OLIVIA ADAYR XAVIER SUAREZ

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS, ULTRAESTRUTURAIS E DOS BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO NOS PULMÕES DE RATOS DIABÉTICOS ALOXÂNICOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em "Bases Gerais da Cirurgia" – Área de Concentração em Agressão, Reparação, Regeneração e Transplantes de Tecidos e Órgãos, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, para obtenção do título de Doutor.

Orientador- Prof. Titular: Antônio José Maria Cataneo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2010

OLIVIA ADAYR XAVIER SUAREZ

Alterações histopatológicas, ultraestruturais e dos biomarcadores do estresse oxidativo nos pulmões de ratos diabéticos aloxânicos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em "Bases Gerais da Cirurgia" – Área de Concentração em Agressão, Reparação, Regeneração e Transplantes de Tecidos e Órgãos, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, para obtenção do título de Doutor.

Orientador- Prof. Titular: Antônio José Maria Cataneo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Suarez, Olivia Adayr Xavier.
Alterações histopatológicas, ultraestruturais e dos biomarcadores do estresse oxidativo nos pulmões de ratos diabéticos aloxânicos / Olivia Adayr Xavier Suarez. – Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.
Orientador: Antônio José Maria Cataneo
Capes: 40102009

1. Diabetes. 2. Pulmões. 3. Oxigênio. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Estresse oxidativo; Morfologia; Pulmões; Ultraestrutura.

"A mente que se abre para uma nova idéia, jamais volta a seu tamanho original" (Einstein, 1879-1955)

DEDICATÓRIAS

À minha família, razão da minha existência...

Aos meus pais, Miguel e Olivia,
deles aprendi valores, herdei uma grande dose de otimismo, o senso de responsabilidade, a virtude de não delegar a outros meus erros... mas perseverar até dar certo.

Ao meu marido César,
por sua dedicação infinita e profícua ao meu crescimento pessoal. Por seus esforços e companheirismo conheci o que me é mais caro: a liberdade de escolha.

Aos meus filhos, Miguel, Pedro e Carolina,
Por me terem escolhido para partilhar suas vidas, para aprendermos muitas coisas juntos, e por me fazerem sentir tão amada e necessária.

E a todos com quem divido anseios, tristezas e, principalmente, alegrias e comemorações...

HOMENAGEM

"Se eu vi mais longe, foi por estar apoiado sobre ombros de gigantes"

(Isaac Newton,1643-1727)

Ao meu orientador, ***Professor Titular Antônio José Maria Cataneo***, exemplo de sabedoria e simplicidade. Obrigada pela generosidade de me acolher como sua aluna e por me transmitir os ensinamentos que possibilitaram a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Minha profunda gratidão a ***todos*** que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho. Em especial:

À bióloga ***Amanda Natália Lucchesi,*** aluna do curso de Mestrado, do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pela ajuda preciosa na obtenção dos parâmetros clínicos, laboratoriais e morfológicos dos pulmões.

Ao biólogo ***Silvio Fernando Guideti Marques***, pelas dosagens dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo pulmonar. O meu sincero obrigada.

À ***Dra. Adriana Polachini do Valle***, médica responsável pelo Laboratório Clínico do HC-Unesp Botucatu, pela franquia do laboratório para a realização das dosagens bioquímicas deste trabalho.

À bióloga ***Maria Salete Sartori*** e às funcionárias ***Maria de Fátima Aparecida Biazon e Maria Luísa dos Santos***, pela realização das dosagens bioquímicas do estudo.

Ao ***Prof. Júlio Defavari***, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pela orientação no protocolo de estudo histopatológico dos pulmões, na fase piloto deste trabalho.

Ao ***Prof. Deilson Elgui de Oliveira***, do Departamento de Patologia e à ***Profa. Érika Veruska Paiva Ortolan***, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pela orientação imprescindível na padronização e realização das medidas morfométricas dos pulmões, pelo programa KS-300.

Às ***Profas. Elisa Aparecida Gregório e Daniela Carvalho dos Santos***, Ex-Chefe e atual Chefe do Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biociências do Campus da Unesp de Botucatu, por terem franqueado o laboratório para a realização das análises microscópicas eletrônicas deste trabalho e pela orientação no protocolo de estudo ultraestrutural dos pulmões.

Ao ***Prof. Reinaldo José da Silva***, do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biociências do Campus da Unesp de Botucatu, pela orientação na padronização e realização das medidas morfométricas das membranas basais dos septos alveolares, à microscopia eletrônica.

Ao Sr. ***Danilo Chaguri***, funcionário do Laboratório de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pelos serviços prestados e ajuda inestimável na realização das etapas experimentais deste trabalho, bem como nos cuidados dispensados aos animais.

Aos ***demais funcionários*** do Laboratório de Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, que colaboraram direta e indiretamente na realização das etapas experimentais deste trabalho.

Ao sr. ***José Carlos Georgette***, funcionário do Laboratório Experimental, do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pela disponibilização da área física e dispensação dos cuidados necessários para a procriação de matrizes de ratos Lewis, oriundas do biotério central da Unicamp.

Ao sr. ***José Carlos Pedroso de Lima,*** do Laboratório de Anatomia Patológica, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pelo preparo histológico e confecção das lâminas dos fragmentos de tecido pulmonar analisados neste estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biociências do Campus da Unesp de Botucatu, ***Maria Helena Moreno e Claudete dos Santos Tardivo,*** pelo preparo dos pulmões para análise à microscopia eletrônica de transmissão.

À srta. ***Luana Ferreira Amaral***, secretária da Associação dos Médicos Plantonistas do HC-Unesp Botucatu, pela digitação do texto e elaboração dos gráficos e tabelas deste trabalho.

À sra. ***Janete Aparecida Herculano, Regina Célia Spadim, Nathanael Pinheiro Salles, Lilian Cristina Nadal Bianchi Nunes e Andrea Paula Longo Devidé,*** funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, pela disposição admirável em sempre colaborar na solução de todos os assuntos relativos aos apontamentos das disciplinas, e na realização da defesa pública do meu Exame de Qualificação e desta tese.

À sras. ***Luciana Pizzani e Selma Maria de Jesus,*** bibliotecárias da Biblioteca Central do Campus da Unesp de Botucatu, pela ajuda indispensável na organização das referências bibliográficas deste trabalho e na confecção de sua ficha catalográfica.

Ao ***Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP)*** pela versão do resumo da tese para a língua inglesa e pelas orientações na realização da análise estatística.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
MATERIAL E MÉTODOS	9
1. Animais utilizados	9
2. Ambiente de experimentação, profilaxia e tratamento de infecções	9
3. Distribuição e sorteio dos animais	10
4. Grupos experimentais	11
5. Momentos de avaliação e sacrifício	11
6. Parâmetros analisados	12
7. Técnicas utilizadas	13
7.1. Anestesia, coleta de sangue e sacrifício	13
7.2. Obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais	14
7.3. Indução do diabetes experimental	15
7.4. Exames laboratoriais	16
7.5. Análise dos biomarcadores do estresse oxidativo pulmonar	16
7.6. Análise dos pulmões pós-morte	17
7.6.1. Peso fresco, volume líquido infundido nos pulmões e cálculo da complacência dos pulmões isolados	17
7.6.2. Exame histopatológico	19
7.6.2.1. Análise de depósitos gordurosos nos vasos arteriais pulmonares	19
7.6.2.2. Análise morfométrica dos pulmões à M.O.	19
7.6.2.3. Análise morfométrica da membrana basal dos septos alveolares à M.E.	22
8. Análise Estatística	24
RESULTADOS	26
1. Achados clínicos e laboratoriais	26
2. Biomarcadores do estresse oxidativo pulmonar	33
3. Achados gerais macroscópicos de necrópsia	35
3.1. Achados macroscópicos dos pulmões	37
4. Achados morfológicos dos pulmões à M.O	42
5. Achados morfológicos dos vasos arteriais pulmonares à M.O.	44
6. Achados morfométricos dos pulmões à M.O.	45
7. Achados morfológicos ultraestruturais dos pulmões à M.E.	48

7.1. Achados morfométricos da membrana basal dos septos alveolares à M.E. 53
DISCUSSÃO 59
CONCLUSÕES 72
RESUMO 75
SUMMARY 80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama representativo da distribuição dos animais nos seus respectivos grupos e subgrupos de estudo, com as variáveis avaliadas. 12

Figura 2 - Ilustração da metodologia utilizada na coleta das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas: A) animal em gaiola metabólica para obtenção dos dados clínicos; B) processo de aquecimento dos animais para coleta de sangue da cauda; C) contenção do animal e exposição da cauda; D) coleta de sangue por secção da cauda para realização dos exames bioquímicos no seguimento. 15

Figura 3 - Metodologia utilizada na perfusão dos pulmões para a medida do volume de líquido infundido, cálculo da complacência e realização do estudo à microscopia ótica. (A) sistema especialmente construído para a perfusão dos pulmões, com formol tamponado; (B) pulmões preparados por entubação traqueal, para serem perfundidos com uma pressão de 20cm de H_2O; (C) pulmões após a perfusão; (D) detalhe dos pulmões distendidos, preparados para a fixação. 18

Figura 4 – Seqüência metodológica da realização das medidas morfométricas da área alveolar e do perímetro alveolar, com auxílio do "software" KS–300. Em A – imagem selecionada para ser medida; B – ajuste manual dos canais de cores (RGB), com seleção das áreas a serem medidas; C – geração de uma "mascara" sobre a imagem editada, a qual tinha a função de delimitar o contorno histográfico das estruturas a serem medidas; D- delimitação do contorno histográfico das estruturas a serem medidas (linhas amarelas), com exclusão de áreas tangenciais e com artefatos técnicos de preparação. 21

Figura 5 – Ilustração dos procedimentos utilizados para a contagem do número de alvéolos/μm^2. Em A – campo histológico a ser contado; B – ajuste manual dos canais de cores (RGB), com seleção dos alvéolos a serem contados; C – obtenção de "máscara" com delimitação do contorno histográfico das estruturas a serem contadas; D - pontuação manual (pontos amarelos), com o "mouse", de cada um dos alvéolos presentes no campo histológico. 22

Figura 6 - Ilustração comparativa do estado nutricional de um rato diabético (A) e de um rato normal (B) sacrificados com 6 meses de seguimento. 27

Figura 7 – Evolução do peso corporal (A), ingestão hídrica (B), ingestão alimentar (C) e diurese (D), em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 29

Figura 8 – Evolução da glicemia de jejum (A), glicose urinária (B), hemoglobina glicosilada (C) e insulina plasmática (D), em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 31

Figura 9 – Evolução da glicemia de jejum em ratos normais e diabéticos do lote II do estudo, avaliada por análise digital (HGT), ao longo do seguimento. 32

Figura 10 - Evolução dos biomarcadores do estresse oxidativo pulmonar: hidroperóxidos lipídicos (A), superóxido dismutase (B), catalase (C) e glutationa peroxidase (D), em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 35

Figura 11 - Ilustração do olho de um animal normal (A) e de um rato diabético (B) sacrificados com 6 meses de seguimento. Note a total opacificação do cristalino no animal diabético. 36

Figura 12 - Aspecto geral do cólon de um animal diabético sacrificado com 6 meses de diabetes. Observe a grande dilatação do cecum deste animal. 37

Figura 13 - Peso fresco (g) dos pulmões de ratos normais e diabéticos nos 2 grupos experimentais, durante o seguimento. 38

Figura 14 - Relação do peso fresco dos pulmões em função do peso corporal dos animais, nos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 39

Figura 15 - Volume líquido infundido nos pulmões (ml) de ratos normais e diabéticos nos 2 grupos experimentais, durante o seguimento. 41

Figura 16 – Ilustração da variação dos valores da complacência dos pulmões isolados, em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 41

Figura 17 - Alvéolos pulmonares de ratos normais e diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Observe em A: estrutura alveolar de rato normal, mostrando área dos espaços alveolares com dimensões normais e quantidade preservada do número de alvéolos (HE 10x); B: estrutura alveolar de rato diabético, mostrando diminuição da área dos espaços alveolares e aumento do número de alvéolos contados/campo (HE 10x), que indiretamente mostram a menor distensão alveolar; C: estrutura morfológica dos septos alveolares de rato normal, mostrando paredes finas, sem alterações inflamatórias (HE 40x); D: estrutura morfológica dos septos alveolares de rato diabético mostrando espessamento das paredes e presença de intenso infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário, fibroblastos e colágeno preenchendo o interstício alveolar (HE 40x). 43

Figura 18 – Aspecto histológico da parede da artéria pulmonar de rato diabético sacrificado com 6 meses de seguimento, mostrando a camada íntima do endotélio (seta) com ausência de depósitos gordurosos. Note a presença de gordura adjacente ao vaso, corada em vermelho, pela técnica do "oil red" (40 x). 44

Figura 19 – Ilustração da contagem do número total de alvéolos/μm^2 em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 46

Figura 20 – Ilustração dos valores medianos encontrados nas medidas do perímetro alveolar em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 47

Figura 21 - Ilustração dos valores medianos encontrados nas medidas da área da superfície alveolar em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 48

Figura 22 – Achados ultraestruturais dos septos alveolares de ratos diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Observe em A: epitélio alveolar constituído de pneumócitos tipo 1 (ep1) voltados para a luz alveolar (LA), mostrando degeneração hialina e atrofia, dispostos sobre a membrana basal do epitélio alveolar (MBEA) com graus variados de espessamento. A luz capilar (LC) é parcialmente colapsada, sendo circundada por endotélio (e) formado por células endoteliais degeneradas, contendo um grande número de vesículas plasmalemais (v). As células endoteliais repousam sobre membrana basal do endotélio capilar (MBEC), a qual se mostra intensamente espessada; B: expansão da matriz extracelular (me) do interstício do septo alveolar, localizada entre a MBEC e a MBEA espessas, mostrando infiltração por edema, vesículas (v) e abundante quantidade de bandas de colágeno (co) que aparecem cortadas longitudinalmente, além de elastina (el) e células "like" fibroblastos - F (magnificação final 42.000x). 50

Figura 23 - Achados ultraestruturais dos septos alveolares de ratos diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Observe em A: intensa expansão da matriz extracelular (setas) localizada acima e abaixo da membrana basal do epitélio alveolar (MBEA) e dos penumócitos tipo 1 (ep1), sendo caracterizada por edema, bandas de colágeno (co), que aparecem cortadas transversalmente, e elastina – el (magnificação final 42.000x); B: luz alveolar colapsada (LA), voltada para o epitélio alveolar contendo microvilosidades (mv) que se projetam para o seu interior. Nota-se pnemócitos tipo 2 (P) contendo abundante quantidade de surfactante (S) retido no interior do citoplasma (magnificação final 5.750x). 51

Figura 24 - Achados ultraestruturais dos septos alveolares de ratos diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Observe em A: corte de célula endotelial (ce) mostrando numerosos corpúsculos de Weibel-Palade (WP), vesículas (v) e vesículas fundidas (vf), indicativos de intensa atividade inflamatória e trombogênica do endotélio vascular, bem como aumento da atividade transcitótica através da membrana celular (magnificação final (42.000x); B: detalhe da fusão das membranas basais do epitélio alveolar (MBEA) e do endotélio capilar (MBEC) espessadas, com luz capilar comprimida e parcialmente ocluída (seta). Note o plasma no interior do lúmen capilar (LC) (magnificação final 17. 000x). 52

Figura 25 - Médias dos valores ± desvios-padrão da espessura das membranas basais do epitélio alveolar (MBEA) e do endotélio capilar (MBEC), em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 55

Figura 26 - Ilustração dos achados ultraestruturais da membrana basal do epitélio alveolar (MBEA) em ratos normais (A) e diabéticos (B), sacrificados com 6 meses de seguimento; LA - luz alveolar; LC - luz capilar. Note o intenso espessamento da MBEA (seta) em rato do grupo diabético quando comparado com o do grupo normal (B) [magnificação final 42.000x). 56

Figura 27 - Ilustração dos achados ultraestruturais da membrana basal do endotélio capilar (MBEC) em ratos normais (A) e diabéticos (B), sacrificados com 6 meses de seguimento; LA - luz alveolar; LC - luz capilar com hemáceas no seu interior; MBEA – membrana basal do epitélio alveolar; ep1 – pneumócitos do tipo 1. Note o intenso espessamento da MBEC (seta) em rato do grupo diabético quando comparado com o do grupo normal (B) [magnificação final 42.000x).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias ± desvios-padrão da evolução do peso corporal (g) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 27

Tabela 2 – Médias ± desvios-padrão da ingestão hídrica (ml/24h) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 28

Tabela 3 – Médias ± desvios-padrão da ingestão alimentar (g/12h) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 28

Tabela 4 – Médias ± desvios-padrão da diurese (ml/24h) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 28

Tabela 5 – Médias ± desvios-padrão da glicemia de jejum (mg/dl) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 29

Tabela 6 – Médias ± desvios-padrão da glicose urinária (mg/dl) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 30

Tabela 7 – Médias ± desvios-padrão da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA_1C) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 30

Tabela 8 – Médias ± desvios-padrão da insulina plasmática (μU/ml) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 30

Tabela 9 – Médias ± desvios-padrão do controle periódico digital da glicemia de jejum (mg/dl), nos 2 grupos experimentais, de animais do lote II, nos respectivos períodos de seguimento. 32

Tabela 10 - Médias ± desvios-padrão da concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPO) e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px), nos 2 grupos experimentais, nos respectivos momentos de sacrifício. 34

Tabela 11 – Médias ± desvios-padrão do peso fresco dos pulmões (g) em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 38

Tabela 12 - Relação do peso fresco dos pulmões (pfp) em função do peso corporal (pc) dos animais, nos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 39

Tabela 13 – Médias ± desvios-padrão dos valores do volume líquido infundido nos pulmões (ml) e da complacência do pulmão isolado (ml/cm H_2O) em ratos normais e diabéticos, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 40

Tabela 14 – Médias ± desvios-padrão da contagem do número total de alvéolos/μm^2 encontrada em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 45

Tabela 15 – Medianas, valores mínimos e máximos, entre colchetes, do perímetro alveolar (µm) em pulmões de ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento 46

Tabela 16 – Medianas, valores mínimos e máximos, entre colchetes, da área da superfície alveolar (μm^2) em pulmões de ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento 47

Tabela 17 - Médias ± desvio-padrão das medidas da espessura da membrana basal do epitélio alveolar (MBEA), em micrômetros, em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 54

Tabela 18 - Médias ± desvio-padrão das medidas da espessura da membrana basal do endotélio capilar (MBEC), em micrômetros, em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento. 54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EROs – espécies reativas do oxigênio

DM – diabetes mellitus

HPO - hidroperóxidos lipídicos

GSH-Px - glutationa peroxidase

SOD - superóxido dismutase

CAT – catalase

GN – Grupo normal

GD – Grupo diabético

M.O. - microscopia ótica

M.E. - microscopia eletrônica

M0 – 14º dia após a indução do diabetes ou de seguimento normal

M1 – 1 mês

M2 – 3 meses

M3 – 6 meses

MBEA - membrana basal do epitélio alveolar

MBEC - membrana basal do endotélio capilar

IM – via intramuscular

mg – miligramas

kg – quilogramas

HE – hematoxilina & eosina

H_2O – água

MB – membrana basal

MIN – valor mínimo

MAX – valor máximo

MD – valor mediano

µm – micrômetro

μm^2 - micrômetro quadrado

AGEs - glicação protéica / advanced glication endproducts

DNA – ácido desoxiribonucleico

PAI – I – fator inibidor do plasminogenio I

TGF – β2 – fator de crescimento transformador beta - 2

PKC - proteina C quinase

VEGF-A – fator de crescimento vascular endoletial - A

GNE - glicosilação não-enzimática

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, atingindo países de todos os níveis de desenvolvimento (HU et al., 2001; GENUTH et al., 2003; FAGOT-CAMPAGNA et al., 2005; NATHAN et al., 2005; DAGOGO-JACK et al., 2006; CASTELL, 2010, NARAYANAN et al, 2010, van DIEREN, 2010). Nos Estados Unidos, a doença atinge cerca de 23,6 milhões de americanos, com mais de 1,6 milhões de novos casos diagnosticados todos os anos. Naquele país, 174 bilhões de dólares foram gastos, em 2007, com o diagnóstico e tratamento da doença e suas complicações (VARAS-LORENZO et al., 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010; SAYDAH & LOCHNER, 2010).

Estudo realizado, em 2004, a partir de dados epidemiológicos sobre o diabetes, de 191 países-membros da Organização Mundial de Saúde, projetou, para 2030, uma prevalência global de diabetes, de 4,4% da população mundial, que extrapolados ao crescimento populacional vai atingir um total de 366 milhões de pacientes diabéticos (WILD et al., 2004).

No Brasil, segundo o último Censo Brasileiro de Diabetes, realizado entre 1986 e 1989, a doença atingia cerca de 7,6% da população, na faixa etária dos 30 aos 69 anos. Destes, observou-se que 50% desconhecia completamente a sua condição de doente, sendo provavelmente identificados através de uma complicação da doença (MALERBI & FRANCO, 1992; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

Estudos conduzidos pelo National Center for Health Statistics, USA, mostraram que, no período entre 1990 e 2005, a prevalência total de diabetes aumentou dramaticamente na velocidade de 4,6% ao ano (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2008). Aplicando-se essa taxa de crescimento na prevalência de diabetes observada no último censo brasileiro, chegaríamos, hoje, a uma prevalência estimada de pacientes diabéticos, no Brasil, de 14,9%, para

a faixa etária dos 30 aos 69 anos, o que equivaleria a um aumento de nada menos que 96,3%.

Dados do IBGE, porém, estimaram, em 2007, uma prevalência total de diabetes no Brasil de 5,9% da população, o que significaria, hoje, uma estimativa de 11 milhões de pacientes diabéticos no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

Dados do Ministério da Saúde do Brasil, de levantamentos regionais e de registros de associações de pacientes diabéticos (BRASIL, 1988; 2006; FRANCO et al., 1988; SILVESTRE, 1997; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000) revelam que o diabetes é a 6ª causa de internação hospitalar, contribuindo de forma significativa na gênese de outras causas de internação, como: cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, insuficiência renal crônica, neuropatia periférica incapacitante, doença vascular periférica e retinopatia diabética. Estima-se que 30% dos pacientes internados em unidades coronarianas e 26% dos indivíduos que ingressam em programas de diálise no País são diabéticos (MALERBI & FRANCO, 1992; SILVESTRE, 1997).

Em que pese, porém, a importância do diabetes nos índices de morbidade e mortalidade mundiais, não há consenso na literatura sobre os mecanismos primariamente responsáveis pela injúria celular desta doença, ao nível dos vasos, coração, rins, retina, nervos e pulmões do paciente diabético (NERUP et al., 1994; ALLEN et al., 2005). Este fato vem explicar as imensas lacunas ainda hoje existentes no conhecimento da fisiopatologia da doença, particularmente em relação à gênese e caracterização das lesões pulmonares diabéticas, as quais, a julgar pela defasagem no conhecimento em relação às outras lesões diabéticas crônicas, principalmente em relação às suas implicações clínicas, podem ser consideradas praticamente desconhecidas (REINILA, 1981; SANDLER, 1990; OFULUE et al., 1999; MEXAS et al., 2006).

Evidências histopatológicas em pulmões de homens e animais, no entanto, sugerem que o sistema respiratório pode ser igualmente afetado pelo diabetes, sendo as alterações encontradas tidas como parte

do curso natural de uma grave doença sistêmica (PLOPPER & MORISHIGE, 1979; VRACKO et al. 1979; KODOLOVA et al., 1982; KIDA et al., 1983).

Sabe-se que o DM é capaz de produzir alterações, no longo prazo, na síntese e na renovação dos constituintes celulares do tecido conectivo pulmonar, bem como na ultraestrutura alvéolo-capilar, levando a anormalidades no interstício alveolar, epitélio alveolar, epitélio bronquiolar, pneumócitos e, principalmente, na membrana basal dos alvéolos e dos capilares alveolares (WEYNAND et al., 1999; NICOLAIE, 2003). Estas alterações, por sua vez, são tidas como as principais responsáveis pela redução da complacência pulmonar, diminuição da capacidade residual funcional e redução do fluxo sangüíneo através dos capilares alveolares, com comprometimento significativo das trocas gasosas (SCHUYLER et al., 1976; SANDLER et al., 1987; LJUBIC et al., 1998; CAZZATO et al., 2004).

Por outro lado, ainda que a hiperglicemia crônica seja a alteração invariavelmente presente nesses pacientes, é provável que este distúrbio represente apenas a etapa inicial do processo de glicosilação não-enzimática do tecido conectivo presente no interstício e nas membranas celulares dos pulmões e, também, nos outros órgãos-alvos do diabetes.

Revisões recentes da literatura têm apontado o estresse oxidativo celular como um dos mecanismos mais importantes na gênese do dano tecidual relacionado à hiperglicemia. Sabe-se que através deste mecanismo o organismo aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), podendo, com isso, iniciar o desenvolvimento das lesões diabéticas crônicas, quando os mecanismos de defesa antioxidantes são insuficientes para conter a ação nociva destas substâncias sobre os componentes celulares, incluindo o DNA (KING & LOEKEN, 2004; VINCENT et al., 2004; BLOCH-DAMTI & BASHAN, 2005; DAVI et al., 2005; NOIRI & TSUKAHARA, 2005; JOHANSEN et al., 2005; JAY et al., 2006; MEHTA et al., 2006).

A despeito da importância desses estudos, é discutível se o estresse oxidativo pode ser considerado a causa primária das lesões diabéticas crônicas, ou simplesmente se constitui, ao lado de diversos outros mecanismos, em mais uma das alterações presentes na etiopatogenia do DM (KANETO et al., 2006; KHAN et al., 2006).

Por outro lado, evidências de que o aumento do estresse oxidativo celular, secundário ao aumento na produção das EROs, pode estar presente durante os processos de auto-oxidação da glicose e de glicolisação protéica, com redução das concentrações de antioxidantes enzimáticos, dão sustentação à hipótese de que a injúria celular mediada por estas substâncias, se não pode ser considerada a causa primária das lesões diabéticas crônicas, no mínimo, tem importante papel no desenvolvimento destas complicações (SCOTT & KING, 2004; SON et al., 2004; NIEDOWICZ & DALEKE, 2005; RAHIMI et al., 2005; STUMP et al., 2005; ROLO & PALMEIRA, 2006).

Infelizmente, porém, não existem estudos de longo prazo onde essas hipóteses tenham sido investigadas; especialmente em se tratando de estudos pareados, com amostras ou populações de pacientes normais e diabéticos, com o mesmo tempo de seguimento.

Neste particular, a obtenção de modelos experimentais de diabetes, cujas características clínicas, metabólicas e histopatológicas se assemelhem ao diabetes humano, pode fornecer dados valiosos para o melhor conhecimento da fisiopatologia desta doença e, possivelmente, responder algumas das nossas indagações (RENARD & VAN OBBERGHEN, 2006).

Oportunamente, a experiência acumulada em longos anos de pesquisa experimental em nossa instituição, envolvendo estudo das lesões diabéticas crônicas nos rins, vasos, retina e nervos de ratos diabéticos (MACEDO et al., 1996; SPADELLA et al., 1996; SPADELLA et al., 1998; MACHADO et al., 2000; LERCO et al., 2003; RODRIGUES et al.; SPADELLA et al., 2005a; SPADELLA et al., 2005b) nos permite postular a hipótese de haver uma possível correlação entre o

acometimento dos pulmões pelo diabetes e o estresse oxidativo deste órgão.

Esta proposta baseia-se em estudo realizado em nosso laboratório experimental (MARQUES, 2005), onde observou-se marcadas alterações, tanto nas concentrações de hidroperóxidos lipídicos (HPO), como na atividade das enzimas glutationa peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido renal de ratos diabéticos aloxânicos, quando comparado às dosagens efetuadas em ratos normais não-diabéticos, já a partir do 1° mês de seguimento do diabetes.

Todavia, são escassos estudos clínicos e experimentais onde essa analogia tenha sido testada para os pulmões (SCHLEIDER et al., 1997; JE et al., 2002; NICOLAIE, 2003; SRIDULYAKUL et al., 2003), principalmente em estudos de longo prazo envolvendo, tanto o estudo histopatológico das lesões pulmonares crônicas, como também, o estresse oxidativo pulmonar ocasionado pelo diabetes.

Os resultados da presente investigação, por certo, trarão informações valiosas para o melhor conhecimento da fisiopatologia do diabetes, possibilitando o controle efetivo de suas complicações no longo prazo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa teve os seguintes objetivos:

1. Caracterizar as alterações morfológicas, morfométricas e ultraestruturais determinadas pelo DM, nos pulmões de ratos diabéticos induzidos pela aloxana, tendo como parâmetros de comparação ratos normais não-diabéticos, de mesmo período de seguimento.

2. Estabelecer uma possível correlação entre a evolução das alterações encontradas com a intensidade do estresse oxidativo pulmonar.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais utilizados

No presente estudo foram utilizados 120 ratos machos, adultos, da linhagem Lewis, sadios ao exame clínico, pesando aproximadamente 250-280 gramas, criados no Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, a partir de matrizes adquiridas do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas, SP (Unicamp). O estudo apresentado, de protocolo nº 556, foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA), da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, no dia 25 de outubro de 2006.

2. Ambiente de experimentação, profilaxia e tratamento de infecções

Os animais foram mantidos em gaiolas de poliuretano, forradas com palha autoclavada, em grupos de 4 animais/caixa, colocadas em "containers", com temperatura, exaustão e iluminação controladas. O controle de insetos foi feito utilizando dispositivos foto-eletrônicos.

Na semana que antecedeu a indução do diabetes experimental, os animais foram vermifugados com mebendazol (Abbott – Cifarma, São Paulo – SP), administrado por via oral e adicionado à água de beber, e tratados profilaticamente de pediculose com fipronil/metoprene (Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia –SP), colocado na superfície da pele. Na evidência de sinais clínicos de piodermite e/ou pneumonia no seguimento, os animais foram tratados, respectivamente, com cuidados locais das lesões com solução degermante de digluconato de clorohexedina (NeoQuimica, São Paulo – SP) e administração de cloridrato de tetraciclina, na dose de 100mg/kg (Bristol – M – Squibb, São Paulo – SP) colocada na água de beber, durante 7-10 dias.

3. Distribuição e sorteio dos animais

Oriundos do biotério, os animais foram inicialmente sorteados em dois grandes grupos de ratos; o primeiro, destinado aos animais que permaneceram como controles (normais não-diabéticos) e o segundo, aos animais que foram submetidos à indução do diabetes experimental (animais diabéticos). Decorridos 14 dias após a indução do diabetes ou de seguimento normal, os animais foram distribuídos em 2 lotes pareados de estudo (lotes I e II), com 60 ratos cada um. Cada um destes lotes foi dividido, por sorteio, em 2 grupos experimentais, constituídos de 30 ratos controles normais não-diabéticos e 30 ratos diabéticos sem qualquer tratamento da doença.

Em decorrência da diversidade da técnica de preparação dos espécimes, ratos do lote I foram utilizados para a avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais em gaiolas metabólicas, obtenção do peso fresco dos pulmões (pfp), obtenção da relação do pfp/peso corporal, estudo dos biomarcadores do estresse oxidativo no tecido pulmonar, estudo das artérias pulmonares e análise ultraestrutural morfológica e morfométrica dos pulmões à microscopia eletrônica (M.E.).

Ratos do lote II, por sua vez, foram utilizados para a perfusão e fixação dos pulmões, com formol tamponado a 10%, para a avaliação do volume de líquido infundido nestes órgãos, da complacência do pulmão isolado, bem como para a análise morfológica e morfométrica à microscopia ótica (M.O.). Para comprovação do estado diabético permanente dos animais deste lote, foi realizado o monitoramento periódico da glicose sanguínea e da glicosúria, utilizando, respectivamente, análise digital da glicemia (Accur – Check - Roche) e a utilização de fitas reagentes (Gluketur Test)

Autópsia com exame completo de todos os órgãos abdominais e torácicos foi realizada em todos os animais dos 2 lotes de estudo.

4. Grupos experimentais

Sumarizando, cada um dos dois lotes iniciais de animais, composto por 60 ratos, foi dividido em 2 grupos experimentais pareados, assim designados:

GN – Grupo normal: com 30 animais normais, sadios, não diabéticos;
GD – Grupo diabético: com 30 animais diabéticos, não-tratados;

Animais que evoluíram para o óbito no período pós-indução do diabetes, e no seguimento precoce ou tardio, foram repostos, de modo a não comprometer o número final de ratos de cada grupo ou subgrupo estudado.

5. Momentos de avaliação e sacrifício

Cada um dos grupos experimentais, em ambos lotes de estudo, foi dividido em 3 subgrupos de ratos, com 10 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados, respectivamente, em 3 momentos do experimento, a saber:

M1 – animais sacrificados com 1 mês de seguimento normal ou com diabetes;
M2 – animais sacrificados com 3 meses de seguimento normal ou com diabetes;
M3 – animais sacrificados com 6 meses de seguimento normal ou com diabetes.

Todos os animais do estudo também tiveram uma avaliação inicial (M0), realizada no 14º dia pós-indução do diabetes ou de seguimento normal, para obtenção apenas de parâmetros clínicos e laboratoriais. A Fig. 1 mostra o diagrama representativo da distribuição dos animais do experimento, nos seus respectivos grupos experimentais

e subgrupos de estudo, juntamente com as variáveis analisadas em cada lote de animais.

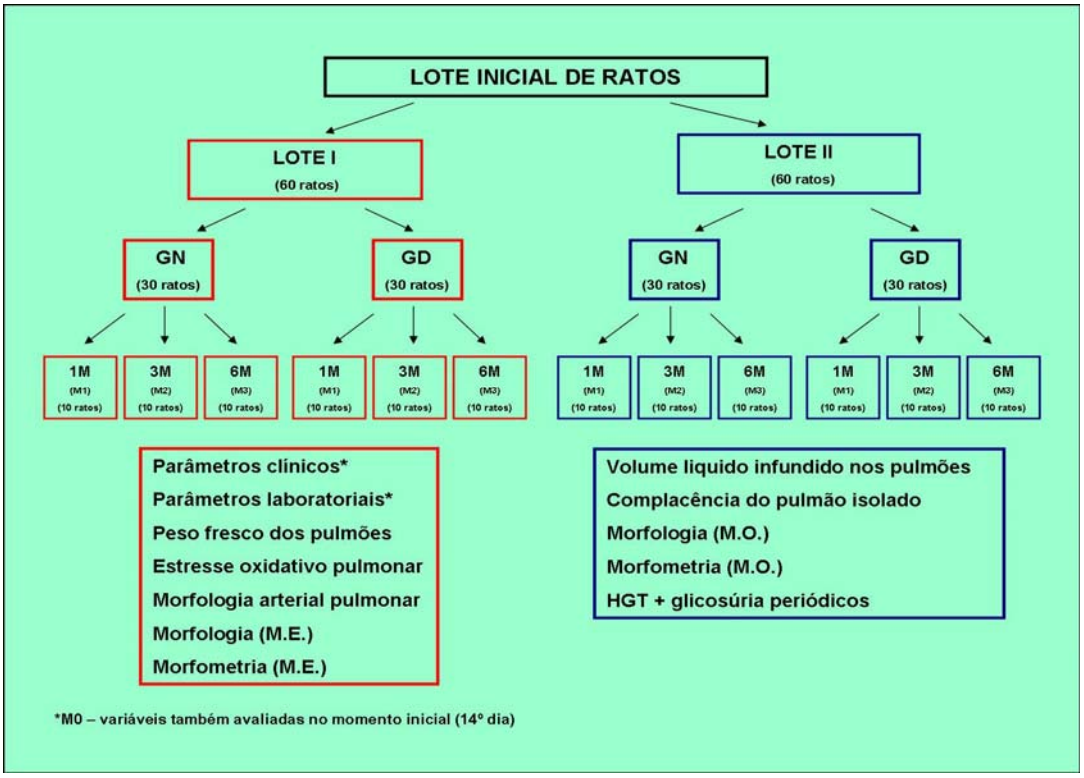


Figura 1 - Diagrama representativo da distribuição dos animais nos seus respectivos grupos e subgrupos de estudo, com as variáveis avaliadas.

6. Parâmetros analisados

No presente estudo foram avaliados os seguintes parâmetros:

Clínicos: estado geral, atividade física, e controles do peso corporal (g), ingestão hídrica (ml/24h), ingestão alimentar (g/12h) e diurese (ml/24h);

Laboratoriais: dosagens de glicose sangüínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada e insulina plasmática;

Biomarcadores do estresse oxidativo: dosagens no tecido pulmonar da concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPO) e da atividade das

enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px);

Exame anatomopatológico:

- Macroscopia: necropsia com exame de todos os órgãos abdominais e torácicos, com ênfase ao peso fresco dos pulmões (pfp), relação pfp/peso corporal, volume de formol infundido nestes órgãos e cálculo da complacência do pulmão isolado. Ênfase também foi dada às complicações infecciosas da pele e tegumento, dos pulmões, da cavidade peritoneal e de outros órgãos;
- Histologia: congelação a fresco do tronco das artérias pulmonares, para a detecção de possíveis depósitos de placas gordurosas na íntima vascular;
- Morfologia dos alvéolos e septos alveolares e morfometria dos alvéolos pulmonares à M.O., com ênfase a: morfologia geral dos alvéolos, septos e interstício alveolar, contagem do nº total de alvéolos, e medidas do perímetro alveolar e da área da superfície alveolar.
- Microscopia eletrônica de transmissão dos septos alveolares, com ênfase à: achados morfológicos ultraestruturais dos septos e interstício alveolares, espessura da membrana basal do epitélio alveolar (MBEA) e espessura da membrana basal do endotélio capilar (MBEC);

7. Técnicas utilizadas

7.1. Anestesia, coleta de sangue e sacrifício

O sacrifício dos animais foi realizado sob efeito de anestesia geral, utilizando ketamina, na dose de 100 mg/Kg de peso corporal, associada à xilazina, na dose de 50 mg/Kg de peso corporal, administradas por via intramuscular. Ambas as drogas foram fabricadas pela Rhobifarma

Ind. Farmacêutica Ltda, Hortolândia – SP. A coleta de sangue no sacrifício foi feita por punção cardíaca, com o tórax aberto. A eutanásia foi feita por exsanguinação volêmica, seguida da secção da veia cava infradiafragmática.

7.2. Obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais

No início do experimento (14º dia após a indução do diabetes ou de seguimento nos animais normais) e, no dia anterior, a cada um dos momentos definidos para o sacrifício (1, 3 e 6 meses), animais do lote I foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, durante um período de 24 horas, sendo oferecida, ao final da tarde, quantidade padronizada de ração e água. Ao término de um período noturno de 12 horas a ração consumida foi registrada (ingestão alimentar em g/12h) e ao término de 24 horas, foram registrados: o volume de água ingerido (ingestão hídrica em ml/24h), a quantidade de urina coletada (diurese em ml/24h) e o peso corporal (g). Um volume de 10 ml da urina coletada foi armazenado para a dosagem de glicose urinária de 24h.

Para obtenção dos parâmetros laboratoriais iniciais e no seguimento tardio, os animais ficaram de jejum por 12h noturnas, sendo o sangue coletado por secção da cauda. Para tanto, os mesmos foram colocados em uma caixa com luzes incandescentes, por um período de 10 minutos, visando aquecê-los e promover a vasodilatação da cauda. A seguir, a cauda foi seccionada em sua extremidade distal, sendo obtidos, por gotejamento, 1,5 ml de sangue para as dosagens bioquímicas. A seguir, a extremidade da cauda seccionada foi amarrada com fio de algodão 2-0, com finalidade hemostática. No seguimento dos animais do lote II, os mesmos foram acompanhados clinicamente, tendo realizado, como referido anteriormente, apenas a dosagem laboratorial inicial da glicose sanguínea (no 7º e 14º dia), seguida de controles periódicos subsequentes deste parâmetro e da glicosúria, nos períodos correspondentes à avaliação e sacrifício dos animais do lote I. A Fig. 2

ilustra as etapas dos procedimentos de obtenção de parâmetros clínicos e metabólicos em animais normais e diabéticos no seguimento.

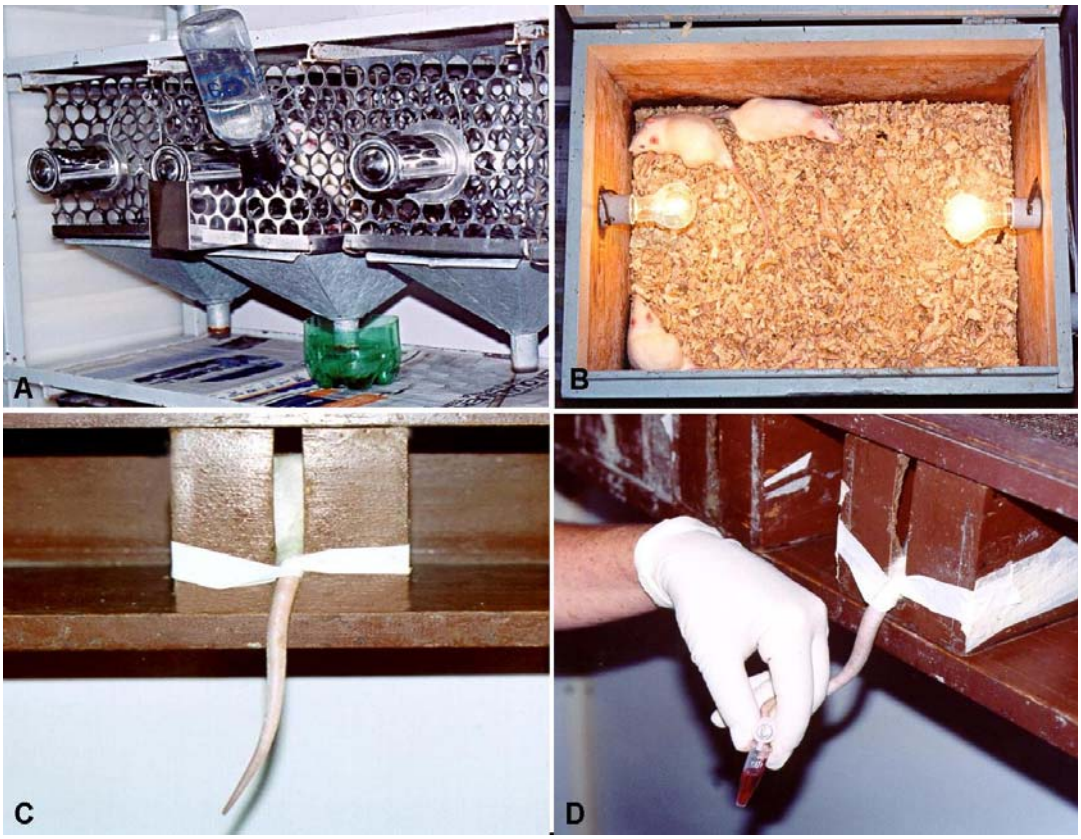


Figura 2 - Ilustração da metodologia utilizada na coleta das variáveis clínicas e laboratoriais estudadas: A) animal em gaiola metabólica para obtenção dos dados clínicos; B) processo de aquecimento dos animais para coleta de sangue da cauda; C) contenção do animal e exposição da cauda; D) coleta de sangue por secção da cauda para realização dos exames bioquímicos no seguimento.

7.3. Indução do diabetes experimental

O diabetes foi induzido pela administração de uma solução aquosa de aloxana a 2% (5,6 dioxiuracil monohidrato – Sigma Co, USA), injetada por via endovenosa, em dose única de 42mg/kg de peso corporal, utilizando-se uma das veias da cauda do animal.

No presente estudo somente foram utilizados animais com sinais clínicos de diabetes grave, glicemia de jejum >250mg/dL e glicose urinária ≥ 3000mg/dL, em duas determinações sucessivas (7 e 14 dias após a indução). Animais diabéticos cujos critérios descritos não foram preenchidos foram excluídos do experimento.

7.4. Exames laboratoriais

As dosagens de glicose sangüínea e urinária foram realizadas pelo método da glicose oxidase com utilização do equipamento Vitro^{R} da Johnson & Johnson. As dosagens de hemoglobina glicosilada foram realizadas por eletroforese, em sangue total, utilizando "kits" da marca Sebia^{R} e a insulina plasmática por radioimunoensaio, em fase sólida, pelo método "coat-a-coat insulun" (DPC-Medlab – São Paulo).

7.5. Análise dos biomarcadores do estresse oxidativo pulmonar

A análise dos biomarcadores do estresse oxidativo pulmonar foi realizada em fragmentos frescos obtidos dos pulmões de cada animal do do lote I do estudo, sendo mantidos congelados em tubos de Ependorff a –86ºC até a realização das dosagens.

No dia da dosagem, os tubos foram resfriados em cubas de isopor com gelo moído a 4ºC. Posteriormente, os fragmentos de pulmão foram homogeneizados e centrifugados a 3000 rpm/5min, sendo determinados no sobrenadante os biomarcadores de interesse (HPO, SOD, CAT, GSH-Px), utilizando reagentes específicos (Cayman Chemical Co – Arbor, MI, USA). As leituras bioquímicas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro para microplacas *SpectraMAX* (modelo 190).

7.6. Análise dos pulmões pós-morte

7.6.1. Peso fresco, volume líquido infundido nos pulmões e cálculo da complacência dos pulmões isolados

Após a exsanguinação, ratos dos 2 grupos experimentais, dos lotes designados, tiveram os seus pulmões removidos em bloco com a traquéia. A seguir, os pulmões foram imediatamente lavados e pesados em balança analítica, para obtenção do peso fresco (pfp) dos órgãos. Cada valor obtido foi dividido pelo peso corporal do animal, para obtenção da relação pfp/peso corporal. Para obtenção do volume de líquido infundido nos pulmões, a traquéia dos animais foi canulada e os órgãos perfundidos com uma solução de formol tamponado a 10%, utilizando um sistema de perfusão dotado de uma coluna líquida com pressão constante de perfusão de 20 cm de H_2O. A seguir, o volume de líquido infundido nos pulmões foi aferido pela quantidade de formol utilizada para completar a distensão pulmonar, tendo como referencial o início da transudação de formalina pelos pulmões.

A complacência dos pulmões isolados foi obtida indiretamente pela razão entre o volume de líquido infundido nestes órgãos, em mililitros (ΔV) pela sua pressão de perfusão, em cm de H_2O, que neste experimento foi mantida constante em 20 cm de H_2O. A Fig. 3 ilustra a metodologia utilizada no preparo dos pulmões para a obtenção do volume de líquido infundido nos órgãos, o cálculo da complacência do pulmão isolado e a fixação para realização do estudo à microscopia ótica.

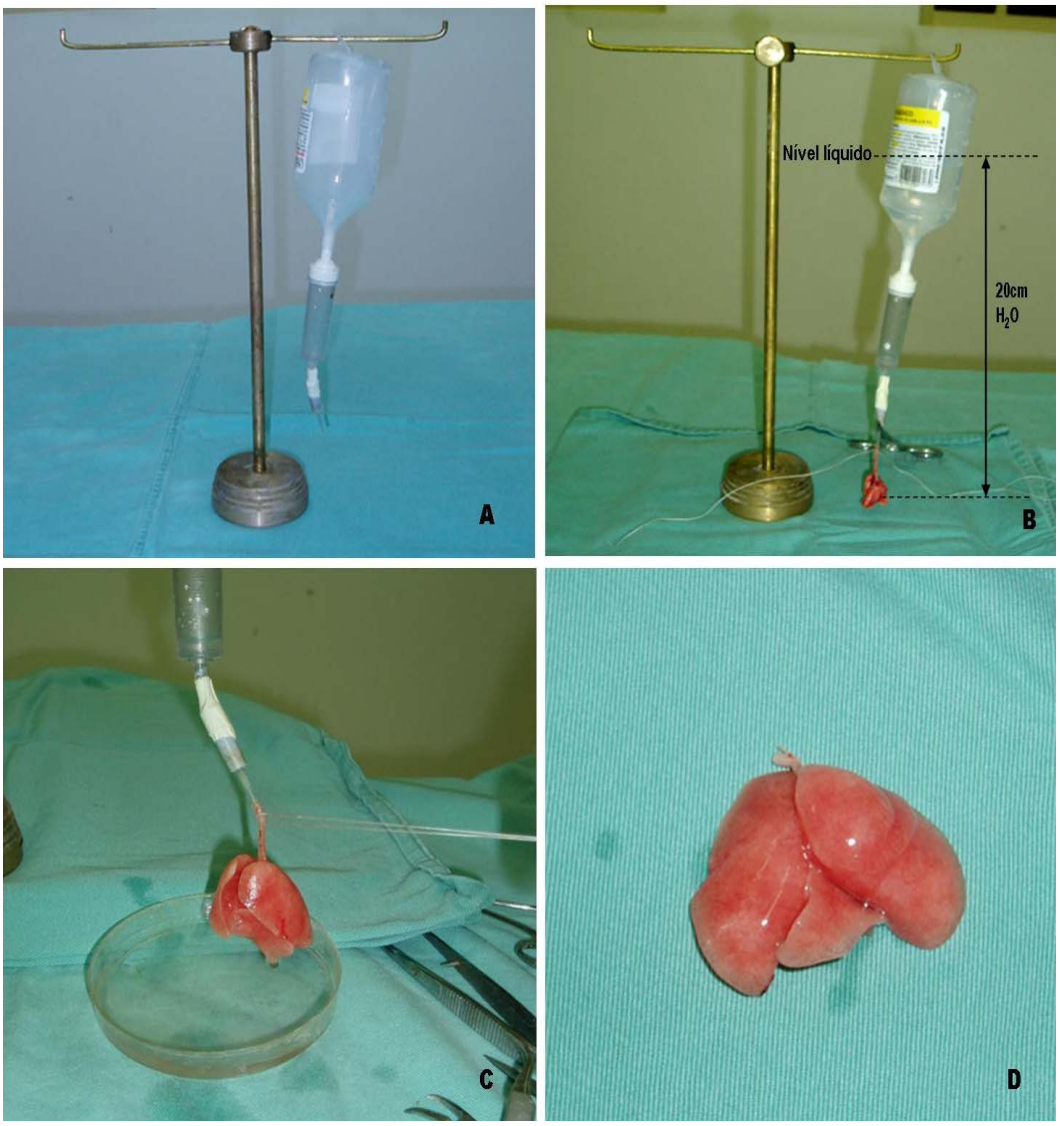


Figura 3 - Metodologia utilizada na perfusão dos pulmões para a medida do volume de líquido infundido, cálculo da complacência e realização do estudo à microscopia ótica. (A) sistema especialmente construído para a perfusão dos pulmões, com formol tamponado; (B) pulmões preparados por entubação traqueal, para serem perfundidos com uma pressão de 20cm de H_2O; (C) pulmões após a perfusão; (D) detalhe dos pulmões distendidos, preparados para a fixação.

7.6.2. Exame histopatológico

Escolhidos por sorteio, os pulmões de 5 ratos de cada subgrupo de estudo (1, 3 e 6 meses), em cada grupo experimental, que tiveram os seus pulmões removidos e perfundidos com formalina, foram mantidos imersos nesta solução, por um período de 48h, para a fixação. Após este período, fragmentos representativos de todos os lobos pulmonares foram seccionados, incluídos em parafina e processados para análise à microscopia ótica (M.O.), utilizando a coloração pela hematoxilina & eosina (HE). Para este objetivo foram analisados 15 órgãos de cada grupo experimental, ou seja, 5 pulmões para cada subgrupo de ratos sacrificados com 1, 3 e 6 meses de seguimento.

7.6.2.1. Análise de depósitos gordurosos nos vasos arteriais pulmonares

Para a análise da presença de depósitos gordurosos na íntima das artérias pulmonares e dos seus troncos, os vasos de 3 ratos, escolhidos por sorteio, em cada subgrupo de estudo (1, 3, e 6 meses), em cada grupo experimental, foram cuidadosamente dissecados, imediatamente após o sacrifício, utilizando uma lupa com aumento de 2,5x (Kheeler – London/UK). Os vasos retirados foram preservados estendidos em papel de filtro, imersos em solução salina gelada, até o congelamento dos espécimes no laboratório. Os fragmentos obtidos ao micrótomo de congelação, contendo um segmento arterial em "Y", foram processados para coloração através da técnica do "oil red", tendo sido analisados 9 segmentos arteriais, de cada grupo experimental.

7.6.2.2. Análise morfométrica dos pulmões à M.O.

Para o estudo morfométrico dos pulmões à M.O., as medidas quantitativas do número total de alvéolos por campo, do perímetro e da área da superfície alveolar foram efetuadas em 50 alvéolos de cada um

dos 5 ratos sorteados para a análise, em cada subgrupo de estudo, de cada grupo experimental, sem o conhecimento prévio do grupo ao qual o animal pertencia; totalizando 250 alvéolos analisados/subgrupo ou 750 alvéolos/grupo experimental. As análises foram efetuadas com o auxílio de um microscópio óptico Nikon Microphot-FXA, ligado a um equipamento de análise digital de imagens, compatível com o padrão IBM-PC "software" KS-300.

Através deste equipamento, as imagens alveolares visualizadas ao microscópio foram inicialmente captadas por uma câmara digital e transferidas para a tela de um computador, onde foram identificadas e salvas em formato "TIFF".

Para a realização das medidas morfométricas as imagens armazenadas foram recuperadas dos arquivos gravados. A seguir, foi utilizada uma ferramenta do programa KS–300, designada "Treshold RGB", que consiste de um processo de segmentação de cores (vermelho, verde e azul), que permite selecionar as áreas de interesse a serem medidas nas imagens captadas.

Para tanto, foi feito um ajuste manual dos canais de cores, até que a imagem a ser medida aparecesse na galeria de imagens do programa, com a tonalidade de cor escolhida pelo examinador. A seguir, era gerada uma "mascara" sobre a imagem editada, a qual tinha a função de delimitar o contorno histográfico das estruturas a serem medidas. A imagem era, então, reeditada pelo examinador, dando-lhe a opção de excluir alvéolos, onde o campo selecionado foi cortado tangencialmente ou continha artefatos técnicos de preparação. Definido o padrão histográfico desejável, as medidas de interesse foram realizadas automaticamente pelo "software", utilizando a ferramenta "measure", cujas medidas em pixels foram convertidas em μm ou μm^2, utilizando a ferramenta "automatic load".

Para a contagem de alvéolos a seqüência de procedimentos realizados foi idêntica. Todavia, o nº final de alvéolos foi obtido pela pontuação manual, com o "mouse", de cada um dos alvéolos presentes nos campos histológicos analisados. O número total de alvéolos/μm^2 foi

obtido pela divisão do número de alvéolos contados, em cada campo histológico, por uma constante K= 1,2549.

As Figs. 4 (A, B, C e D) e 5 (A e B) ilustram a seqüência metodológica que foi seguida durante a obtenção das medidas morfométricas dos pulmões.

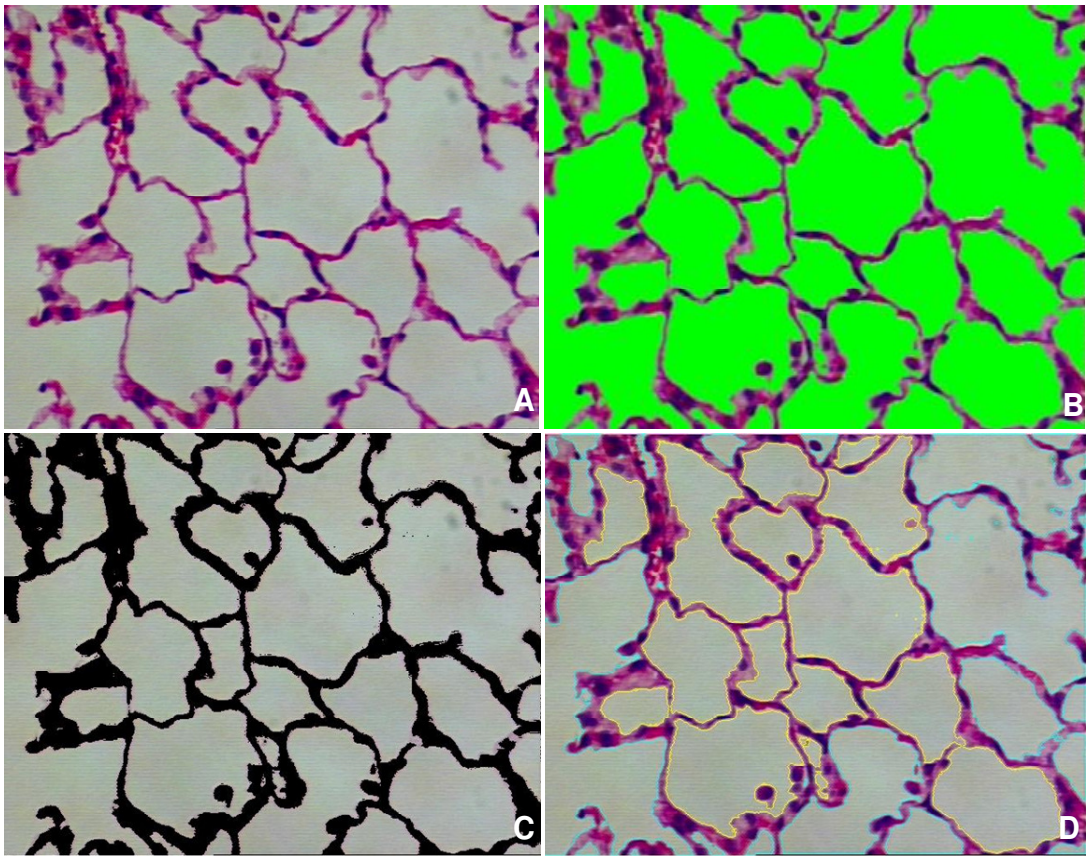


Figura 4 – Sequência metodológica da realização das medidas morfométricas da área alveolar e do perímetro alveolar, com auxílio do "software" KS–300. Em A – imagem selecionada para ser medida; B – ajuste manual dos canais de cores (RGB), com seleção das áreas a serem medidas; C – geração de uma "mascara" sobre a imagem editada, a qual tinha a função de delimitar o contorno histográfico das estruturas a serem medidas; D- delimitação do contorno histográfico das estruturas a serem medidas (linhas amarelas), com exclusão de áreas tangenciais e com artefatos técnicos de preparação.

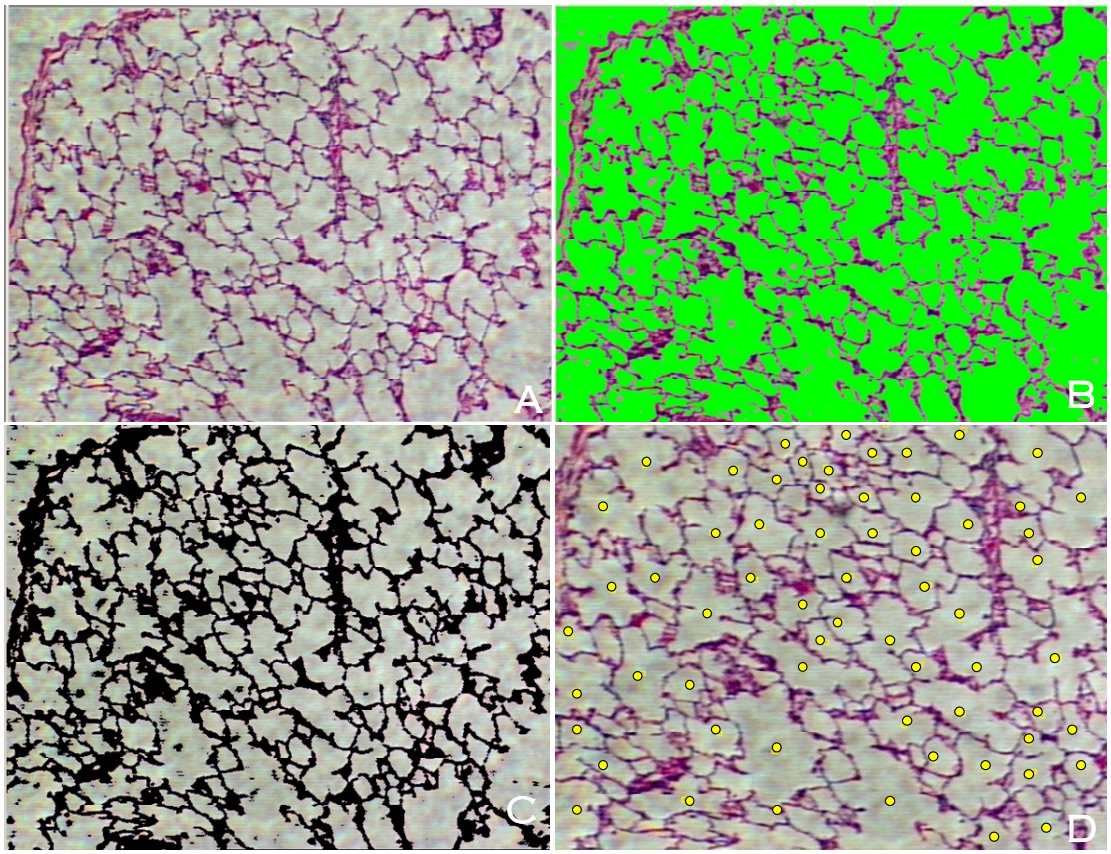


Figura 5 – Ilustração dos procedimentos utilizados para a contagem do número de alvéolos/μm^2. Em A – campo histológico a ser contado; B – ajuste manual dos canais de cores (RGB), com seleção dos alvéolos a serem contados; C – obtenção de "máscara" com delimitação do contorno histográfico das estruturas a serem contadas; D - pontuação manual (pontos amarelos), com o "mouse", de cada um dos alvéolos presentes no campo histológico.

7.6.2.3. Análise morfométrica da membrana basal dos septos alveolares à M.E.

Para o estudo dos septos alveolares à M.E., os pulmões de 3 ratos/subgrupo de animais sacrificados com 1, 3 e 6 meses de seguimento, em cada um dos 2 grupos experimentais, foram sorteados

para a análise. De cada rato, 5 blocos de tecido pulmonar foram obtidos; de cada bloco, 6 eletromicrografias dos septos alveolares foram obtidas, totalizando 90 eletromicrografias analisadas/subgrupo de estudo ou 270 eletromicrografias analisadas/grupo experimental.

Para o processamento do tecido pulmonar utilizado nas análises eletrônicas foi obedecida à seguinte padronização: fixação dos pulmões em solução de glutaraldeído a 2%; lavagem dos tecidos em tampão fosfato 0,1M; pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%; desidratação em soluções de concentrações crescentes de acetona; infiltração do tecido em solução de araldite; obtenção de cortes semifinos de 0,5 micras, com auxílio de um micrótomo; coloração dos cortes com azul de metileno a 1%; seleção das áreas de interesse no microscópio de luz; trimagem manual dos blocos; obtenção de cortes ultrafinos como o uso de ultramicrótomo Leica Ultracut UCT; contrastação do tecido com acetato de uranila; lavagem seqüencial com álcool; contrastação com citrato de chumbo; lavagem dos cortes com água destilada; análise dos cortes preparados ao microscópio eletrônico de transmissão Philips – CM 100, com obtenção das eletromicrografias com filme 35 mm da Kodak Eastman 502 e obtenção de cópias em papel fotográfico da Kodak (Kodachrome RC Print). As micrografias foram feitas com aumentos variando entre 1.150x e 8.400x, com magnificação final entre 5.750x e 42.000x, sendo as mesmas posteriormente digitalizadas em “scanner” da HP Scanjet 3800, com resolução ajustada para 300 dpi.

As variáveis analisadas à M.E. foram: espessura da membrana basal do epitélio alveolar (MBEA), espessura da membrana basal do endotélio capilar (MBEC), análise descritiva dos septos alveolares, interstício alveolar, epitélio alveolar (pneumócitos tipo 1) e pneumócitos tipo 1I.

As medidas da espessura da MBEA e da MBEC foram realizadas pelo método semi-automático de análise de imagens, utilizando o “software” Qwin Lite, versão 3.1.

Para tanto, foi utilizada a técnica originalmente descrita por SIPERSTEIN et al. (1968), modificada por WILLIAMSON et al. (1969), e

depois por LERCO (2004), em nosso laboratório, onde a espessura da MB foi analisada em 4 pontos distintos, sendo considerados os valores mínimos, médios e máximos de cada medida. Foram excluídos das medidas todas as estruturas cortadas tangencialmente e/ou com artefatos de preparação.

Para a realização das medidas morfométricas foi utilizada a ferramenta "measure" do "software" Qwin Lite, a qual permitia, através de um aplicativo, demarcar exatamente a extensão da MB a ser medida.

Os valores da espessura da MB foram expressos em micrômetros (μm) de espessura mínima, média e máxima.

8. Análise Estatística

O estudo das variáveis clínicas (peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese), laboratoriais (glicose sangüínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada e insulina plasmática) e dos biomarcadores do estresse oxidativo (HPO, SOD, CAT e GSH-Px), segundo os grupos, normal e diabético, e os seus respectivos momentos de sacrifício, foi realizado através da Análise de Variância, no delineamento inteiramente casualizado, complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey (MONTGOMERY, 1991), ou pela análise não-paramétrica de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, para as variáveis que tiveram resultados com distribuição heterogênea.

O estudo das variáveis histopatológicas estudadas à M.O. foi feito utilizando a Análise de Variância e o teste "t" de Student; o estudo das variáveis pulmonares pela M.E. (morfometria) foi realizado pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney usando o software Sigma-Instat 2.0.

Todas as discussões estatísticas do estudo foram realizadas no nível de 5% de significância ou $P<0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Achados clínicos e laboratoriais

Ratos controles (GN) apresentaram parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com os observados em animais de mesma linhagem, em todos os períodos de avaliação do experimento. Não ocorreram óbitos neste grupo. Em contraste, ratos diabéticos (GD), sem qualquer tratamento da doença, evoluíram com dificuldade acentuada de ganho de peso corporal (Fig. 6) e aumento significante ($P<0,01$) da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparados com animais controles - GN (Tabs. 1 a 4 e Fig. 7 – A, B, C e D). Os níveis de glicose sanguínea, glicose urinária e de hemoglobina glicosilada também foram elevados em ratos diabéticos, sendo os valores plasmáticos da insulina significantemente baixos ($P<0,001$).

Ratos diabéticos também mantiveram sustentada hiperglicemia e glicosúria +++, durante todos os períodos de seguimento do experimento, quando comparados com os respectivos controles, em ambos os lotes de estudo. Os resultados bioquímicos dos animais do lote I são apresentados nas tabelas numeradas de 5 a 8 e ilustrados na Fig. 8 – A, B, C e D. Os resultados do controle periódico da glicemia, por análise digital (HGT), nos animais do lote II, são mostrados na Tab. 9 e Figura 9.

Aproximadamente 32% do lote inicial de animais que receberam aloxana foram a óbito nos primeiros 14 dias após a indução do diabetes, em decorrência de distúrbios metabólicos e/ou dos efeitos tóxicos da droga. Cerca de 22% dos animais que receberam aloxana foram refratários à droga, não tendo desenvolvido diabetes, ou a apresentaram na forma leve ou moderada, tendo sido excluídos do estudo.

Dos animais colocados em seguimento nos grupos diabéticos, 7 animais morreram no seguimento tardio (até 6 meses), em decorrência de pneumonia. Um animal diabético morreu em decorrência de

cetoacidose diabética. Não houve complicações nos animais do GN de ambos os lotes de animais.

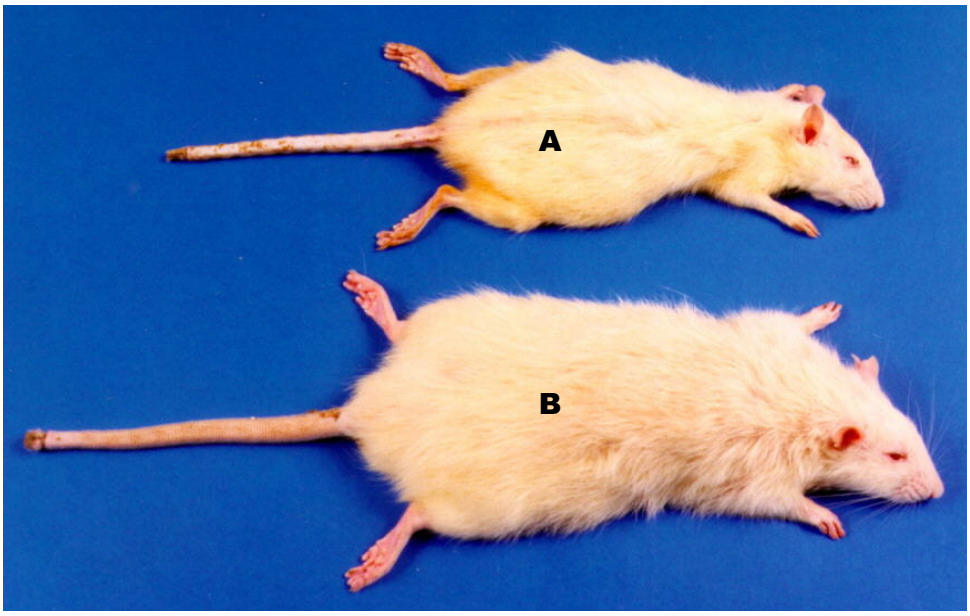


Figura 6 - Ilustração comparativa do estado nutricional de um rato diabético (A) e de um rato normal (B) sacrificados com 6 meses de seguimento.

Tabela 1 – Médias ± desvios-padrão da evolução do peso corporal (g) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início	1M	3M	6M
GN	260,5 ± 10,3	350,5 ± 15,6	436,4 ± 30,0	532,0 ± 47,3
GD	265,4 ± 8,4	250,2 ± 10,5*	288,2 ± 18,6*	295,4 ± 20,8*

*GN = GD no início; GN > GD para P<0,01, com 1, 3 e 6 meses de seguimento

Tabela 2 – Médias ± desvios-padrão da ingestão hídrica (ml/24h) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início	**1M**	**3M**	**6M**
GN	50,4 ± 17,5	50,0 ± 8,1	45,6 ± 13,2	52,4 ± 12,0
GD	112,2 ± 32,0*	136,4 ± 12,4*	128,5 ± 10,8*	140,6 ± 15,6*

*GN < GD para P<0,01 no início e com 1, 3 e 6 meses de seguimento

Tabela 3 – Médias ± desvios-padrão da ingestão alimentar (g/12h) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início	**1M**	**3M**	**6M**
GN	20,6 ± 5,0	23,0 ± 5,8	23,5 ± 7,2	22,5 ± 4,0
GD	35,0 ± 7,4*	32,8 ± 6,0*	32,0 ± 5,4*	30,0 ± 4,2*

*GN < GD para P<0,05 no início e com 1, 3 e 6 meses de seguimento

Tabela 4 – Médias ± desvios-padrão da diurese (ml/24h) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início	**1M**	**3M**	**6M**
GN	8,0 ± 1,8	10,2 ± 2,5	8,8 ± 3,2	10,5 ± 2,5
GD	110,6 ± 36,5*	146,6 ± 32,8*	125,0 ± 30,3*	138,4 ± 28,8*

*GN < GD para P<0,01 no início e com 1, 3 e 6 meses de seguimento

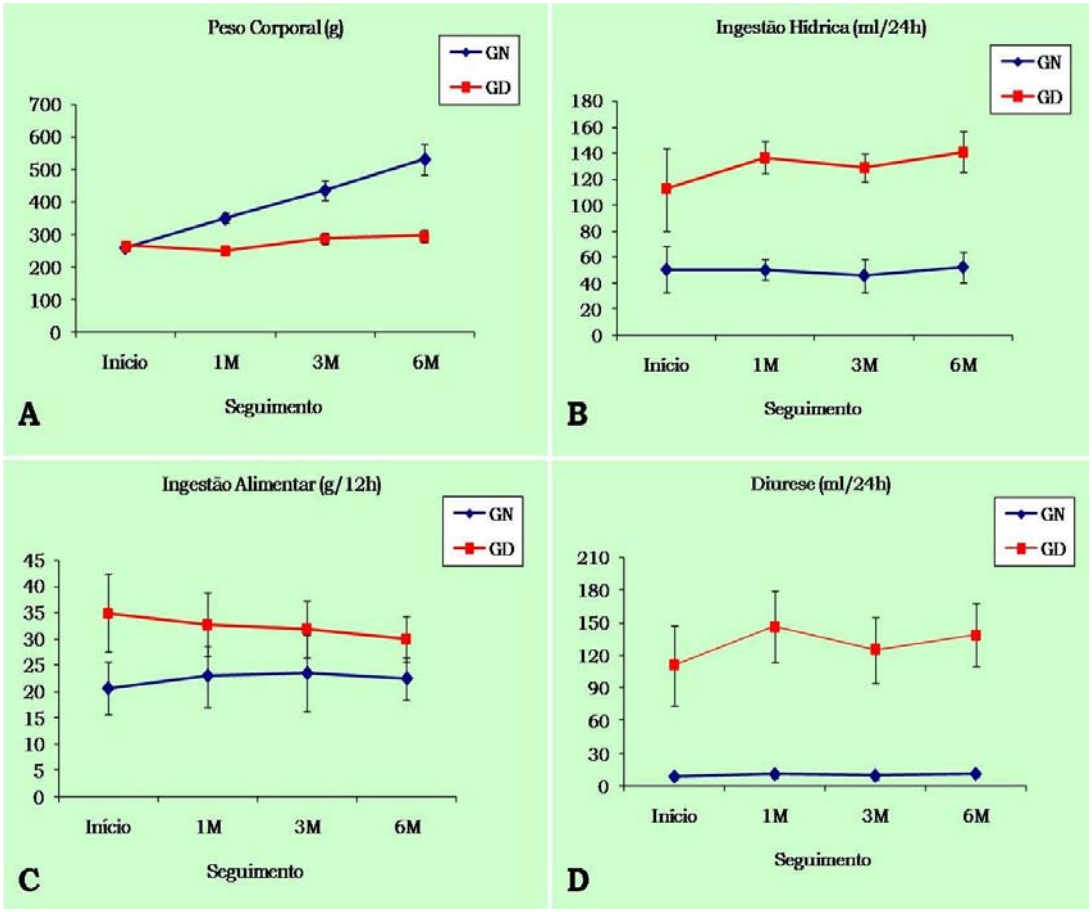


Figura 7 – Evolução do peso corporal (A), ingestão hídrica (B), ingestão alimentar (C) e diurese (D), em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

Tabela 5 – Médias ± desvios-padrão da glicemia de jejum (mg/dl) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	**Seguimento**			
	Início	**1M**	**3M**	**6M**
GN	116,6 ± 12,5	108,4 ± 10,5	110,5 ± 11,3	106,0 ± 12,4
GD	367,4 ± 43,5*	390,6 ± 46,8*	376,8 ± 38,9*	458,4 ± 40,2*

*GN < GD para P<0,01 no início e com 1, 3 e 6 meses de seguimento

Tabela 6 – Médias ± desvios-padrão da glicose urinária (mg/dl) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início	**1M**	**3M**	**6M**
GN	10,4 ± 6,5	10,8 ± 4,6	9,6 ± 5,0	8,8 ± 4,6
GD	4830,0 ± 930,0*	4112,6 ± 1005,0*	5326,4 ± 978,0*	4946,5 ± 1040,0*

*GN < GD para P<0,01 no início e com 1, 3 e 6 meses de seguimento

Tabela 7 – Médias ± desvios-padrão da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA_1C) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início	**1M**	**3M**	**6M**
GN	4,7 ± 0,2	4,3 ± 0,4	4,2 ± 0,5	4,6 ± 0,8
GD	10,6 ± 0,5*	12,7 ± 0,8*	11,5 ± 1,0*	11,8 ± 1,0*

* GN < GD para P<0,01 no início e com 1, 3 e 6 meses de seguimento

Tabela 8 – Médias ± desvios-padrão da insulina plasmática (μU/ml) nos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início	**1M**	**3M**	**6M**
GN	42,3 ± 4,3	44,5 ± 4,0	40,3 ± 4,6	42,4 ± 4,5
GD	20,4 ± 3,1*	22,6 ± 2,7*	22,8 ± 3,5*	25,6 ± 2,3*

*GN > GD para P<0,001 no início e com 1, 3 e 6 meses de seguimento

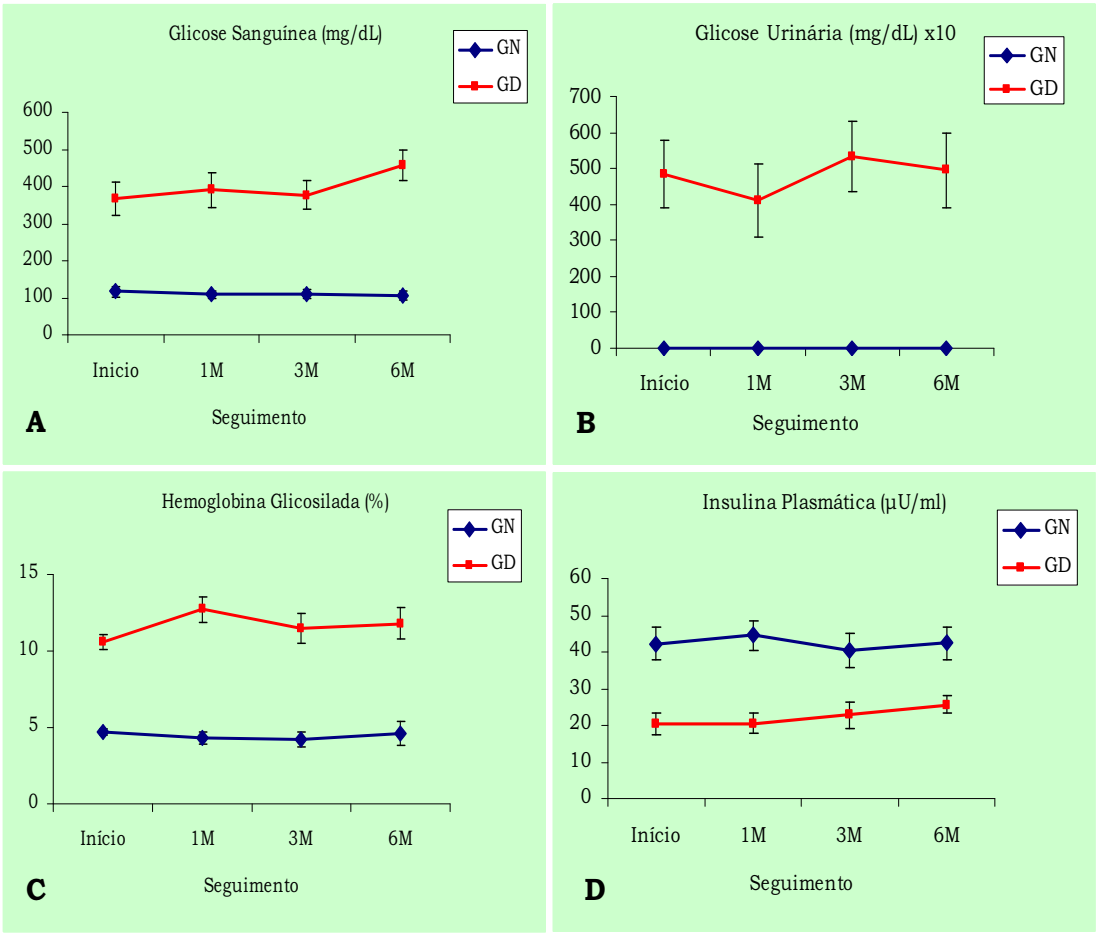


Figura 8 – Evolução da glicemia de jejum (A), glicose urinária (B), hemoglobina glicosilada (C) e insulina plasmática (D), em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

Tabela 9 – Médias ± desvios-padrão do controle periódico digital da glicemia de jejum (mg/dl), nos 2 grupos experimentais, de animais do lote II, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início	**1M**	**3M**	**6M**
GN	102,6 ± 10,4	117,4 ± 9,7	100,8 ± 10,3	115,0 ± 11,6
GD	373,8 ± 38,5*	374,2 ± 40,2*	406,2 ± 39,5*	418,0 ± 42,4*

*GN < GD para P<0,01 no início e com 1, 3 e 6 meses de seguimento

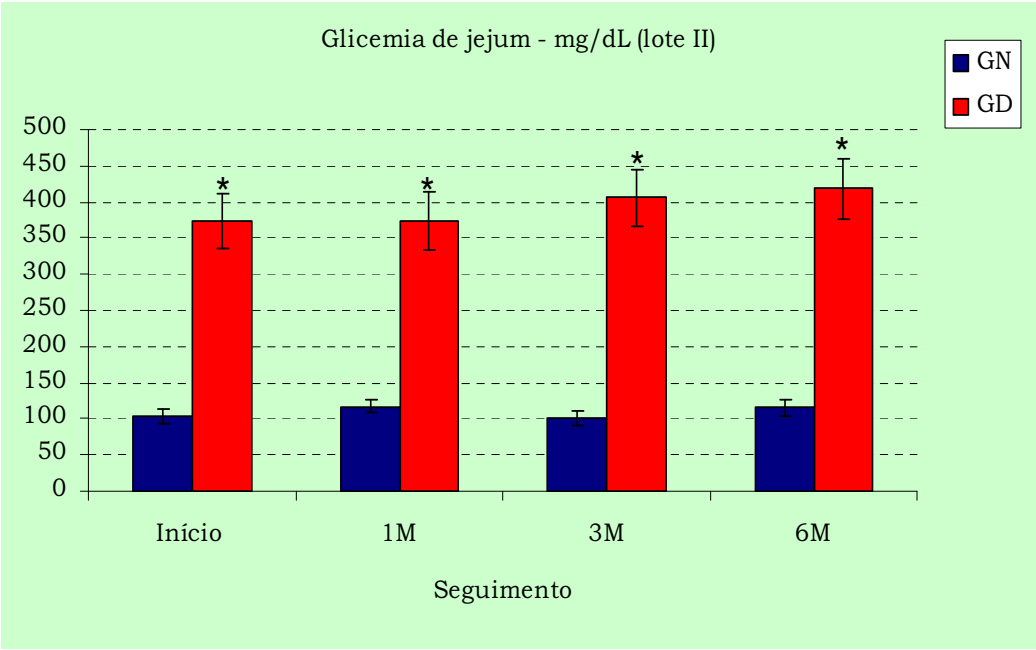


Figura 9 – Evolução da glicemia de jejum em ratos normais e diabéticos do lote II do estudo, avaliada por análise digital (HGT), ao longo do seguimento.

2. Biomarcadores do estresse oxidativo pulmonar

A concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPO) no tecido pulmonar foi significantemente elevada (P<0,01) em animais do GD, nas dosagens efetuadas com 1, 3 e 6 meses de seguimento, quando comparadas com as observadas em ratos do GN. Contrariamente, a atividade antioxidante do tecido pulmonar ligada às enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px) foram reduzidas nestes períodos, sendo significantemente baixas (P<0,01) após 3 meses de indução do diabetes. Observou-se, também, que o estresse oxidativo pulmonar guarda estreita relação com o tempo de duração do diabetes, sendo mais intenso nos pulmões de animais sacrificados mais tardiamente, com 6 meses de seguimento. A Tab. 10 e a Fig. 10 – A, B, C e D mostram os resultados encontrados em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de sacrifício.

Tabela 10 - Médias ± desvios-padrão da concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPO) e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px), nos 2 grupos experimentais, nos respectivos momentos de sacrifício.

		Seguimento		
Parâmetros	Grupos	1M	3M	6M
HPO	GN	40,67 ± 0,52	41,21 ± 0,49	46,58 ± 0,78
(nmol/g)	GD	71,30 ± 0,53*	77,80 ± 0,55*	98,25 ± 0,86*
SOD	GN	81,37 ± 0,64	79,48 ± 1,05	70,47 ± 0,93
(U/g)	GD	78,40 ± 1,28(ns)	53,23 ± 0,59*	47,53 ± 1,20*
CAT	GN	67,84 ± 0,74	64,75 ± 1,46	66,48 ± 0,98
(µmol/g)	GD	66,50 ± 1,15 (ns)	50,76 ± 1,02*	41,58 ± 1,23*
GSH-Px	GN	11,63 ± 0,63	10,30 ± 0,50	6,68 ± 0,37
(µmol/min/g)	GD	10,86 ± 0,76(ns)	5,51 ± 0,32*	3,27 ± 0,56*

HPO : *GN < GD para P < 0,01 com 1, 3 e 6 meses.
SOD/CAT/GSH-Px : (ns)GN = GD para P > 0,10 com 1 mês
SOD/CAT/GSH-Px: *GN > GD para P < 0,01 com 3 e 6 meses.

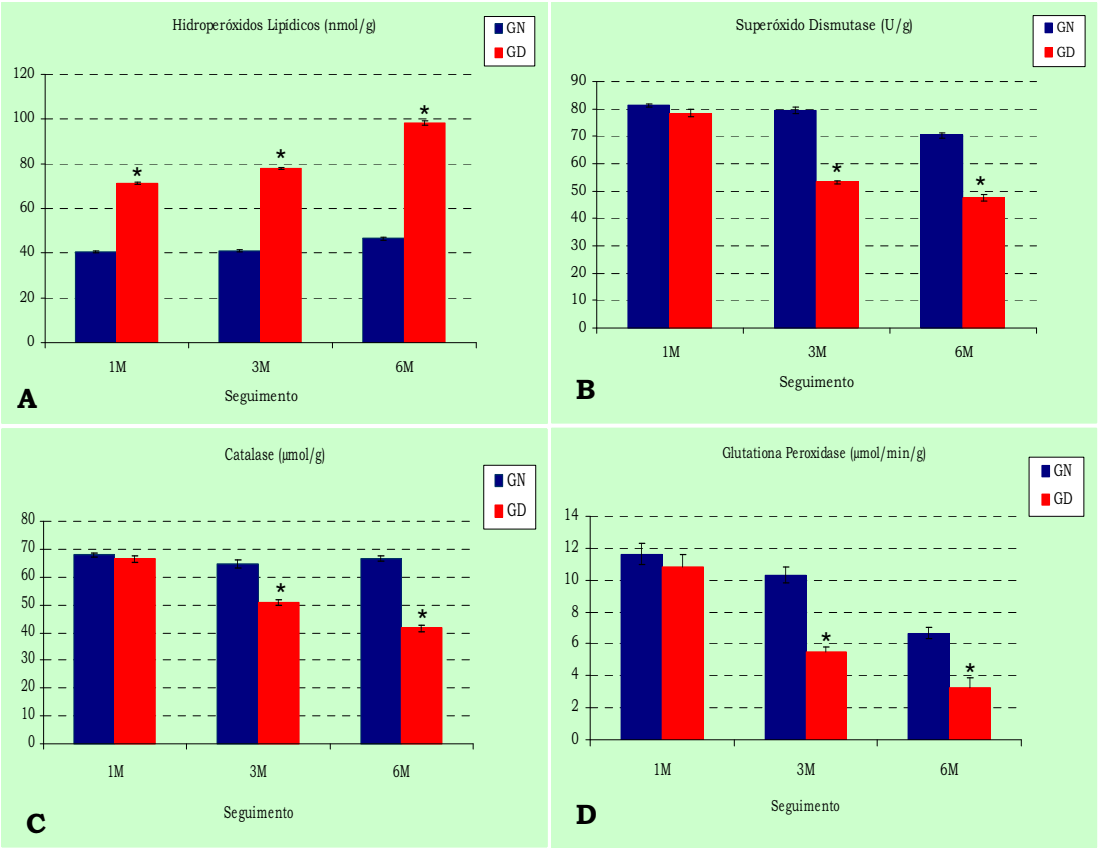


Figura 10 - Evolução dos biomarcadores do estresse oxidativo pulmonar: hidroperóxidos lipídicos (A), superóxido dismutase (B), catalase (C) e glutationa peroxidase (D), em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

3. Achados gerais macroscópicos de necrópsia

Durante a necrópsia observou-se que ratos do GD apresentaram significativa redução da massa muscular e gordurosa de todo o corpo, quando comparados com ratos do GN. Esta debilidade da massa corpórea foi mais evidente em animais sacrificados com 6 meses de seguimento. Ratos do GD também apresentaram episódios frequentes de infecções da pele (piodermites) e também estiveram mais sujeitos a infestações por piolhos.

Em 80% dos ratos diabéticos foi observada catarata bilateral em diferentes graus de maturação, sendo mais prevalente em animais diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Neste subgrupo de estudo, 100% dos animais sacrificados estavam completamente cegos devido à opacificação total do cristalino.

Distensão e dilatação do intestino grosso (megacólon), preponderantemente mais intensa no cólon direito, também foi um achado freqüente na necrópsia dos animais diabéticos, acometendo quase que a totalidade dos animais sacrificados a partir do 3º. mês de doença. A Fig. 11 ilustra comparativamente o aspecto geral dos olhos de um animal normal e de um diabético, sacrificados com 6 meses de seguimento, e a Fig. 12 o aspecto usual do intestino grosso de um animal sacrificado com 6 meses de diabetes.

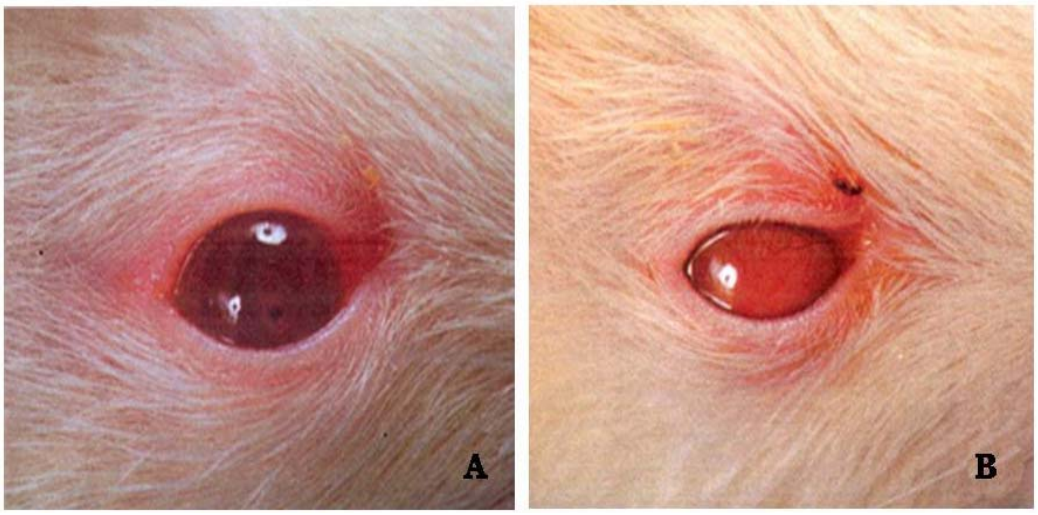


Figura 11 - Ilustração do olho de um animal normal (A) e de um rato diabético (B) sacrificados com 6 meses de seguimento. Note a total opacificação do cristalino no animal diabético.

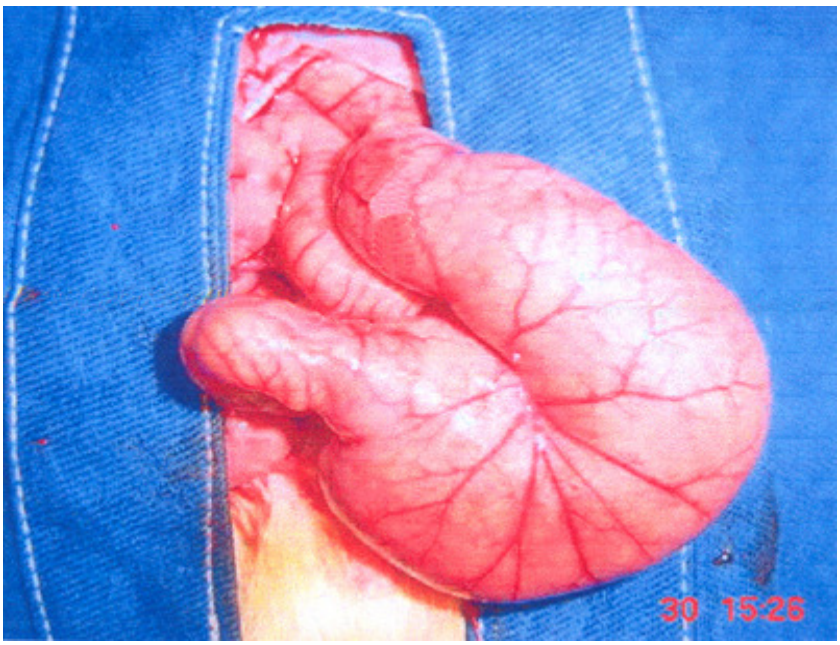


Figura 12 - Aspecto geral do cólon de um animal diabético sacrificado com 6 meses de diabetes. Observe a grande dilatação do cecum deste animal.

3.1. Achados macroscópicos dos pulmões

Infecção pulmonar foi constatada na autópsia de 7 animais diabéticos do estudo, revelada por congestão e hepatização do parenquima pulmonar. Um destes animais com pneumonia, também apresentou abscesso pulmonar e empiema.

O peso fresco dos pulmões foi significantemente reduzido ($P<0,001$) em ratos do GD, quando comparado com ratos GN. Entretanto, considerada a relação de proporção entre o peso fresco dos órgãos e o peso corporal dos animais, ratos do GD apresentaram o peso dos pulmões significantemente maior ($P<0,05$) que o observado em ratos do GN, a partir do 3º mês de seguimento (Tabs. 11 e 12 e Figs.13 e 14).

Tabela 11 – Médias ± desvios-padrão do peso fresco dos pulmões (g) em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

Grupos	Seguimento	Parâmetro
		Peso fresco (g)
GN	1M	2,20 ± 0,21
	3M	2,37 ± 0.36
	6M	2,16 ± 0,26
GD	1M	1,52 ± 0,11*
	3M	1,88 ± 0,87*
	6M	1,83 ± 0,78*

* GD < GN para P<0,001 após 1, 3 e 6 meses de seguimento

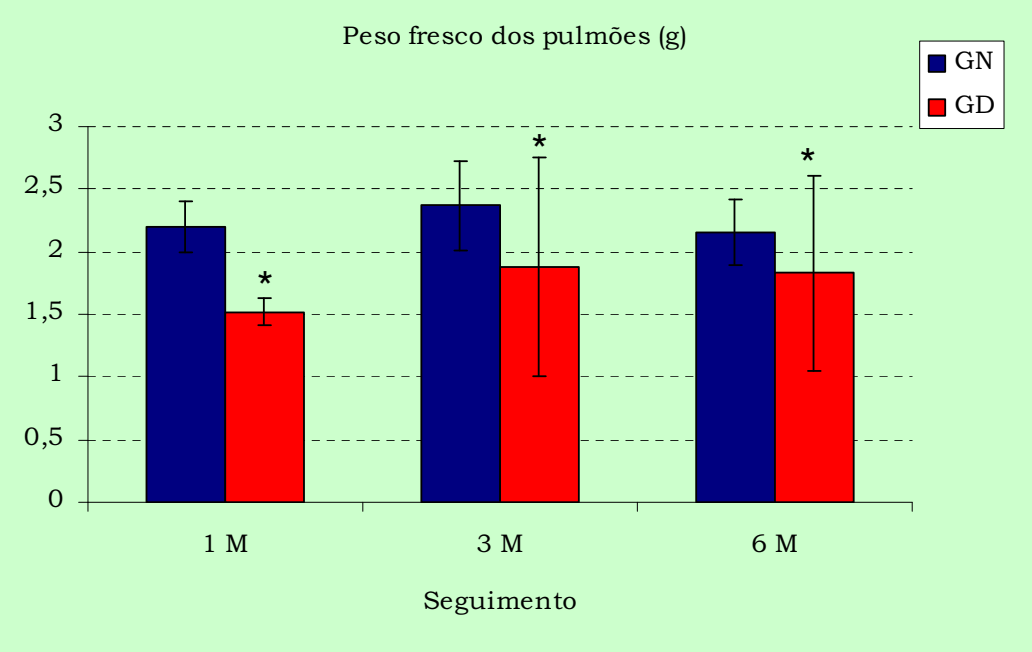


Figura 13 - Peso fresco (g) dos pulmões de ratos normais e diabéticos nos 2 grupos experimentais, durante o seguimento.

Tabela 12 - Relação do peso fresco dos pulmões (pfp) em função do peso corporal (pc) dos animais, nos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

Grupos	Seguimento (meses)	Parâmetros		
		Peso fresco pulmões (g)	Peso corporal (g)	Relação pfp/pc
GN	1	2,20 ± 0,21	350,5 ± 15,6	0,0062
	3	2,37 ± 0,36	436,4 ± 30,0	0,0054
	6	2,16 ± 0,26	532,0 ± 47,3	0,0040
GD	1	1,52 ± 0,11	250,2 ± 10,5	0,0060^{ns}
	3	1,88 ± 0,87	288,2 ± 18,6	0,0065*
	6	1,83 ± 0,78	295,4 ± 20,8	0,0061*

^{ns} GN = GD para P>0,10 no 1º mês, * GN<GD para P<0,05 com 3 e 6 meses de seguimento.

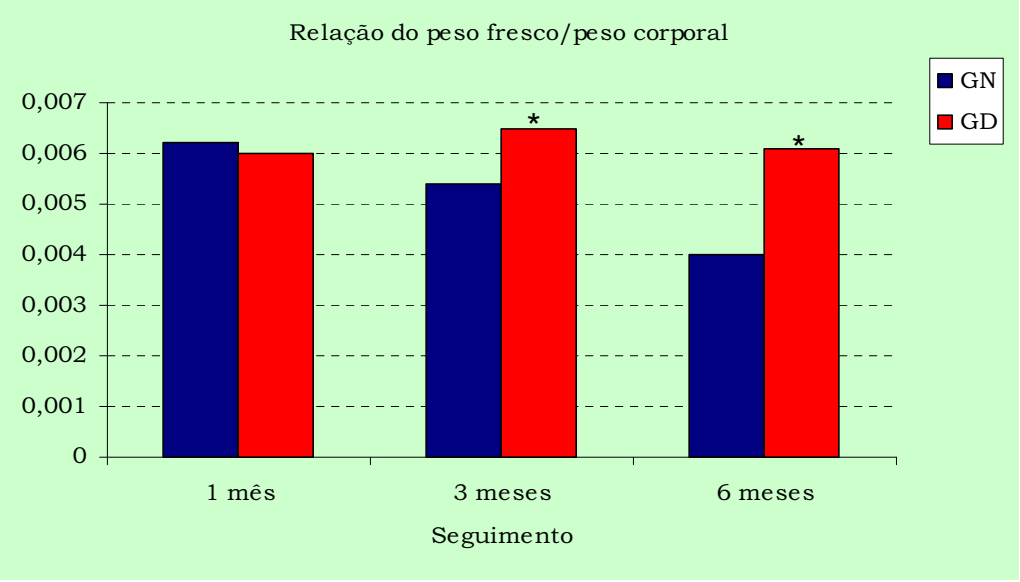


Figura 14 - Relação do peso fresco dos pulmões em função do peso corporal dos animais, nos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

O volume de líquido infundido nos pulmões e a complacência destes órgãos isolados (ΔV/P) também foram significantemente reduzidos (P<0,0001) em ratos do GD quando comparados com o observado em ratos do GN, em todos os períodos de sacrifício do experimento. (Tab. 13 e Figs.15 e 16).

Tabela 13 – Médias ± desvios-padrão dos valores do volume líquido infundido nos pulmões (ml) e da complacência do pulmão isolado (ml/cm H_2O) em ratos normais e diabéticos, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

Grupos	Seguimento	Parâmetros	
		Volume infundido (ml)	Complacência do pulmão isolado (ml/cm H_2O)
GN	1M	12,15 ± 0,11	0,6075 ± 0,008
	3M	12,58 ± 0,07	0,6290 ± 0,020
	6M	12,66 ± 0,76	0,6330 ± 0,013
GD	1M	9,07 ± 0,08*	0,4538 ± 0,004*
	3M	9,00 ± 0,16*	0,4502 ± 0,008*
	6M	8,96 ± 0,94*	0,4480 ± 0,008*

* GD < GN para P< 0,0001 após 1, 3 e 6 meses de seguimento

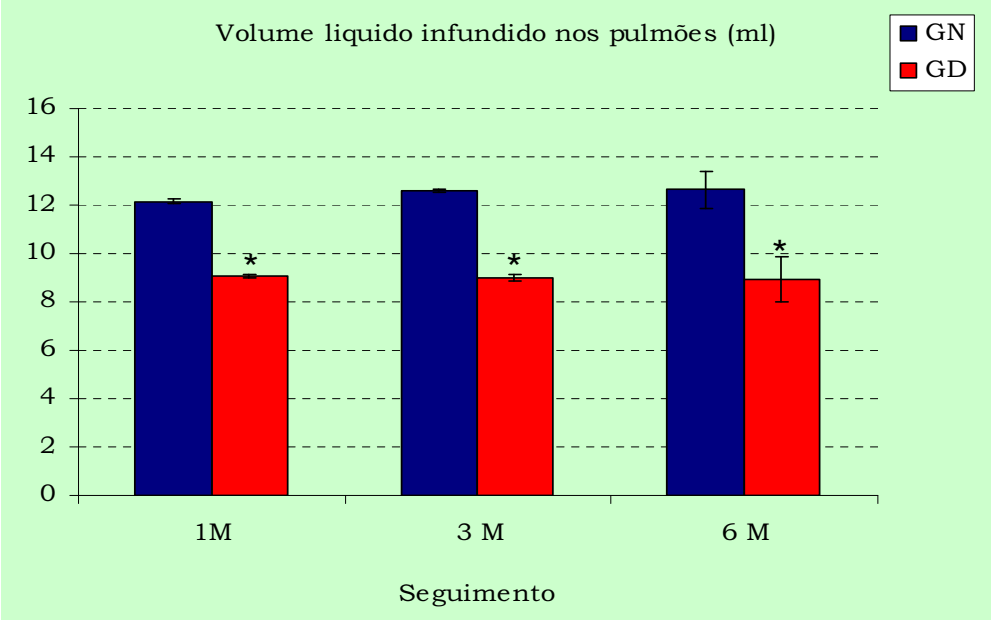


Figura 15 - Volume líquido infundido nos pulmões (ml) de ratos normais e diabéticos nos 2 grupos experimentais, durante o seguimento.

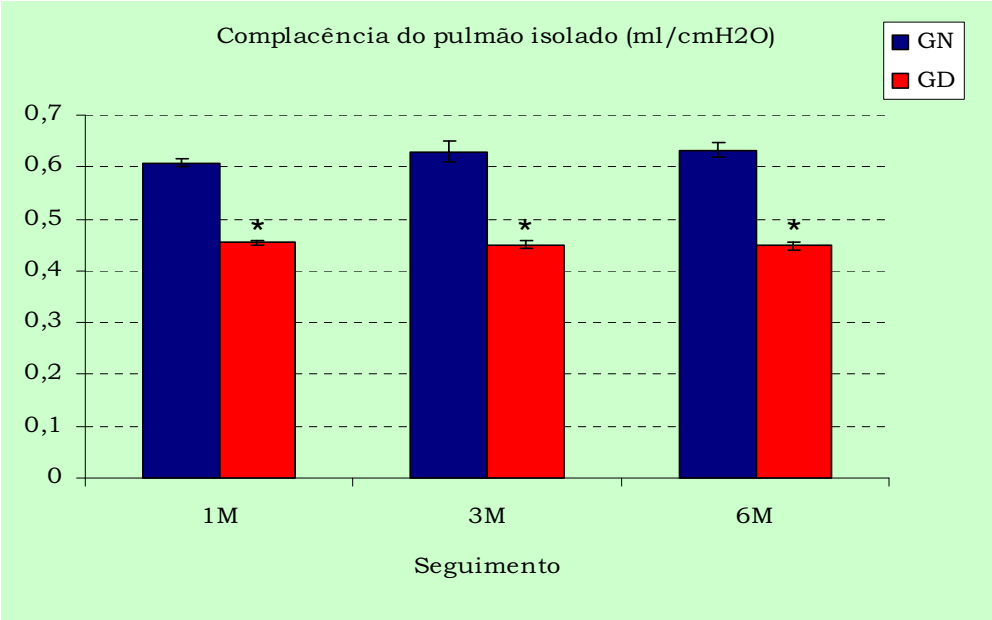


Figura 16 – Ilustração da variação dos valores da complacência dos pulmões isolados, em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

4. Achados morfológicos dos pulmões à M.O

Todos os ratos do GD mostraram alterações histopatológicas nos pulmões, que incluíram: graus variados de congestão, edema, transudato plasma/hemorrágico intra-alveolar, diminuição dos espaços alveolares e a presença de infiltrado inflamatório mononuclear linfo-plasmocitário, acometendo o interstício pulmonar. Sete ratos diabéticos apresentaram quadro histopatológico compatível com pneumonia, caracterizada por congestão e infiltração inflamatória polimorfonuclear intersticial, e a presença de exsudato neutrofílico intra-alveolar. Em outros 12 ratos diabéticos, sacrificados com 3 meses (4 animais) e com 6 meses de seguimento (8 animais), também foi observado aumento da matriz extracelular, difusamente distribuída no interstício dos septos alveolares, determinando o espessamento das paredes alveolares (Fig. 17). Estas anormalidades não foram vistas em animais controles (GN); ratos do GN também não tiveram pneumonia.

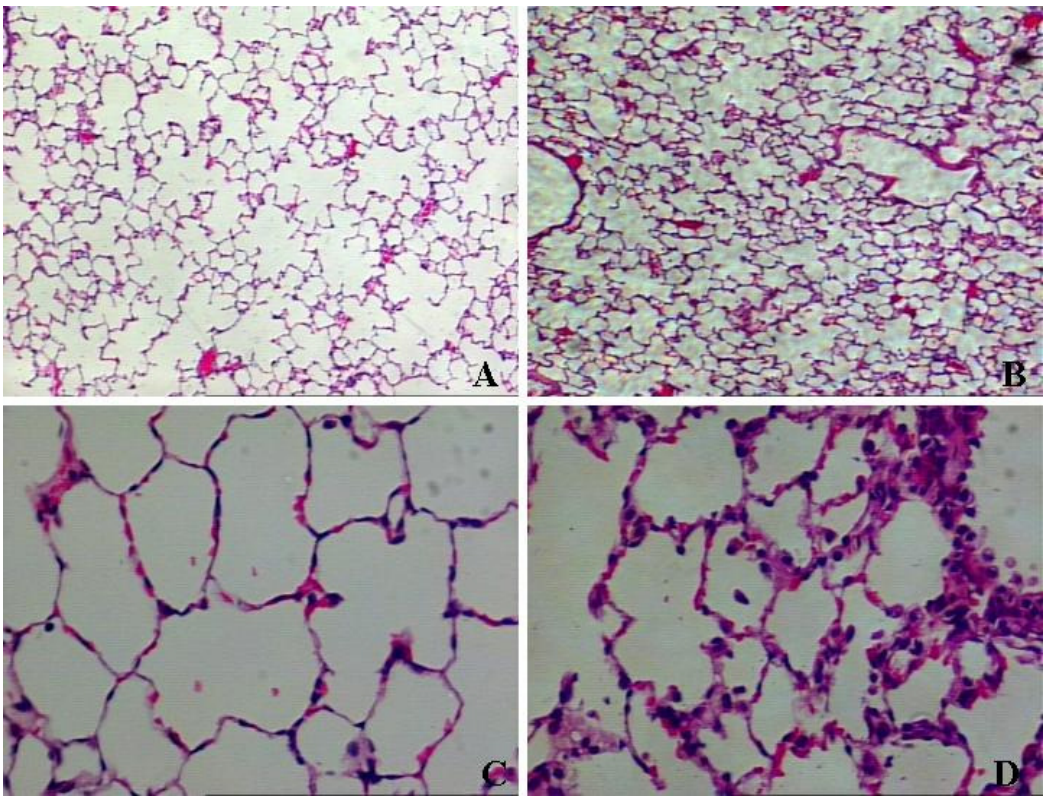


Figura 17 - Alvéolos pulmonares de ratos normais e diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Observe em A: estrutura alveolar de rato normal, mostrando área dos espaços alveolares com dimensões normais e quantidade preservada do número de alvéolos (HE 10x); B: estrutura alveolar de rato diabético, mostrando diminuição da área dos espaços alveolares e aumento do número de alvéolos contados/campo (HE 10x), que indiretamente mostram a menor distensão alveolar; C: estrutura morfológica dos septos alveolares de rato normal, mostrando paredes finas, sem alterações inflamatórias (HE 40x); D: estrutura morfológica dos septos alveolares de rato diabético mostrando espessamento das paredes e presença de intenso infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário, fibroblastos e colágeno preenchendo o interstício alveolar (HE 40x).

5. Achados morfológicos dos vasos arteriais pulmonares à M.O.

A despeito da gravidade das lesões morfológicas observadas nos pulmões de ratos do GD, no presente estudo não observamos depósitos gordurosos no endotélio das artérias pulmonares e nos seus respectivos troncos, mesmo nos animais sacrificados mais tardiamente. A Fig. 18 ilustra o aspecto morfológico do endotélio vascular de um rato diabético sacrificado com 6 meses de seguimento.

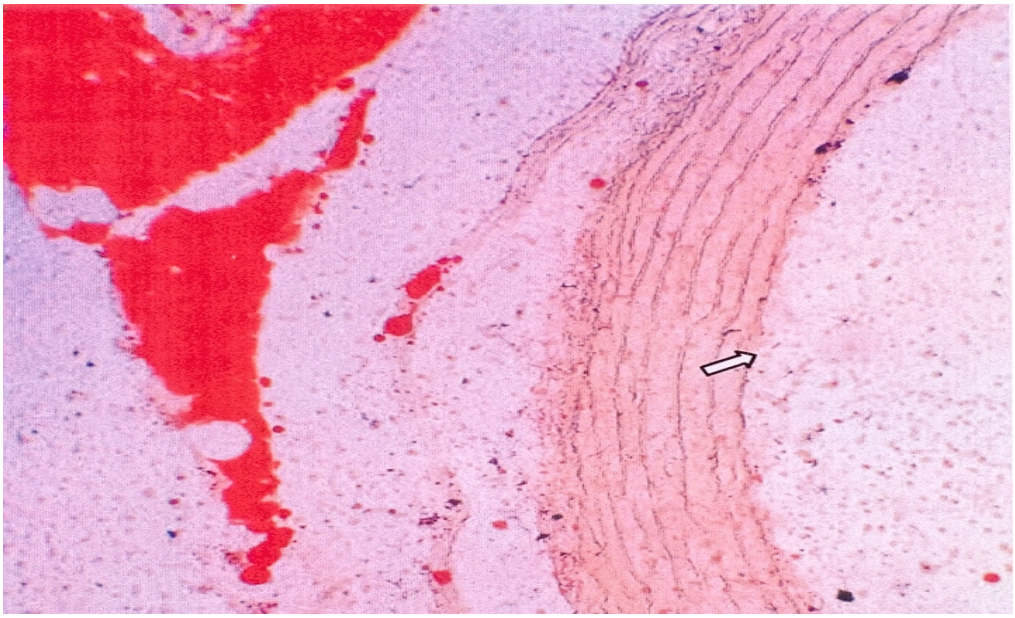


Figura 18 – Aspecto histológico da parede da artéria pulmonar de rato diabético sacrificado com 6 meses de seguimento, mostrando a camada íntima do endotélio (seta) com ausência de depósitos gordurosos. Note a presença de gordura adjacente ao vaso, corada em vermelho, pela técnica do “oil red” (40 x).

6. Achados morfométricos dos pulmões à M.O.

O perímetro alveolar e a área da superfície alveolar foram significantemente reduzidos em ratos do GD (P<0,01), quando comparados com ratos do GN. Como conseqüência, a contagem do número total de alvéolos/campo, averiguada em pulmões de ratos do GD foi significantemente elevada (P<0,01), em relação aos animais controles. Estes achados guardam estreita relação com a redução do volume de líquido infundido nos pulmões e a redução da complacência do pulmão isolado. As Tabs. numeradas de 14 a 16 e as Figs. de 19 a 21 mostram os achados morfométricos dos alvéolos.

Tabela 14 – Médias ± desvios-padrão da contagem do número total de alvéolos/μm^2 encontrada em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

Grupos	Contagem do nº total de alvéolos/μm^2 Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	94,82 ± 17,37	102,71 ± 17,12	112,68 ± 18,36
GD	129,09 ± 23,83*	133,48 ± 18,42*	140,56 ± 19,75*

* GN < GD para P < 0,01, com 1, 3 e 6 meses de seguimento

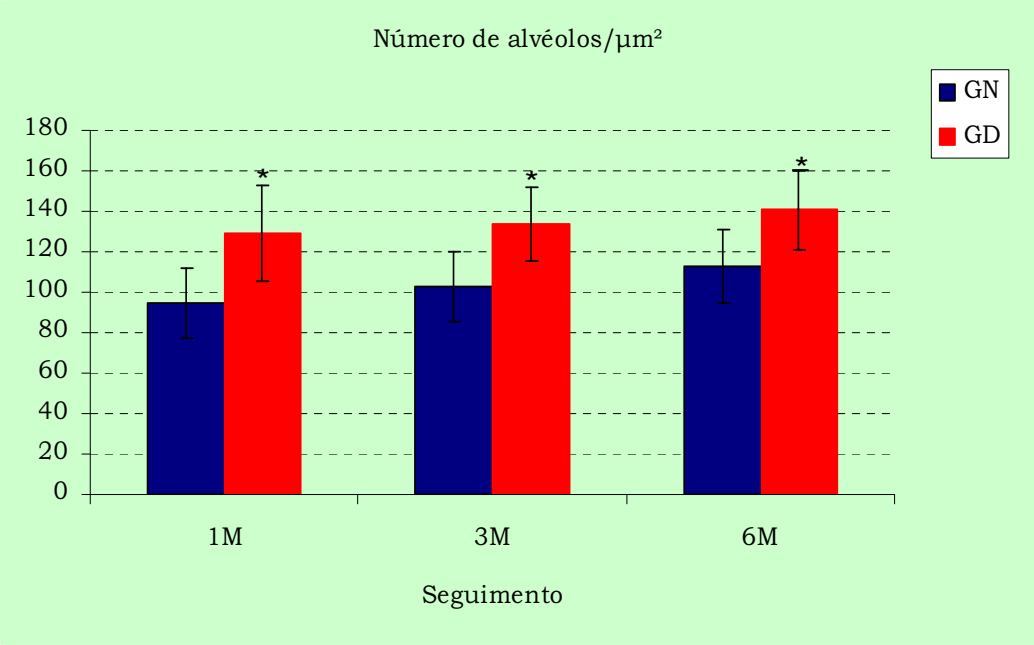


Figura 19 – Ilustração da contagem do número total de alvéolos/µm² em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

Tabela 15 – Medianas, valores mínimos e máximos, entre colchetes, do perímetro alveolar (µm) em pulmões de ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento

Grupos	Perímetro Alveolar (µm) Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	1145,50 [405,91; 2261,60]	1086,42 [405,60; 2132,15]	1016,28 [315,00; 1917,10]
GD	112,60 [44,41; 729,09]*	215,40 [58,15; 804,37]*	165,60 [46,38; 912,12]*

* GD < GN para P < 0,01 após 1, 3 e 6 meses de seguimento

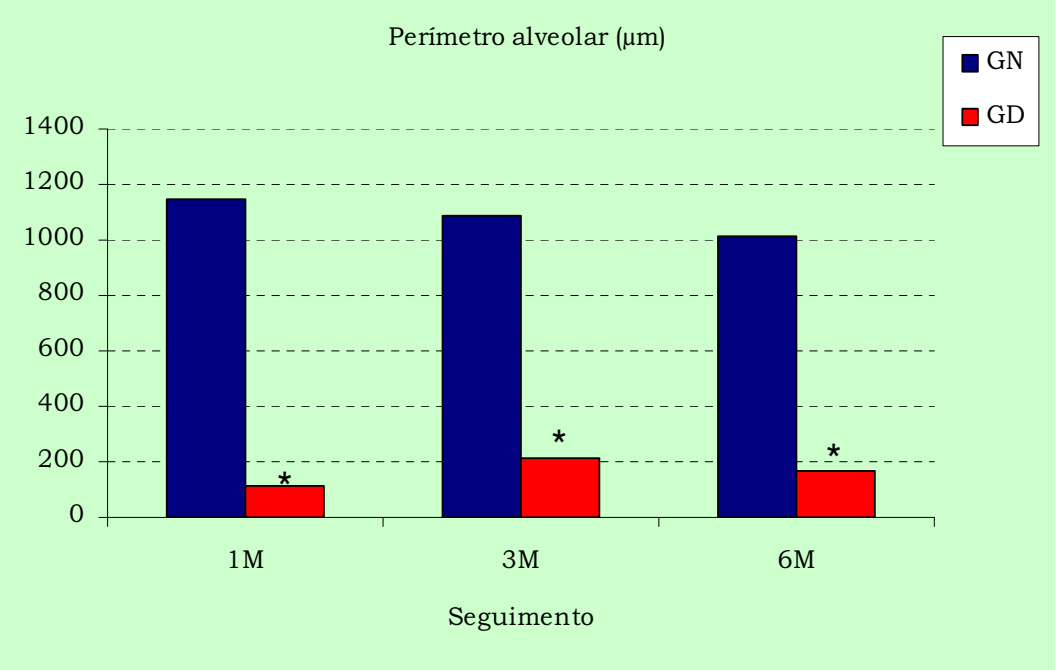


Figura 20 – Ilustração dos valores medianos encontrados nas medidas do perímetro alveolar em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

Tabela 16 – Medianas, valores mínimos e máximos, entre colchetes, da área da superfície alveolar (µm²) em pulmões de ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento

Grupos	Área da Superfície Alveolar (µm²) Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	22179 [17120; 35858]	22499 [18447; 26660]	21814 [17986; 27615]
GD	14395 [13005; 18021]*	14007 [11984; 24135]*	13145 [9184; 22037]*

* GD < GN para P < 0,01 após 1, 3 e 6 meses de seguimento

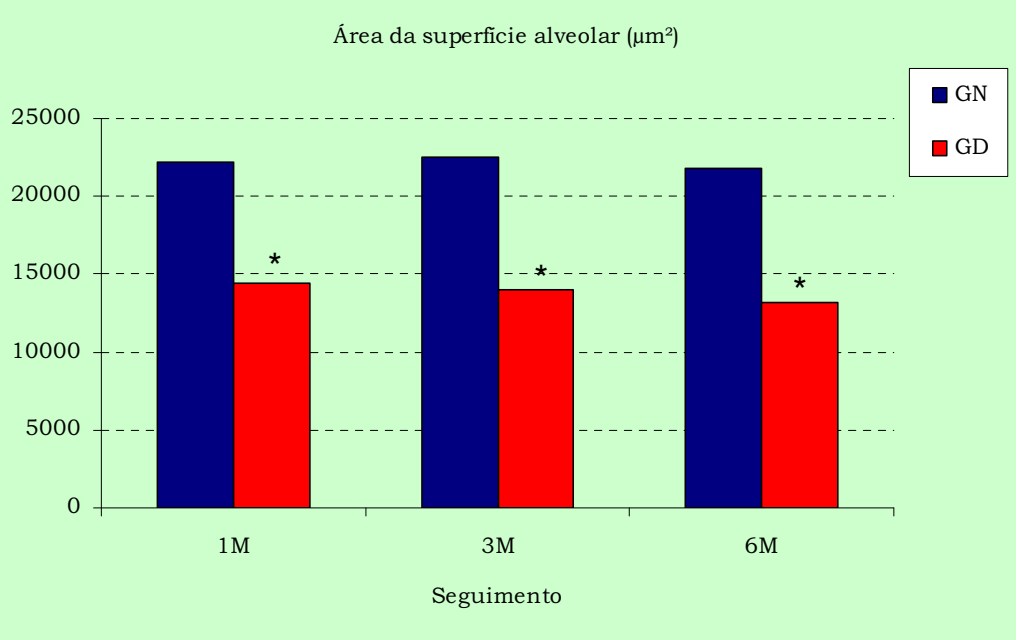


Figura 21 - Ilustração dos valores medianos encontrados nas medidas da área da superfície alveolar em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

7. Achados morfológicos ultraestruturais dos pulmões à M.E.

O epitélio alveolar de ratos diabéticos sacrificados mais tardiamente (3 e 6 meses) mostrou-se com evidente grau de atrofia, sendo constituído por uma única camada de pneumócitos tipo 1, por vez, com áreas de necrose, dispostas sobre a membrana basal intensamente espessada e por vezes fundida com a membrana basal do endotélio capilar (Fig. 22 e 24). Em todos os animais diabéticos de longa duração, também observamos que os espaços alveolares e a luz dos capilares alveolares se mostraram colapsados, e por vezes ocluídos (Fig.24) pela abundante hiperplasia da matriz celular intersticial, rica em colágeno, elastina e fibroblastos (Figs. 22 e 23). Os capilares alveolares eram circundados por células endoteliais com expansão da matriz intersticial, contendo um grande número de vesículas

plasmalemais (Fig. 22), por vez, com abundante quantidade de corpúsculos de Weibel-Palade (Fig. 24). Estas alterações não foram vistas ou tiveram pouca intensidade em animais sacrificados com 1 mês de seguimento.

Pulmões de ratos do GD também apresentaram alterações ultraestruturais dos pneumócitos tipo 2, principalmente em animais sacrificados após o 3º mês de seguimento. Entre estas alterações, observamos rarefação do número destas células, com retenção de surfactante no interior do citoplasma celular (Fig. 23).

Todas as alterações ultraestrurais descritas não foram observadas em ratos do GN, em qualquer período de sacrifício. As Figs. numeradas de 22 a 24 ilustram os achados ultraestruturais dos pulmões de ratos dos 2 grupos experimentais, sacrificados com 6 meses de seguimento.

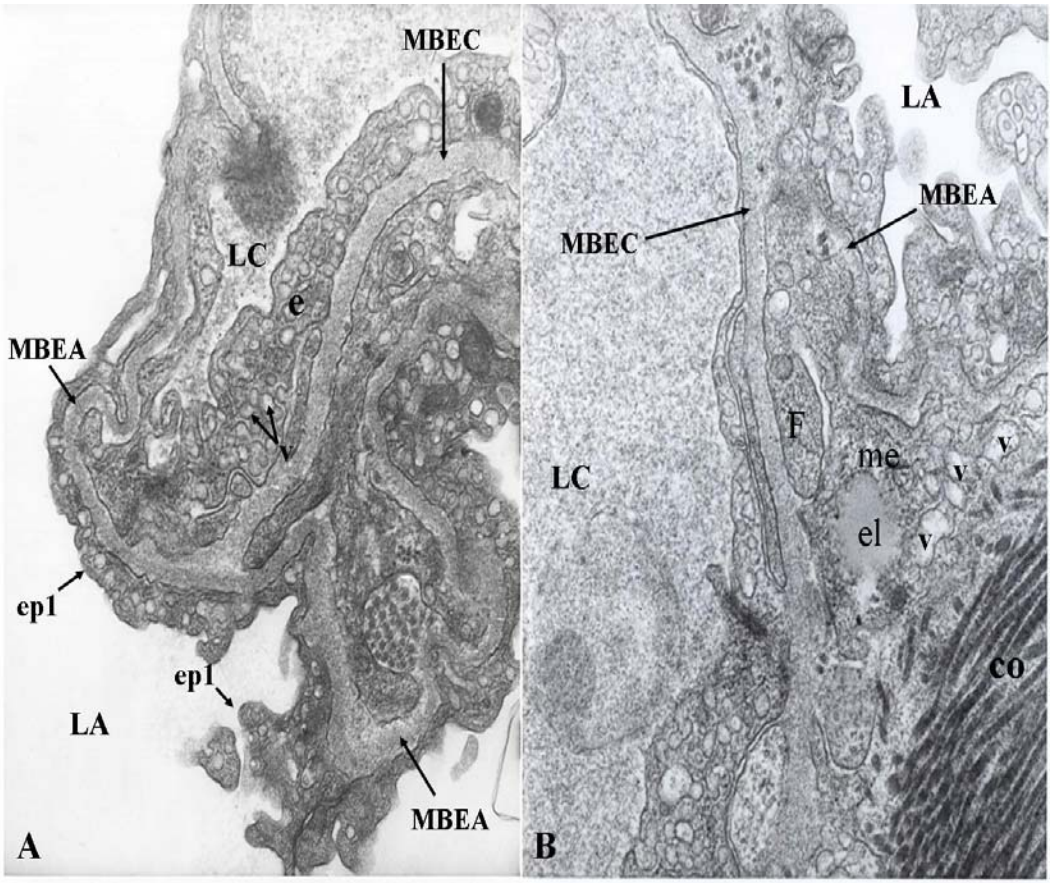


Figura 22 – Achados ultraestruturais dos septos alveolares de ratos diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Observe em A: epitélio alveolar constituído de pneumócitos tipo 1 (ep1) voltados para a luz alveolar (LA), mostrando degeneração hialina e atrofia, dispostos sobre a membrana basal do epitélio alveolar (MBEA) com graus variados de espessamento. A luz capilar (LC) é parcialmente colapsada, sendo circundada por endotélio (e) formado por células endoteliais degeneradas, contendo um grande número de vesículas plasmalemais (v). As células endoteliais repousam sobre membrana basal do endotélio capilar (MBEC), a qual se mostra intensamente espessada; B: expansão da matriz extracelular (me) do interstício do septo alveolar, localizada entre a MBEC e a MBEA espessas, mostrando infiltração por edema, vesículas (v) e abundante quantidade de bandas de colágeno (co) que aparecem cortadas longitudinalmente, além de elastina (el) e células "like" fibroblastos - F (magnificação final 42.000x).

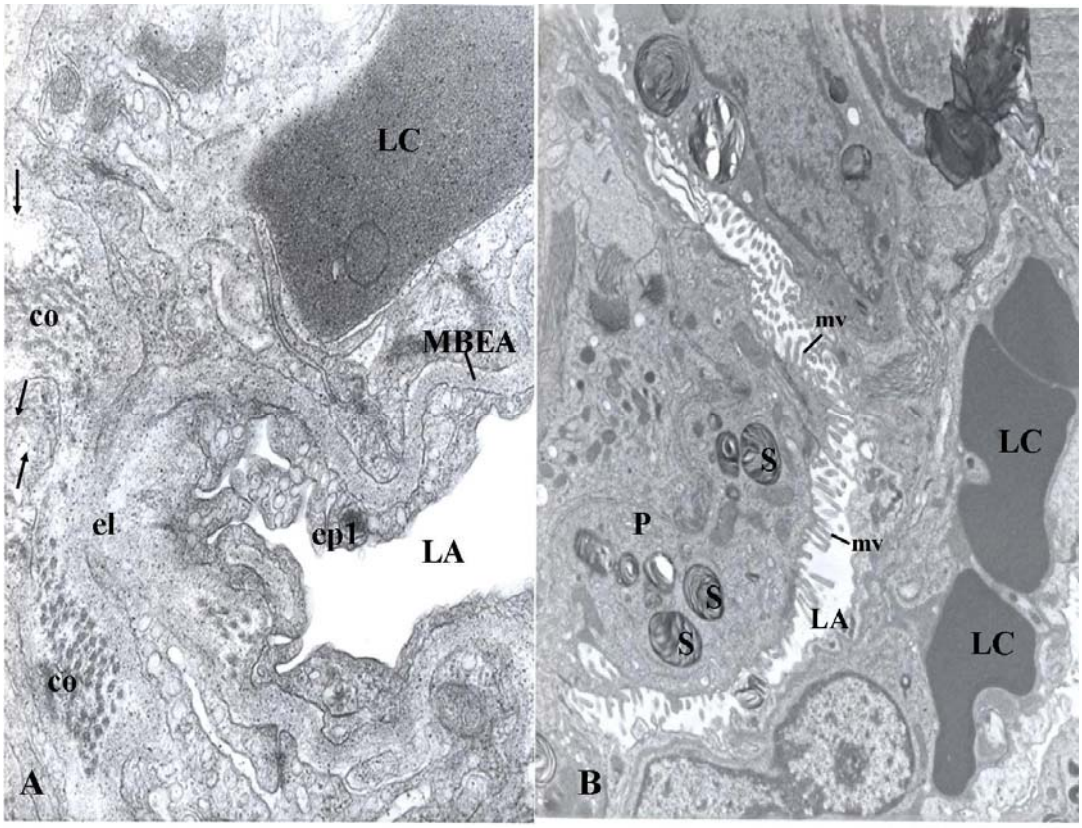


Figura 23 - Achados ultraestruturais dos septos alveolares de ratos diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Observe em A: intensa expansão da matriz extracelular (setas) localizada acima e abaixo da membrana basal do epitélio alveolar (MBEA) e dos penumócitos tipo 1 (ep1), sendo caracterizada por edema, bandas de colágeno (co), que aparecem cortadas transversalmente, e elastina – el (magnificação final 42.000x); B: luz alveolar colapsada (LA), voltada para o epitélio alveolar contendo microvilosidades (mv) que se projetam para o seu interior. Nota-se pnemócitos tipo 2 (P) contendo abundante quantidade de surfactante (S) retido no interior do citoplasma (magnificação final 5.750x).

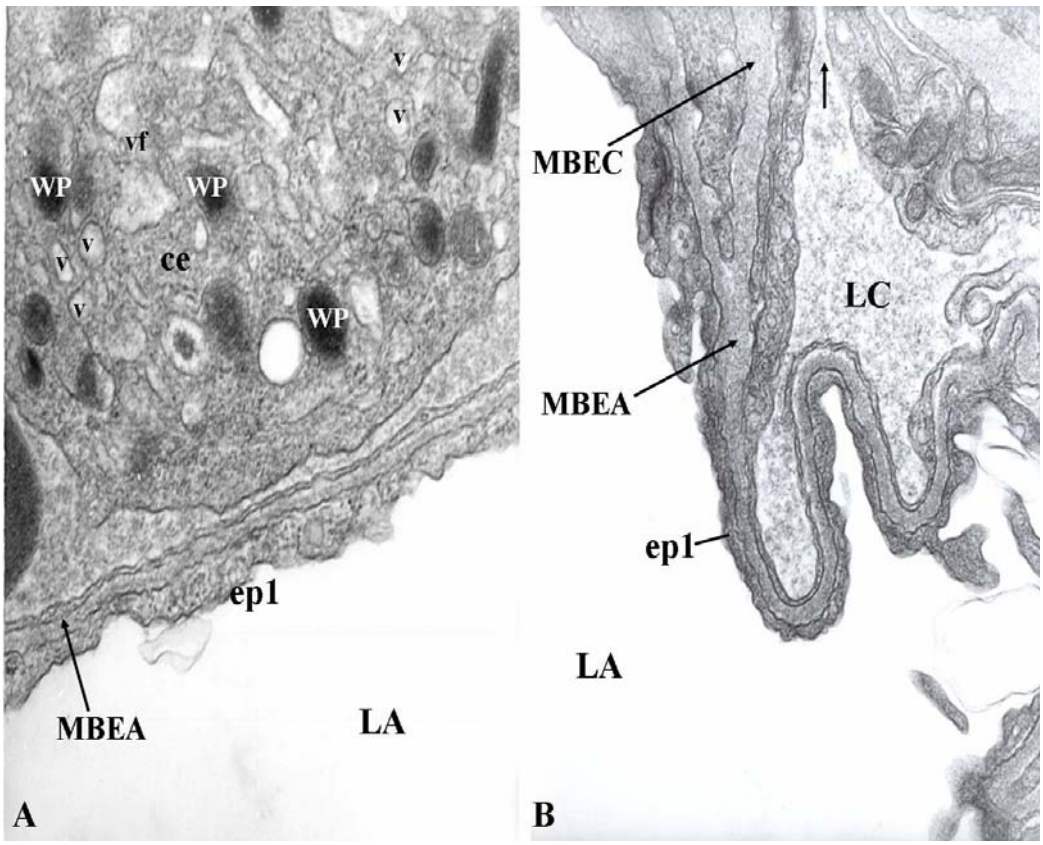


Figura 24 - Achados ultraestruturais dos septos alveolares de ratos diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Observe em A: corte de célula endotelial (ce) mostrando numerosos corpúsculos de Weibel-Palade (WP), vesículas (v) e vesículas fundidas (vf), indicativos de intensa atividade inflamatória e trombogênica do endotélio vascular, bem como aumento da atividade transcitótica através da membrana celular (magnificação final (42.000x); B: detalhe da fusão das membranas basais do epitélio alveolar (MBEA) e do endotélio capilar (MBEC) espessadas, com luz capilar comprimida e parcialmente ocluída (seta). Note o plasma no interior do lúmen capilar (LC) (magnificação final 17. 000x).

7.1. Achados morfométricos da membrana basal dos septos alveolares à M.E.

Tanto a membrana basal do epitélio alveolar (MBEA), como a membrana basal do endotélio capilar (MBEC), dos pulmões de ratos do GD foram significantemente espessadas ($P<0,01$) quando comparadas com ratos GN, em todos os períodos de sacrifício do experimento (Tabs. 17 e 18).

A Fig. 25 ilustra os valores medianos encontrados para as medidas da espessura da MBEA e da MBEC, com suas respectivas variações. As Figs. 26 e 27 ilustram os achados ultraestruturais da MBEA e da MBEC em ratos normais e diabéticos, sacrificados com 6 meses de seguimento.

Tabela 17 - Médias ± desvio-padrão das medidas da espessura da membrana basal do epitélio alveolar (MBEA), em micrômetros, em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

Grupos	MBEA (µm) Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	0,0876 ± 0,0032	0,1034 ± 0,0038	0,0845 ± 0,0028
GD	0,1543 ± 0,0028*	0,1635 ± 0,0040*	0,1803 ± 0,0020*

* GN < GD para P < 0,01, com 1, 3 e 6 meses de seguimento

Tabela 18 - Médias ± desvio-padrão das medidas da espessura da membrana basal do endotélio capilar (MBEC), em micrômetros, em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

Grupos	MBEC (µm) Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	0,1612 ± 0,0115	0,1802 ± 0,0105	0,1492 ± 0,0112
GD	0,2440 ± 0,0124*	0,2836 ± 0,0130*	0,3004 ± 0,0138*

* GN < GD para P < 0,01, com 1, 3 e 6 meses de seguimento

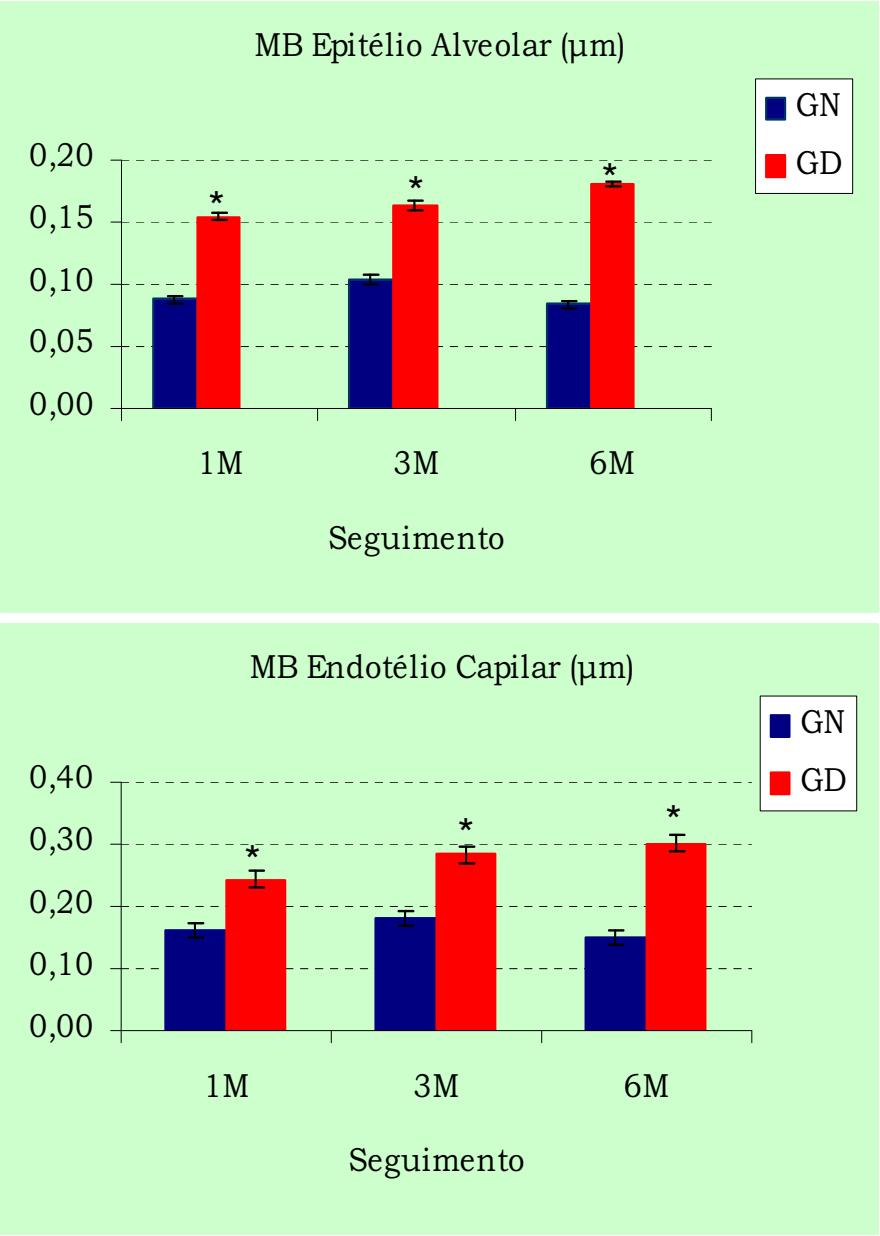


Figura 25 - Médias dos valores ± desvios-padrão da espessura das membranas basais do epitélio alveolar (MBEA) e do endotélio capilar (MBEC), em ratos dos 2 grupos experimentais, após 1, 3 e 6 meses de seguimento.

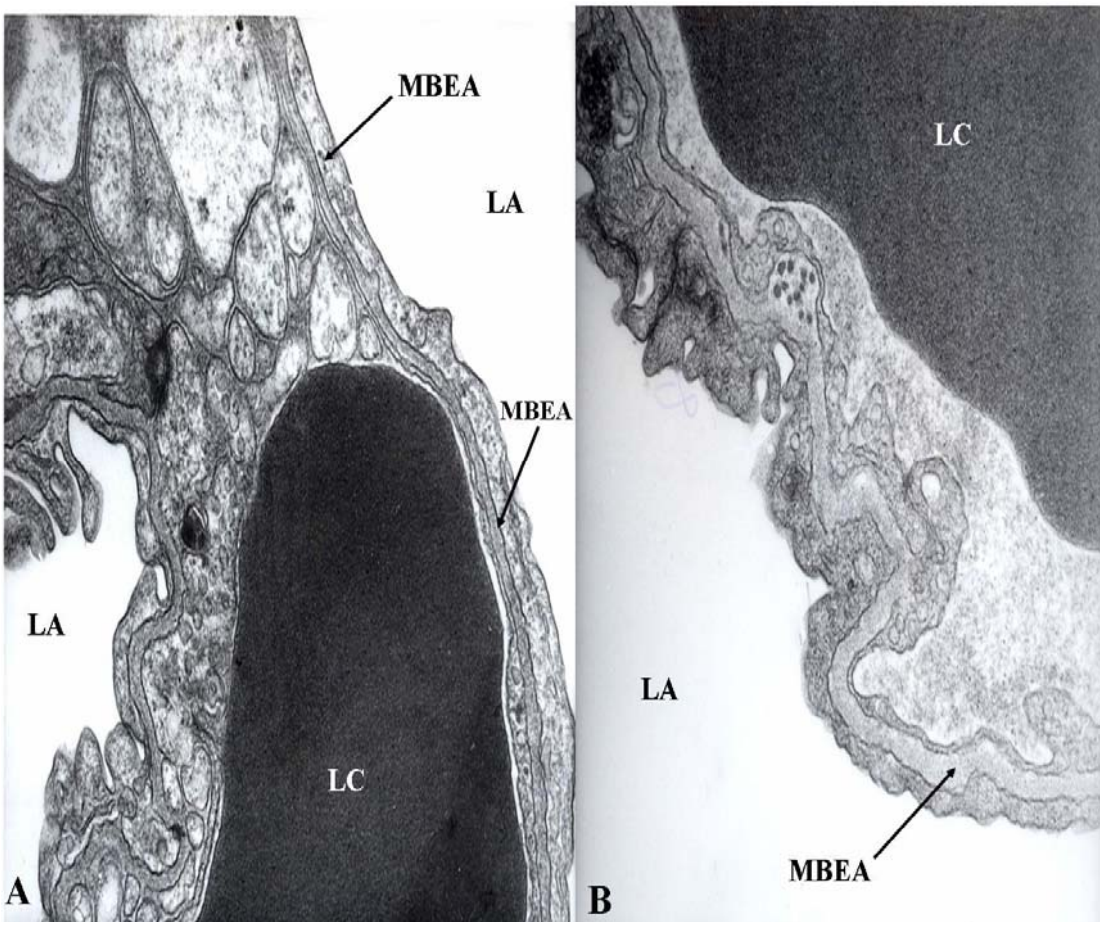


Figura 26 - Ilustração dos achados ultraestruturais da membrana basal do epitélio alveolar (MBEA) em ratos normais (A) e diabéticos (B), sacrificados com 6 meses de seguimento; LA - luz alveolar; LC - luz capilar. Note o intenso espessamento da MBEA (seta) em rato do grupo diabético quando comparado com o do grupo normal (B) [magnificação final 42.000x).

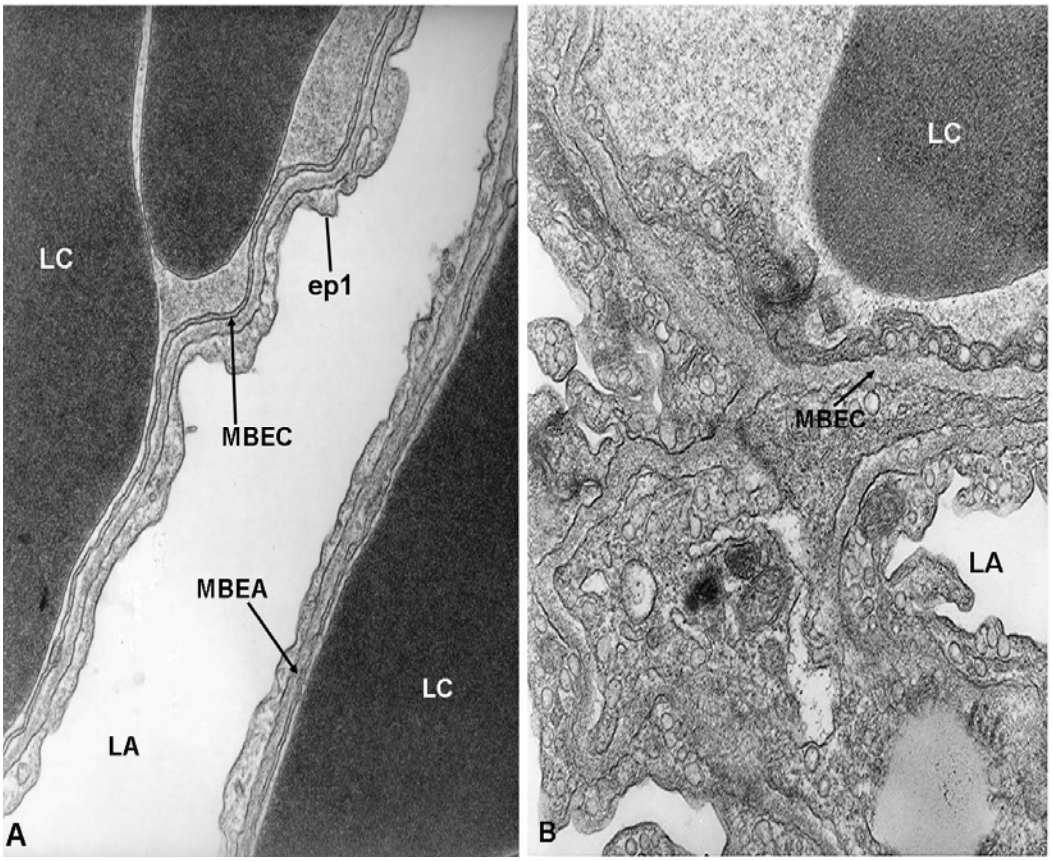


Figura 27 - Ilustração dos achados ultraestruturais da membrana basal do endotélio capilar (MBEC) em ratos normais (A) e diabéticos (B), sacrificados com 6 meses de seguimento; LA - luz alveolar; LC - luz capilar com hemáceas no seu interior; MBEA – membrana basal do epitélio alveolar; ep1 – pneumócitos do tipo 1. Note o intenso espessamento da MBEC (seta) em rato do grupo diabético quando comparado com o do grupo normal (B) [magnificação final 42.000x).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Em que pese o impacto negativo do DM sobre a qualidade de vida e a sobrevida dos seus portadores, infelizmente, ainda não são completamente conhecidos os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese e evolução das lesões crônicas determinadas por esta doença.

Neste contexto, a utilização de modelos-experimentais de diabetes, capazes de reproduzir as alterações clínicas, metabólicas e histopatológicas observadas no curso da moléstia, é bastante promissora no sentido de melhor compreender a fisiopatologia e o tratamento do DM.

Neste estudo observamos que a aloxana, administrada por via endovenosa, foi capaz de induzir diabetes persistente no rato, caracterizado por sinais clínicos evidentes de diabetes grave, associados a um estado de hiperglicemia e hipoinsulinemia crônicos, com altas taxas de hemoglobina glicosilada.

A despeito dessas vantagens, o uso da aloxana acompanhou-se de uma alta taxa de mortalidade, situada em torno de 32%, cujos óbitos ocorreram em decorrência dos efeitos tóxicos da droga, principalmente nas primeiras duas semanas após a indução do diabetes.

LUKENS (1948), em uma extensa revisão da literatura a respeito da ação da aloxana, em animais de várias espécies, incluindo o rato, o cão, o coelho, o macaco e o gato, relatou índices de mortalidade que oscilaram entre 33% e 100% na mesma espécie. Atribuiu este fato a existência de múltiplos fatores capazes de mudar os efeitos da droga, envolvendo desde a sensibilidade do hospedeiro, até o estado de hidratação da droga, a velocidade de infusão, a via de administração, a dieta, o tempo de jejum, o peso do animal e a utilização concomitante de algumas substâncias capazes de influenciar o seu mecanismo de ação, tais como os barbitúricos, o ácido nicotínico e os aminobenzenos.

Segundo LUKENS (1948), os ratos, por exemplo, são mais sensíveis a uma dose constante de aloxana, após terem sido alimentados previamente com uma dieta contendo alto teor de gordura.

As taxas de mortalidade, nestes casos, alcançam 90% a 100%. Por outro lado, dietas pobres em gordura, com altas concentrações de proteínas e carboidratos, são capazes de diminuir essas taxas para 33% a 40%, índices bastante similares aos nossos achados utilizando uma dieta padrão para ratos.

O jejum também tem papel importante na resposta das espécies à aloxana. Cerca de 95% dos ratos tratados com aloxana, administrada com o animal em jejum prolongado de 48 a 60 horas, tornam-se diabéticos. A administração de uma dose similar de aloxana, quando o jejum não foi observado, diminui este índice diabetogênico para 25%. Em nosso estudo este índice esteve em torno de 48%, observado um jejum de 12 horas.

Cerca de 20% dos animais do nosso estudo, submetidos à injeção endovenosa de aloxana, foram refratários à ação diabetogênica da droga, ou desenvolveram diabetes de intensidade leve ou moderada (glicemia < 200mg/dl), tendo sido excluídos do estudo. Este achado já havia sido relatado por LAZAROW & PALAY (1946) quando estudavam os efeitos da aloxana em relação às diversas vias de administração.

Segundo esses autores, a administração endovenosa deve ser a via de escolha na maioria das espécies animais, onde os efeitos da aloxana mais se aproximam daqueles originalmente descritos por DUNN et al (1943), quando descreveram pela primeira vez a atividade diabetogênica desta substância, ao estudar os efeitos do ácido úrico e seus derivados na produção da lesão renal em coelhos. As vias subcutânea e intraperitoneal também podem ser satisfatórias para a obtenção de diabetes no rato; enquanto que no coelho, doses muito elevadas devem se utilizadas para que se atinja o mesmo efeito. Segundo LUKENS (1948), a via oral é usualmente insatisfatória para a obtenção de diabetes com aloxana.

Estudo clássico de GITTER et al. (1948) revela a importância do peso corporal na suscetibilidade das espécies aos efeitos tóxicos da aloxana. Em um estudo detalhado, realizado em ratos, por estes pesquisadores, eles observaram que a toxicidade da aloxana se altera

numa relação linear com o peso do animal, aumentando 0,73 poderes de toxicidade para cada unidade de peso corporal. Observaram, também, que o uso da aloxana exibe uma estreita margem de segurança entre as doses letal e diabetogênica, motivo pelo qual os índices de mortalidade costumam ser elevados em estudos do diabetes que utilizam o modelo experimental aloxânico. A morte, nestes casos, habitualmente ocorre em decorrência de distúrbio metabólico associado à necrose tubular renal aguda (GARCIA et al., 1998), que difere clínica e morfológicamente das lesões renais diabéticas crônicas ocasionadas pelo diabetes aloxânico no longo prazo (MAUER et al., 1976).

A gravidade do diabetes produzido pela aloxana também não guarda relação constante com a dose de substância utilizada, como observado com estreptozotocina, onde é possivel se obter diabetes de vários níveis de gravidade (JUNOD et al, 1969). Todavia, a obtenção de diabetes com níveis leves ou moderados de gravidade fugia aos objetivos deste trabalho.

Por outro lado, a aloxana é uma droga bastante seletiva para as células beta-pancreáticas, produtoras de insulina, destruindo particularmente somente esta linhagem celular, com preservação da integridade morfológica das células alfa e delta do pâncreas (SPADELLA et al., 2000), e praticamente toda a sua parte exócrina.

Por essas razões, a aloxana é uma droga consagrada nos estudos experimentais do diabetes porque reproduz, com fidelidade, todas as alterações anatomopatológicas do DM, especialmente sobre os vasos, rins, olhos e nervos do hospedeiro diabético (SCHELLINI et al., 1995; MACHADO et al., 2000; LERCO et al., 2006; MACEDO et al., 2007; SPADELLA et al., 2008).

Neste estudo, também demonstramos que os pulmões de ratos com DM induzido pela aloxana também são afetados pela doença, mostrando que o diabetes aloxânico também é um modelo adequado para o estudo da pneumopatia diabética crônica.

A questão que prevalece, todavia, é como o DM determina a variedade de alterações que afeta indistintamente todos órgãos e

sistemas de homens e animais, tendo como pressuposto básico um estado de hiperglicemia crônica.

Evidências de que o aumento do estresse oxidativo resultante da elevação na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) pode estar presente durante os processos de auto-oxidação da glicose e de glicosilação protéica, com redução das concentrações de antioxidantes enzimáticos, dão sustentação à hipótese de que a agressão celular mediada por estas substâncias tem importante papel na etiopatogenia do DM (RAHIMI et al., 2005; ROLO & PALMEIRA, 2006).

Segundo MARITIM et al. (2003), o estresse oxidativo tanto pode ser o agente indutor da destruição das células betas pancreáticas, que resulta na hiperglicemia, como pode ser o agente promotor da seqüência de alterações que resulta na microangiopatia, nefropatia, retinopatia e neuropatia diabética crônica, bem como nas lesões provocadas pelo diabetes sobre o coração, os pulmões, o fígado e outros órgãos.

Sabe-se que cerca de 2 a 5% do oxigênio absorvido pelo organismo durante a respiração não são utilizados, sofrendo redução tetravalente e gerando as EROs. As EROs ou radicais livres são formados durante os processos de auto-oxidação da glicose e glicosilação protéica, durante o processo de obtenção de energia nos seres vivos aeróbios. Entre as principais EROs formadas no organismo, têm destaque os hidroperóxidos de lipídio, a hidroxila e o peróxido de hidrogênio.

Estes compostos, entretanto, são altamente instáveis e muito reativos com os componentes celulares, podendo também se ligar a outros radicais, ou iniciar a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas e organelas celulares (VAZIRI., 2004).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, mas a membrana celular é uma das estruturas preferenciais da agressão destas substâncias e, portanto, mais facilmente atingida pela peroxidação lipídica ou liperoxidação (VAZIRI., 2004).

O ataque das EROs à membrana celular resulta em alterações na sua estrutura e permeabilidade, com conseqüente perda da seletividade na troca iônica. Também ocorre liberação do conteúdo das organelas celulares, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, com formação de produtos tóxicos, como o malondialdeído, resultando na morte celular.

Outros compostos, porém, como os carboidratos, as proteínas e o próprio DNA celular podem sofrer a ação tóxica das EROs. Segundo COSKUN et al. (2005), a agressão das EROs sobre os carboidratos da membrana plasmática provoca a diminuição da sua capacidade de reconhecer moléculas na superfície celular. Este dano funcional torna a célula mais suscetível à ação tóxica de algumas substâncias, como os produtos finais da glicação protéica ou AGEs, da sigla em inglês, "advanced glication endproducts".

As EROs ao agirem sobre o DNA celular, que é predominantemente constituído de cadeias protéicas, podem determinar mutações cromossômicas responsáveis por alterações na expressão de vários caracteres aberrantes nas células, como o crescimento celular anômalo, observado no câncer, o depósito de substâncias indesejáveis na parede dos vasos, observado na arteriosclerose, e a degeneração dos tecidos orgânicos, observado no processo de envelhecimento.

Por outro lado, organismos saudáveis apresentam mecanismos adequados de defesa antioxidante, impedindo a ação tóxica das EROs sobre as células. Entretanto, na produção excessiva de radicais livres ou EROs, ou na redução das defesas antioxidantes, o equilíbrio bioquímico das células é alterado, havendo uma maior concentração de EROs em relação às defesas antioxidantes, o que vem a se constituir no estresse oxidativo celular (BLOKHINA et al., 2003; COSKUN et al., 2005; MARQUES, 2005; VAZIRI, 2004).

Os agentes antioxidantes são constituídos por enzimas produzidas pelo próprio organismo (antioxidantes enzimáticos) e por substâncias resultantes do metabolismo ou ingeridas na dieta, como algumas vitaminas, proteínas e minerais (antioxidantes não-

enzimáticos). Entre os principais agentes antioxidantes enzimáticos, utilizados pelo organismo para combater as EROs, estão a glutationa peroxidase (GSH-Px), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Entre os principais antioxidantes não-enzimáticos estão incluidos as vitaminas C e E, os carotenóides, a glutationa reduzida e os oligoelementos: cobre, zinco, manganês e selênio.

O estudo apresentado sugere que o estresse oxidativo celular também está presente no tecido pulmonar de ratos diabéticos induzidos pela aloxana, demonstrado pela elevação significante dos radicais oxidantes hidroperóxidos (HPO) e pela redução das defesas antioxidantes deste órgão, observada por níveis baixos da atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-Px, principalmente após o 3º mês de diabetes.

O estresse oxidativo pulmonar, segundo KING & LOEKEN (2004), parece guardar estreita relação com a duração do estado diabético, sendo mais intenso em animais sacrificados mais tardiamente. Este achado sugere que a cronicidade da hiperglicemia pode ser mais relevante na gênese das lesões diabéticas crônicas, do que propriamente os valores elevados da glicose sanguínea. Este fato foi observado neste trabalho e já havia sido observado em nosso laboratório em rins de animais diabéticos induzidos pela aloxana (SPADELLA et al., 2008).

É discutível, porém, se o estresse oxidativo celular age como um agente indutor ou promotor das lesões diabéticas crônicas, ou se constitui, simplesmente, ao lado de diversos outros mecanismos, em mais uma das etapas de uma complexa cascata de eventos que resulta na agressão celular (KHAN et al., 2006).

A par das evidências é razoável aceitar que outros mecanismos fisiopatológicos também podem explicar, ao lado das EROs, a etiopatogenia das lesões diabéticas crônicas.

Um dos mecanismos bastante conhecido de agressão celular é mediado pelos AGEs. Estas substâncias resultam da peroxidação das proteínas, e são capazes de inativar várias enzimas responsáveis pelas

trocas moleculares ao nível das membranas celulares e organelas (THOMAS et al., 2005; TAN et al., 2007).

Também tem sido destacado o mecanismo de ativação da via dos polióis nos tecidos que independem de insulina para captar a glicose, como o tecido nervoso, onde a hiperglicemia crônica pode aumentar os níveis de sorbitol intracelular, elevar a osmolaridade das células e ocasionar a sua morte (KHAN et al., 2006).

O aumento da glicose intracelular nos tecidos que não dependem de insulina também pode ativar a via das hexosaminas, a qual é responsável por converter a glicose em compostos derivados da acetilglicosamina, a qual modula a expressão de várias proteínas e fatores celulares, como o fator inibidor do plasminogênio – I (PAI – I) e o fator de crescimento transformador beta-2 (TGF – β2), os quais podem favorecer a formação de trombos no interior dos vasos e a produção excessiva de matriz colagênica no endotélio vascular, diretamente implicados na gênese e evolução da microangiopatia diabética (REES et al., 2008).

A hiperglicemia crônica também pode ativar a via da proteina C quinase (PKC) nos tecidos insulino-dependentes. Esta substancia é formada a partir da oxidação dos ácidos graxos livres, na impossibilidade de o organismo obter energia a partir da glicose intracelular. O excesso de PKC, porém, diminui as concentrações de óxido nítrico nos tecidos, aumentando os níveis do fator TGF – β2 e do fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A), os quais primariamente favorecem a diminuição do fluxo sanguíneo, o estreitamento da rede capilar e o depósito de matriz cicatricial, favorecendo as tromboses e oclusões vasculares (OHSHIRO & TAKASU, 2006; REES et al., 2008).

Pelo pressuposto, é fortemente aceito pelos pesquisadores do assunto, que qualquer tratamento do diabetes que tenha por objetivo prevenir, estabilizar e/ou reverter as lesões diabéticas crônicas deve passar primeiro pelo controle efetivo da hiperglicemia crônica, que do ponto de vista fisiopatológico parece ser a única forma de controlar a

produção de EROs e AGEs, e também de inibir a ativação das demais vias moleculares prejudiciais à função celular.

A despeito da melhora do prognóstico do paciente diabético insulino-dependente tratado com reposição exógena de insulina, dieta e/ou hipoglicemiantes orais (PIRART, 1978; UNGER, 1982), não há evidências suficientes na literatura para afirmar que a terapêutica convencional do diabetes possa prevenir o aparecimento e evitar a progressão das lesões diabéticas crônicas, no longo prazo (TCHOBROUTSKY, 1978; DCCT RESEARCH GROUP, 1988). Similarmente, a despeito da existência de alguns estudos demonstrando a efetividade de alguns agentes antioxidantes na redução dos processos de peroxidação lipídica e glicosilação protéica (EVANS & GOLDFINE, 2000; BLOKHINA et al., 2003; ZIEGLER et al., 2004; COSKUN et al., 2005; SRIDULYAKUL et al., 2006), também não há estudos controlados e randomizados, com amostras representativas de pacientes, capazes de comprovar o efeito benéfico destas substâncias na prevenção dos efeitos deletérios das EROs e de outros compostos sobre o organismo diabético.

No presente estudo comprovamos que um estado de hiperglicemia permanente, de longa duração, observado em ratos diabéticos sem qualquer tratamento, parece ser o agente indutor da sequência de eventos que levou ao comprometimento das principais estruturas orgânicas dos pulmões, cujas lesões muito possivelmente estiveram associadas ao estresse oxidativo do tecido pulmonar.

Entre as alterações encontradas observamos que o peso fresco dos pulmões e o volume líquido infundido nestes órgãos foram reduzidos em animais diabéticos. Resultados similares também foram observados por KIDA et al. (1983) em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, e por OFULUE et al. (1988) que, como nós, também observaram que o peso dos pulmões estava aumentado em ratos diabéticos, se considerada a proporção entre esta variável e o peso corporal dos animais.

A diminuição do peso absoluto dos pulmões e do volume de líquido necessário para a sua completa distensão corroborou o fato de a

complacência dos pulmões isolados ter sido reduzida em nossos animais diabéticos, quando comparada com a observada em animais controles. Segundo alguns autores, estes achados muito possivelmente estão relacionados à retração e à perda da elasticidade do pulmão diabético, podendo ser entendida como o resultado do aumento da quantidade de colágeno e elastina presente no interstício alveolar (BROWNLEE et al. 1984; REES et al., 2008).

Segundo SANDLER (1990), o aumento do conteúdo de colágeno nos pulmões está intimamente relacionado às alterações bioquímicas dos constituintes do tecido conectivo pulmonar, induzido pelas altas concentrações de glicose circulante, sendo mediado pelos processos de glicosilação não-enzimática (GNE) e pela geração de EROs.

Segundo esse autor é possível que a exposição dos pulmões à hiperglicemia crônica, esta ocasione uma excessiva formação de resíduos de lisina e hidroxilisina durante o processo de GNE das proteínas do tecido conectivo pulmonar. Estas substâncias, por sua vez, são capazes de alterar o “cross-link” do colágeno e da elastina, os quais são importantes para conferir a força e a elasticidade dos pulmões SANDLER (1990). Desta forma, é postulado que a ativação excessiva da GNE no DM possa ser a causa das alterações nas propriedades mecânicas do pulmão diabético. Esta hipótese é sustentada por outros autores (MAIDA et al., 1979).

Em nosso estudo também observamos que ratos diabéticos apresentaram diminuição significante do perímetro e da área da superfície alveolar, quando comparados com ratos normais controles. Como conseqüência, a contagem total do número de alvéolos pareceu significantemente aumentada em animais diabéticos. Considerada a complacência pulmonar como uma relação entre a variação do volume em função da pressão de infusão do órgão, também podemos inferir que este achado pode ser atribuído à menor capacidade de distensão alveolar de pulmões diabéticos, durante o processo de infusão líquida dos órgãos. Estes resultados também foram observados por outros pesquisadores (KIDA et al., 1983; OFULUE et al. 1988), quando

analisaram os aspectos morfológicos, morfométricos e a elasticidade dos pulmões de ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, na fase de crescimento. Todavia, OFULUE et al. (1988) não observaram alterações na elasticidade pulmonar destes animais, a despeito de terem notado um aumento na quantidade de colágeno e elastina nos septos alveolares, quando analisados morfológicamente.

Por outro lado, as anormalidades da síntese e "turnover" do tecido conectivo pulmonar, secundário a excessiva GNE, também podem levar ao espessamento das membranas basais dos alvéolos, com redução na capacidade de difusão de gases e também do fluxo sanguíneo através da rede capilar-alveolar (OFULUE & THURLBECK, 1988).

Neste estudo demonstramos que ratos diabéticos apresentaram intenso espessamento, tanto da membrana basal (MB) do epitélio alveolar, como da do endotélio capilar; achados estes suportados por outros estudos (VRACKO et al., 1979; KODOLOVA et al., 1982 WEYNAND et al., 1999). Estas alterações tiveram a mesma intensidade em pulmões de ratos diabéticos sacrificados com 1 e 3 meses de seguimento, porém, as mesmas foram significativamente mais graves em animais sacrificados com 6 meses de seguimento; fato corroborado pela maior quantidade de fibroblastos, colágeno e elastina presente nos cortes ultraestruturais de pulmões de ratos sacrificados mais tardiamente.

Estes achados sugerem que o espessamento das MBs alveolares possivelmente também guarda estreita relação com a duração do estado diabético, contudo, um tempo maior de exposição dos pulmões sob os efeitos deletérios da doença é necessário para que diferenças significativas na espessura das membranas possam ser detectadas.

VRACKO et al. (1979) e WEYNAND et al. (1999), porém, estudando material de autópsia de pacientes diabéticos concluíram que o espessamento da MB alveolar não guardava correlação com a duração do DM. Para este achado paradoxal os autores levantaram as hipóteses de que, ou a verdadeira duração do DM nos pacientes por eles analisados não era perfeitamente conhecida, ou o espessamento da MB

pulmonar é um fenômeno que abrupta e inexplicavelmente aparece, permanecendo inalterado durante toda a evolução da doença; hipótese discutível no nosso ponto de vista, pois graus variáveis de espessamento das MBs, em função do tempo, têm sido observados nos rins e retina de animais e de pacientes diabéticos, e no processo normal de envelhecimento (SCHELLINI et al., 1997; GIANNARELLI et al., 2005; SPADELLA et al., 2005; SPADELLA et al., 2008).

Por outro lado, o DM também atinge difusamente outras estruturas dos pulmões, incluindo os espaços alveolares, os pneumócitos, a produção e liberação do surfactante e as organelas celulares. Em nossas análises observamos que os espaços alveolares e a luz dos capilares alveolares de ratos diabéticos sacrificados mais tardiamente se mostraram colapsados pela abundante hiperplasia da matriz celular intersticial, rica em colágeno e elastina. As células do epitélio alveolar (pneumocitos tipo 1) se mostraram com evidente grau de atrofia, havendo também rarefação de pneumócitos do tipo 1I e grande retenção de surfactante no interior do citoplasma celular. Estas alterações já haviam sido reportadas anteriormente por POPOV & SIMIONESCU (1997) estudando hamsters diabéticos e/ou com hiperlipidemia, em períodos variáveis de seguimento de 2 a 24 semanas, tendo concluído, como nós, que o DM é uma grave doença sistêmica que afeta os pulmões na mesma intensidade que afeta os outros órgãos. Estudos realizados por PLOPPER & MORISHIGE (1978) também comprovaram os achados de que o DM afeta a ultraestrutura dos pneumócitos tipo 2, bem como a do epitélio não-ciliado dos bronquíolos (PLOPPER & MORISHIGE, 1979).

A despeito, porém, das alterações pulmonares provocadas pelo diabetes, no presente estudo, com a metodologia utilizada, não foi detectada a presença de depósitos gordurosos nas paredes do tronco e dos ramos principais das artérias pulmonares, utilizando a técnica específica pelo “oil red”, através da microscopia ótica. Este achado possivelmente mostra que a lesão do endotélio dos grandes vasos pode ser muito mais dependente da pressão do que propriamente dos efeitos

diretos do diabetes sobre a íntima vascular. Como as artérias pulmonares usualmente são vasos de baixa pressão, isto possivelmente poderia explicar porque não foram encontrados depósitos gordurosos nas artérias de nossos animais diabéticos.

No entanto, estudo realizado por REINILÄ (1981) avaliando a ultraestrutura de ramos arteriais coronarianos, tibiais e das artérias pulmonares de ratos diabéticos não-tratados, induzidos pela estreptozotocina, 2 meses após a indução do diabetes, encontrou significante espessamento da membrana basal da musculatura lisa destas artérias, em 40% dos animais. Todavia, não encontrou quaisquer alterações na camada elástica da aorta e da artéria pulmonar destes animais, demonstrando que o diabetes, embora possa comprometer universalmente todos os vasos arteriais, ele preferencialmente atinge a rede capilar (microangiopatia) e as arteríolas musculares (macroangiopatia).

REINILÄ et al. (1977; 1980) já haviam encontrado anteriormente, depósitos de triglicérides nos ramos musculares das artérias pulmonares, de ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, utilizando estudos histoquímicos e, também, em artérias elásticas, como a aorta e artéria pulmonar destes animais, utilizando análises através da microscopia eletrônica. Estes achados sugerem que o acúmulo de lípides em artérias de hospedeiros diabéticos pode resultar do aumento da concentração de ácidos graxos não-esterificados encontrados nestes animais, fato não observado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório por LERCO et al (2000), avaliando ratos diabéticos aloxânicos, com longo período de seguimento.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. O diabetes aloxânico no rato determina alterações morfológicas, morfométricas e ultraestruturais dos pulmões, caracterizadas por diminuição do peso fresco e do volume líquido infundido nos órgãos, diminuição da complacência do pulmão isolado, aumento do número total de alvéolos/campo, redução do perímetro e da área da superfície alveolar.

2. O diabetes também determina inúmeras alterações dos septos alveolares, que incluem: expansão da matriz extracelular intersticial, com edema e deposição de colágeno e elastina; atrofia e degeneração dos pneumócitos do tipo 1; alterações dos pneumócitos tipo 2, com retenção de surfactante; degeneração, inflamação e aumento da atividade trombogênica do endotélio capilar; e espessamento significante das membranas basais do epitélio alveolar e do endotélio capilar.

3. O estresse oxidativo pulmonar possivelmente tem papel relevante na gênese e evolução das lesões histopatológicas encontradas, demonstrado pelo aumento significante da concentração de radicais oxidantes hidroperóxidos (HPO) no tecido pulmonar e diminuição das defesas antioxidantes deste órgão, mediadas pela atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px).

4. A gravidade das lesões pulmonares observadas em ratos diabéticos, bem como o estresse oxidativo dos pulmões, foi mais intensa em animais sacrificados mais tardiamente, com 6 meses de seguimento, portanto, guardando relação estreita com o tempo de duração do diabetes.

5. Apesar da gravidade das lesões provocadas pelo DM nos pulmões, não ocorreu depósito de gordura no endotélio da artéria pulmonar e de seus ramos.

RESUMO

RESUMO

Introdução: Evidências histopatológicas em pulmões de homens e animais sugerem que o sistema respiratório é igualmente afetado pelo diabetes mellitus (DM). Todavia, a julgar pela defasagem nos conhecimentos em relação às outras lesões diabéticas crônicas, observa-se que os pulmões têm sido negligenciados, principalmente no que se refere aos estudos que visam à melhor caracterização das alterações diabéticas que afetam estes órgãos, bem como os mecanismos possivelmente implicados em sua gênese e evolução. **Objetivos**: Este estudo foi realizado com os seguintes objetivos: 1- Caracterizar as alterações morfológicas, morfométricas e ultraestruturais determinadas pelo DM, nos pulmões de ratos diabéticos induzidos pela aloxana, tendo como parâmetro de comparação ratos normais não-diabéticos, de mesmo período de seguimento; 2- Estabelecer uma possível correlação entre a evolução dessas alterações com a intensidade do estresse oxidativo pulmonar. **Material e Métodos**: Cento e vinte ratos Lewis, machos, pesando entre 250 – 280g, foram distribuídos em 2 lotes de animais, com 60 ratos cada um. Cada um destes lotes foi dividido, por sorteio, em 2 grupos experimentais: GN – 30 ratos não-diabéticos controles; GD – 30 ratos diabéticos sem qualquer tratamento da doença. Cada grupo experimental, dentro dos seus respectivos lotes, foi posteriormente dividido em 3 subgrupos de animais, com 10 ratos cada, para serem sacrificados após 1, 3 e 6 meses de seguimento, respectivamente. O diabetes foi induzido pela administração endovenosa de aloxana a 2%, na dose única de 42mg/kg de peso corporal, tendo sido utilizados no experimento somente animais diabéticos com sinais clínicos evidentes de diabetes grave, associados a níveis glicêmicos >250mg/dl. Parâmetros clínicos, tais como: peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese foram obtidos de todos os animais de um dos lotes, em todos os períodos de seguimento, com o uso de gaiolas metabólicas. Glicose sanguínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada e insulina

plasmática também foram determinadas nestes animais, em todos os períodos. Confirmação do estado diabético também foi efetuada em todos os animais diabéticos do outro lote, em todos os períodos de seguimento, através da medida da glicemia e da glicosúria. A concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPO) e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px) foram medidas no tecido pulmonar de todos os animais de um dos lotes, em todos os períodos de sacrifício. Durante o sacrifício, os pulmões de todos os animais foram removidos, juntamente com a traquéia, e pesados para a obtenção dos pesos frescos dos órgãos. O volume de líquido infundido nos pulmões foi obtido após perfusão dos órgãos com formalina a 10%. A complacência do pulmão isolado foi obtida pela relação entre o volume de líquido infundido e a pressão de infusão de 20 cm H_2O. O número total de alvéolos, o perímetro alveolar e a área da superfície alveolar foram avaliados, por sorteio, em 5 animais de cada subgrupo de estudo, utilizando um analisador digital de imagens à M.O. Um total de 250 alvéolos, em cada subgrupo de estudo, foi medido, totalizando 750 alvéolos analisados por grupo experimental. A ultraestrutura de 3 pulmões de cada subgrupo de sacrifício de animais, também foi analisada pela M.E., tendo sido avaliada a espessura das membranas basais do epitélio alveolar (MBEA) e do endotélio capilar (MBEC), bem como as características morfológicas do interstício dos septos alveolares, dos pneumócitos tipos 1 e 2, e das células endoteliais. Um total de 90 eletromicrografias foram analisadas/subgrupo de estudo, totalizando 270 eletromicrografias analisadas por grupo experimental. **Resultados**: Ratos do GD apresentaram sinais clínicos evidentes de diabetes grave, com dificuldade de ganho ponderal, poliúria, polidpsia e polifagia, associados a um estado de hiperglicemia, hiperglicohemoglobinemia e hipoinsulinemia persistentes, quando comparados com ratos controles do GN ($P<0,001$). Ratos do GD também se mantiveram diabéticos durante todo o seguimento, quando comparados com seus respectivos controles. Ratos do GD apresentaram

aumento significante da concentração de radicais oxidantes (HPO) no tecido pulmonar (P<0,01), quando comparados com os controles, desde o 1º mês de sacrifício. Em contraste, a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px foi reduzida em todos os períodos de seguimento, sendo as diferenças estatisticamente significantes após 3 e 6 meses de diabetes. A intensidade do estresse oxidativo pulmonar foi maior em animais diabéticos sacrificados mais tardiamente. Os pesos frescos dos pulmões, bem como o volume de formol infundido nestes órgãos foram significantemente reduzidos em ratos do GD (P<0,01), quando comparados com o GN; embora, proporcionalmente ao peso corporal dos animais, o peso dos pulmões esteve significantemente aumentado nos sacrifícios realizados com 3 e 6 meses de seguimento (P<0,05). A complacência do pulmão isolado foi reduzida em ratos do GD, em relação aos controles (P<0,0001). O número total de alvéolos/μm^2 foi maior em ratos do GD que nos controles, enquanto que o perímetro e a área da superfície alveolar foram significantemente diminuidos (P<0,01). Ratos do GD apresentaram expansão da matriz extracelular intersticial dos septos alveolares, com edema e deposição de colágeno e elastina, quando vistos à M.E. Também foram observados atrofia e degeneração dos pneumócitos tipo 1; vacuolização dos pneumócitos tipo 2, com retenção de surfactante; degeneração, inflamação e aumento da atividade trombogênica do endotélio capilar; e espessamento significante da MBEA e da MBEC; alterações estas não observadas em ratos controles do GN. Diferentemente do observado nos vasos sistêmicos de homens diabéticos, animais diabéticos aloxânicos não apresentaram depósitos gordurosos na parede da artéria pulmonar e seus ramos. **Conclusões**: Nós concluímos que o diabetes experimental no rato, induzido pela aloxana, determina alterações morfológicas, morfométricas e ultraestruturais dos pulmões, as quais podem ter como mecanismos fisiopatológicos principais a hiperglicemia crônica e o estresse oxidativo do tecido pulmonar, o qual está diretamente relacionado com a duração do diabetes.

Unitermos: Diabetes Mellitus. Aloxana. Pulmões. Estresse Oxidativo. Morfologia. Ultraestrutura. Ratos.

SUMMARY

SUMMARY

Introduction: Histopathological evidences in human and animal lungs suggest that the respiratory system is equally affected by diabetes mellitus (DM). However, judging from the gap in the knowledge of other chronic diabetic lesions, it is observed that the lungs have been neglected, particularly as regards studies aiming at a better characterization of diabetic alterations that affect such organs as well as of mechanisms possibly implicated in their genesis and development. **Objectives**: This study was conducted with the following objectives: 1- To characterize morphological, morphometric and ultrastructural alterations determined by DM in the lungs of alloxan-induced diabetic rats using normal non-diabetic rats followed during the same period of time as a comparison parameter; 2- To establish a possible correlation between the development of such alterations with the intensity of pulmonary oxidative stress. **Material and Methods**: One hundred and twenty male Lewis rats weighing 250 – 280g were distributed into 2 animal lots with 60 rats each. Also, each of such lots was randomly divided into 2 experimental groups: GN – 30 non-diabetic control rats; GD – 30 diabetic rats without any treatment for the disease. Each experimental group, within each respective lot, was later divided into 3 subgroups of animals, each comprising 10 rats, to be sacrificed after 1, 3 and 6 months of follow-up, respectively. Diabetes was induced by intravenous administration of 2% alloxan at a single dose of 42mg/kg of body weight. Only diabetic animals with evident clinical signs of severe diabetes associated with glycemic levels > 250mg/dl were used. Clinical parameters, such as body weight, water intake, food intake and urine output, were obtained from all animals from the one of animal lots in all follow-up periods by using metabolic cages. Blood glucose, urinary glucose, glycosilated hemoglobin and plasma insulin were also determined in these animals in all periods. Confirmation of the diabetic status was also performed for all diabetic animals from the other lot in all follow-up periods by measuring glycemia and glycosuria. Lipid

hydroperoxide (HPO) concentration and the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and gluthatione peroxidase (GSH-Px) were measured in the pulmonary tissue of all animals from the one of animal lots in all sacrifice periods. During sacrifice, the lungs and tracheas of all animals were removed and measured for assessment of the organs' fresh weight. The fluid volume infused into the lungs was obtained for animals after perfusion of the organs with 10% formalin. The isolated lung compliance was calculated by the ratio between the volume of fluid infused in the lung by infusion pressure of 20 cm H_20. The total number of alveoli, the alveolar perimeter and the alveolar surface area were randomly evaluated in 5 animals from each study subgroup by using a digital image analyzer using light microscopy. A total number of 250 alveoli from each study subgroup were measured, totaling 750 analyzed alveoli per experimental group. The ultrastructure of 3 lungs from each sacrifice subgroup was also analyzed by electron microscopy (E.M.). The thickness of basement membranes of the alveolar epithelium (AEBM) and capillary endothelium (CEBM) as well as the morphological characteristics of the interstitium of alveolar septa, type-1 and type-2 pneumocyte cells and endothelial cells were evaluated. A total number of 90 electromicrographs were analyzed/study subgroup, totaling 270 electromicrographs analyzed per experimental group. **Results**: GD rats showed evident clinical signs of severe diabetes with difficulty for body weight gain, polyuria, polydipsia and polyphagia associated with a state of hyperglycemia, hyperglycohemoglobinemia and persistent hypoinsulinemia when compared to GN control rats ($P<0.001$). GD rats also showed to be diabetic during the whole follow-up as compared to their respective controls. GD rat showed significantly increased concentration of oxidant radicals (HPO) in the pulmonary tissue ($P<0.01$) as compared with controls from the first sacrifice month. However, the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px was reduced in all follow-up periods, and differences were statistically significant after 3 and 6 months of diabetes. Intensity of pulmonary

oxidative stress was higher in diabetic rats sacrificed later. The fresh weights of the lungs as well as their infused volumes were significantly reduced in GD rats (P<0.01), in the respective study lots, as compared with GN. Nevertheless, the weight of the lung was significantly increased in the sacrifices performed after 3 and 6 months of follow-up (P<0.05), proportionally to the animals' body weight. The isolated lung compliance was significantly reduced in GD rats (P<0,0001) as compared with controls. The total number of alveoli/μm^2 was larger in GD rats than in controls whereas the alveolar perimeter and alveolar surface area were significantly reduced (P<0.01). GD rats showed expansion in the extracellular interstitial matrix of the alveolar septa with edema and collagen and elastin deposition when observed by E.M. The following were also observed: atrophy and degeneration of type-1 pneumocyte cells; type-2 pneumocyte vacuolization, with surfactant retention; degeneration, inflammation and increased thrombogenic activity of the capillary endothelium; and significant AEBM and CEBM thickening. Such alterations were not observed in GN control rats. Differently from the diabetic systemic human vessels, alloxan-induced diabetic rats did not present fatty depositions in pulmonary artery wall and its branches. **Conclusions**: It was concluded that alloxan-induced experimental diabetes in rats determines morphological, morphometric and ultrastructural lung alterations, whose main physiopathological mechanisms may be chronic hyperglycemia and oxidative stress of the pulmonary tissue, which is directly correlationed to diabetes duration.

Key words: Diabetes Mellitus. Alloxan. Lungs. Oxidative Stress. Morphology. Ultrastructure. Rats.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D.A.; YAQOOB, M.M.; HARWOOD, S.M. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. **J. Nutr. Biochem.**, v.16, n.12, p.705-713, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diabetes statistics**: data from the 2007 National Diabetes Fact Sheet (the most recent year for which data is available). Disponível em: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/>. Acesso em: 29 set. 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Economic consequences of diabetes mellitus in the U.S. in 1997. **Diabetes Care**, v.21, n.2, p.296-309, 1998.

BLOCH-DAMTI, A.; BASHAN, N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal**, v.7, n.11-12, p.1553-1567, 2005.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann. Bot.**, v.91, p.179-194, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Documentação do Ministério da Saúde. **Doenças crônico-degenerativas**: evolução e tendências atuais. Brasília, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diabetes Mellitus**. Brasília, 2006. (Cadernos de atenção básica, 16).

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2008.337p.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; CERAMI, A. Non-enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. **Ann. Intern. Med.**, v.101, p.527-537, 1984.

CASTELL, C. Epidemiology and classification for diabetes mellitus. **Rev. Enferm.**, v.33, n.2, p.9-15, 2010.

CAZZATO, S. et al. Lung function in children with diabetic mellitus. **Pediatr. Pulm.**, v.37, p.17-23, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Center for Health Statistics. **Crude and age-adjusted prevalence of diagnosed diabetes per 100 population, United States**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/diabetes/statistics/prev/national/figage. htm>. Acesso em: 09 set. 2008.

COSKUN, O. et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects srtreptozotocin- induced oxidative stress and B-cell damage in rat pancreas. **Pharmacol. Res.**, v.51, p.117-123, 2005.

DAGOGO-JACK, S. Primary prevention of type-2 diabetes in developing countries. **J. Natl. Med. Assoc.**, v.98, n.3, p.415-419, 2006.

DAVI, G.; FALCO, A.; PATRONO, C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. **Antioxid. Redox Signal**, v.7, n.1-2, p.256-268, 2005.

DCCT RESEARCH GROUP. Are continuing studies of metabolic control and microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus justified? The diabetes control and complications trial. **New Engl. J. Med.**, v.318, p.246-250, 1988.

DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; McLETCHIE, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, v.1, p.484-487, 1943.

EVANS, J.L.; GOLDFINE, I.D. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Technol. Ther. Autumn.**, v.2, n.3, p.401-413, 2000.

FAGOT-CAMPAGNA, A.; BOURDEL-MARCHASSON, I.; SIMON, D. Burden of diabetes in an aging population: prevalence, incidence, mortality, characteristics and quality of care. **Diabetes Metab.**, v.31, n.2, p.5S35-5S52, 2005.

FRANCO, L.J. et al. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do diabetes mellitus no Brasil. In: BRASIL. Ministério da Saúde. **Censo de diabetes**. Brasília, 1988. p.1-32.

GARCÍA, V.M. et al. Early manifestations of nephropathy in alloxan-induced-treated rats. **Ren. Fail.**, v.20, n.4, p.551-564, 1998.

GENUTH, S. et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.26, n.11, p.3160-3167, 2003.

GIANNARELLI, R. et al. Effects of pancreas-kidney transplantation on diabetic retinopathy. **Transpl. Int.**, v.18, n.5, p.619-622, 2005.

GITTER, S.; PRIETO-DIAZ , LUKENS, F.D.W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev**., v.28, p.302-340, 1948.

HU, F.B. et al. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up. **Arch. Intern. Med.**, v.161, n.14, p.1717-1723, 2001.

JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENDLING, K.K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radic. Biol. Med.**, v.40, n.2, p.183-192, 2006.

JE, H.D. et al. Combination of vitamin C and rutin on neuropathy and lung damage of diabetes mellitus rats. **Arch. Pharm. Res.**, v.25, n.2, p.184-190, 2002.

JOHANSEN, J.S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc. Diabetol.**, v.4, n.1, p.5-15, 2005.

JUNOD, A. et al. Diabetogenic action of streptozotocin relationship of dose to metabolic response. **J. Clin. Invest.**, v.48, p.2129-2139, 1969.

KANETO, H. et al. 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.**, v.38, n.5-6, p.782-793, 2006.

KHAN, Z.A.; FARHANGKHOEE, H.; CHAKRABARTI, S. Towards newer molecular targets for chronic diabetic complications. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v.4, n.1, p.45-57, 2006.

KIDA, K. et al. Changes in lung morphologic features and elasticity caused by streptozotocin-induced diabetes mellitus in growing rats. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.128, p.125-131, 1983.

KING, G.L.; LOEKEN, M.R. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. **Histochem. Cell Biol.**, v.122. n.4, p.333-338, 2004.

KODOLOVA, I.M.; LYSENKO, I.V.; SALTYKOV, B.B. Changes in the lung in the diabetes mellitus. **Arkh. Patol.**, v.44, p.35-40, 1982.

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

LERCO, M.M. **Caracterização do modelo experimental de diabetes mellitus induzido pela aloxana**. Estudo clínico, laboratorial e histopatológico do rim, retina, coronária, aorta e artéria ilíaca no rato. 2000. 112f. Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

LERCO, M.M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir. Bras.**, v.18, n.2, p.132-142, 2003.

LERCO, M.M. et al. The number of podocytes and slit diaphragm is decreased in experimental diabetes nephropathy. **Acta Cir. Bras.**, v.21, n.2, p.87-91, 2006.

LERCO, M.M. **Nefropatia diabética experimental**. Estudo de parâmetros clínicos, laboratoriais e análise ultra-estrutural e morfométrica da membrana basal e podócitos glomerulares de ratos diabéticos induzidos pela aloxana. 2004. 114f. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

LJUBIĆ, S. et al. Reduction of difusion capacity for carbon monoxide in diabetic patient. **Chest**, v.114, n.4, p.1033-1035, 1998.

LUKENS, F.D.W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, v.28, p.302-340, 1948.

MACEDO, C.S. et al. Effect of long-term treatment with insulin and/or acarbose on glomerular basement membrane thickening in alloxan diabetic rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, n.10, p.1329-1335, 1996.

MACEDO, C.S. et al. Reduction of podocytes in late diabetic alloxan nephropathy. Prevention by glycemic control. **Acta Cir. Bras.**, v.22, p.337-341, 2007.

MACHADO, J.L.M. et al. Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzidos pela aloxana. **Acta Cir. Bras.**, v.15, n.2, p.86-93, 2000.

MAIDA, A.M.; ROZOVSKI, S.J.; KAGAN, H.M. Changes in lung lysyl oxidase activity in streptozotocin-diabetes and in starvation. **Biochem. Biophys. Acta**, v.585, p.481-487, 1979.

MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v.15, n.11, p.1509-1516, 1992.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes oxidative stress, and antioxidants: a review. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v.17, n.1, p.24-38, 2003.

MARQUES, S.F.G. **Nefropatia diabética experimental**. Associação do estresse oxidativo com as lesões renais crônicas observadas em ratos diabéticos aloxânicos. Estudo clínico, laboratorial, anatomopatológico e dos marcadores bioquímicos envolvidos nos mecanismos de injúria celular mediada pelas espécies reativas do oxigênio (ERO). 2005. 161f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

MAUER, S.M. et al. Studies of diabetic nephropathy in animals and man. **Diabetes**, v.25, p.850-857, 1976.

MEHTA, J.L. et al. Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.38, n.5-6, p.794-803, 2006.

MEXAS, A.M. et al. Pulmonary lesions in cats with diabetes mellitus. **J. Vet. Intern. Med.**, v.20, n.1, p.47-51, 2006.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analyses of experiments**. 3.ed. New York: John Wiley, 1991.

NARAYANAN, M.L. et al. Diabetes prevalence, incidence, complications and mortality among Alaska Native people 1985-2006. **Int. J. Circumpolar Health**, v.69, n.3, p.236-252, 2010.

NATHAN, D.M. et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **New Engl. J. Med.**, v.353, n.25, p.2643-2653, 2005.

NERUP, J. et al. On the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**, v.37, suppl.2, p.S82-S89, 1994.

NICOLAIE, T.; ZAVOIANU, C.; NUTA, P. Pulmonary involvement in diabetes mellitus. **Rom. J. Intern. Med.**, v.41, n.4, p.365-374, 2003.

NIEDOWICZ, D.M.; DALEKE, D.L. The role of oxidative stress in diabetic complications. **Cell Biochem. Biophys.**, v.43, n.2, p.289-330, 2005.

NOIRI, E.; TSUKAHARA, H. Parameters for measurement of oxidative stress in diabetes mellitus: applicability of enzyme-linked immunosorbent assay for clinical evaluation. **J. Investig. Med.**, v.53, n.4, p.167-175, 2005.

OFULUE, A.F.; KIDA, K.; THURBLECK, W.M. Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary lamina. **Respiration**, v.66, p.14-19, 1999.

OFULUE, A.F.; KIDA, K.; THURBLECK, W.M. Experimental diabetes and the lung. I. Changes in growth, morphometry and biochemistry. **Am. Rev. Respir.**, v.137, p.162-166, 1988.

OFULUE, A.F.; THURLBECK, W.M. Experimental diabetes and the lung. II. In vivo connective tissue metabolism. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.138, n.2, p.284-289, 1988.

OHSHIRO, Y.; TAKASU, N. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy. **Nippon Rinsho**, v.64, n.5, p.997-1003, 2006.

PIRART, J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 to 1973. **Diabetes Care**, v.2, p.342-348, 1978.

PLOPPER, C.G.; MORISHIGE, W.K. Alteration in granular (type II) pneumocyte ultrastruture by streptozotocin – induced diabetes in the rat. **Lab. Invest.**, v.38, p.143-148, 1978.

PLOPPER, C.G.; MORISHIGE, W.K. Alterations in the ultrastructure of nonciliated bronchiolar epithelial (clara) cells by streptozotocin-induced diabetic rats. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.120, n.5, p.1137-1143, 1979.

POPOV, D.; SIMIONESCU, M. Alterations of lung structure in experimental diabetes, and diabetes associated with hyperlipidemia in hamsters. **Eur. Respir. J.**, v.10, p.1850-1858, 1997.

RAHIMI, R. et al. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. **Biomed. Pharmacother.**, v.59, n.7, p.365-373, 2005.

REES, M.D. et al. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. **Free Radic. Biol. Med.**, v.44, p.1973-2001, 2008.

REINILÄ, A. Long-term effects of untreated diabetes on the arterial wall in rat. An ultrastructural study. **Diabetologia**, v.20, n.3, p.205-212, 1981.

REINILÄ, A.; AKERBLOM, H.K.; SCOW, R.O. Accumulation of lipid in muscular arteries of short-term diabetic rats. An ultrastructural study. **Diabetologia**, v.19, p.529-534, 1980.

REINILÄ, A.; KOIVISTO, V.A.; AKERBLOM, H.K. Lipids in the pulmonary artery and the lungs of severely diabetic rats: a histochemical and chemical study. **Diabetologia**, v.13, p.305-310, 1977.

RENARD, C.; VAN OBBERGHEN, E. Role of diabetes in atherosclerotic pathogenesis. What have we learned from animal models? **Diabetes Metab.**, v.32, n.1, p.15-29, 2006.

RODRIGUES, A.C. et al. Choroidal vasculature in diabetic rats. **J. Submycrosc. Cytol. Pathol.**, v.36, p.3-40, p.327-331, 2004.

ROLO, A.P.; PALMEIRA, C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.212, n.2, p.167-178, 2006.

SANDLER, M. Is the lung a “target organ” in diabetes mellitus? **Arch. Intern. Med.**, v.150, n.7, p.1385-1388, 1990.

SANDLER, M.; BUNN, A.E.; STEWART, R.I. Cross-section study of pulmonary function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.135, p.223-229, 1987.

SAYDAH, S.; LOCHNER, K. Socioeconomic status and risk of diabetes-related mortality in the U.S. **Public Health Rep.**, v.125, n.3, p.377-388, 2010.

SCHELLINI S.A. et al. Ultrastructural and morphometric aspects of ageing in the retinal capillaries of rats. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.29, n.2, p.275-280, 1997.

SCHELLINI, S.A. et al. Müller cells and diabetic retinopathy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.977-980, 1995.

SCHLEIDER, E.D.; WAGNER, E.; NERLICH, A.G. Increased accumulation of the glycoxidation product N (episilon) - (carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. **J. Clin. Invest.**, v.99, n.3, p.457-488, 1997.

SCHUYLER, M.R. et al. Abnormal lung elasticity in juvenile diabetes mellitus. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.113, p.37-41, 1976.

SCOTT, J.A.; KING, G.L. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1031, p.204-213, 2004.

SILVESTRE, J.A. **Hospitalizações SUS 1997**. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenadoria de Atenção à Saúde do Idoso, 1997.

SIPERSTEIN, M.D.; UNGER, R.N.; MADISON, L.L. Studies of muscle capillary basement membranes in normal subjects, diabetic, and prediabetic patients. **J. Clin. Invest**., v. 47, p. 1973-1999, 1968.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Dados sobre Diabetes Mellitus no Brasil**. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/97-estatisticas/342-dados-sobre-diabetes-mellitus-no-brasil>. Acesso em: 29 set. 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo II**. Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo, 2000.

SON, S.M. et al. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Curr. Diab. Rep.**, v.4, n.4, p.247-252, 2004.

SPADELLA, C.T. et al. Effect of pancreas transplantation on the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1019-1024, 1996.

SPADELLA, C.T. et al. Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana. **Acta Cir. Bras.**, v.20, n.1, p.46-54, 2005a.

SPADELLA, C.T. et al. Long-term effects of insulin therapy, islet transplantation, and pancreas transplantation in the prevention of glomerular changes in kidneys of alloxan-induced diabetic rats. **Transpl. Proc.**, v.37, p.3468-3471, 2005b.

SPADELLA, C.T. et al. Pancreas transplantation prevents cellular oxidative stress in kidneys of alloxan-induced diabetic rats. **Transpl. Proc.**, v.40, n.2, p.524-528, 2008.

SPADELLA, C.T. et al. Relationship between endocrine function and digital image quantitation of the pancreatic insulin-, and glucgon positive cel masses in normal, alloxan-diabetic, and heterotopic transplanted rats. **Transpl. Proc.**, v.32, n.8, p.2820-2823, 2000.

SPADELLA, C.T. et al. Temporal relationship between successful pancreas transplantation and control of ocular complications in alloxan-induced diabetic rats. **Transpl. Proc.**, v.40, n.2, p.518-523, 2008.

SPADELLA, C.T.; SCHELLINI, S.A.; BACCHI, C.E. Pancreas transplantation versus islet transplantation versus insulin therapy in the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. **Transpl. Proc.**, v.30, p.327-329, 1998.

SRIDULYAKUL, P. et al. Endothelial nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary circulation of streptozotocin-induced diabetic rats: comparison using image analysis. **Clin. Hemorheol. Microcirc.**, v.29, n.3-4, p.423-428, 2003.

SRIDULYAKUL, P.; CHAKRAPHAN, D.; PATUMRAJ, S. Vitamin C supplementation could reverse diabetes-induced endothelial dysfunction in mesenteric microcirculation in STZ-rats. **Clin. Hemorheol. Microcirc.**, v.34, n.1-2, p.315-321, 2006.

STUMP, C.S.; CLARK, S.E.; SOWERS, J.R. Oxidative stress in insulin-resistant conditions: cardiovascular implications. **Treat. Endocrinol.**, v.4, n.6, p.343-351, 2005.

TAN, A.I.; FORBES, J.M.; COOPER, M.E. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. **Semin. Nephrol.**, v.27, n.2, p.130-143, 2007.

TCHOBROUTSKY, G. Relation of diabetic control to development of microvascular complications. **Diabetologia**, v.15, p.143-152, 1978.

THOMAS, M.C.; FORBES, J.M.; COOPER, M.E. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. **Am. J. Ther.**, v.12, n.6, p.562-572, 2005.

UNGER, R.H. Meticulous control of diabetes: benefits, risks and precautions. **Diabetes**, v.31, p.479-483, 1982.

VAN DIEREN, S. et al. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. **Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.**, v.7, suppl.1, p.S3-8, 2010.

VARAS-LORENZO, C. et al. Prevalence of glucose metabolism abnormalities and cardiovascular co-morbidity in the US elderly adult population. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf.**, v.15, n.5, p.317-326, 2006.

VAZIRI, N.D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens**, v.13, p.93-99, 2004.

VINCENT, A.M. et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocr. Rev.**, v.25, n.4, p.612-628, 2004.

VRACKO, R.; THORNING, D.; HUANG, T.W. Basal lamina of alveolar epithelium and capillaries quantitatives changes with ageing in diabetes mellitus. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.120, p.973-983, 1979.

WEYNAND, B. et al. Diabetes Mellitus induces a thickening of the pulmonary basal lamina. **Respiration**, v.66, p.14-19, 1999.

WILD, S.; GOJKA, R.; GREEN, A. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, n.5, p.1047-1053, 2004.

WILLIAMSON, J.R.; VOGLER, N.J.; KILO, C. Estimation of vascular basement membrane. Theorical and practical considerations. **Diabetes**, v. 18, p. 567-578, 1969.

ZIEGLER, D. et al. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. **Diabetes Med.**, v.21, n.2, p.114-121, 2004.