas metabólicas individuais, durante um período de 24 horas, para obtenção dos parâmetros clínicos. Para obtenção dos exames bioquímicos iniciais, os animais ficaram de jejum por 12h noturnas, sendo o sangue coletado por secção da cauda. No sacrifício, a coleta de sangue foi feita por punção cardíaca, com o tórax aberto, imediatamente antes do sacrifício.

b) Anestesia

Todos os procedimentos invasivos realizados nos animais, bem como o sacrifício e a necropsia foram realizados sob o efeito de anestesia geral com cloridrato de ketamina, na dose de 100mg/kg de peso corporal + cloridrato de xilazina – 50mg/kg de peso corporal (Rhobifarma Ind. Farmacêutica Ltda.), administrados por via intramuscular.

c) Exames laboratoriais

Os exames bioquímicos do sangue foram determinador por química seca, utilizando o sistema Vitros (Johnson & Johnson, USA). A hemoglobina glicosilada foi dosada por eletroforese com gel de agarose (Sebia, France) e a insulina por radioimunoensaio (Diagnostic Products Corporation, USA).

d) Exame anatomopatológico

Macroscopia (Peso fresco do fígado)

Após a exsanguinação, animais de ambos os grupos experimentais tiveram o fígado removido em bloco, sendo o órgão lavado e imediatamente pesado em balança analítica. A relação entre o peso do fígado e o peso corporal também foi estabelecida.

Estudo histopatológico à microscopia ótica (MO)

Para o estudo histopatológico à MO fragmentos representativos de todos os lobos hepáticos foram retirados, e a seguir, cortados sobre placa de cera rosa de parafina, em fragmentos longitudinais com 5 mm de comprimento por 3 mm de espessura. Parte destes fragmentos foi colocada em frascos contendo formol tamponado a 10%, pré- fixados por 48h, e posteriormente encaminhados ao laboratório de anatomia patológica para emblocamento em parafina, secção e coloração pelas técnicas da hematoxilina & eosina (HE) e vermelho picrosírius. Outra parte dos fragmentos hepáticos foi pré-fixada em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato, pH 7,3, por um período inicial de 24h, e a seguir, seccionados em fragmentos cilíndricos de 5 mm de comprimento por 1 mm de espessura e mantidos em glutaraldeído

2,5%, até o processamento para microscopia eletrônica de transmissão. Para cada subgrupo de ratos, sacrificados com 6, 14 e 26 semanas de seguimento, 5 animais foram sorteados para o estudo à MO do fígado, totalizando 15 animais analisados/grupo experimental. De cada um dos 5 animais foram obtidos 2 blocos de tecidos; de cada bloco foram preparadas 2 lâminas pela HE e 1 pelo *red* picrosirius, cada uma contendo 2 cortes de fígado. Um total de 30 lâminas foi analisado por subgrupo de ratos ou 90 lâminas por cada grupo experimental (60 HE; 30 *red* picrosirius).

Todas as lâminas foram examinadas ao microscópio de luz, em estudo duplo-cego, por dois examinadores diferentes, sem o conhecimento prévio do grupo experimental ao qual o animal pertencia. Todas as análises foram supervisionadas por um patologista experiente.

As análises histológicas foram feitas pelo método qualitativo-descritivo, levando em conta a presença, ausência e intensidade dos eventos histológicos observados. A figura 2 ilustra o fluxograma utilizado no preparo e análise morfológica à MO.

Grupos Experimentais

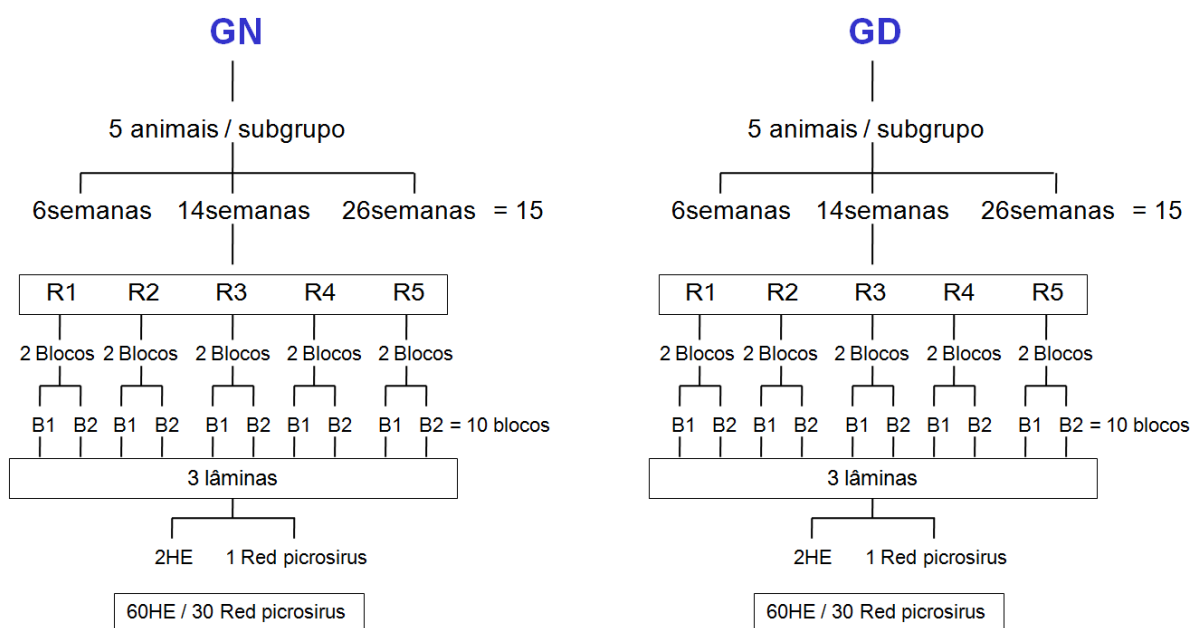


Figura 2- Fluxograma utilizado no preparo e análise morfológica à M.O

Estudo histopatológico à microscopia eletrônica (ME)

Para o estudo à ME, o fígado de 3 ratos de cada subgrupo de animais, sacrificados com 6, 14 e 26 semanas de seguimento, em cada um dos 2 grupos experimentais, foram utilizados por sorteio. De cada rato, 1 bloco de tecido hepático foi obtido, tendo sido seccionado em cortes ultrafinos, preparados conforme técnica padronizada para microscopia eletrônica de

transmissão. Dos cortes preparados de cada um dos blocos, 10 eletromicrografias dos hepatócitos, espaços porta e sinusóides foram obtidas, utilizando um microscópio eletrônico de transmissão Philips – CM 100, totalizando 30 eletromicrografias/subgrupo de estudo ou 90 eletromicrografias/grupo experimental. As eletromicrografias foram feitas com aumentos variando entre 1.200x e 4.800x. Para o estudo qualitativo das variáveis histopatológicas à ME foi utilizada a análise descritiva, sob supervisão de um profissional experiente. A figura 3 ilustra o fluxograma utilizado no preparo e análise ultraestrutural à ME.

Grupos Experimentais

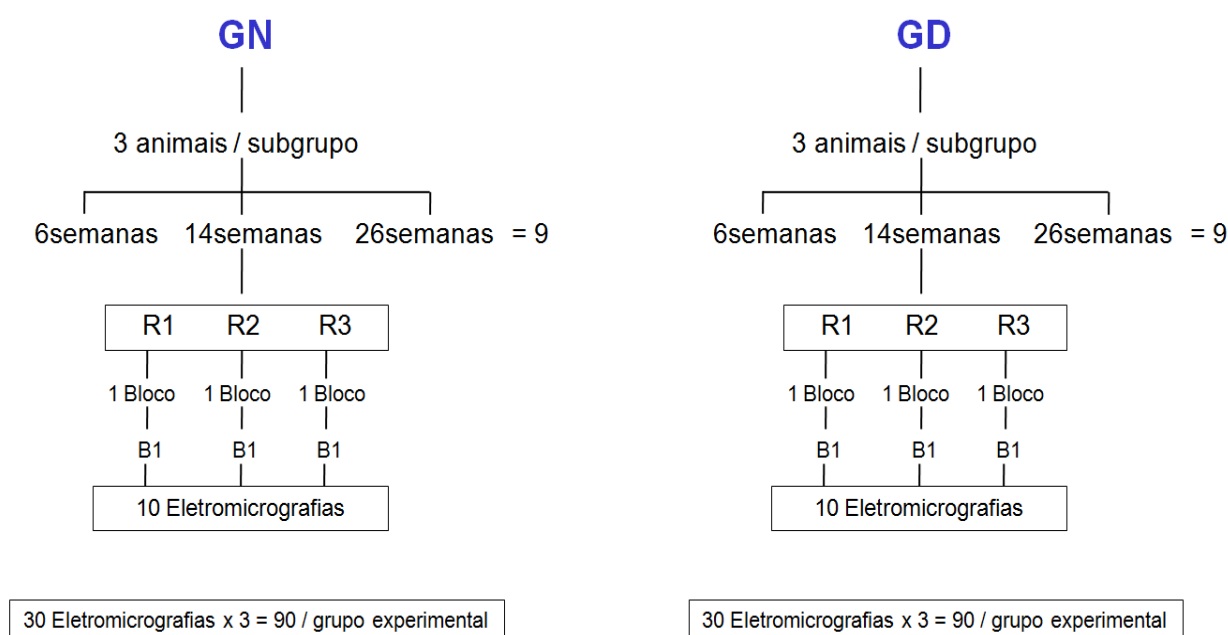


Figura 3 – Fluxograma utilizado no preparo e análise ultraestrutural à M.E

e) Análise estatística

O estudo das variáveis clínicas, laboratoriais e do peso fresco do fígado, e sua relação com o peso corporal, nos vários momentos do experimento foi feito através da análise de variância para o esquema fatorial 2x4 ou 2x3, no delineamento inteiramente casualizado, complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey, ou pela análise não-paramétrica de Mann-Whitney. Todas as discussões estatísticas do estudo foram realizadas no nível de significância de 5% ou $P < 0,05$.

RESULTADOS

Achados clínicos e laboratoriais:

Ratos controles não-diabéticos (GN) apresentaram parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com o observado para a espécie e idade, em todos os períodos avaliados, com 2, 6, 14 e 26 semanas de seguimento.

Em contraste, ratos diabéticos hiperglicêmicos, sem qualquer tipo de tratamento (GD) evoluíram com progressiva perda de peso corporal e aumento significativo da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparado com os animais do GN ($P<0,01$). Neste grupo, os animais diabéticos também apresentaram aumento significativo da glicose sangüínea, glicose urinária e da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), com níveis significativamente baixos de insulina plasmática em relação aos ratos do GN ($P<0,01$). As Figs. 4 e 5 demonstram os achados clínicos e laboratoriais obtidos em ambos os grupos experimentais, com 2, 6, 14 e 26 semanas de seguimento.

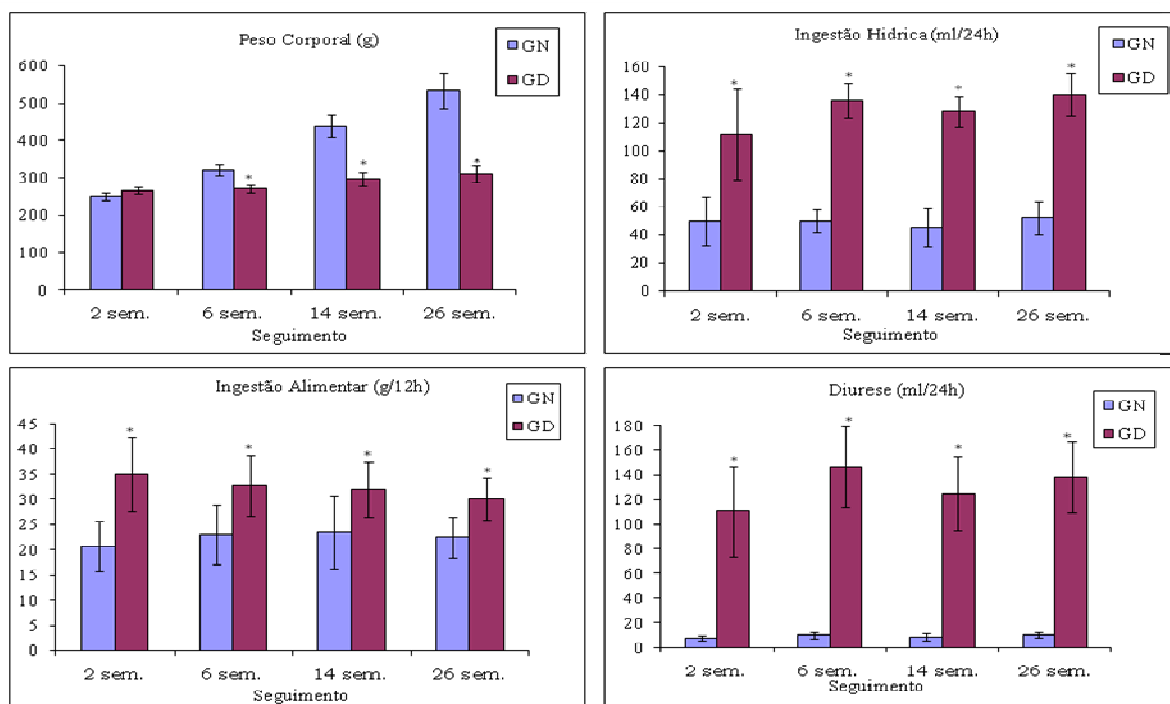


Figura 4 – Evolução do peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese em ratos controles não-diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, durante os períodos de avaliação do experimento.

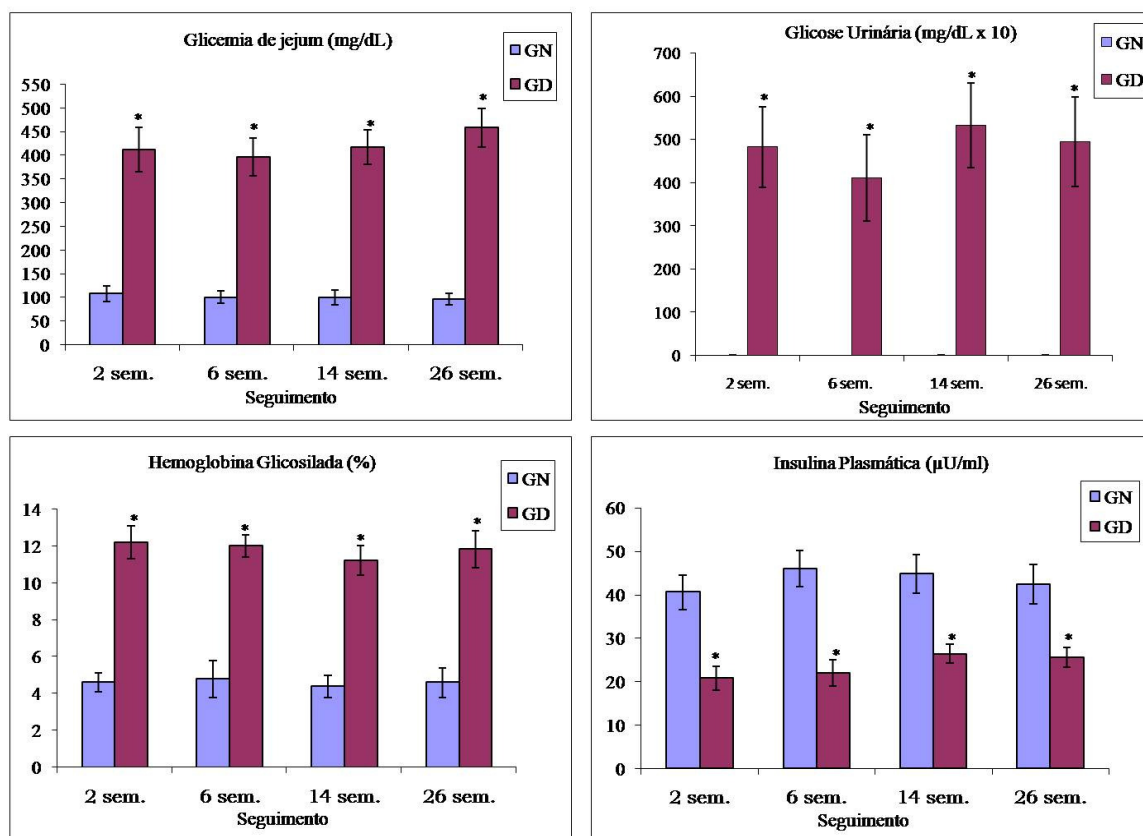


Figura 5 - Evolução da glicose sanguínea de jejum, glicose urinária, hemoglobina glicosilada e insulina plasmática em ratos controles não-diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, durante os períodos de avaliação do experimento.

Testes da função hepática e análise dos lipídios sanguíneos

Os testes da função hepática e o perfil dos lipídios sanguíneos observados em ratos dos grupos GN e GD, ao longo do seguimento, estão apresentados nas Tabs. 1 e 2. Observou-se que os níveis sanguíneos de AST e ALT foram significativamente elevados em ratos do GD, nas dosagens efetuadas com 2 semanas de seguimento, quando comparados aqueles observados em animais do GN ($P < 0,001$). Entretanto, já a partir da 6ª semana de seguimento diabético os níveis da AST foram normais até o final do experimento, em contraste aos valores da ALT que permaneceram sempre elevados nas dosagens efetuadas com 6, 14 e 26 semanas de seguimento. Por outro lado, nenhuma diferença estatisticamente significativa, entre ratos controles e diabéticos, foi observada nos valores dos demais testes da função hepática, bem como nas dosagens de colesterol total, triglicérides e lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL; LDL), durante todo o experimento.

Tabela 1 – Medianas, valores máximos e mínimos de parâmetros relacionados à função hepática de ratos controles não-diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, durante os vários períodos de seguimento experimental.

		Parâmetros				
Grupos	Seguimento	Bilirrubinas (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	F. Alcalina (U/L)	γ-GT (U/L)
GN	2 sem.	0,42 (0,32-0,76)	30 (20-32)	36 (34-50)	68 (60-105)	84 (52-96)
GD		0,56 (0,38-0,80)	96* (35-115)	87* (42-108)	76 (66-102)	70 (58-105)
P valor		0,6870	<0,001	<0,001	0,3860	0,4254
GN	6 sem.	0,50 (0,30-0,80)	26,5 (18-36)	41,0 (35-52)	79,5 (65-102)	70,5 (46-112)
GD		0,54 (0,38-0,75)	29,0 (18-36)	92,0* (37-96)	85,0 (67-110)	80,5 (56-108)
P valor		0,9705	0,6305	<0,001	0,4813	0,3930
GN	14 sem.	0,60 (0,55-0,74)	26,5 (22-30)	39,0 (28-50)	55,0 (48-72)	31,0 (22-45)
GD		0,70 (0,56-0,80)	28,5 (26-32)	80,0* (66-97)	64,5 (50-80)	39,0 (32-50)
P valor		0,3429	0,3229	<0,001	0,3362	0,2702
GN	26 sem.	0,39 (0,28-0,52)	42,0 (38-50)	43,0 (26-55)	55,0 (36-80)	40,5 (22-54)
GD		0,44 (0,30-0,60)	51,5 (40-56)	78,5* (72-92)	67,5 (55-90)	53,0 (38-70)
P valor		0,4857	0,2000	<0,001	0,3429	0,2000

GN – grupo controle não-diabético; GD – grupo diabético hiperglicêmico; AST – aspartato amino transferase; ALT – aspartato alanina transferase; F.alcalina – fosfatase alcalina; γ - GT – gama glutamil transferase.

* GN < GD com 2, 6, 14 e 26 semanas de seguimento (teste de Mann-Whitney)

Tabela 2 – Medianas, valores máximos e mínimos de parâmetros relacionados ao perfil lipídêmico de ratos controles não-diabéticos e ratos diabéticos hiperglicêmicos, durante os vários períodos de seguimento experimental.

Grupos	Seguimento	Parâmetros			
		Colesterol total	HDL colesterol	LDL colesterol	Triglicérides
		(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
GN	2 sem.	176,0 (152-206)	48,0 (45-58)	22,0 (15-28)	118,0 (98-135)
GD		180,5 (160-210)	46,0 (40-48)	25,0 (18-32)	125,0 (106-146)
P valor		0,3864	0,6236	0,3240	0,4412
GN	6 sem.	186,5 (178-202)	54,5 (45-60)	17,5 (13-26)	122,5 (104-132)
GD		188,5 (180-197)	50,5 (47-60)	18,5 (16-26)	127,0 (110-140)
P valor		0,6842	0,7394	0,4359	0,4813
GN	14 sem.	189,0 (186-200)	55,5 (48-60)	18,0 (16-20)	121,0 (119-140)
GD		192,5 (182-204)	53,0 (49-58)	20,0 (18-24)	127,5 (118-132)
P valor		0,8857	0,6857	0,2000	0,8857
GN	26 sem.	191,0 (188-195)	52,5 (46-60)	18,5 (16-22)	133,0 (125-142)
GD		199,0 (186-215)	47,0 (42-50)	23,0 (19-24)	135,0 (122-152)
P valor		0,3429	0,2000	0,1143	0,8857

GN – grupo controle não-diabético; GD – grupo diabético hiperglicêmico
 GN = GD com 2, 6, 14 e 26 semanas de seguimento (teste de Mann-Whitney)

Peso fresco do fígado e relação do peso fresco do fígado/peso corporal

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o peso fresco do fígado de animais controles não-diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, ao longo de todo o experimento. Porém, considerada a relação entre o peso fresco do fígado e o peso corporal, observou-se que o peso fresco do fígado de ratos diabéticos foi significativamente maior que o observado em ratos controles, com 14 e 26 semanas de seguimento ($P < 0,001$). A Tab. 3 demonstra estes achados.

Tabela 3 – Médias $\pm$ SD do peso fresco do fígado (g) e da relação entre o peso fresco do fígado e o peso corporal de ratos controles não–diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, nos vários períodos de seguimento experimental.

Parâmetros e Seguimento						
Grupos	Peso fresco (g)			Relação peso fresco / peso corporal		
	6 sem.	14 sem.	26 sem.	6 sem.	14 sem.	26 sem.
GN	11,1420	12,3300	12,3320	0,0445	0,0277	0,0243
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,6050	1,0080	2,1700	0,0036	0,0041	0,0034
GD	10,8990	9,5560	11,5040	0,0463	0,0555*	0,0595*
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1,0430	1,0430	0,5772	0,0041	0,0128	0,0104
P (valor)	0,1076	0,0865	0,3075	0,3064	<0,0001	<0,0001

GN – grupo controle, não diabético; GD – grupo diabético hiperglicêmico

* GN < GD com 14 e 26 semanas de seguimento (teste “t” Student)

Análise morfológica do fígado à MO

Os achados morfológicos do fígado de animais controles não-diabéticos, sacrificados com 6, 14 e 26 semanas de seguimento mostraram parênquima hepático com estrutura geral preservada, com lóbulos hepáticos constituídos por hepatócitos normais, circundados por sinusóides contendo células de Kupffer e hemáceas na luz capilar, distribuídos radialmente em direção às veias centrolobulares,. Os espaços porta também se apresentavam normais, não

tendo sido visualizado infiltrado inflamatório, degeneração gordurosa ou distribuição anormal dos fibroblastos e do colágeno em ratos sacrificados com 6 e 14 semanas de seguimento. Somente discreta degeneração gordurosa focal microvesicular foi observada no fígado de animais controles, não-diabéticos, sacrificados com 26 semanas de seguimento, sem qualquer outra anormalidade.

Por outro lado, animais diabéticos hiperglicêmicos apresentaram alterações morfológicas hepáticas que tiveram estreita relação com o tempo de seguimento diabético, caracterizadas por parênquima hepático constituído por hepatócitos contendo vacúolos gordurosos focais ou generalizados, de aspecto micro ou macrovesicular, associados à presença de dilatação dos sinusóides e perda progressiva da estrutura geral do órgão. Alterações inflamatórias, compatíveis com esteatohepatite, representadas por infiltrado inflamatório mononuclear, de moderada intensidade, foram observadas nos espaços interlobulares e peri-portais, em 40% dos cortes histológicos analisados do fígado de animais sacrificados com 26 semanas de seguimento diabético. Fibrose hepática, de leve intensidade, circundando os vasos portais, também foi observada em 20% dos cortes histológicos analisados pelo *red* picrosirius nos animais deste subgrupo. As Figs. numeradas de 6 a 8 ilustram os achados morfológicos encontrados nos dois grupos experimentais.

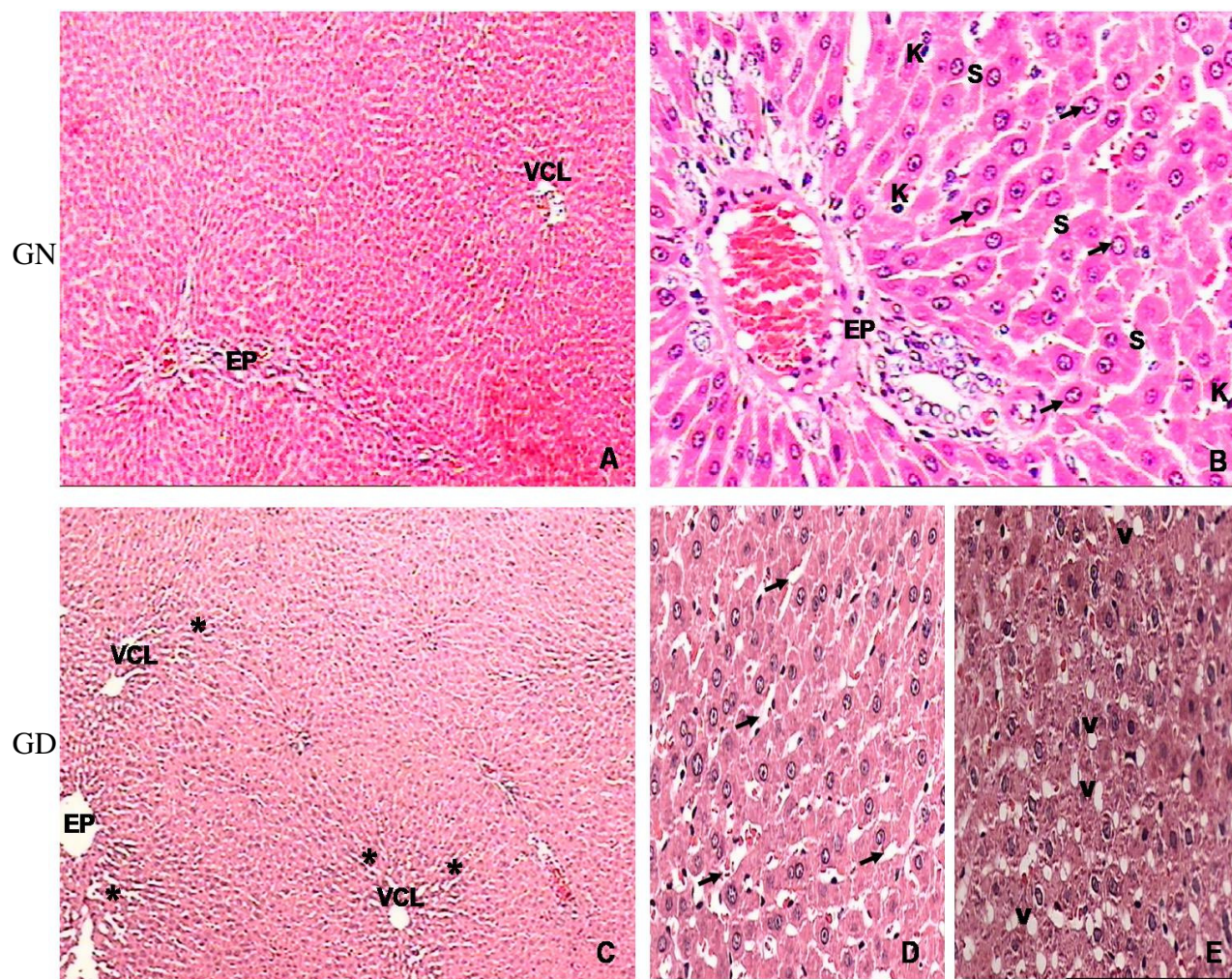


Figura 6 - Aspecto histológico do fígado de ratos controles e diabéticos hiperglicêmicos, sacrificados com 6 semanas de seguimento, onde se observa em: A/ B – visão geral do fígado de rato controle não-diabético, mostrando parênquima hepático homogêneo, espaço porta (ep) e veia centrolobular (VCL). No detalhe, os hepatócitos com seus núcleos (setas), sinusóides (S), células de Kupffer (K) e espaço porta (EP) preservados; C/D/E – fígado de rato diabético mostrando alargamento dos sinusóides hepáticos (*), dispostos radialmente em direção à veia centro lobular (VCL), que ao maior aumento revelam dilatação (setas) e a formação de degeneração gordurosa microvesicular, de leve intensidade (v) - HE – 40X/400X

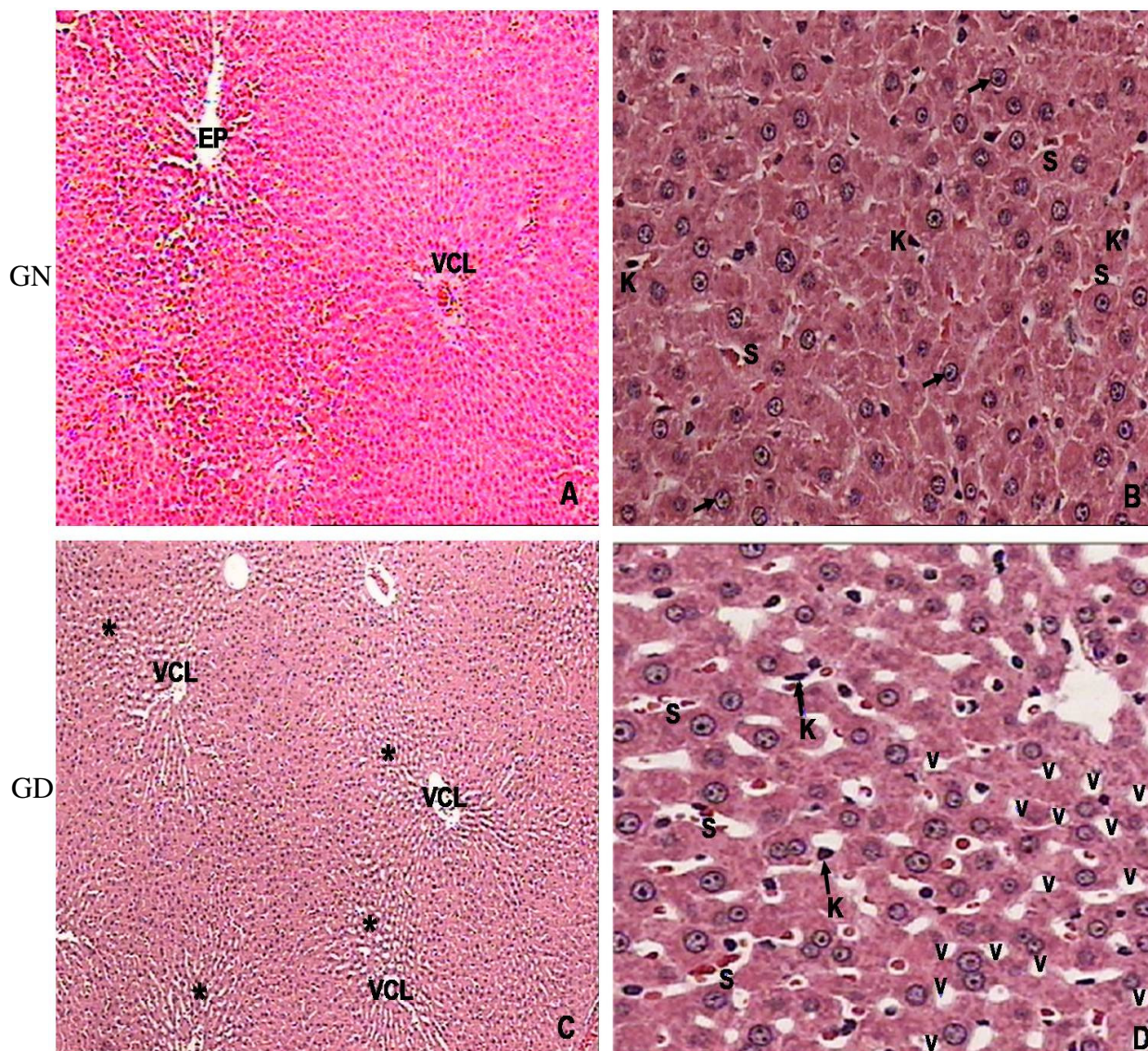


Figura 7 - Aspecto histológico do fígado de ratos controles e diabéticos hiperglicêmicos, sacrificados com 14 semanas de seguimento, onde se observa em: A/B – visão geral do fígado de rato controle não-diabético, com espaço porta (EP), veia centrolobular (VCL) e hepatócitos normais; no detalhe, os hepatócitos com seus núcleos (setas), formando trabéculas organizadas radialmente, as quais são circundadas por sinusóides (S) contendo células de Kupffer (K) e hemáceas no interior da luz capilar; C/D – fígado de animal diabético mostrando hepatócitos com áreas focais de degeneração gordurosa (*), de moderada intensidade, adjacentes às veias centrolobulares (VCL), em meio às áreas de parênquima hepático relativamente preservado. Ao maior aumento nota-se dilatação sinusoidal (S), com células de Kupffer (K) e a presença de degeneração gordurosa microvesicular (v), de moderada intensidade - HE – 40X/400X.

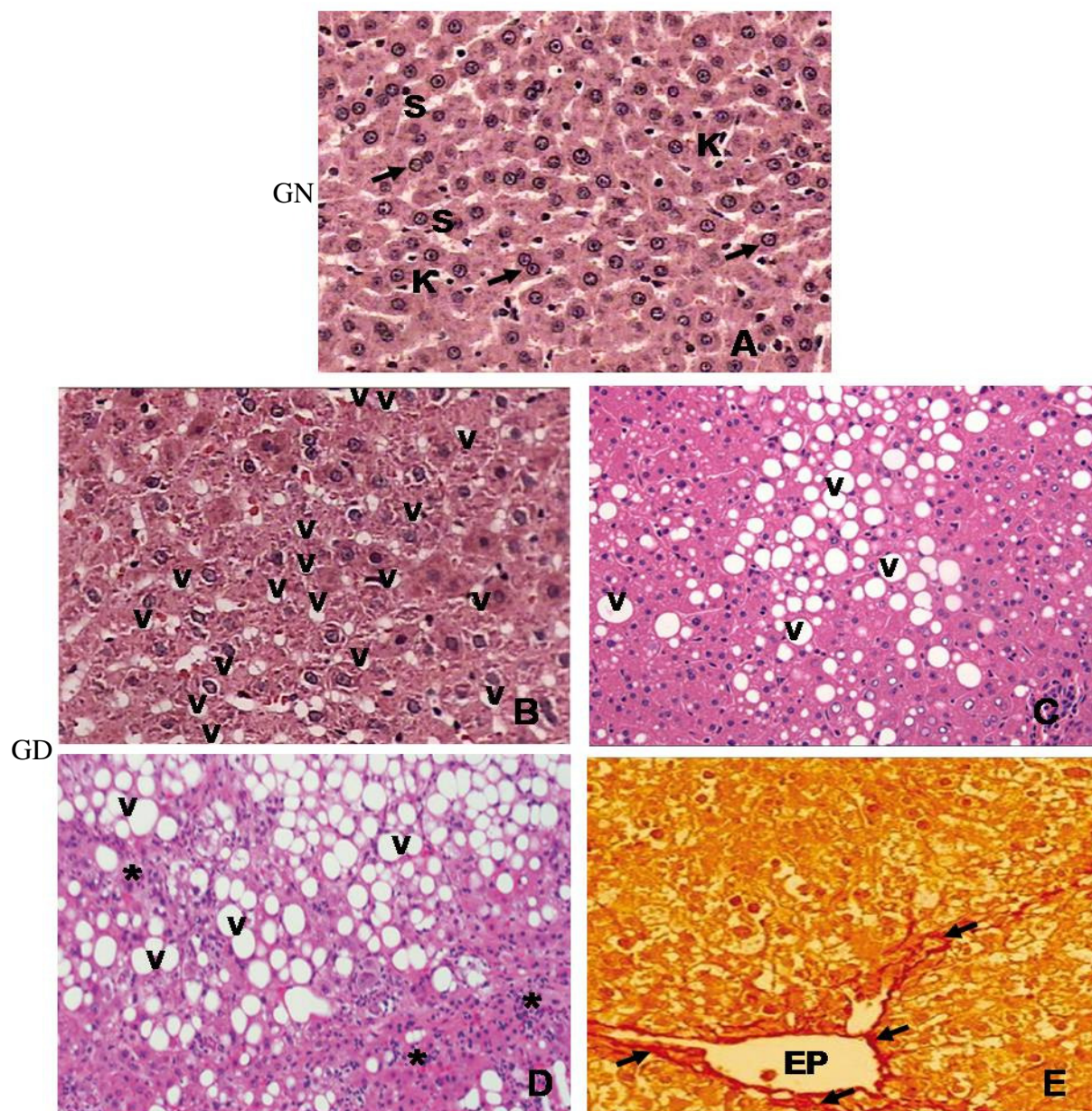


Figura 8 - Aspecto histológico do fígado de ratos controles e diabéticos hiperglicêmicos, sacrificados com 26 semanas de seguimento, onde se observa em: A – hepatócitos de rato controle não-diabético, com seus núcleos (setas) dispostos ao redor dos lóbulos hepáticos, formando placas celulares, as quais são circundadas por sinusóides (S) contendo células de Kupffer (K); B – hepatócitos de rato diabético apresentando degeneração gordurosa microvesicular difusa (v), associada à dilatação capilar; C – hepatócitos de rato diabético com degeneração gordurosa macrovesicular difusa (v), de grave intensidade; D – fígado de rato diabético com processo inflamatório mononuclear interlobular, compatível com esteatohepatite (*), em permeio a hepatócitos com degeneração gordurosa macrovesicular difusa; E – fígado de rato diabético com fibrose peri-portal de intensidade leve, com perda da arquitetura geral do órgão (HE e *red picrosirius* – 400X).

Os achados ultraestruturais do fígado mostraram diferenças significantes entre animais controles não-diabéticos e diabéticos hiperglicêmicos, sendo a gravidade das lesões encontradas no GD estreitamente relacionada com o tempo de seguimento experimental. Hepatócitos de ratos diabéticos apresentaram progressiva desorganização da arquitetura estrutural, com aparente escassez do número de organelas intracitoplasmáticas, deposição de gordura e vacuolização do parênquima hepático, micro e macrovesicular, quando comparados com hepatócitos de ratos controles, onde apenas discreta degeneração gordurosa focal foi observada em animais sacrificados mais tardiamente, com 26 semanas de seguimento. Alterações degenerativas das mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso (RER) e núcleos também foram observadas em hepatócitos de ratos diabéticos, sacrificados com 26 semanas de seguimento, caracterizadas por mitocôndrias edemaciadas e aparente diminuição do número de cristas mitocondriais e cisternas do RER; foi observado, também, condensação da heterocromatina nuclear. As Figs.enumeradas de 9 a 12 ilustram os achados ultraestruturais encontrados.

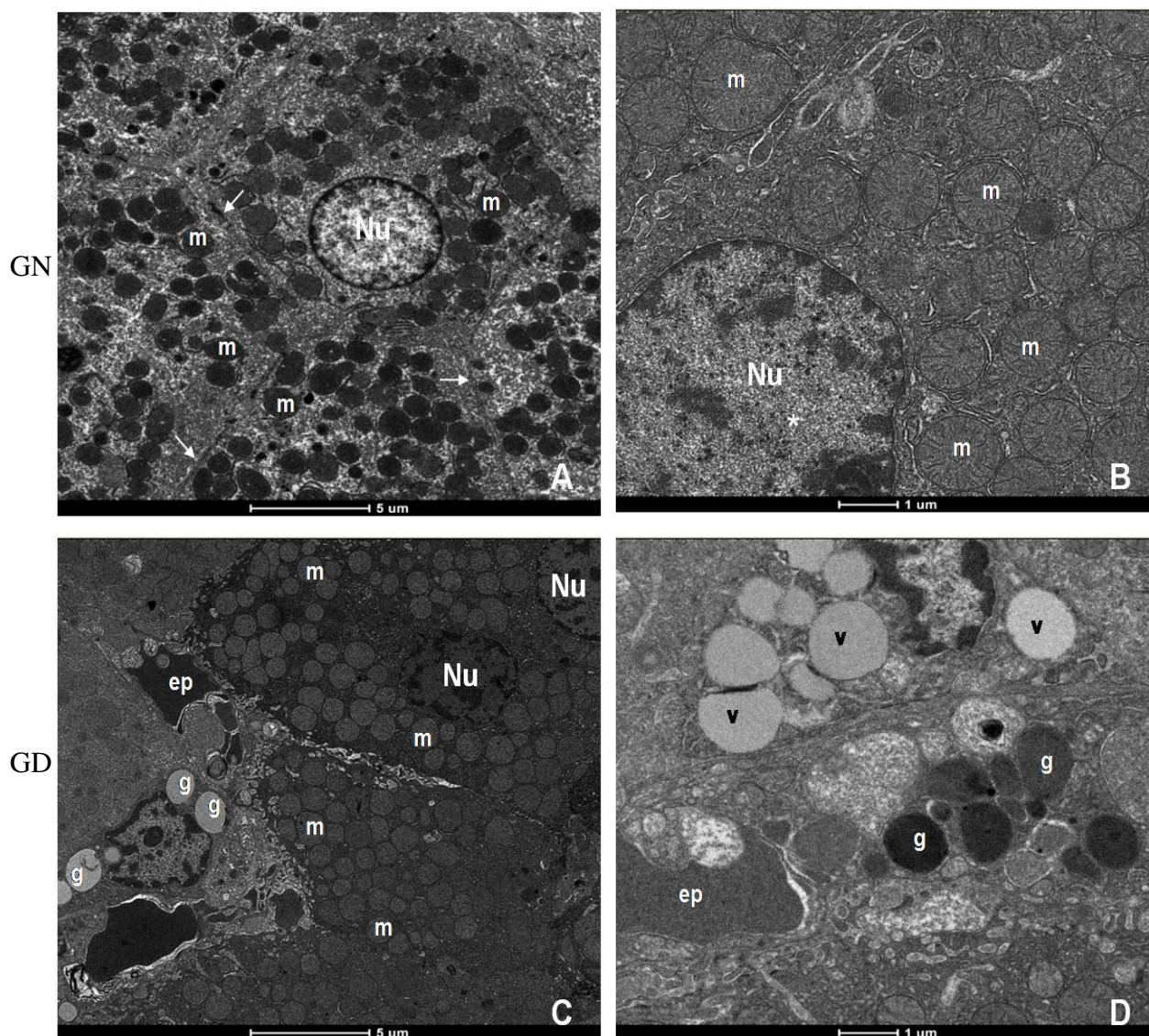


Figura 9 – Ultraestrutura das células hepáticas de ratos controles e diabéticos hiperglicêmicos, sacrificados com 6 semanas de seguimento, onde se observa em: A – visão geral de hepatócitos íntegros, de forma poliédrica, separados pelos espaços de Disse (setas), em rato controle do GN. Note o núcleo celular (Nu) e o citoplasma repleto de mitocôndrias (m), sem qualquer evidência de alterações (Bar: 5μm, 1900x); B – detalhe de hepatócito de rato do GN mostrando o núcleo (Nu) rico em eucromatina (*) e as mitocôndrias (m) (Bar: 1 μm, 4800x); C – visão geral de hepatócito de rato do GD mostrando perda parcial da organização da arquitetura ultraestrutural da célula, com início do acúmulo de gordura no citoplasma (g). Nu – núcleo; ep – espaço porta; m – mitocôndrias (Bar: 5μm, 1900x); D – detalhe de hepatócito de rato do GD mostrando gotículas de gordura (g) e vacuolização do citoplasma celular (v), onde a gordura foi removida durante o processo de preparação dos cortes para a microscopia eletrônica. ep – espaço porta (Bar: 1 μm, 4800x).

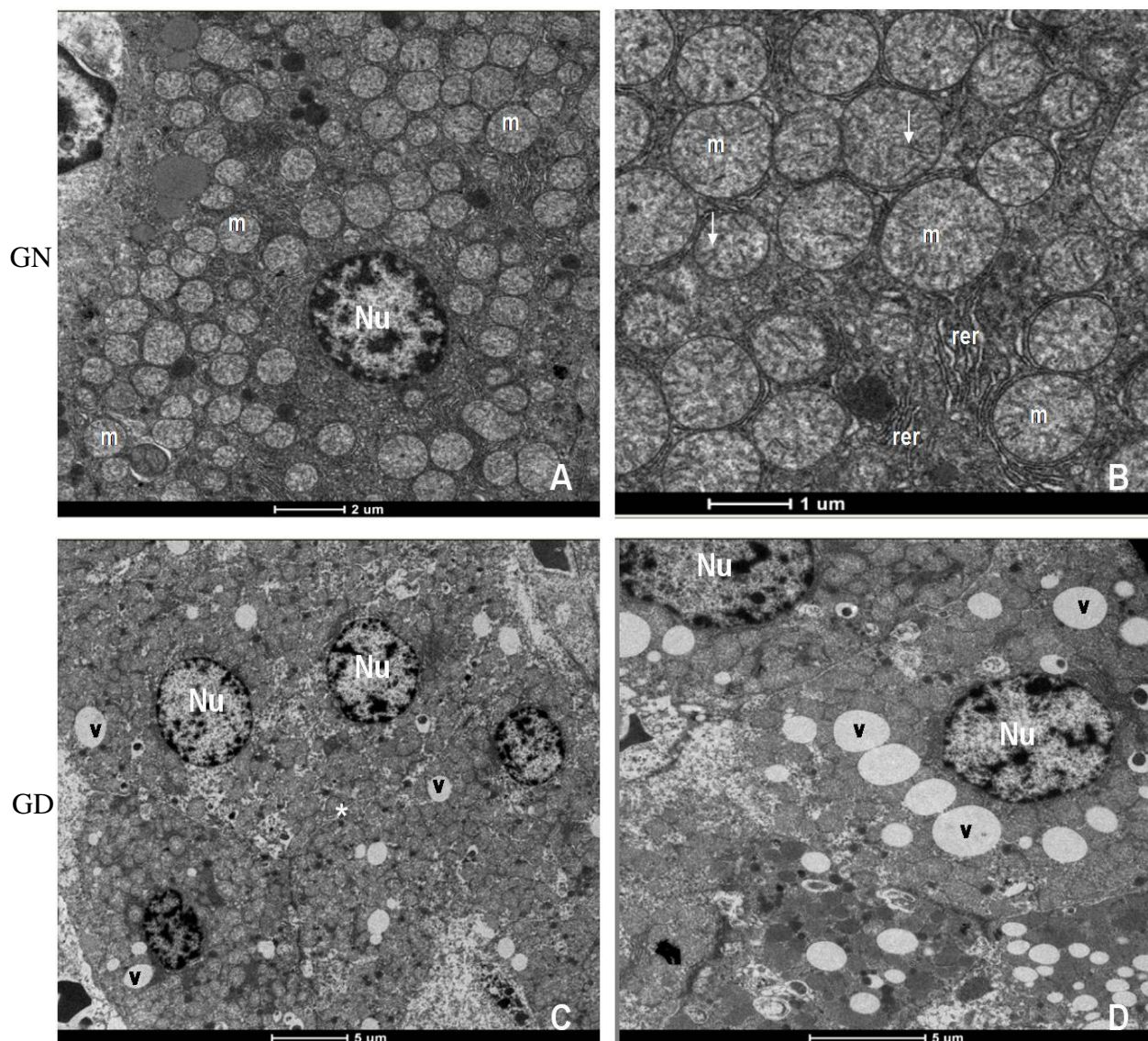


Figura 10 - Ultraestrutura das células hepáticas de ratos controles e diabéticos hiperglicêmicos, sacrificados com 14 semanas de seguimento, onde se observa em: A/B – detalhe das mitocôndrias íntegras de rato controle do GN, com inúmeras cristas mitocondriais (setas). Nu – núcleo; m – mitocôndrias; rer – retículo endoplasmático rugoso (A – Bar: 2 µm, 2900x; B – Bar: 1 µm, 4800x); C/D - visão geral de hepatócito de rato do GD mostrando desaparecimento dos espaços de Disse, com perda da organização da arquitetura ultraestrutural da célula (*) e visualização de poucas organelas no citoplasma. Note o agravamento do processo de degeneração gordurosa macro e microvesicular das células hepáticas (v). Nu – núcleo (Bar: 5µm, 1900x);

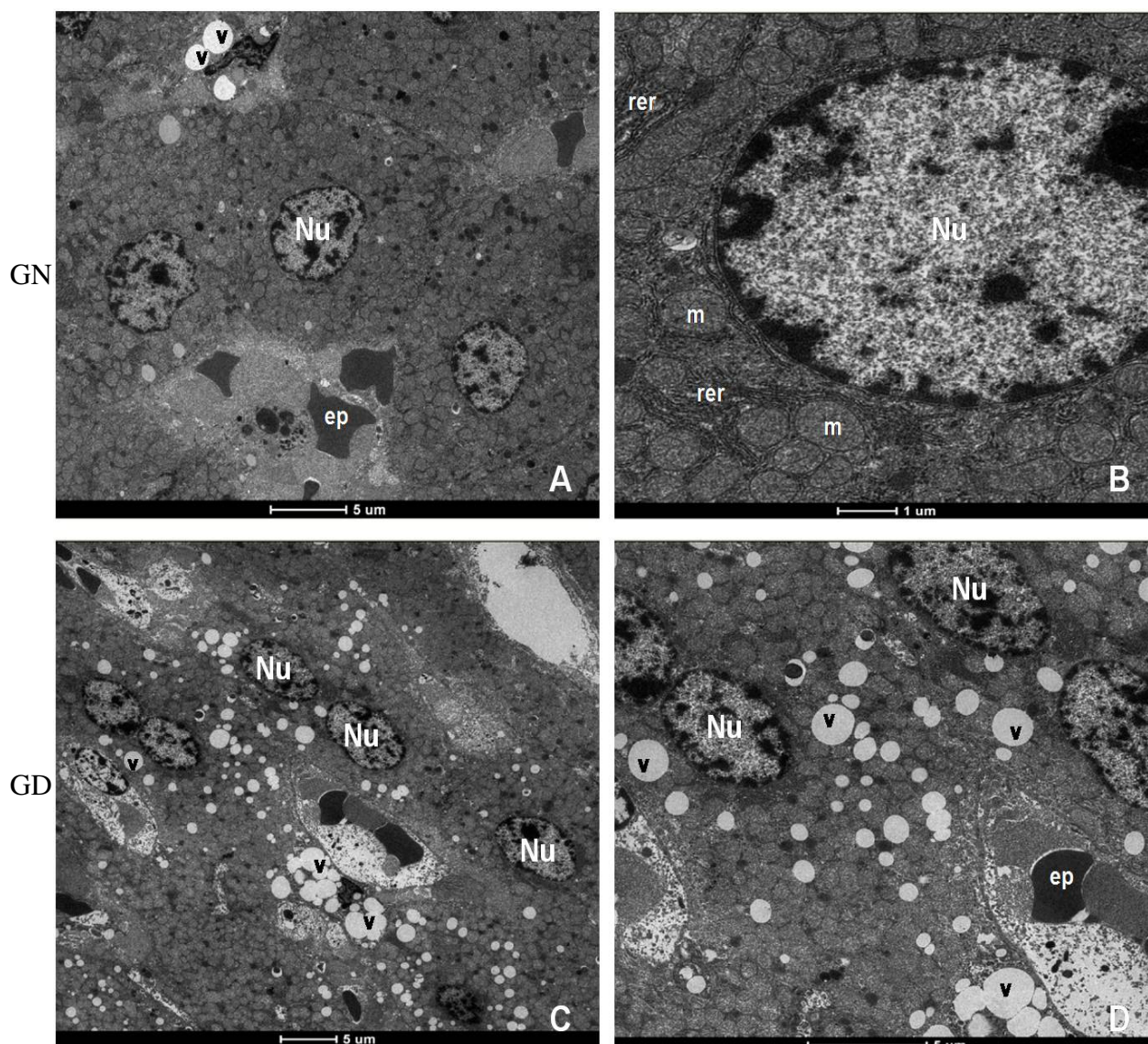


Figura 11 - Ultraestrutura das células hepáticas de ratos controles e diabéticos hiperglicêmicos, sacrificados com 26 semanas de seguimento, onde se observa em: A/B – visão geral de hepatócito de rato do GN mostrando alguns focos de degeneração gordurosa microvesicular (v). Note no detalhe a preservação da ultraestrutura celular, com núcleo (Nu), mitocôndrias (m), retículo endoplasmático rugoso (rer) e espaço porta (ep) íntegros (A – Bar: 5 μ m, 1200x; B – Bar: 1 μ m, 4800x); C/D - visão geral de hepatócito de rato do GD mostrando completa desorganização da arquitetura ultraestrutural da célula, com perda de organelas intracitoplasmáticas. Note no detalhe, a degeneração gordurosa macro e microvesicular difusa (v) das células hepáticas (v). Nu – núcleo, ep – espaço porta (A - Bar: 5 μ m, 1200x; B: 5 μ m, 2900x).

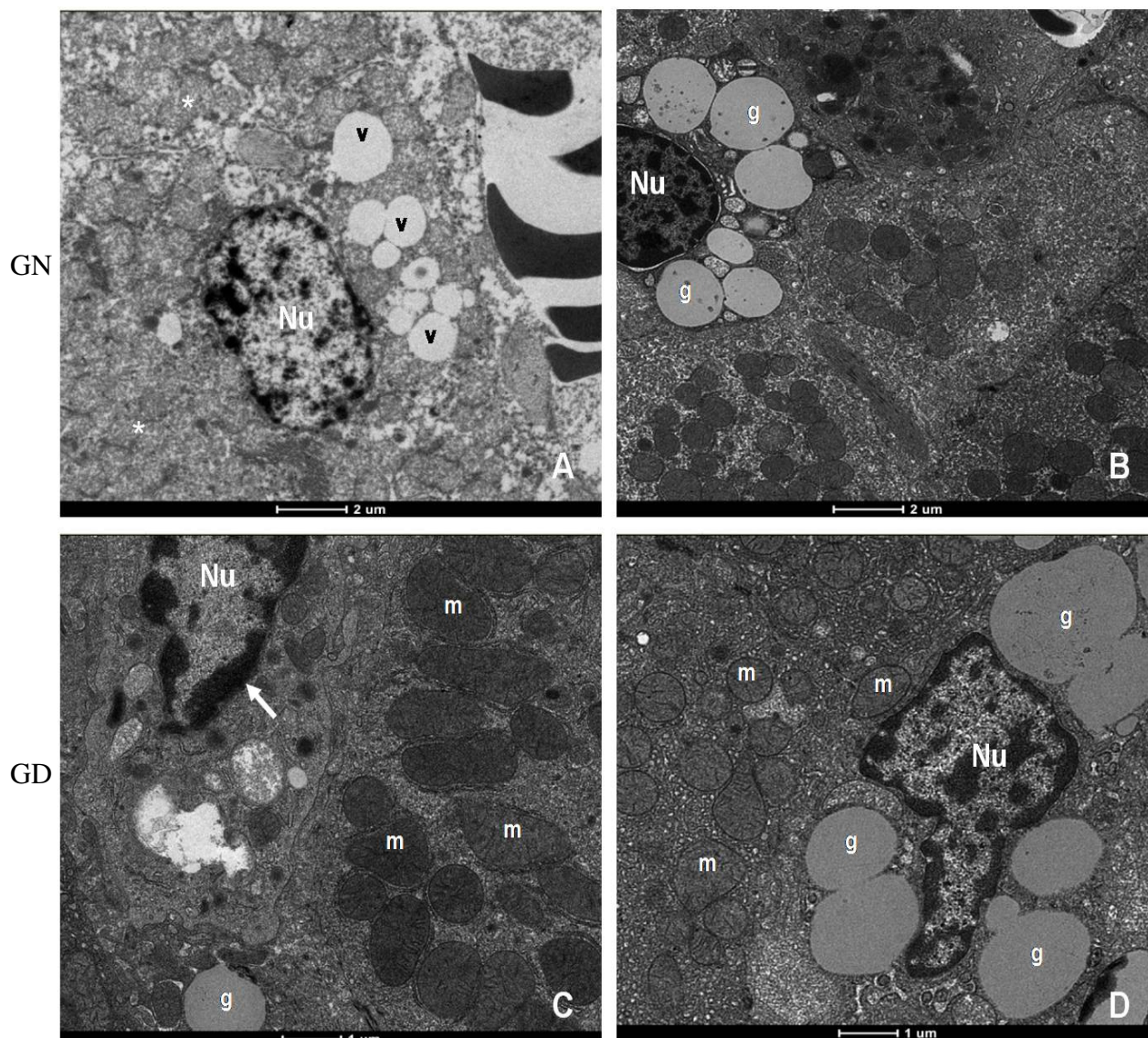


Figura 12 - Ultraestrutura das células hepáticas de rato diabético hiperglicêmico, sacrificado com 26 semanas de seguimento, onde se observa em: A/B – intensa desorganização da ultraestrutura celular (*), visualização de poucas mitocôndrias (m), a maioria degeneradas, desaparecimento do retículo endoplasmático rugoso e a presença de gotículas de gordura (g) e vacúolos (v) – Bar: 2 μ m, 2900x; C/D – detalhe de mitocôndrias edemaciadas (m), com escassas cristas mitocondriais. Note a condensação da heterocromatina nuclear (seta) e o acúmulo de macrogotículas de gordura (g) - Bar: 1 μ m, 4800x.

DISCUSSÃO

Evidências clínicas e experimentais sugerem que o fígado, a exemplo dos vasos, rins, retina e nervos, também pode ser afetado pelo diabetes mellitus (DM)¹⁴⁻¹⁷. Todavia, o reconhecimento do DM como causa primária de hepatopatia crônica ainda tem sido negligenciado na prática médica, em virtude da grande variedade de condições clínicas, metabólicas e hormonais que podem levar à DHGNA, como a obesidade, a má nutrição, a má absorção intestinal, a dislipidemia, as tireopatias e a síndrome metabólica¹⁸.

Neste estudo demonstramos que ratos com diabetes mellitus do tipo 1 (DM1), induzido pela administração endovenosa de aloxana (ALX), apresentam alterações bioquímicas no sangue e também lesões morfológicas e ultraestruturais no fígado que, em grande parte, se assemelham às aquelas descritas na hepatopatia diabética crônica observada no homem, indo desde a degeneração gordurosa das células hepáticas e a esteatohepatite, até a fibrose periportal.

Caracteristicamente, as lesões observadas no fígado dos animais diabéticos deste estudo atingiram universalmente todas as estruturas do órgão, incluindo tanto os espaços porta e os sinusóides, como também os hepatócitos, os núcleos e as organelas intracitoplasmáticas, incluindo, progressivamente, o alargamento dos sinusóides, a degeneração gordurosa micro- e macrovesicular, a esteatohepatite e a fibrose periportal, além das alterações ultraestruturais dos hepatócitos, particularmente as mitocôndrias, o retículo endoplasmático rugoso (RER) e os núcleos celulares.

É questionável, no entanto, se as alterações histopatológicas observadas no fígado de animais diabéticos induzidos pela ALX são devidas à ação tóxica desta droga ou ao estado diabético que ela provoca. É amplamente conhecido, porém, que tanto a ALX, como a estreptozotocina (STZ), têm um efeito tóxico sobre as células beta-pancreáticas, causando DM1, que se estende sobre os rins e o fígado de animais de várias espécies^{19,20}. A toxicidade sistêmica destas drogas, porém, está estreitamente relacionada à espécie, idade e peso do animal utilizado e, também, ao estado de hidratação, via de administração, velocidade de infusão e ao tempo de jejum observado para a administração dos fármacos²¹.

É conhecido que a ação tóxica sistêmica da ALX e da STZ comumente é observada nas primeiras 2 semanas após a indução do diabetes e que, particularmente, a ALX, ela exibe uma estreita margem de segurança entre a dose diabetogênica e a letal, onde as mortes habitualmente ocorrem em decorrência de cetoacidose diabética e/ou insuficiência renal ou hepática²¹. Este fato destaca a importância de se realizar observações experimentais do fígado

após as fases agudas ou subagudas da ação da ALX, pois após estes períodos é possível identificar com mais clareza a causa real das alterações observadas.

Goel (1977) ²² estudando peixes diabéticos induzidos pela ALX, nas primeiras 100h após a administração da droga, observou necrose submaciça do fígado destes animais, tendo postulado que a droga alteraria as vias regulares do metabolismo celular, incluindo a inativação de certas enzimas, levando ao dano hepático e à morte. Este achado tem sido descrito por alguns autores, porém, ele não foi observado no fígado dos animais deste estudo demonstrando, possivelmente, que a necrose hepática focal ou difusa, quando presente, somente pode ser vista em animais cujo sacrifício ou óbito ocorrem precocemente. Kume et al (1994) ⁸ também relataram alterações morfológicas agudas no fígado de camundongos tratados com STZ, incluindo hipertrofia dos hepatócitos, aumento do número de grânulos acidófilos intracitoplasmáticos e hiperplasia de ductos biliares, achados também não observados no fígado dos animais do presente estudo. Os resultados de Goel (1977) ²² e Kume et al (1994) ⁸ sugerem, no entanto, que as alterações morfológicas hepáticas, observadas nas fases precoces do tratamento com ALX ou STZ, podem estar muito mais relacionadas à ação tóxica destas drogas do que aos efeitos do DM.

Voss et al (1988) ²³ mostraram que a STZ tem efeito danoso sobre o fígado de ratos, mesmo quando o estado hiperglicêmico não foi instalado, revelado pelo aumento significativo dos níveis sanguíneos de aspartato alanina aminotransferase (ALT). Os autores observaram, no entanto, que este efeito foi de curta duração (10 dias), e que somente em animais que desenvolveram hiperglicemia, os níveis desta enzima permaneceram elevados após 30 dias da indução do diabetes. Este achado também foi observado nos animais diabéticos aloxânicos deste estudo, onde os níveis sanguíneos de aspartato aminotransferase (AST) e ALT estiveram elevados nas primeiras 2 semanas do tratamento, mas somente a ALT permaneceu significativamente elevada nas dosagens efetuadas com 6, 14 e 26 semanas após a indução do DM. Em contraste, porém, aos dados descritos por alguns autores ^{8,9} não observamos alterações significantes nos demais testes da função hepática, incluindo as enzimas de excreção, o colesterol, os triglicérides e as lipoproteínas de alta e baixa densidade, durante todos os momentos de avaliação do experimento.

Kozyritskii & Minchenko (1978) ⁴ também observaram alterações ultraestruturais importantes em hepatócitos de ratos diabéticos induzidos pela ALX, acompanhados por um período de 12 semanas, demonstradas pelo aumento do tamanho das mitocôndrias, redução do desenvolvimento do RER e escassa proliferação dos elementos do retículo endoplasmático liso. Surpreendentemente, porém, todas as alterações ultraestruturais observadas no fígado destes animais foram revertidas com a administração de insulina e a restauração dos níveis

normais de glicose sanguínea. Este achado demonstrou que a despeito de um efeito tóxico inicial da ALX, as lesões hepáticas observadas em ratos, principalmente após a 2ª semana de diabetes, estão muito mais relacionadas à deficiência de insulina e ao estado hiperglicêmico, do que propriamente aos efeitos tóxicos desta droga sobre o fígado. Estudos publicados posteriormente têm comprovado esta hipótese ao demonstrar que o controle eficaz dos níveis anormais de glicose sanguínea em animais diabéticos é capaz de aliviar e/ou restaurar o padrão histológico normal do fígado ^{9,11-13,24}.

Curiosamente, porém, algumas lesões hepáticas determinadas pela ação tóxica da ALX ou STZ, nas fases agudas e subagudas do tratamento, também podem ser observadas nas fases crônicas de indução do diabetes, sugerindo que as mesmas tanto podem resultar dos efeitos isolados destes agentes químicos ou da hiperglicemia crônica, como também da ação combinada destes fatores. Laguens et al (1980)⁷ já alertavam para este fato ao observar que dilatação de cisternas e degranulação da superfície do RER, edema de mitocôndrias e perda de cristas mitocondriais foram observados em hepatócitos de camundongos C3H-s, 21 dias após o tratamento com STZ, tanto em animais que desenvolveram, como naqueles que não desenvolveram diabetes. Por outro lado, Mahmoud & Al-Salahy (2004)⁹ demonstraram que a hiperglicemia exerce papel de crucial importância na gênese das lesões hepáticas ao induzir alargamento dos sinusóides, dilatação das cisternas e perda de ribossomos do RER, tanto em hepatócitos de peixes tratados com doses repetidas de glicose, como naqueles que receberam exclusivamente ALX. Analogamente, estes autores também mostraram que a normalização dos níveis glicêmicos, utilizando uma suspensão aquosa de sementes de lupina, foi capaz de restaurar a maioria das lesões histológicas e ultraestruturais observadas no fígado destes animais.

É interessante salientar, porém, que a gravidade das lesões histopatológicas observadas no fígado dos animais do presente estudo guardou estreita relação com o tempo de seguimento diabético, sendo tanto mais graves quanto maior o tempo de seguimento experimental, especialmente em animais diabéticos com 26 semanas de diabetes, sem qualquer controle do estado hiperglicêmico. Alargamento dos sinusóides hepáticos e degeneração gordurosa focal microvesicular, com vacuolização das células hepáticas já foram observadas a partir da 6ª semana de diabetes. Estas lesões iniciais progressivamente se estenderam ao restante do parênquima hepático, na 14ª semana, para comprometer toda a extensão do órgão, na 26ª semana de diabetes, onde o fígado caracteristicamente apresentou degeneração gordurosa macrovesicular difusa, por vezes acompanhada de infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (esteatohepatite) e fibrose periportal de leve intensidade. Estas duas últimas alterações, no entanto, somente foram encontradas em animais sacrificados

tardiamente, com 26 semanas de diabetes, sugerindo que a evolução da degeneração gordurosa do fígado para esteatohepatite e fibrose é dependente da exposição crônica das células hepáticas às elevadas concentrações de glicose sanguínea. Por outro lado, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular não foram observados no cortes histológicos do fígado dos animais deste estudo, em qualquer momento de sacrifício, sendo sugestivo afirmar, porém, que lesões desta natureza poderiam eventualmente ser observadas em estudos com maior tempo de seguimento.

Comprometimento ultraestrutural progressivo também foi visto no fígado dos animais diabéticos do presente estudo, caracterizado por desorganização da ultraestrutura das células hepáticas, perda de organelas intracitoplasmáticas, degeneração gordurosa macro- e microvesicular e alterações qualitativas específicas das organelas intracitoplasmáticas e núcleos, caracterizadas por escassez do desenvolvimento do RER, edema de mitocôndrias, aparente rarefação das cristas mitocôndrias e distribuição anormal dos grânulos de heterocromatina.

Achados análogos também foram descritos por Welt et al (2004)⁵ ao realizar análises morfológicas e morfométricas do tecido hepático de ratos Wistar, expostos aos efeitos do diabetes experimental induzido pela STZ ou submetidos à hipóxia aguda, durante um período de 16 semanas, quando observaram aumento do tamanho dos hepatócitos e dos seus núcleos, diminuição da relação núcleo/citoplasma e do conteúdo de glicogênio hepático, com deficiência do número de cisternas do RER, além da presença de numerosos vacúolos de gordura nas células hepáticas (“Ito cells”) e aumento da densidade dos colágenos tipos I, III e VI ao redor dos vasos portais e no interior dos espaços de Disse, denotando fibrose hepática. Estudo prévio realizado por Doi et al (1997)²⁵ também apontavam que os núcleos das células hepáticas também são atingidos pelo DM, ao observar que além do aumento da área dos hepatócitos, muitas vezes eles se apresentavam binucleados, com heterogeneidade na forma, tamanho e na distribuição dos grânulos de cromatina nuclear.

Guven et al (2006)¹² estudando os efeitos protetores da melatonina sobre as lesões do fígado de ratos diabéticos induzidos pela STZ, durante um período de 4 semanas, também observaram congestão dos sinusóides e degeneração hidrópica, necrose focal e infiltração gordurosa microvesicular dos hepatócitos, associados à inflamação periportal moderada, acúmulo de substância homogênea na cromatina nuclear, diminuição do número de organelas intracitoplasmáticas e degeneração mitocondrial. Estes autores, no entanto, não observaram degeneração gordurosa macrovesicular e fibrose hepática evidenciando, muito possivelmente, o caráter crônico destas alterações. Resultados similares também foram observados por Adewole & Ojewole (2007)¹³ quando estudavam os efeitos do extrato aquoso de ervas do

gênero *artrocarpus communis* sobre a glicemia e as alterações bioquímicas, morfológicas e ultraestruturais do fígado de ratos diabéticos induzidos pela STZ, como o mesmo tempo de seguimento experimental. Em contraste, Remédio et al (2011)⁶ estudando o benefício do exercício físico sobre a morfologia do fígado de ratos com DM1, induzido pela ALX, por um período de 8 semanas, observaram remarcado aumento do número de mitocôndrias nas células hepáticas de animais diabéticos, quando comparado com animais controles, ambos sedentários, sem qualquer evidência de alterações ultraestruturais relevantes nestas organelas.

É consenso afirmar, portanto, que o fígado, a exemplo dos outros órgãos, também é afetado pelo DM no longo prazo. Entretanto, diferentemente do DM2, onde as vias de agressão hepática são relativamente bem conhecidas, pouco se sabe sobre a fisiopatologia da doença crônica do fígado em portadores de DM1.

É amplamente conhecido que o estresse oxidativo celular (EO) tem importante papel na gênese e evolução das lesões diabéticas crônicas sobre os vasos, rins, retina e nervos, e muito possivelmente, também, sobre o fígado de homens e animais diabéticos^{14,26-28}. Segundo Méndez-Sánchez et al (2004)²⁹, a persistência de um estado diabético e de estresse crônico das células hepáticas parece ser um dos fatores preditivos mais importantes para o desenvolvimento de cirrose em pacientes diabéticos com degeneração gordurosa do fígado de etiologia não-alcoólica (DGFNA), particularmente nos obesos. Para Haque & Sanyal (2002)³⁰ o aumento da oxidação de ácido graxos livres (AGL) pelo fígado pode gerar espécies reativas do oxigênio (EROs), as quais podem induzir aos processos de peroxidação lipídica, alterações estruturais e funcionais das células e a morte celular. Em condições fisiológicas as defesas antioxidantes do organismo conseguem neutralizar os efeitos nocivos destas substancias. Em condições patológicas, porém, como no diabetes, o equilíbrio metabólico é rompido, iniciando-se o estresse oxidativo. A manutenção do estresse oxidativo ao nível hepático desencadeia respostas de adaptação do fígado ao estresse crônico, que incluem a ativação e/ou inibição de vários sítios moleculares responsáveis pela transdução e transcrição de sinais que comandam o ciclo biológico celular³¹. As alterações do ciclo biológico celular, por sua vez, acabam por comprometer a capacidade de replicação e regeneração hepática, levando a apoptose ou morte celular. Por outro lado, o excesso de AGL no fígado pode isoladamente levar a apoptose dos hepatócitos, sendo considerado, por isto, um dos mecanismos de injúria celular comumente descrito em pacientes com DGFNA³².

Estudo prévio realizado em nosso laboratório³³ já havia mostrado que o DM1 é capaz de alterar, no longo prazo, o balanço oxidativo do fígado de ratos diabéticos induzidos pela ALX, caracterizado pelo aumento significativo de EROs no tecido hepático e marcada redução das defesas antioxidantes. É sugestivo afirmar, portanto, que as alterações das

enzimas hepáticas no sangue (AST e ALT) e as lesões morfológicas e ultraestruturais encontradas no fígado dos animais deste estudo podem estar intimamente correlacionadas ao estresse crônico causado pelo DM nas células hepáticas.

Todavia, permanecem obscuras as vias moleculares pelas quais o estresse crônico induz lesões histopatológicas no fígado em portadores de DM1, onde os mecanismos de hiperinsulinemia e resistência hepática e periférica à ação da insulina não são usualmente os mecanismos preponderantes.

Para Regnell & Lernmark (2011)¹⁶ três mecanismos podem estar envolvidos, isolada ou combinadamente, na patogênese da DGFNA em portadores de DM1: 1- taxas atípicas de lipoproteínas ou o mal funcionamento das mesmas levariam à alterações na secreção de triglicérides pelas células hepáticas, levando ao acúmulo de gordura no fígado; 2 – ativação de fatores de transcrição do metabolismo hepático pela hiperglicemia, tais como: o fator regulador das ligações protéicas elementares do esterol (SREBPs) e o fator de resposta às ligações protéicas elementares dos carboidratos (ChREBP) promoveriam a lipogênese hepática; 3- excesso de glicose transportada pelo GLUT2 (fator hiperregulador do transporte de glicose) levariam à síntese intrahepática de gordura.

Diversas alterações quantitativas e qualitativas das lipoproteínas são observadas em pacientes com DM1, mesmo naqueles com bom controle metabólico, incluindo: aumentada proporção de colesterol, triglicérides, lipoproteínas de baixa e muito baixa densidades (LDL e VLDL), além de alterações na composição das camadas periféricas de lipoproteínas, na glicação de apolipoproteínas, na oxidação de LDL e na quantidade de partículas densas pequenas³⁴. Estas últimas alterações, segundo este autor, seriam capazes de alterar a função destas substâncias e conduzir à DGFNA. Todavia, nem todas as alterações do metabolismo das lipoproteínas poderiam ser completamente explicadas pela hiperglicemia, sendo postulado que um estado de hiperinsulinemia periférica, provocado pela constante administração de insulina subcutânea nos portadores de DM1, teria também importante papel na gênese destas alterações e no conseqüente acúmulo de gordura no fígado³⁴. Contrariamente, é possível afirmar que talvez a DGFNA não seja uma conseqüência, mas sim um fator contributivo para o desenvolvimento das anormalidades lipoprotéicas observadas nestes pacientes³⁵. No presente estudo, porém, não observamos quaisquer anormalidades no metabolismo das lipoproteínas, em qualquer período de seguimento diabético, sob regime de sustentada hiperglicemia.

Os SREBPS são fatores de transcrição de sinais que ativam diretamente a expressão de mais de 30 genes ligados à síntese e liberação do colesterol, ácidos graxos, triglicérides e fosfolípidos³⁶. Estudos *in vitro* têm demonstrado que elevadas concentrações de glicose no

sangue tem capacidade de aumentar as concentrações de SREPB-1c - uma forma precursora dos SREBPS - no retículo endoplasmático. O SREPB1-c, por sua vez, em ação conjunta como o ChREBP, aumentam a expressão de genes lipogênicos derivados da piruvato quinase (LPK), como também das enzimas acetil-CoA-carboxilase (ACC) e ácido graxo sintetase (FAS)³⁷. A LPK catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato, a principal fonte de ACC, predominantemente utilizada na síntese dos ácidos graxos³⁸, e a FAS, a conversão de malonil-CoA em ácidos graxos de cadeia longa³⁹. De acordo com Yamashita et al (2001)⁴⁰ o ChREBP pode estimular a transcrição dos genes responsáveis pela ativação da LPK em resposta à hiperglicemia mesmo sem a participação da insulina. Por esta razão, o ChREBP tem sido apontado com um fator contributivo muito importante para o acúmulo de gordura no fígado em pacientes com DM1⁴¹.

O último mecanismo envolvido na gênese da DGFNA é mediado pelo GLUT 2 e regulado pelo SREBP1-c. O GLUT2 é um facilitador do transporte de glicose para as células-alvo, primariamente encontrada no fígado, rins, intestino e nas células β -pancreáticas⁴². Em ratos, a expressão do GLUT2 hepático é estimulada pela hiperglicemia e hipoinsulinemia⁴³. Assim, na vigência de um estado diabético grande quantidade de glicose é transportada para o fígado, gerando um estoque adicional deste carboidrato nos hepatócitos, que rapidamente é desviado para a síntese de ácidos graxos, os quais são exportados para o sangue na forma de lipoproteínas e/ou armazenados no parênquima hepático, na forma de triglicérides, originando a esteatose.

Regnell & Lernmark (2011)¹⁶ enfatizam, ainda, que em hepatócitos de roedores, a insulina exerce importante papel na gênese da esteatose, haja vista modular o fluxo de ácidos graxos livres transportados pelas vias protéicas mediadas pelas FATPs 2 e 5 (vias protéicas transportadoras de ácidos graxos), cujas ações são dose- dependentes e bimodais, mediadas pelo substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2) em regime de baixas concentrações de insulina e pelo IRS-1 nos estados de hiperinsulinemia, indicando que um ótimo equilíbrio no níveis de insulina circulantes é necessário para a regulação do metabolismo das gorduras no fígado. Assim, desvios deste equilíbrio, pela falta de produção de insulina (DM1) ou o excesso deste hormônio na corrente sanguínea, devido à elevada resistência periférica à ação da insulina (DM2) ou administração inadequada de insulina exógena, levam ao acúmulo de gordura no fígado⁴⁴.

A questão que não foi completamente respondida, porém, é como a DGFNA evolui para a esteatohepatite, e mais tarde para a fibrose e/ou cirrose hepática nos portadores de DM1. É sugestivo afirmar, no entanto, que muitos mecanismos postulados para a gênese destas complicações em pacientes com DM2, também estejam presentes em pacientes com

DM1, mesmo porque, uma parcela significativa destes pacientes também pode ser obesa, sendo os mecanismos de resistência periférica à insulina e hiperinsulinemia endógena ou iatrogênica, também observados²⁹.

Para Portincasa et al (2005)¹⁸, o início e progressão da DGFNA para esteatohepatite e cirrose hepática envolvem dois pontos cruciais: o primeiro relacionado aos fatores de risco dos pacientes, como os defeitos genéticos e o estilo de vida; o segundo relacionado às alterações dos mecanismos moleculares intra-e extracelulares que levam ao dano hepático, incluindo a oxidação dos AGL, a formação de EROs, a peroxidação lipídica e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela inflamação, necrose e fibrose hepatocelular. Segundo Dowman et al (2010)⁴⁵ o acúmulo de triglicérides no fígado aumenta a suscetibilidade deste órgão à injúria mediada por citocinas/adipocitocinas inflamatórias ou pelo estresse oxidativo hepatocelular, favorecendo a evolução da DGFNA para esteatohepatite e/ou fibrose. Segundo estes pesquisadores, os AGL também são capazes de agir diretamente no fígado, promovendo a lesão hepática. Estes compostos tanto podem ser submetidos à β -oxidação, como serem esterificados com o glicerol para formar os triglicérides, que conduzem ao acúmulo de gordura no fígado. No interior deste órgão, os AGL também podem aumentar o estresse oxidativo hepático e/ou ativar diversas vias inflamatórias que contribuem para a progressão da DGFNA.

Roskams et al (2003)²⁸ postularam que em indivíduos saudáveis as células hepáticas mortas estimulam a replicação dos hepatócitos maduros, no sentido de reconstituir o tecido hepático lesado. No entanto, na presença de DGFNA, o estresse oxidativo hepático pode inibir a replicação dos hepatócitos maduros, resultando na expansão das células progenitoras hepáticas (células ovais), as quais podem se diferenciar em “hepatocyte-like cells”, mas que não são hepatócitos. O aumento da quantidade de células ovais e de “hepatocyte-like cells”, por sua vez, está fortemente correlacionado com a evolução da DGFNA para fibrose hepática, e também com a carcinogênese hepatocelular.

CONCLUSÕES

O DM induzido pela ALX provoca alterações bioquímicas no sangue, e lesões morfológicas e ultraestruturais no fígado do rato, que muito se assemelham às encontradas no fígado do homem, e que incluem desde a esteatose, esteatohepatite até a fibrose hepática.

A gravidade das lesões histopatológicas observadas no fígado guardou estreita relação com o tempo de seguimento diabético, sendo tanto mais graves quanto maior o tempo de

seguimento experimental, especialmente em animais diabéticos com 26 semanas de diabetes, sem qualquer controle do estado hiperglicêmico.

O modelo experimental de hepatopatia diabética crônica obtido pode servir de base para a realização de novas investigações, tendo-se o cuidado em correlacionar as lesões histológicas do fígado com a fase do experimento no qual elas foram observadas.

RESEARCH ARTICLE

Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in the Rat Liver that Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans

Amanda Natália Lucchesi¹, Lucas Langoni Cassettari², and César Tadeu Spadella³

¹BS, Graduate Program in General Basis of Surgery, Faculty of Medicine, São Paulo State University (UNESP), 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brazil, an.lucchesi@gmail.com

²PT, PhD, Faculty of Medicine, São Paulo State University (UNESP), 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brazil, lucascassettari@gmail.com

³MD, PhD, Full Professor of Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Medicine, São Paulo State University (UNESP), 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brazil, spadella@fmb.unesp.br

Correspondence should be addressed to César T. Spadella, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina, Campus UNESP, Distrito de Rubião Jr s/nº, CEP: 18618-970 Botucatu, SP, Brasil, telefone: +55(14) 3880-1441; e-mail: spadella@fmb.unesp.br

Abstract

Purpose: Evaluate long-term effects of alloxan-induced diabetes in rat liver. *Methods:* Male Wistar rats were randomly distributed into two groups: 30 non-diabetic control (NC) and 30 untreated diabetic (UD), further divided into three subgroups and sacrificed after 6, 14, and 26 weeks. Clinical and laboratory parameters were assessed, liver fresh weight and body weight ratio obtained and liver tissue analyzed by optical and transmission electron microscopy. *Results:* UD rats showed sustained hyperglycemia, high glycosylated hemoglobin rates and low plasma insulin levels. High serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were observed in UD rats after 2 weeks, but only ALT remained elevated until the end of experiment. Liver fresh weight did not differ from NC rats, but liver fresh weight and body weight ratio was significantly higher in UD after 14 and 26 weeks. UD rats showed liver morphological changes characterized for hepatic sinusoidal enlargement and micro- and macrovesicular hepatocyte fatty degeneration, with progressive liver structure loss, steatohepatitis and periportal fibrosis. Ultrastructural changes of hepatocytes such as decrease in the number of intracytoplasmic organelles and degeneration of mitochondria, rough endoplasmic reticulum (rER) and nuclei were also observed as early as six weeks of diabetes. *Conclusion:* Alloxan diabetes induced liver morphological and ultrastructural changes that closely resemble human disease, ranging from steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis. Our study reproduced a suitable experimental model of chronic liver disease useful as the basis for further investigations

Introduction

Association between type 2 diabetes mellitus (T2DM) and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), a term used to describe a wide spectrum of liver disorders ranging from steatosis to cirrhosis, has long been recognized [1-3]. However, in contrast to the attention given to this entity to patients with T2DM, little is known about the evolution of liver injury in patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM).

On the other side, animal-models of T1DM chemically induced by alloxan (ALX) or streptozotocin (SZ) could provide valuable information about the natural history of NAFLD, helping to better understand the mechanisms responsible for this condition. Nonetheless, there are few long-term studies where liver injury has been well documented [4-6].

In addition, due to the short follow-up of animals, much of the published experimental researches on T1DM has limited reach to define clearly whether observed histopathological

liver injuries are the result of toxic effects of ALX or SZ or linked to diabetic hyperglycemic state that these drugs cause [7-13].

So, the aim of this investigation was to evaluate if T1DM is able to cause morphological and ultrastructural changes in the liver of diabetic rats induced by alloxan to allow characterize the effects of this drug and diabetes for a long period of follow-up. We hope that the findings can play a suitable experimental model of diabetic chronic liver disease.

Methods

Animals and Diabetes Induction.

Use of laboratory animals was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of our institution. Sixty male Wistar rats, with approximately 250g, were used in this experiment. During the study the rats were conditioned in polyurethane boxes, placed in air-conditioned environment at 25 ° C with controlled lighting and exhaust, daily receiving standard balanced chow for rodents and water *ad libitum*.

Diabetes was induced by alloxan (Sigma Co, USA) administered intravenously at a dose of 42mg/ kg of body weight using one of the tail veins. We only used animals with clinical signs of severe diabetes and fasting glucose ≥ 250 mg/dL in two successive determinations (1 and 2 weeks after diabetes induction). Diabetic animals that died in the post-induction period or at follow-up were replaced to avoid compromising the final number of rats in the sample.

Animals were randomly assigned into 2 experimental groups: NC – 30 non-diabetic control rats; UD – 30 diabetic rats without any treatment of hyperglycemia. Each group was further divided into 3 subgroups with 10 rats each to be sacrificed after 6, 14, and 26 weeks of follow-up or diabetes.

Analyzed Parameters.

After 2 weeks of follow-up or diabetes and in each time point of sacrifice, clinical (body weight, water intake, food intake, and diuresis) and laboratory (blood glucose, urine glucose, glycosylated hemoglobin, plasma insulin, bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, γ -glutamyl transferase, total cholesterol, triglycerides, and lipoproteins of high and low densities) parameters were analyzed. Clinical parameters were obtained using individual metabolic cages. The blood biochemical tests were determined by chemical dry system using Vitros (Johnson and Johnson, USA). Glycosylated hemoglobin was measured by electrophoresis with agarose gel (Sebia, France) and insulin by

radioimmunoassay (Diagnostic Products Corporation, USA). At sacrifice, the liver fresh weight and its relation with the body weight were obtained and liver tissue fragments were analyzed for optical and transmission electron microscopy.

Technical Procedures.

All invasive procedures on animals were performed under general anesthesia using ketamine (100 mg/kg of body weight) + xylazine (50 mg/kg of body weight), administered intramuscularly (Rhobifarma Ind. Farmacêutica Ltda, Brazil). Blood samples at follow-up were obtained by the tail vein section and at sacrifice by cardiac puncture, with chest open. After exsanguination the entire liver was removed, rinsed, and weighed on an analytical balance. For histological analysis, segments representing the entire organ were randomly taken from 15 rats in each experimental group (5 animals per subgroup of sacrifice) and cut, prefixed in buffered 10% formalin, and then processed up paraffin blocks, sectioned at 3-5 μm . Two liver tissue blocks were prepared from each rat; from each block 2 histological slides were stained with heamatoxylin and eosin (HE) and 1 slide with red picosirius. Thirty slides (each containing two sections of liver) were analyzed by subgroup of rats or 90 slides for each experimental group (60 HE; 30 red picosirius). All slides were examined by light microscopy, in a double-blind, by two different investigators who were unaware of the experimental group to which the livers belonged. All analyzes used the descriptive qualitative method and were supervised by an experienced pathologist. For ultrastructural analysis, small pieces of liver were prefixed in 2.5% glutaraldehyde, washed in cocodylate buffer solution and postfixed in 1% osmium tetroxide. Specimens were dehydrated using ascending grades of alcohols and embedded in epon-araldite mixture. The ultrathin sections stained with uranyl-acetate and lead citrate were examined under transmission electron microscope (Phillips – CM 100). For this analysis, the livers from 9 rats of each experimental group were randomly collected (3 per subgroup of sacrifice). A block of liver tissue was prepared from each rat; from this block 10 electron micrographs from hepatocytes were obtained, at magnification ranging between 1,200x and 4,800x. A total of 30 electron micrographs were examined per subgroup of rats or 90 per experimental group. All analyzes used the descriptive method and were supervised by an experienced biologist.

Statistical Analysis.

The study of the clinical and laboratory variables, as well as of the liver fresh weight and its relation with the body weight, according to the 2 experimental groups and the 4 time

points of evaluation or sacrifice, was conducted by means of 2 x 4 or 2 x 3 factorial analysis of variance, in a completely randomized design, complemented by the Tukey's multiple comparisons test for homogeneous or parametric variables or by Mann-Whitney nonparametric analysis for the variables showing results with a heterogeneous distribution. All the statistical discussions in the study were performed at the level of significance of 5% or $P < 0.05$.

Results

Clinical and Laboratory Findings.

Non-diabetic control rats (NC) showed clinical and laboratory parameters compatible with those observed in normal animals of the same strain in all evaluation periods of the experiment. In contrast, diabetic rats without any treatment of hyperglycemia (UD) progressed to severe loss of body weight and significant increase in water intake, food intake, and urine output when compared with NC ($P < 0.001$). The blood glucose, urine glucose, and glycosylated hemoglobin were persistently elevated in UD rats, with plasma insulin values being significantly lower (Figure 1). High serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were observed in UD rats after 2 weeks of diabetes. AST values, however, were restored to normal levels after 6 weeks, while ALT levels remained significantly elevated until the end of experiment. There were no significant differences in other liver function tests as well as the concentration of blood lipids and lipoproteins of high and low densities (HDL; LDL) all over the study (Tables 1 and 2).

Liver Fresh Weight and Liver Fresh Weight/Body Weight Ratio. Liver fresh weight did not differ between UD and NC rats in all time points of sacrifice, but, liver fresh weight/body weight *ratio* was significantly higher in UD rats after 14 and 26 wks (Table 3).

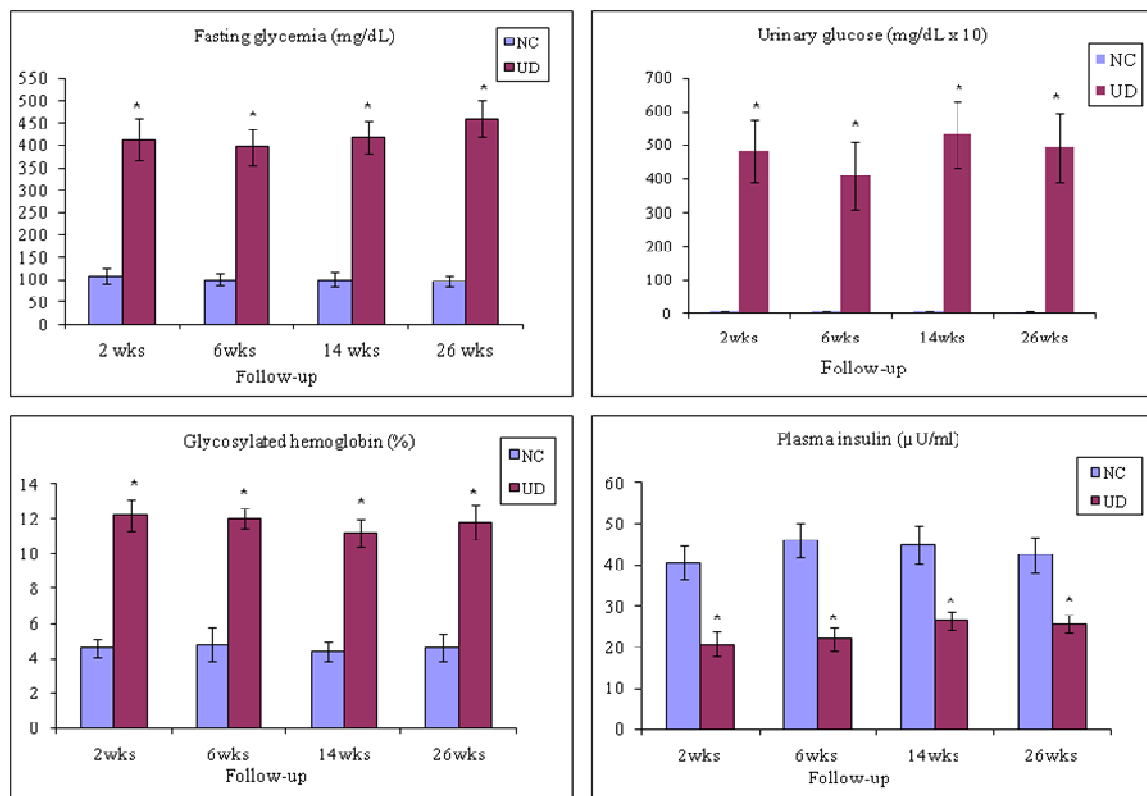


Figure 1- Means $\pm$ SD of fasting glycemia (A), urinary glucose (B), glycosylated hemoglobin (C) and plasma insulin (D) in animals from the two experimental groups during follow-up.

Table 1 - Medians, maximum and minimum values of parameters related to liver function of non-diabetic control and untreated diabetic rats during the various experimental follow-up periods.

Groups	Follow-up	Parameters				
		Bilirrubine (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	AlKalinePh (U/L)	γ -GT (U/L)
NC	2 wks	0.42 (0.32-0.76)	30 (20-32)	36 (34-50)	68 (60-105)	84 (52-96)
UD		0.56 (0.38-0.80)	96* (35-115)	87* (42-108)	76 (66-102)	70 (58-105)
P value		0.6870	<0.001	<0.001	0.3860	0.4254
NC	6 wks	0.50 (0.30-0.80)	26.5 (18-36)	41.0 (35-52)	79.5 (65-102)	70.5 (46-112)
UD		0.54 (0.38-0.75)	29.0 (18-36)	92.0* (37-96)	85.0 (67-110)	80.5 (56-108)
P value		0.9705	0.6305	<0.001	0.4813	0.3930
NC	14 wks	0.60 (0.55-0.74)	26.5 (22-30)	39.0 (28-50)	55.0 (48-72)	31.0 (22-45)
UD		0.70 (0.56-0.80)	28.5 (26-32)	80.0* (66-97)	64.5 (50-80)	39.0 (32-50)
P value		0.3429	0.3229	<0.001	0.3362	0.2702
NC	26 wks	0.39 (0.28-0.52)	42.0 (38-50)	43.0 (26-55)	55.0 (36-80)	40.5 (22-54)
UD		0.44 (0.30-0.60)	51.5 (40-56)	78.5* (72-92)	67.5 (55-90)	53.0 (38-70)
P value		0.4857	0.2000	<0.001	0.3429	0.2000

NC –non-diabetic control; UD – untreated diabetic; AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase; Alkaline Ph –alkaline phosphatase; γ - GT – gamma glutamil transferase.

*NC < UD at 2, 6, 14 and 26 weeks of follow-up (Mann-Whitney test)

Table 2 - Medians, maximum and minimum values of parameters related to lipids profile of non-diabetic control and untreated diabetic rats during the various experimental follow-up periods.

Groups	Follow-up	Parameters			
		Total cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	LDL cholesterol (mg/dL)	Tryglycerides (mg/dL)
NC	2 wks	176.0 (152-206)	48.0 (45-58)	22.0 (15-28)	118.0 (98-135)
UD		180.5 (160-210)	46.0 (40-48)	25.0 (18-32)	125.0 (106-146)
P value		0.3864	0.6236	0.3240	0.4412
NC	6 wks	186.5 (178-202)	54.5 (45-60)	17.5 (13-26)	122.5 (104-132)
UD		188.5 (180-197)	50.5 (47-60)	18.5 (16-26)	127.0 (110-140)
P value		0.6842	0.7394	0.4359	0.4813
NC	14 wks	189.0 (186-200)	55.5 (48-60)	18.0 (16-20)	121.0 (119-140)
UD		192.5 (182-204)	53.0 (49-58)	20.0 (18-24)	127.5 (118-132)
P value		0.8857	0.6857	0.2000	0.8857
NC	26 wks	191.0 (188-195)	52.5 (46-60)	18.5 (16-22)	133.0 (125-142)
UD		199.0 (186-215)	47.0 (42-50)	23.0 (19-24)	135.0 (122-152)
P value		0.3429	0.2000	0.1143	0.8857

NC –non-diabetic control; UD – untreated diabetic;
NC = UD at 2, 6, 14 and 26 weeks of follow-up (Mann-Whitney test)

Table 3 - Mean $\pm$ SD of fresh liver weight (g) and the fresh liver weight/body weight ratio of non-diabetic control and untreated diabetic rats during the various experimental follow-up periods

Parameters and Follow-up						
Groups	Fresh liver weight (g)			Fresh liver weight/body weight ratio		
	6 sem.	14 sem.	26 sem.	6 sem.	14 sem.	26 sem.
NC	11.1420	12.3300	12.3320	0.0445	0.0277	0.0243
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1.6050	1.0080	2.1700	0.0036	0.0041	0.0034
UD	10.8990	9.5560	11.5040	0.0463	0.0555*	0.0595*
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	1.0430	1.0430	0.5772	0.0041	0.0128	0.0104
P value	0.1076	0.0865	0.3075	0.3064	<0.0001	<0.0001

NC –non-diabetic control; UD – untreated diabetic;

* NC < UD at 14 and 26 weeks of follow-up (Student “t” test)

Morphological Findings by Light Microscopy.

NC rats showed liver parenchyma with general structure preserved, consisting of hepatic lobules with normal hepatocytes surrounded by sinusoids, distributed radially towards the centrilobular veins, containing Kupffer cells and red blood cells into the capillary lumen. The portal spaces were also normal not having been observed inflammatory infiltration, fatty degeneration or abnormal distribution of fibroblasts and collagen in rats sacrificed at 6 and 14 weeks of follow up. Only mild focal microvesicular fatty degeneration was observed in the liver of NC animals sacrificed at 26 weeks of follow up, with no other abnormalities. Unlike, UD rats presented morphological changes of the liver that had close temporal relationship with the diabetic follow-up, characterized by hepatocytes containing focal or generalized fatty vacuoles, with micro- or macrovesicular feature, associated with the presence of dilated sinusoids and progressive loss of general structure of the organ. Inflammatory changes consistent with steatohepatitis, represented by mononuclear inflammatory infiltrate of moderate intensity were observed in the interlobular and periportal spaces, in 40% of analyzed histological sections of the liver from animals sacrificed at 26 weeks of diabetic

follow-up. Hepatic fibrosis, mild, surrounding the portal vessels was also observed in 20% of liver histological sections analyzed by red picosirius in this subgroup of animals. Suggestive histological evidences of cirrhosis or hepatocellular carcinoma were not observed. Figure 2 illustrates the morphological findings of the two experimental groups.

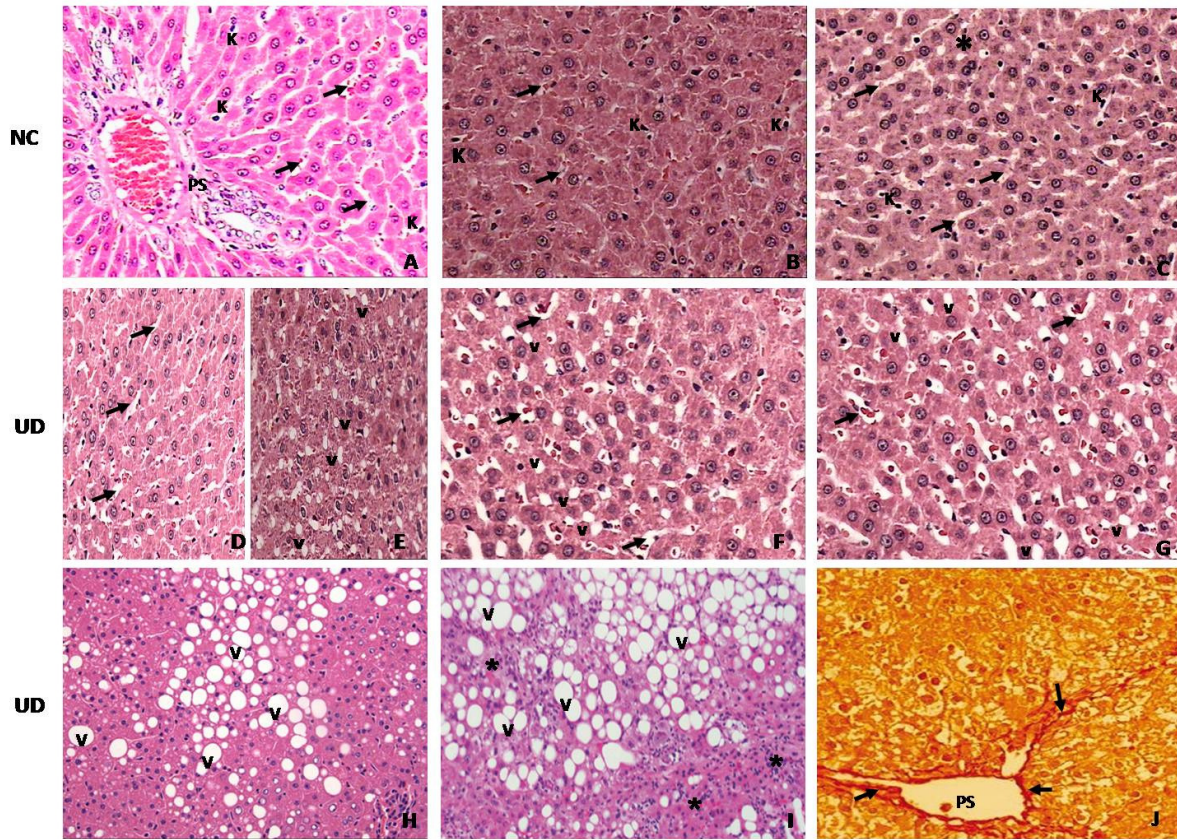


Figure 2 – A, B, and C: histological pattern of liver from nondiabetic control rats (NC) showing normal-appearing of hepatocytes, portal space (PS), sinusoids (arrows) and Kupffer cells (K) at 6, 14, and 26 weeks of follow-up, respectively. Note focal area of mild steatosis in control rats sacrificed at 26 weeks (*). D and E: liver from untreated diabetic rats (UD) sacrificed at 6 weeks showing the beginning of sinusoidal enlargement (arrows) and small amount of fatty vacuoles (v), respectively. F and G: liver from UD rats sacrificed at 14 and 26 weeks showing progressive worsening of sinusoidal enlargement (arrows) and liver fatty degeneration (v), respectively. Liver from UD rats at 26 weeks showing in: H - macrovesicular fatty degeneration (v); I – interlobular mononuclear inflammatory infiltrate consistent with steatohepatitis (*); J – periportal (PS) fibrosis (arrows). H&E and red picosirius (400 x).

Ultrastructural Findings by Transmission Electron Microscopy.

The ultrastructural findings of the liver showed significant differences between non-diabetic and diabetic animals. Likewise, the severity of the lesions found in UD rats was

closely related to the time of diabetic follow-up, being visibly more severe with 26 weeks. Hepatocytes from these animals showed progressive disruption of structural architecture, characterized for an apparent decrease in the number of intracytoplasmic organelles, associated to fat deposition and vacuolization of the liver, compatible to micro- and macrovesicular steatosis. Degenerative changes of mitochondria, rough endoplasmic reticulum (rER) and nuclei were also observed in hepatocytes from UD rats, sacrificed at 26 weeks of follow-up, characterized by swollen mitochondria and apparent decrease in the number of mitochondrial cristae and cisterns of the rER. Condensation of nuclear heterochromatin was also observed. Figures 3 illustrates the ultrastructural findings.

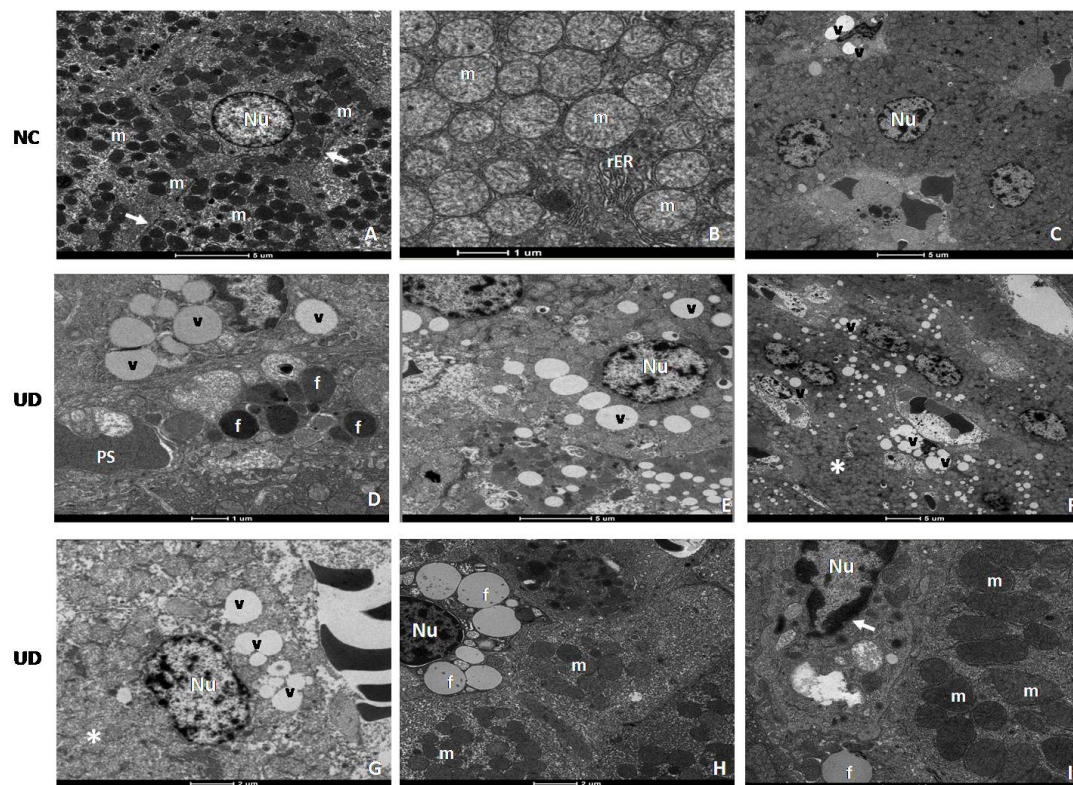


Figure 3 – Electron micrographs of nondiabetic control rats (NC) sacrificed at 6, 14 and 26 weeks, respectively, showing: A - normal-appearing of hepatocyte, nucleus (Nu), mitochondria (m) and Disse's space (arrows); B – Detail of mitochondria (m) and rough endoplasmic reticulum (rER) with their preserved structures; C – focal area of lipid vacuoles (v) in control rat sacrificed later (scale bars: A, C: 1,900x; B: 4,800x). D, E, and F: hepatocytes of untreated diabetic rats (UD) sacrificed at 6, 14, and 26 weeks, respectively, showing: D – hepatocyte showing moderate amount of lipid vacuoles (v) and hepatic lipid droplets (f); E - Worsening of liver fatty degeneration (v); F - poor organization of the organelles within the cytoplasm with disappearance of the Disse's space and rER (*) with diffuse liver fatty degeneration (v) (scale bars: D: 4,800x; E, F: 1,900x). G, H, and I: hepatocytes of UD rats sacrificed at 26 weeks showing: G - intense disorganization of cell ultrastructure (*); H - scarce amount of mitochondria (m) within the cytoplasm; I - mitochondria appear larger, less electron-dense

with less distinct cristae (m). Note the condensation of nuclear chromatin (arrow) (scale bars: G, H, I: 4,800x).

Discussion

Clinical and experimental evidences suggest that the liver, like the vessels, kidneys, retina and nerves, can also be affected by diabetes mellitus [14-17]. However, recognition of diabetes mellitus (DM) as the primary cause of chronic liver disease has yet been neglected in medical practice, because of the wide variety of clinical, metabolic and hormonal conditions that can lead to NAFLD, such as obesity, malnutrition, intestinal malabsorption, dyslipidemia, thyroid disorders and the metabolic syndrome [18].

This study demonstrated that rats with T1DM induced by intravenous administration of ALX presented biochemical changes in blood and also morphological and ultrastructural lesions in the liver, which largely resemble those described in chronic liver disease seen in humans, ranging from fatty degeneration of liver cells and steatohepatitis until periportal fibrosis.

Typically, the lesions observed in the liver of the diabetic animals in this study reached universally all structures of the organ, including both portal areas and sinusoids, as well as hepatocytes, nuclei, and intracytoplasmic organelles, including progressively enlargement of sinusoids, micro- and macrovesicular fatty degeneration, steatohepatitis and periportal fibrosis. Beside this, ultrastructural changes in the hepatocytes, particularly the mitochondria, the rough endoplasmic reticulum (rER) and cell nuclei were also observed.

It is doubtful, however, whether the histopathological changes observed in the liver of ALX-induced diabetic rats are due to the toxic action of the drug or the diabetic state that it causes. It is widely known that both ALX as streptozotocin (SZ) have a toxic effect on pancreatic beta cells, causing T1DM, which extends on the kidneys and the liver of animals of several species [19,20]. The systemic toxicity of these drugs, however, is closely related to species, age and body weight of the animal used and also to the hydration status, route of administration, infusion rate and duration of fasting observed for the administration of drugs [21].

It is known that systemic toxic action of ALX and STZ is commonly observed in the first 2 weeks after diabetes induction and, particularly, the ALX, it displays a narrow margin of safety between the diabetogenic and lethal dose, where the deaths commonly occur as a result of diabetic ketoacidosis and/or kidney or liver failure [21]. This fact highlights the importance of performing experimental observations of the liver after acute or subacute

phases of ALX action, because after these periods can be identified with more clearly the real cause of the observed changes.

Goel (1977) [22], studying ALX-induced diabetic fishs during the first 100h after administration of the drug observed submassive necrosis of the liver of these animals, having postulated that ALX alters the regular pathways of cellular metabolism, including the inactivation of certain enzymes, leading to liver damage and death. This finding has been described by some authors, however, it was not observed in the liver of animals in this study demonstrating possibly that the focal or diffuse hepatic necrosis, when present, it can be seen only in animals whose sacrifice or death occur early. Kume et al (1994) [8] also reported acute morphological changes in the liver of mice treated with SZ, including hypertrophy of hepatocytes, an increased number of intracytoplasmic granules acidophilus and bile duct hyperplasia, findings also not observed in the liver of the animals of this study. The results of these researchers suggest, however, that liver morphological alterations observed in the early stages of treatment with ALX or SZ may be more related to the toxic action of these drugs to the effects of DM.

Voss et al (1988) [23] showed that the SZ has harmful effect on the liver of rats, even when the hyperglycemic state was not installed, revealed by significant increase in blood levels of alanine aminotransferase (ALT). The authors noted, however, that this effect was short (10 days), and only in animals that developed hyperglycemia, this enzyme levels remained elevated 30 days after diabetes induction. This finding was also observed in alloxan-diabetic animals of this study where blood levels of aspartate aminotransferase (AST) and ALT were elevated in the first 2 weeks of treatment, but only ALT remained significantly elevated in measurements performed at 6, 14 and 26 weeks after diabetes induction. In contrast, however, to the data described by some authors [8, 9] we did not observe significant changes in other liver function tests, including liver enzymes of excretion, cholesterol, triglycerides, and lipoproteins of low and high densities, for all time points of the experiment.

Kozyritskii and Minchenko (1978) [4] also observed significant ultrastructural changes in hepatocytes of alloxan-induced diabetic rats accompanied by a 12-week period as demonstrated by the increase in mitochondrial size, reducing the development of the rough endoplasmic reticulum (rER) and little proliferation of smooth endoplasmic reticulum elements. Surprisingly, however, all the ultrastructural changes observed in the liver of these animals were reversed by the administration of insulin and the restoration of normal blood glucose levels. This finding demonstrated that despite an initial toxic effect of ALX, the hepatic lesions observed in rats, especially after the 2nd week of diabetes, are more related to insulin deficiency and the hyperglycemic state, than to the toxic effects of this drug on the

liver. Published studies have subsequently confirmed this hypothesis by demonstrating that effective control of abnormal blood glucose levels in diabetic animals is able to relieve and/or restore normal liver histological pattern [9, 11-13, 24].

Interestingly, however, some liver lesions determined by the toxic action of ALX or SZ in acute and subacute phases of treatment, may also be observed in chronic stages of diabetes induction, suggesting that they may both result from the separate effects of these chemicals or chronic hyperglycemia, as well as the combined action of these factors. Laguens et al (1980) [7] have already alerted to this fact by noting that dilation of cisterns and degranulation of rER surface, swelling of mitochondria and loss of mitochondrial cristae were observed in hepatocytes of C3H-s mice, 21 days after treatment with SZ, in both animals have developed, as those who did not develop diabetes. On the other hand, Al-Mahmoud and Salahy (2004) [9] demonstrated that hyperglycemia plays an important role in the genesis of liver injury by inducing enlargement of sinusoids, dilation of cisterns and loss of ribosomes of rER, both in hepatocytes of fish treated with repeated doses of glucose and in those who received only ALX. Likewise, these authors also showed that normalization of blood glucose levels, using an aqueous suspension of lupine seeds, was able to restore most of histological and ultrastructural lesions observed in the liver of these animals.

It is interesting to note, however, that the severity of the histopathological lesions observed in the liver of animals in this study kept a close relationship with time of diabetes, being so much severe the longer the experimental follow-up, especially in diabetic animals at 26 weeks of diabetes without any control of the hyperglycemic state. Enlargement of sinusoids and focal microvesicular fatty degeneration with vacuolization of liver cells have been observed as early as the 6th week of diabetes. These initial lesions gradually spread to the rest of the liver parenchyma in the 14th week, commit to the entire organ, in the 26th week of diabetes, where the liver characteristically showed diffuse macrovesicular fatty degeneration, sometimes accompanied by interstitial mononuclear inflammatory infiltrate (steatohepatitis) and mild periportal fibrosis. The latter two changes, however, were only found in animals sacrificed later, at 26 weeks of diabetes, suggesting that the evolution of liver fatty degeneration to steatohepatitis and fibrosis is dependent upon chronic exposure of the liver cells to high concentrations of blood glucose. Moreover, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma were not observed in histological sections of livers from this study at any time of sacrifice, being suggestive assert, however, that injuries of this nature could be observed in studies with longer follow-up.

Ultrastructural progressive impairment was also seen in the liver of the diabetic animals in this study, characterized by disorganization of the ultrastructure of liver cells, loss

of intracytoplasmic organelles, micro- and macrovesicular fatty degeneration and qualitative and specific changes of intracytoplasmic organelles and nuclei, characterized by lack of development of rER, swelling of mitochondria, the apparent decrease of mitochondrial crests and abnormal distribution of heterochromatin granules.

Similar findings were also described by Welt et al. (2004) [5] by performing morphological and morphometric analyzes of the liver tissue from Wistar rats exposed to the effects of experimental diabetes induced by SZ or submitted to acute hypoxia, over a period of 16 weeks, when observed increasing the size of hepatocytes and their nuclei, decreased nucleus/cytoplasm ratio and hepatic glycogen content, deficient number of rRER cisterns, and the presence of numerous fat vacuoles in liver cells ("Ito cells") with increased density of types I, III and VI collagens around the portal vessels and within the space of Disse, denoting hepatic fibrosis. Previous study by Doi et al. (1997) [25] also indicated that the nuclei of liver cells are also affected by DM, noting that besides the increased area of hepatocytes, they often were binucleates, with heterogeneity in form, size, and distribution of nuclear chromatin granules.

Guven et al. (2006) [12] while studying the protective effects of melatonin on liver injury of SZ-induced diabetic rats, over a period of 4 weeks, also observed congestion of sinusoids, hydropic degeneration, focal necrosis and microvesicular fatty infiltration of hepatocytes, associated with moderate periportal inflammation, accumulation of homogeneous substance in the nuclear chromatin, decreased number of intracytoplasmic organelles and mitochondrial degeneration. These authors, however, found no macrovesicular fatty degeneration and hepatic fibrosis showing, quite possibly, the chronic nature of these changes. Similar results were also observed by Adewole and Ojewole (2007) [13] while studying the effects of herbal aqueous extract of *artrocarpus communis* on blood glucose and biochemical, morphological and ultrastructural changes in the liver of SZ-induced diabetic rats, as the same time of experimental follow-up. In contrast, Remedio et al. (2011) [6] studying the benefit of exercise on the morphology of rat liver with T1DM induced by ALX, for a period of 8 weeks, observed remarkable increase in the number of mitochondria in the liver cells of diabetic animals compared to controls, both sedentary, with no evidence of significant ultrastructural changes in these organelles.

There is consensus, however, that the liver, like other organs, is also affected by the DM in the long-term. However, unlike the T2DM, where the pathways of liver injury are relatively well known, little is known about the pathophysiology of chronic liver disease in patients with T1DM.

It is widely known that the cellular oxidative stress (OS) plays an important role in the genesis and progression of chronic diabetic lesions on the vessels, kidneys, retina and nerves, and also, much possibly, on the liver of diabetic men and animals [14, 26 -28]. According to Méndez-Sánchez et al. (2004) [29], the persistence of a diabetic condition, and chronic stress in liver cells seems to be one of the most important predictor for the development of cirrhosis in diabetic patients with NAFLD, particularly in the obese. For Haque and Sanyal (2002) [30] increased oxidation of free fatty acid (FFA) by the liver can generate reactive oxygen species (ROS), which can induce the process of lipid peroxidation, causing structural and functional changes in the cells and cell death. Under physiological conditions the body's antioxidant defenses can neutralize the harmful effects of these substances. Under pathological conditions, however, such as in diabetes, the metabolic balance is broken, starting oxidative stress. The maintenance of hepatic oxidative stress triggers adaptation responses of the liver to chronic stress, which include activation and/or inhibition of several molecular sites responsible for transducing and transcription of signals that regulate the biological cell cycle [31]. Changes of the biological cell cycle, in turn, ultimately compromising the ability of replication and liver regeneration, leading to apoptosis or cell death. On the other hand, excessive amount of FFA in the liver alone may lead to apoptosis of hepatocytes, being considered, therefore, one mechanism of cellular injury commonly observed in patients with NAFLD [32].

Previous study conducted in our laboratory [33] had already shown that the T1DM is able to change, in the long-term, the oxidative balance of the liver of ALX-induced diabetic rats, characterized by a significant increase of ROS in liver tissue and markedly reduced defense antioxidants. It is suggestive assert, therefore, that changes in blood liver enzymes (AST and ALT) and morphological and ultrastructural lesions found in the liver of animals in this study may be closely correlated to chronic stress caused by the DM in liver cells.

However, remain unclear molecular pathways by which chronic stress induces histopathological lesions in the liver in patients with T1DM, where the mechanisms of hyperinsulinemia and hepatic and peripheral resistance to insulin action are not usually the predominant mechanisms.

To Regnell and Lernmark (2011) [16] three mechanisms may be involved, separately or in combination, in the pathogenesis of NAFLD in patients with T1DM: 1- atypical rates of lipoproteins or malfunction of the same would lead to alterations in triglyceride secretion by liver cells, leading to accumulation of fat in the liver; 2 - activation of transcription factors of hepatic metabolism by hyperglycemia, such as the sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and the carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) would promote

hepatic lipogenesis; 3- excess of liver glucose transported by the glucose transporter 2 factor (GLUT2) would lead to intrahepatic fat synthesis.

Several quantitative and qualitative changes in lipoproteins are observed in T1DM patients, even those with good metabolic control, including: increased proportion of cholesterol, triglycerides, and lipoproteins of low and very low densities (LDL; VLDL), besides changes in the composition of the peripheral layers of lipoproteins, apolipoproteins glycation, LDL oxidation, and the amount of small dense particles [34]. These latest changes, according to this author, would be able to change the function of these substances and lead to NAFLD. However, not all changes of lipoprotein metabolism could be completely explained by hyperglycemia, being postulated that a state of peripheral hyperinsulinemia, caused by constant administration of subcutaneous insulin in patients with T1DM, would also have an important role in the genesis of these changes and the consequent accumulation of fat in the liver [34]. Conversely, it is possible assert that the NAFLD perhaps is not a consequence but a contributory factor to the development of lipoprotein abnormalities observed in these patients [35]. In the present study, however, we did not observe any abnormalities in lipoprotein metabolism, in any diabetic follow-up, even under a sustained hyperglycemia.

The SREBPs are factors utilized in the transcription of cell signals that directly activate the expression of over 30 genes related to the synthesis and release of cholesterol, fatty acids, triglycerides, and phospholipids [36]. *In vitro* studies have demonstrated that elevated concentrations of blood glucose are capable of increasing concentrations of SREPB-1c - a precursor form of SREBPs - in the endoplasmic reticulum. The SREPB1-c, in turn, acting together as ChREBP, increasing the expression of lipogenic genes derived from pyruvate kinase (LPK), as well as the enzymes acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS) [37]. The LPK catalyzes the conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate, the main source of ACC, predominantly used in the synthesis of fatty acids [38], and the FAS, the conversion of malonyl-CoA in long chain fatty acids [39]. According to Yamashita et al. (2001) [40] the ChREBP can stimulate transcription of genes responsible for the activation of LPK in response to hyperglycemia even without the participation of insulin. For this reason, ChREBP has been appointed as a very important contributory factor for the accumulation of fat in the liver in patients with T1D [41].

The latter mechanism involved in the pathogenesis of NAFLD is mediated by GLUT2 and regulated by SREBP1-c. The GLUT2 is a facilitative glucose transporter to target cells, primarily found in liver, kidney, gut and in the pancreatic β -cells [42]. In rats, the hepatic expression of GLUT2 is stimulated by hyperglycemia and hypoinsulinemia [43]. Thus, in the presence of diabetic state a large amount of glucose is transported to the liver, generating an

additional stock of this carbohydrate in hepatocytes which is rapidly diverted to the synthesis of fatty acids, which are exported to the blood as lipoproteins and/or stored in the liver parenchyma in the form of triglycerides, resulting in steatosis.

Regnell and Lernmark (2011) [16] also emphasize that in hepatocytes of rodents, insulin plays an important role in the genesis of steatosis, since it modulates the flow of FFA transported by protein pathways mediated by 2 and 5 FATPs (fatty acid transport proteins), whose actions are dose dependent and bimodal, mediated by the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) under low concentrations of insulin and by the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in the states of hyperinsulinemia, indicating that an ideal balance in circulating insulin levels is required for the regulation of fat metabolism in the liver. Thus, deviations from this equilibrium, such as the lack of production of insulin (T1DM) or the excess of this hormone in the bloodstream, due to elevated peripheral resistance to insulin action (T2DM) or inadequate administration of exogenous insulin, lead to fat accumulation in the liver [44].

The question that was not fully answered, however, is as NAFLD progresses to NASH, and later to fibrosis and/or cirrhosis in patients with T1DM. It is suggestive to assert, however, that many postulated mechanisms for the genesis of these complications in patients with T2DM, are also present in patients with T1DM, not least because a significant part of these patients may also be obese, and the mechanisms of peripheral insulin resistance and endogenous or iatrogenic hyperinsulinemia are also observed [29].

To Portincasa et al. (2005) [18], the onset and progression of NAFLD to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and liver cirrhosis involve two crucial points: the first related to the patients' risk factors, such as genetic defects and lifestyle; the second related to changes in intra- and extracellular molecular mechanisms that lead to liver damage, including oxidation of FFA, the formation of ROS, lipid peroxidation and release of proinflammatory cytokines, responsible for inflammation, hepatocellular necrosis and fibrosis. According Dowman et al. (2010) [45] the accumulation of triglycerides in the liver increases the susceptibility of this organ to injury mediated by inflammatory cytokines/adipocytokines or hepatocellular oxidative stress, by favoring the development of NAFLD to NASH and/or fibrosis. According to these researchers, the FFA are also capable of acting directly on the liver, promoting the liver injury. These compounds can either be submitted to β -oxidation as being esterified with glycerol to form triglycerides, leading to fat accumulation in the liver. Inside this organ, FFA may also increase hepatic oxidative stress and/or activate various inflammatory pathways that contribute to the progression of NAFLD.

Roskams et al. (2003) [28] stated that in healthy individuals the dead liver cells stimulate replication of mature hepatocytes, to reconstruct the damaged liver tissue. However,

in the presence of NAFLD, hepatic oxidative stress can inhibit the replication of mature hepatocytes, resulting in the expansion of hepatic progenitors (oval cells), which can differentiate into "hepatocyte-like cells", but are not hepatocytes. The increased amount of oval cells and "hepatocyte-like cells", in turn, is strongly correlated with the development of NAFLD to hepatic fibrosis, and also with hepatocellular carcinogenesis.

Conclusion

Alloxan diabetes induced biochemical changes in the blood, and morphological and ultrastructural lesions in rat liver, which closely resemble those found in the liver of humans, ranging from steatosis and steatohepatitis to liver fibrosis. The severity of histopathological lesions observed in the liver keeps close relationship with time of diabetes, being more severe the longer the experimental follow-up, especially in diabetic animals at 26 weeks of diabetes, without any control of hyperglycemia. The experimental model of diabetic chronic liver disease obtained can serve as a basis for new investigations, having the need, however, of correlating the histological findings with the experimental phase in which liver damage was observed.

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. Kunie Iabuki Rabello Coelho from the Department of Pathology, Faculty of Medicine of Botucatu – UNESP, for her supervision during analysis of liver tissue by light and electron microscopy. Research supported for Coordination for Higher Education Staff Development (CAPES) and Foundation for the Support of Research of the State of Sao Paulo (FAPESP).

Referência / References

1. G.C. Farrell, C.Z. Larter, "Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis," *Hepatology*, vol. 43, pp. S99-S112, 2006.
2. B.W. Smith, L.A. Adams, "Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment," *Nat Rev Endocrinol*, vol. 7, no. 8, pp. 456-465, 2011.
3. H. Ahmadieh, S.T. Azar, "Liver disease and diabetes: association, pathophysiology, and management," *Diabetes Res Clin Pract*; vol. 104, no. 1, pp. 53-62, 2014.
4. V.G. Kozrytskii, A.G. Minchenko, "Ultrastructural changes in rat hepatocytes with diabetes and insulin administration," *Tsitol Genet*, vol. 12, no.5, pp. 397-401, 1978.
5. K. Welt, J. Weiss, R. Martin, D. Dettmer, T. Hermsdorf, K. Asayama, S. Meister, G. Fitzl, "Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes and acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract," *Exp Toxic Pathol*, vol. 55, pp. 331-345, 2004.
6. R.N. Remedio, A. Castellar, R.A. Barbosa, R.J. Gomes, F.H. Caetano, "Morphology and protein content of hepatocytes in type 1 diabetic rats submitted to physical exercises. *Micron* 42: 484-491, 2011.
7. R.P. Laguens, S. Candela, R.E. Hernández, J.J. Gagliardino, "Streptozotocin-induced liver damage in mice," *Horm Metab Res*, vol. 12, no. 5, pp. 197-201, 1980.
8. E. Kume, Y. Ohmachi, S. Itagaki, K. Tamura, K. Doi, "Hepatic changes of mice in the subacute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes," *Exp Toxicol Pathol*, vol. 46, no. 4-5, pp. 368-374, 1994.
9. A.B. Mahmoud, M.B. Al-Salahy, "Physiological and histological studies on the effect of lupine seeds on the fish, *Clarias lazera* treated with glucose and alloxan," *Fish Physiol and Biochem*, vol. 30, pp. 213-229, 2004.
10. B. Can, N.N. Ulusu, K. Kilingç, N. Leyla-Acan, Y. Saran, B. Turan. "Selenium treatment protects diabetes-induced biochemical and ultrastructural alteration in liver tissue," *Biol Trace Elem Res*, vol. 105, no. 1-3, pp. 135-150, 2005.
11. W. Dabrós, A. Goc, B. Turyna, AM. Kordowiak. "Sodium metavanadate affected control and streptozotocin-diabetic rat liver golgi complexes," *Pol J Pathol*, vol. 57, no. 2, pp. 91-97, 2006.
12. A. Guven, O. Yavuz, M. Cam, F. Ercan, N. Bukan, C. Comunoglu, F. Gokce, "Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats," *Acta Histochem*, vol. 108, pp. 85-93, 2006.

13. S.O. Adewole, J.A.O. Ojewole, "Artocarpus communis forst. Root-bark aqueous extract- and streptozotocin-induced ultrastructural and metabolic changes in hepatic tissues of Wistar rats," *Afr J Trad Cam*, vol. 4, no. 4, pp. 397-410, 2007.
14. P. Evelson, C. Susemihl, I. Villarreal, S. Llesuy, R. Rodriguez, H. Peredo, A. Lemberg, J. Perazzo, E. Filinger, "Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats," *Ann Hepatol*, vol. 4, no. 2, pp. 115-120, 2005.
15. N.C. Leite, C.A. Villela-Nogueira, V.L. Pannain, A.C. Bottino, G.F. Rezende, C.R. Cardoso, G.F. Salles, "Histopathologic stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors," *Liver Int*, vol. 3, pp. 700-706, 2011.
16. S.E. Regnell, A. Lernmark, "Hepatic steatosis in type 1 diabetes," *Rev Diabet Stud*, vol. 84, no. 4, pp. 454-467, 2011.
17. J.P. Verderese, Z. Younossi, "Interaction of type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease," *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 7, no. 5, pp. 405-407, 2013.
18. P. Portincasa, I. Grattagliano, V.O. Palmieri, G. Palasciano, "Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management", *Clin Biochem*, vol. 38, pp. 203-217, 2005.
19. J.S. Dunn, H.L. Sheehan, N.E.D. McLetchie, "Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally," *Lancet*, vol. 1, pp. 484-487, 1943.
20. A. Junod, A.E. Lambert, L. Orci, R. Pictet, A.E. Gonet, A.E. Renold, "Studies of the diabetogenic action of streptozotocin," *Proc Soc Exp Biol*, vol. 126, pp. 201-205, 1967.
21. F.D.W. Lukens, "Alloxan diabetes," *Physiol Rev*, vol. 28, pp. 304-330, 1948.
22. K.A. Goel, "Submassive necrosis of liver of *Channa gachua*, a fresh water fish during experimental alloxan diabetes," *Anat Anz*, vol. 141, no. 2, pp. 130-135, 1977.
23. C. Voss, K. Brachmann, K. Hartmann, "Effect of streptozotocin on transaminases, creatinine and urea in serum of rats," *Exp Clin Endocrinol*, vol. 92, pp. 37-42, 1988.
24. W.E. Abdel-Aal, I.M. Abdel-Nabi, R.A. Hanna, K.A. Mahdy, "Biochemical and histological changes in normal and alloxan-diabetic rats after lupine seeds administration," *J Egypt Ger Soc Zool*, vol. 10, no. A, pp. 252-267, 1993.
25. K. Doi, J. Yamanouchi, E. Kume, A. Yasoshima, "Morphologic changes in hepatocyte nuclei of streptozotocin (SZ)-induced diabetic mice," *Exp Toxicol Pathol*, vol. 49, no. 3-4, pp. 295-299, 1997.
26. Z.A. Khan, H. Farhangkhoe, S. Chakrabarti, "Towards molecular targets for chronic diabetic complication," *Curr Vasc Pharmacol*, vol. 4, pp. 45-57, 2006.
27. H. Kaneto, Y. Nakatani, D. Kawamori, T. Miyatsuka, T.A. Matsuoka, M. Matsuhisa, Y. Yamasaki, "Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal

- kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance,” *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 38, pp. 782-793, 2006.
28. T. Roskams, S.Q. Yang, A. Koteish, A. Durnez, R. DeVos, X. Huang, R. Achten, C. Verslype, A.M. Diehl, “Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease,” *Am J Pathol*, vol. 163, pp. 1301-1311, 2003.
 29. N. Méndez-Sanchez, N.C. Chávez-Tapia, M. Uribe, “An update on nonalcoholic fatty liver disease,” *Rev Invest Clin*, vol. 56, pp. 72-82, 2004.
 30. M. Haque, A.J. Sanyal, “The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease,” *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, vol. 16, pp. 709-731, 2002.
 31. S.Q. Yang, H.Z. Lin, A.K. Mandal, J. Huanag, A.M. Diehl, “Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology,” *Hepatology*, vol. 34, pp. 694-706, 2001.
 32. A.J. Wigg, I.C. Roberts-Thomson, R.B. Dymock, P.J. McCarthy, R.H. Grose, A.G. Cummins, “The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis,” *Gut*, vol. 48, pp. 206-211, 2001.
 33. A.N. Lucchesi, N.T. Freitas, L.L. Cassettari, S.F.G. Marques, C.T. Spadella, “Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease,” *Acta Cir Bras*, vol. 28, no. 7, pp. 502-508, 2013.
 34. B. Verges, “Lipid disorders in type 1 diabetes,” *Diabetes Metab*, vol. 35, no. 5, pp. 353-360, 2009.
 35. J. Lenaerts, L. Verresen, W. Van-Steenbergen, J. Fevery, “Fatty liver hepatitis and type 5 hyperlipoproteinemia in juvenile diabetes mellitus. Case report and review of the literature,” *J Clin Gastroenterol*, vol. 12, no. 1, pp. 93-97, 1990.
 36. J.D. Horton, J.L. Goldsteins, M.S. Brown, “SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver,” *J Clin Invest*, vol. 109, no. 9, pp. 1125-1131, 2002.
 37. P. Ferre, F. Foulle, “SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective,” *Horm Res*, vol. 68, pp. 72-82, 2007.
 38. J.D. Browning, J.D. Horton, “Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury,” *J Clin Invest*, vol. 114, no. 2, pp. 147-152, 2004.
 39. M.O. Weickert, A.F. Pfeiffer, “Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism,” *Diabetologia*, vol. 49, no. 8, pp. 1732-1741, 2006.

40. H. Yamashita, M. Takenoshita, M. Sakurai, R.K. Bruick, W.J. Henzel, W. Shillinglaw, D. Arnot, K. Uyeda, "A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 98, no. 16, pp. 9116-9121, 2001.
41. H. Elasha, S. Alzahrani, M. Almalki, A. Alomair, W. Alshakweer, "Acute hepatic steatosis: an unusual manifestation of poorly controlled type 1 diabetes," *Pract Diab Int*, vol. 27, no.7, pp. 282-283, 2010.
42. B. Thorens, H.K. Sarkar, H.R. Kaback, H.F. Lodish, "Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells," *Cell*, vol. 55, pp. 281-290, 1988.
43. C. Postic, R. Burcelin, F. Rencurel, J.P. Pegorier, M. Loizeau, J. Girard, A. Leturque, "Evidence for a transient inhibitory effect of insulin on GLUT2 expression in the liver: studies *in vivo* and *in vitro*," *Biochem J*, vol. 293, no. 1, pp. 119-124, 1993.
44. S. Softic, M. Kirby, N. Shroyer, R. Kohli, "Hepatic steatosis in type 2 and type 1 diabetes mellitus is mediated by insulin signaling via fatty acid transport proteins," *J Pediatr Gastroenterol*, vol. 51, suppl 2, pp. E33-E34, 2010.
45. J.K. Dowman, J.W. Tomlinson, P.N. Newsome, "Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease," *Int J Med*, vol. 103, pp. 71-83, 2010.