

**AMANDA NATÁLIA LUCCHESI**

**Avaliação clínica, laboratorial e dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo hepatocelular em ratos diabéticos induzidos pela aloxana**

Dissertação 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 Mestre.

**Orientador: Prof. Adjunto César Tadeu Spadella**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2010

**AMANDA NATÁLIA LUCCHESI**

**Avaliação clínica, laboratorial e dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo hepatocelular em ratos diabéticos induzidos pela aloxana**

Dissertação 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 Mestre.

**Orientador: Prof. Adjunto César Tadeu Spadella**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

2010

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

Lucchesi, Amanda Natalia.

Avaliação clínica, laboratorial e dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo hepatocelular em ratos diabéticos induzidos pela aloxana / Amanda Natalia Lucchesi. - Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: César Tadeu Spadella

Capes: 40101002

1. Diabetes. 2. Síndrome metabólica. 3. Fígado – Doenças.

Palavras-chave: Antioxidantes; Diabetes Mellitus; Doença gordurosa do fígado de etiologia não-alcoolica; Estresse oxidativo; Síndrome metabólica.

## **DEDICATÓRIAS**

## **Dedicatórias**

Aos meus pais **Luiz Carlos Lucchesi e Lúcia de Fátima Maschieri Lucchesi**, verdadeiras dádivas em minha vida, os quais serão eternamente meu espelho; obrigada por todo apoio, carinho, orações, cuidado e inestimável amor.

Às minhas irmãs **Letícia Natália Lucchesi e Mirelle Natália Lucchesi**, pela presença constante em minha vida; companheiras que levarei comigo por toda vida.

Ao meu noivo **Fernando Dias Fernandes**, meu amor, amigo e companheiro; obrigada pela compreensão, carinho e apoio concedidos em todos os momentos.

Ao pastor **Valter Calixto**, amigo e irmão de fé; obrigada por todas as orações concedidas, verdadeiro exemplo de vida.

Ao **Professor César Tadeu Spadella**, pessoa na qual tenho verdadeira admiração, mais que um orientador, ele é um pai, um exemplo de vida e sabedoria diária, sempre me motivando e incentivando, serei eternamente grata pela confiança depositada durante todo o trabalho e pelo conhecimento à pesquisa sempre transmitido.

**HOMENAGENS**

Ao meu **Senhor Jesus Cristo**,  
**meu Deus**, dono de todo entendimento e sabedoria, por mais esta  
vitória conquistada em minha vida

Aos meus avós maternos **Waldemar Maschieri e Lourdes Creste Maschieri (in memorian)** pessoas que sempre foram um exemplo de luta e perseverança.

Aos meus avós paternos **José Luiz Gonçalves Lucchesi (in memorian) e Eoracy Torelli Lucchesi**, pelo carinho, exemplo de vida e perseverança.



## **AGRADECIMENTOS**

## **Agradecimentos**

Minha eterna gratidão a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização deste trabalho. Em especial:

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

Aos **técnicos Ednelson Bianchi e Danilo Borsato**, pela ajuda e colaboração nos momentos experimentais;

Ao **biólogo Dr. Sílvio Fernando Guideti Marques**, pela ajuda na realização das dosagens dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo hepatocelular;

À **bióloga Dra. Maria Salete Sartori** e as funcionárias Maria de Fátima Aparecida Biazon e Maria Luisa dos Santos pela realização das dosagens laboratoriais.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP**, pela amizade e paciência nas orientações;

À **querida secretária e amiga Luana Ferreira Amaral**, pela ajuda constante na formatação desta dissertação;

Ao **peçoal da secretaria do Departamento de Cirurgia e Ortopedia**, Simone, Mary e Douglas pela ajuda e atenção concedidas em todos os momentos necessários;

À sra. **Rosemeire Aparecida Vicente** bibliotecária Central do Campus da Unesp de Botucatu, pela confecção de sua ficha catalográfica deste trabalho.

À sra. **Rosemary Cristina da Silva** e à sra. **Taís Almeida** bibliotecárias Central do Campus da Unesp de Botucatu, pela ajuda na correção das citações bibliográficas deste trabalho.

Ao **GAP- Grupo de apoio a pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP**, pela versão do resumo desta tese para o inglês e pelas orientações da sua parte estatística.

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

## **SUMÁRIO**

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
1 - Animais utilizados	28
2 - Ambiente de experimentação, profilaxia e tratamento de infecções	28
3 - Grupos experimentais	29
4 - Momentos de avaliação e sacrifício	29
5 - Parâmetros analisados	30
6 - Técnicas utilizadas	30
6.1. Anestesia e sacrifício	30
6.2. Método de indução do diabetes experimental	31
6.3. Metodologia utilizada na obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais em gaiolas metabólicas	31
6.4. Exames laboratoriais	33
6.5. Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo hepatocelular	33
6.5.1- Determinação de hidroperóxidos lipídicos (HPO)	34
6.5.2 - Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	34
6.5.3 - Determinação da atividade da catalase (CAT)	35
6.5.4- Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)	35
6.6. - Exame anatomopatológico	35
7. Análise estatística	35
RESULTADOS	37
1. Achados clínicos e laboratoriais	38
2. Marcadores do estresse oxidativo hepatocelular	48
3. Achados macroscópicos de necropsia	53
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES	67
RESUMO	69
SUMMARY	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1 - 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. 32
- Figura 2 - Ilustração comparativa do estado nutricional de um rato diabético (A) e de um rato normal (B) sacrificados com 6 meses de seguimento. 39
- Figura 3 - Evolução do peso corporal (g) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 40
- Figura 4 - Evolução da ingestão hídrica (ml/24h) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 41
- Figura 5 - Evolução da ingestão alimentar (g/12h) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 42
- Figura 6 - Evolução da diurese (ml/24h) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 43
- Figura 7 - Evolução da glicemia de jejum (mg/dl) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 44
- Figura 8 - Evolução da glicose urinária (mg/dl) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 45

Figura 9 – Evolução da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 46

Figura 10 – Evolução da insulina plasmática ( $\mu$ U/ml) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento. 47

Figura 11 – Variação da concentração de hidroperóxidos lipídeos (nmol/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 49

Figura 12 – Variação da concentração da atividade de superóxido dismutase SOD (U/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 50

Figura 13 – Variação da concentração da atividade da catalase (micromol/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 51

Figura 14 – Variação da concentração da atividade de glutathione peroxidase (micromol/minuto/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 52

Figura 15 - 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. 54

Figura 16 - Aspecto geral do cólon de um animal diabético sacrificado com 6 meses de diabetes. Observe a grande dilatação do cecum deste animal. 54

## **LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1 – Médias  $\pm$  desvios-padrão da evolução do peso corporal (g) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 40

Tabela 2 – Médias  $\pm$  desvios-padrão da ingestão hídrica (ml/24h) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 41

Tabela 3 – Médias  $\pm$  desvios-padrão da ingestão alimentar (g/12h) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 42

Tabela 4 – Médias  $\pm$  desvios-padrão da diurese (ml/24h) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 43

Tabela 5 – Médias  $\pm$  desvios-padrão da glicemia de jejum (mg/dl) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 44

Tabela 6 – Médias  $\pm$  desvios-padrão da glicose urinária (mg/dl) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 45

Tabela 7 – Médias  $\pm$  desvios-padrão da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1</sub>C) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 46

Tabela 8 – Médias  $\pm$  desvios-padrão da insulina plasmática ( $\mu$ U/ml) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento. 47



Tabela 9 - Médias  $\pm$  desvios-padrão das concentrações de hidroperóxidos de lipídeos (nmol/g tecido hepático) em animais dos dois grupos experimentais, durante o período de seguimento. 49

Tabela 10 - Médias  $\pm$  desvios-padrão da atividade de superóxido dismutase SOD (U/g tecido hepático) em animais dos dois grupos experimentais, durante o período de seguimento. 50

Tabela 11 - Médias  $\pm$  desvios-padrão da atividade da catalase (micromol/g tecido hepático) em animais dos dois grupos experimentais, durante o período de seguimento. 51

Tabela 12 - Médias  $\pm$  desvios-padrão da atividade de glutathione peroxidase (micromol/minuto/g tecido hepático) em animais dos dois grupos experimentais, durante o período de seguimento. 52

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

---

DM – Diabetes Mellitus

EROs - espécies reativas do oxigênio

PKC - proteína C quinase

DGFNA - doença hepática gordurosa, de etiologia não-alcoólica

GN- Grupo Controle: constituído de 30 ratos normais, não-diabéticos;

GD- Grupo Diabético: constituído de 30 ratos diabéticos induzidos pela administração endovenosa de aloxana, sem qualquer tratamento;

M<sub>1</sub> - animais dos 3 subgrupos, no momento inicial do experimento (14<sup>o</sup> dia), para obtenção apenas de parâmetros clínicos e laboratoriais.

M<sub>2</sub> – animais sacrificados com 1 mês de seguimento normal ou com diabetes;

M<sub>3</sub> – animais sacrificados com 3 meses de seguimento normal ou com diabetes;

M<sub>4</sub> – animais sacrificados com 6 meses de seguimento normal ou com diabetes.

HPOs - hidroperóxidos lipídicos

SOD - superóxido dismutase

CAT – catalase

GSH-Px - glutathione peroxidase

IM – intramuscular

HGT - hemoglicoteste

HbA<sub>1</sub>C - hemoglobina glicosilada

NBT - nitrobluetetrazólio

GSSG - glutathione oxidada

GR - glutathione reductase

NADPH – trifosfato de adenosine dinucleotídeo

AGEs - glicação protéica/“advanced glycation endproducts”

AGL - ácidos graxos livres

TG – triglicérides

TNF $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

## **INTRODUÇÃO**

## **INTRODUÇÃO**

O Diabetes Mellitus (DM) é considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, atingindo países de todos os níveis de desenvolvimento e pessoas de todas as classes sociais (DAVIDSON, 2001; DAGOGO - JACK, 2006; FAGOT – CAMPAGNA et al., 2005; GENUETH et al., 2003; HU et al., 2001; KIM et al., 2006).

Nos Estados Unidos, estima-se que a doença atinja cerca de 23,6 milhões de pessoas, correspondendo a 7,8% da população americana. Destas, 17,9 milhões de pessoas tem o diagnóstico de diabetes confirmado, sendo que 5,7 milhões desconhecem a sua condição de doente. Outras 57 milhões de pessoas são classificadas como pré-diabéticas, sendo estimada uma incidência de 1,6 milhões de novos casos todos os anos, em pessoas acima dos 20 anos de idade. Naquele país, são gastos quase 174 bilhões de dólares anualmente com o tratamento da doença e suas complicações; destes 116 bilhões são gastos com medicamentos e 58 bilhões no custeio de despesas relacionadas ao ônus social do diabetes vinculado à perda do trabalho, morte prematura e deficiência. (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998; VARAS-LORENZO et al., 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O DM também acompanha-se de altos índices de morbidade e mortalidade, sendo a 7<sup>a</sup> causa associada de morte registrada nos Estados Unidos, em 2006. Entre as complicações determinadas pelo diabetes, a doença cardíaca foi observada em 68% dos casos de morte relacionadas ao diabetes, entre pessoas com idade igual ou superior a 65 anos. O risco de sofrer um derrame cerebral foi 2 a 4 vezes maior em pessoas portadoras de diabetes, naquele país, quando comparado às pessoas não-diabéticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007)

O diabetes também é a principal causa de cegueira, entre adultos com idade compreendida entre 20 e 74 anos. Entre as lesões oculares determinadas pela doença, a retinopatia é responsável por 12.000 a 24.000 novos casos de cegueira, nos E.UA., a cada ano. Dados de 2005,

revelam que a nefropatia diabética foi responsável por 44% dos novos casos de falência renal, sendo que 46.739 pessoas diabéticas iniciaram o tratamento de hemodiálise nos E.U.A. e Porto Rico. Naquele ano, aproximadamente 180.000 pacientes diabéticos, com insuficiência renal crônica, estavam vivendo sob regime de diálise ou haviam recebido um enxerto renal nestes países. Cerca de 60 a 70% das pessoas com diabetes têm algum dano do sistema nervoso periférico. Mais de 60% das amputações não traumáticas de membros inferiores ocorrem em pessoas portadoras de diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

Em nosso país, a situação não é muito diferente, pois o diabetes desempenha papel de fundamental importância nos elevados índices de morbidade e mortalidade nacionais. 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 a importância do DM na elevação dos índices de morbidade e mortalidade mundiais, os mecanismos primariamente responsáveis pela agressão dos tecidos e órgãos pela doença, ainda são bastante discutíveis. Esta lacuna no conhecimento vem explicar a incapacidade de os pesquisadores encontrarem um tratamento eficaz para prevenir e/ou controlar a progressão da lesão diabética crônica praticamente sobre todos os órgãos da economia animal (DE OLIVEIRA & MILECH, 2004).

Infelizmente, inúmeras pesquisas têm confirmado que o controle eficaz da glicose sanguínea, com o uso de dieta, insulina ou administração de hipoglicemiantes orais, não é suficientemente capaz de controlar as lesões diabéticas crônicas, no longo prazo (VIBERTI et al., 1983; DANDONA et al., 1985; THE DCCT RESEARCH GROUP, 1988). O mesmo pode ser dito para os sistemas implantáveis de administração de insulina (TAMBORLANE & PRESS, 1984; CANNY et al., 1985), e também para o transplante de ilhotas de Langerhans e o transplante de pâncreas, que embora com boas perspectivas no tratamento do diabetes, ainda continuam restritos a um grupo selecionado de pacientes, estando associados a riscos de complicações metabólicas e aos inconvenientes advindos da cirurgia e da

imunossupressão crônica (RYAN et al., 2001; GRUESSNER & SUTHERLAND, 2005).

Este viés no tratamento do diabetes dá sustentação à hipótese de que a normalização da hiperglicemia talvez possa ser apenas uma das etapas metabólicas a serem controladas na doença. Este fato, porém, suscita a necessidade de se realizar novas pesquisas, em busca de conhecimentos capazes de embasar estratégias terapêuticas mais eficazes para o controle desta terrível moléstia e suas complicações.

Neste sentido, estudos de NERUP et al., 1994 e relatos do THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003, têm sugerido que a base inicial das anormalidades do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas no diabetes é a ação inadequada da insulina, ao nível dos tecidos alvos atingidos pela doença, em decorrência da resistência à ação deste hormônio e/ou de sua secreção deficiente pelo pâncreas, que resultam na hiperglicemia.

Todavia, ainda que a hiperglicemia crônica seja a alteração invariavelmente presente nesses pacientes, é provável que este distúrbio represente, apenas, a etapa inicial de uma complexa cascata de eventos que conduz às anormalidades metabólicas e às lesões crônicas do diabetes.

Revisões recentes da literatura têm apontado o estresse oxidativo celular como um dos mecanismos de suma importância na gênese do dano tecidual relacionado à hiperglicemia. Através deste mecanismo, o diabetes seria capaz de aumentar a produção de radicais livres, ou espécies reativas do oxigênio (EROs), ao nível celular, as quais, pela sua toxicidade, seriam capazes de iniciar ou promover o desenvolvimento das lesões diabéticas crônicas sobre os vasos, retina, rins, fígado, pulmões, nervos e tecidos do hospedeiro diabético, caso as defesas antioxidantes do organismo não fossem capazes de bloquear a ação nociva destas substâncias (BLOCH-DAMI et al., 2005; DAVI et al., 2005; KANETO et al., 2006; KHAN et al., 2006).

Sabe-se que cerca de 2 a 5% do oxigênio absorvido pelo organismo para produzir energia não são utilizados, sofrendo redução tetravalente e gerando as EROs.

Esses 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.

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.

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 os hidroperóxidos lipídicos e o malondialdeído, resultando na morte celular.

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 ser o estresse oxidativo celular (BLOKHINA et al., 2003; VAZIRI, 2004; COSKUN et al., 2005; MARQUES, 2005).

As lesões celulares provocadas pela toxicidade do oxigênio e seus produtos têm despertado o interesse de inúmeros pesquisadores, pois estão diretamente associadas a diversos processos fisiopatológicos, como: o favorecimento ao aparecimento de mutações cromossômicas, o envelhecimento, o câncer, a inflamação, a arteriosclerose, a síndrome demencial, e particularmente, o diabetes.

No entanto, há razoáveis evidências na literatura para afirmar que o estresse oxidativo celular também não é o único mecanismo capaz de



desencadear as lesões diabéticas crônicas, haja vista o papel nocivo de outras substâncias produzidas no organismo diabético, como os produtos avançados da glicação protéica (TAN et al., 2007) e a ativação das vias moleculares dos canais de cálcio, do poli-ol e da proteína C quinase (KHAN et al., 2006) todos, provavelmente, com ações fisiopatológicas interligadas.

Estes fatos vêm explicar, hoje, a existência de inúmeras vertentes de pesquisas clínicas e experimentais sobre o diabetes, as quais demandam uma grande quantidade de hipóteses discutíveis e conflitantes, ainda a serem testadas.

De nosso interesse está a correlação existente entre a lesão hepática determinada pelo DM, particularmente a doença gordurosa do fígado, de etiologia não alcoólica, e o possível papel das EROs sobre a gênese das complicações hepáticas decorrentes desta patologia, tendo como objeto de estudo modelos-animais de diabetes.

Evidências clínicas e experimentais sugerem que o fígado, a exemplo dos demais órgãos, também pode ser comprometido pelo DM, no longo prazo (HARRISON & DIEHI, 2002; LI et al, 2002; ADAMS & ANGULO, 2005; LECLERCQ et al., 2007; YEAH & BRUNT, 2007; EVELSON et al., 2005; PORTINCASA et al., 2005).

O comprometimento do fígado pelo diabetes é conhecido pela designação de doença hepática gordurosa, de etiologia não-alcoólica (DGFNA), que histologicamente não pode ser distinguida da esteatose hepática induzida pelo álcool (HARRISON & DIEHI, 2002).

A DGFNA está presente em até 24% da população mundial, atingindo aproximadamente 5% da população americana (McCULLOUGH, 2002). Afeta primordialmente pacientes com fatores de riscos metabólicos, tais como a obesidade, o diabetes, a dislipidemia e/ou os portadores da síndrome metabólica (CLARK, 2006). Estima-se, hoje, que entre 25 a 75% dos pacientes obesos e portadores de DM do tipo 2 são acometidos pela DGFNA (McCULLOUGH, 2002).

A DGFNA caracteriza-se por ser um síndrome-clínico-patológico com amplo espectro de manifestações histológicas, que pode assumir

desde um curso clínico benigno, até formas mais graves de doença hepática crônica, como a esteato-hepatite não alcoólica, a cirrose hepática e, eventualmente, o carcinoma do fígado (CLARK, 2006; YEAH & BRUNT, 2007).

Embora a DGFNA seja uma entidade bastante reconhecida, não estão claramente definidos, ainda, os seus reais mecanismos fisiopatológicos. Primariamente, porém, esta doença tem sido considerada uma manifestação hepática da síndrome de resistência à insulina, a qual altera o metabolismo dos ácidos graxos resultando no acúmulo de gordura no fígado. Esta alteração, por sua vez, exacerba a insulino-resistência hepática, piorando o aproveitamento da glicose por este órgão (ADAMS & ANGULO, 2005).

Estudos clínicos e experimentais recentes sugerem que uma vez estabelecida a DGFNA no diabetes, o fígado já comprometido poderia sofrer a ação das EROs e ter o agravamento do dano hepatocelular, com inflamação e progressão para esteato-hepatite e cirrose (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2004; FRAENKEL et al., 2004; EVELSON et al., 2005; ANDICAN & BURÇAK, 2005; EVANS, 2007; CALAMITA & PORTINCASA, 2007; DUVNJAK et al., 2007).

Por outro lado, ainda é controverso na literatura se o estresse oxidativo do tecido hepático, observado frequentemente em modelos experimentais de diabetes, é a causa ou a conseqüência das alterações histopatológicas observadas no fígado destes animais. Também são escassos os estudos de longo prazo onde o estresse oxidativo tenha sido investigado neste órgão e em outros tecidos, havendo também dúvidas, se o estresse oxidativo atua como agente indutor e/ou promotor da lesão hepatocelular (LI et al., 2002; RAHIMI et al., 2005). Estas premissas evidenciam a necessidade de novas investigações sobre o assunto, no intuito de melhor esclarecer os mecanismos fisiopatológicos implicados na gênese da DGFNA, com vistas a sua prevenção e tratamento mais eficazes.

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram:

1 - Caracterizar as alterações clínicas e laboratoriais de ratos diabéticos induzidos pela administração endovenosa de aloxana;

2 – Avaliar as potencialidades deste modelo-animal de Diabetes Mellitus para produzir estresse oxidativo das células hepáticas, visando a estabelecer, em estudo futuro, uma correlação entre as alterações observadas e as eventuais lesões histopatológicas encontradas, no longo prazo, no fígado destes animais;

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Animais utilizados**

Neste estudo foram utilizados ratos machos, adultos, da linhagem Lewis, pesando em torno de 250g, com aproximadamente três meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu. Durante o experimento os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu. Este trabalho, cujo protocolo de nº 687, foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em 25 de setembro de 2008.

### **2. Ambiente de experimentação, profilaxia e tratamento de infecções**

Os animais foram acondicionados em caixas de poliuretano, forradas com palha autoclavada, em grupos de 4 ratos por caixa, colocadas em ambiente climatizado à 25° C, com exaustão e foto-períodos artificiais claro/escuro de 12 horas, sendo alimentados com ração balanceada padrão para roedores, recebendo água *ad libidum*. 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, adicionado à água de beber e tratados profilaticamente de pediculose, e fipronil/metoprene (Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia –SP), respectivamente, por via oral, adicionado à água de beber e colocado na superfície da pele. Na evidência de sinais clínicos de piodermite e/ou pneumonia, 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. Grupos experimentais**

Do lote inicial de animais oriundos do biotério foram sorteados dois 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 grupos experimentais, assim designados:

**GN - Grupo Controle:** constituído de 30 ratos normais, não-diabéticos;

**GD . Grupo Diabético:** constituído de 30 ratos diabéticos induzidos pela administração endovenosa de aloxana, sem qualquer tratamento da doença;

Óbitos ocorridos pós-indução do diabetes e no seguimento tardio foram repostos, de modo a não comprometer o número final de ratos estudados.

### **4. Momentos de avaliação e sacrifício**

Cada um dos grupos experimentais foi dividido em 3 subgrupos de ratos, com 10 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados, respectivamente, em 4 momentos do experimento, a saber:

M<sub>1</sub> - animais dos 3 subgrupos, no momento inicial do experimento (14º dia), para obtenção apenas de parâmetros clínicos e laboratoriais.

M<sub>2</sub> - animais sacrificados com 1 mês de seguimento normal ou com diabetes;

M<sub>3</sub> - animais sacrificados com 3 meses de seguimento normal ou com diabetes;

M<sub>4</sub> – animais sacrificados com 6 meses de seguimento normal ou com diabetes.

## **5. 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;

Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo: dosagens no tecido hepático da concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPO) e da atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px);

Exame anatomopatológico:

Macroscopia: necropsia com exame de todos os órgãos abdominais e torácicos, com ênfase às complicações infecciosas da pele e tegumento, dos pulmões, da cavidade peritoneal e de outros órgãos;

## **6. Técnicas utilizadas**

### **6.1. Anestesia e sacrifício**

O sacrifício dos animais foi realizado sob efeito de anestesia geral, utilizando ketamina, na dose de 100 mg/Kg de peso corporal (Rhobifarma Ind. Farmacêutica Ltda, Hortolândia – SP), associada à xilazina, na dose de 50 mg/Kg de peso (Rhobifarma Ind. Farmacêutica Ltda, Hortolândia – SP), administradas por via IM. A eutanásia foi feita por hipovolemia e secção da veia cava infradiafragmática.



## **6.2. Método de indução do diabetes experimental**

O diabetes foi induzido pela administração de aloxana (5,6 dioxiuracil monohidrato – Sigma Co, USA), por via endovenosa, na dose única de 42mg/kg de peso corporal, utilizando uma das veias da cauda do animal, após jejum de 12 horas. O diabetes foi confirmado em duas avaliações consecutivas, realizadas com 7 e 14 dias após a indução, tendo por base a observação de parâmetros clínicos de diabetes grave (poliúria, polidipsia e polifagia) e a determinação da quantidade de glicose no sangue e na urina destes animais.

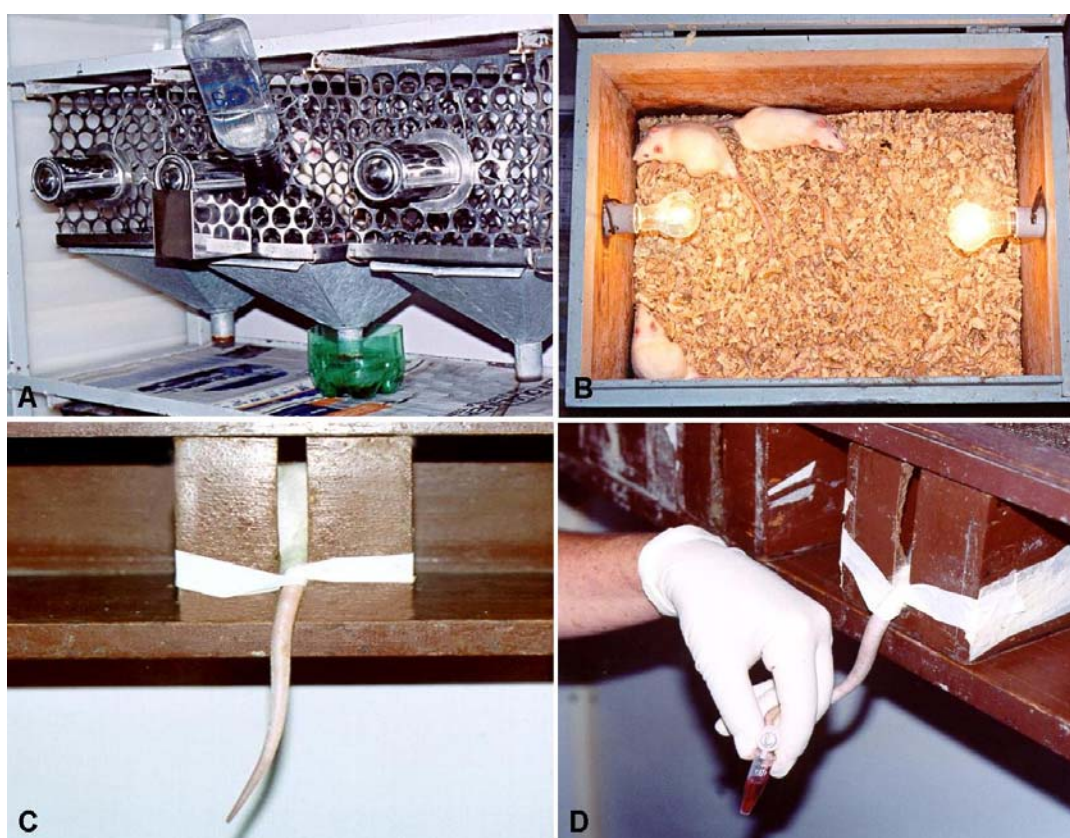
Neste experimento somente foram utilizados ratos com glicosúria +++ e com glicemia >200mg/dl, determinadas no período inicial por fitas reagentes e hemoglicoteste (HGT), respectivamente.

## **6.3. Metodologia utilizada na obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais em gaiolas metabólicas**

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), os animais 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, 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. A coleta de sangue nos demais momentos de avaliação do experimento foi feita durante o sacrifício dos animais, por punção cardíaca, com o tórax aberto. A Fig. 1 ilustra a metodologia utilizada na coleta de parâmetros clínicos e laboratoriais em gaiolas metabólicas.



**Figura 1** - 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.

#### **6.4. Exames laboratoriais**

As dosagens de glicose sangüínea e urinária foram realizadas pelo método enzimático da Johnson & Johnson, para utilização em equipamento Vitro. A glicosuria e cetonuria foram quantificadas através de fitas reagentes (Gluketur test), o hemogluco teste por dispositivo digital (Accur – Check - Roche), a hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1C</sub>) pelo perfil eletroforético da hemoglobina, utilizando kits da marca Sebia, e a insulina plasmática por radioimunoensaio, pela técnica do duplo anticorpo em fase sólica (COAT-A-COAT INSULIN), utilizando kits da DPC –MedLab., São Paulo).

#### **6.5. Avaliação dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo hepatocelular**

Para o estudo do estresse oxidativo hepatocelular, os fígados de todos os animais de ambos os grupos experimentais foram retirados e pesados, tendo sido obtidos fragmentos representativos de todos os lobos hepáticos. A seguir, os fragmentos foram cortados com lâmina de barbear sobre uma placa de cera rosa de parafina, em fragmentos longitudinais menores com 5 mm de comprimento por 3mm de espessura. Parte destes fragmentos foi colocada em tubos de Ependorff e congelada a -80°C para a medida da concentração de radicais oxidantes HPO e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px. Outra parte foi colocada em frascos contendo formol tamponado a 10% ou glutaraldeído a 2,5% e encaminhada para os laboratórios de anatomia patológica e microscopia eletrônica, para estudo histopatológico e ultraestrutural do fígado, a ser realizado em projeto futuro, em continuidade ao trabalho ora apresentado.

Após haver sido completada a coleta de amostras do fígado de todos os animais sacrificados com 1, 3 e 6 meses de seguimento, os fragmentos ultra-congelados deste órgão foram resfriados em cuba de isopor, com gelo picado, a 4°C. Posteriormente, o tecido hepático de

cada animal foi homogeneizado em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 4 ml de tampão HEPES (20 mM e pH 7,2), contendo 1mM de EGTA, 210 mM de manitol e 70 mM de sacarose. Os homogeneizados foram centrifugados a 3000rpm, por 5 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C (PEREIRA et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração e atividade das enzimas de interesse neste estudo. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro para microplacas *SpectraMAX* (modelo 190). Todos os reagentes utilizados para a determinação dos parâmetros anteriores foram fabricados pela Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA).

#### **6.5.1. Determinação da concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPO)**

O método utilizado para a quantificação de HPO consistiu, inicialmente, no tratamento do tecido hepático com clorofórmio, a fim de eliminar qualquer interferência causada por íons férricos endógenos ou por peróxido de hidrogênio. Através deste método os hidroperóxidos presentes na amostra devem reagir com íons ferrosos ( $Fe^{2+}$ ) produzindo íons férricos ( $Fe^{3+}$ ). Após a adição de um cromógeno, os íons férricos formados foram medidos pelo espectrofotômetro a 500nm (MIHALJEVIC et al., 1996).

#### **6.5.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD total foi determinada com base na capacidade de a enzima inibir a redução do NBT (nitrobluetetrazólio) por radicais livres gerados pela xantina oxidase em meio alcalino. Neste processo, a xantina oxidase gera fluxo de ( $O_2^-$ ) do NBT em temperatura ambiente. A atividade da SOD, expressa em unidade (U) da enzima por mililitro (ml), foi definida como a quantidade de enzima necessária para

exibir 50% da dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ), medida através de leitura espectrofotométrica a 450nm (MAIER & CHAN, 2002).

### **6.5.3. Determinação da atividade da catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada com base na capacidade de a enzima reagir com o metanol, na presença de peróxido de hidrogênio. O formaldeído produzido foi medido a 540nm, após adição do cromógeno *Purpald* (JOHANSSON & BORG, 1988).

### **6.5.4. Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)**

A atividade da GSH-Px foi medida através da oxidação da glutathiona em presença de *cumene hidropéroxido*. A glutathiona oxidada (GSSG) formada através da GSH-Px foi convertida em glutathiona reduzida (GSH), na presença de glutathiona redutase (GR) e NADPH +  $H^+$ . Uma unidade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 $\mu$ mol de GSH por minuto, que corresponde a 0,5  $\mu$ mol de NADPH +  $H^+$  oxidado por minuto, com absorvância a 340nm (URSINI et al., 1985).

## **6.6. Exame anatomopatológico**

Durante a necrópsia foram avaliadas todas as alterações macroscópicas determinadas pelo diabetes, no longo prazo, tais como: debilidade muscular, caquexia, presença de infecções, catarata ocular e neuropatia autonômica do cólon.

## **7. 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), dos

marcadores bioquímicos do estresse oxidativo hepatocelular (HPO, SOD, CAT e GSH-Px), segundo os 2 grupos experimentais e 3 ou 4 momentos de avaliação (inicial e nos sacrifícios), foi realizado através da análise de variância para o esquema fatorial 2x3 ou 2x4, 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.

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

## **RESULTADOS**

## **RESULTADOS**

### ***1. Achados clínicos e laboratoriais***

Ratos controles (GN) apresentaram parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com o observado para a espécie e idade, em todos os períodos avaliados, com 1, 3 e 6 meses de seguimento. Não houve óbitos neste grupo.

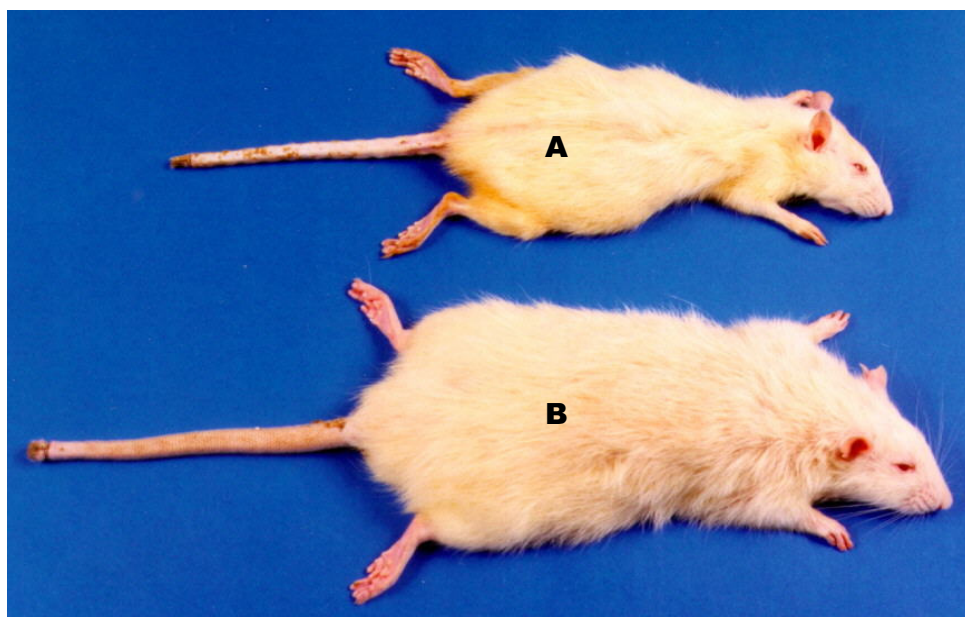
Em contraste, ratos diabéticos, sem qualquer tipo de tratamento (GD) evoluíram com progressiva perda de peso corporal (Fig. 2) e aumento significativo da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparado com os animais do GN ( $P < 0,01$ ). Neste grupo, os animais diabéticos também apresentaram aumento significativo da glicose sangüínea, glicose urinária e da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1C</sub>), com níveis significativamente mais baixos de insulina plasmática em relação aos ratos controles ( $P < 0,01$ ).

O índice de mortalidade também foi extremamente elevado nos animais que receberam aloxana. Do lote inicial de animais tratados com esta droga, aproximadamente 37,5% dos ratos morreram nos primeiros 14 dias após a indução do diabetes, em decorrência de alterações metabólicas e/ou, pela ação tóxica da droga. Cerca de 20% 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 30 animais colocados em seguimento no GD, aproximadamente 16,7% (5 animais) morreram no seguimento tardio até 6 meses, devido à desnutrição e/ou infecção pulmonar.



As tabelas numeradas de 1 a 8 e as figuras numeradas de 3 a 10 demonstram os achados clínicos e laboratoriais obtidos em ambos os grupos experimentais, com 1, 3 e 6 meses de seguimento.

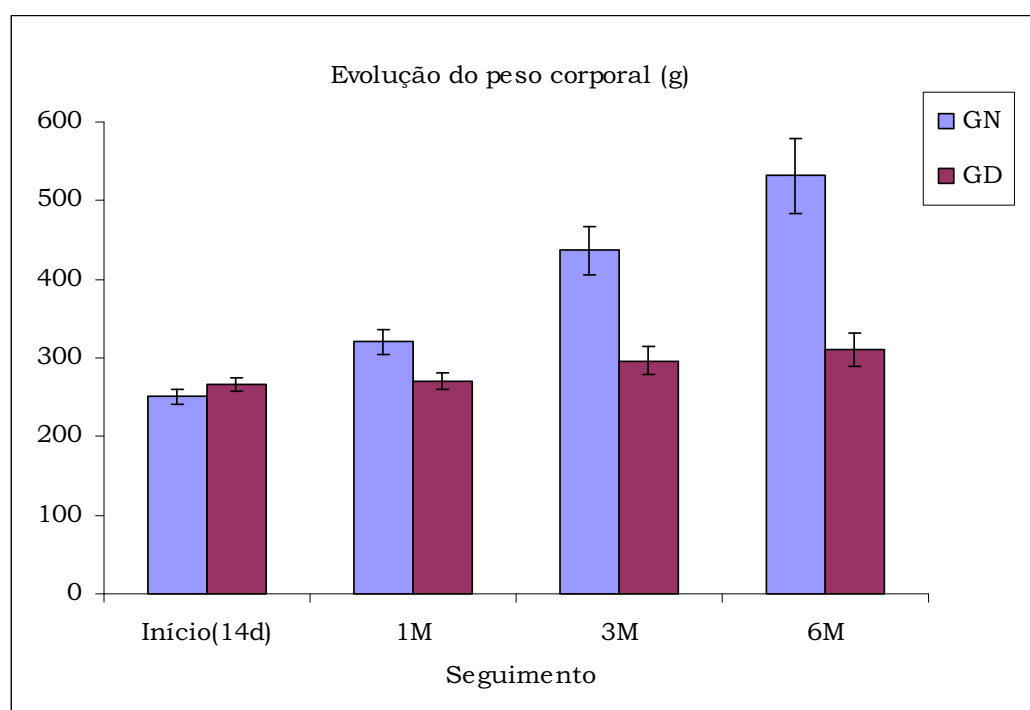


**Figura 2** - Ilustração comparativa do estado nutricional de um rato diabético (A) e de um rato normal (B) sacrificados com 6 meses de seguimento.

**Tabela 1** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da evolução do peso corporal (g) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início (14d)	1M	3M	6M
GN	250,5 $\pm$ 10,3	320,6 $\pm$ 15,6	436,4 $\pm$ 30,0	532,0 $\pm$ 47,3
GD	265,4 $\pm$ 8,4	270,3 $\pm$ 10,5*	296,5 $\pm$ 18,6*	310,3 $\pm$ 20,8*

\*GN = GD (início); GN > GD para  $P < 0,01$ , com 1, 3 e 6 meses de seguimento

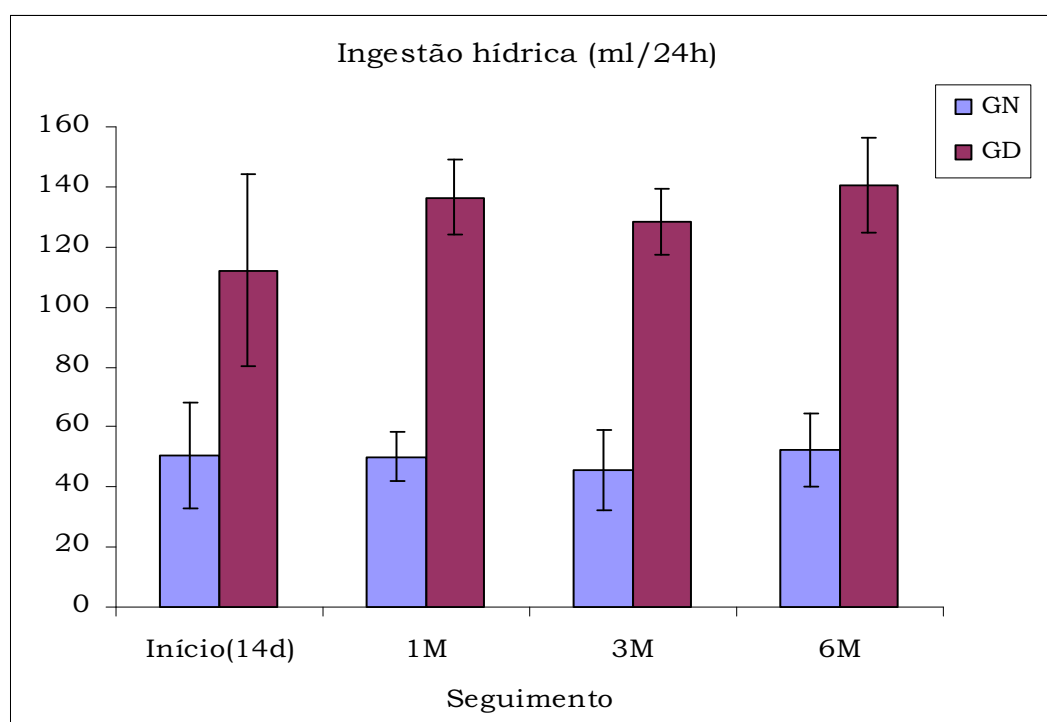


**Figura 3** – Evolução do peso corporal (g) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

**Tabela 2** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da ingestão hídrica (ml/24h) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início (14d)	1M	3M	6M
GN	50,4 $\pm$ 17,5	50,0 $\pm$ 8,1	45,6 $\pm$ 13,2	52,4 $\pm$ 12,0
GD	112,2 $\pm$ 32,0*	136,4 $\pm$ 12,4*	128,5 $\pm$ 10,8*	140,6 $\pm$ 15,6*

\*GN < GD (início); GN < GD para P<0,01, com 1, 3 e 6 meses de seguimento

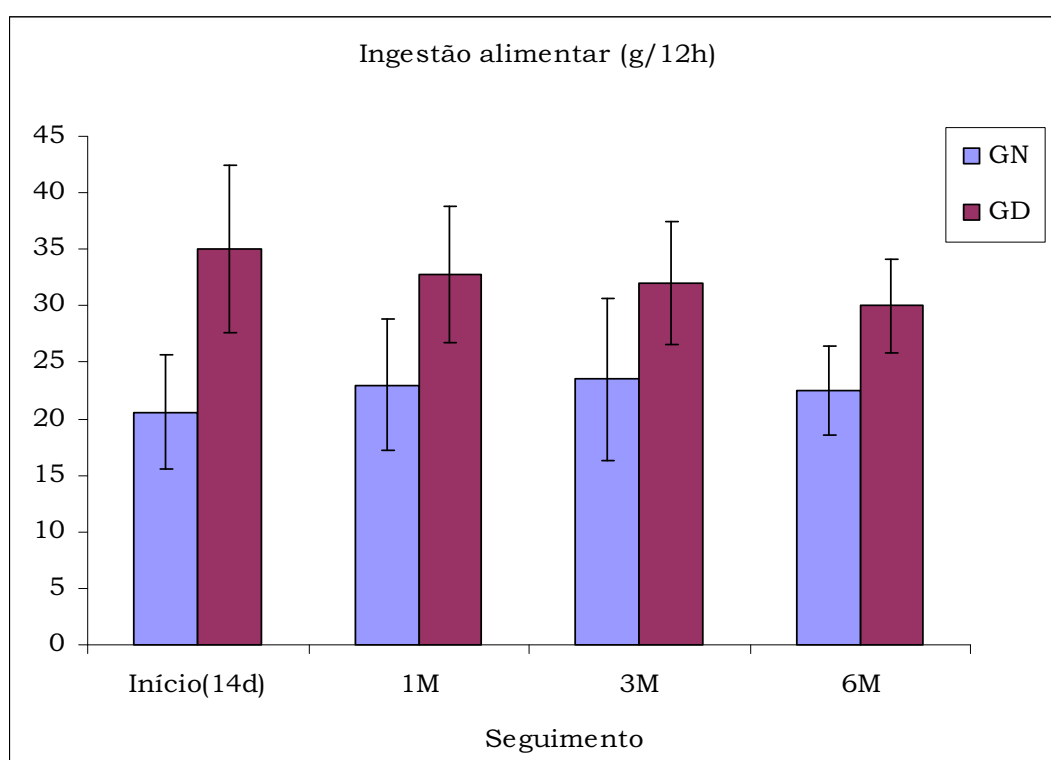


**Figura 4** – Evolução da ingestão hídrica (ml/24h) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

**Tabela 3** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da ingestão alimentar (g/12h) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início (14d)	1M	3M	6M
GN	20,6 $\pm$ 5,0	23,0 $\pm$ 5,8	23,5 $\pm$ 7,2	22,5 $\pm$ 4,0
GD	35,0 $\pm$ 7,4*	32,8 $\pm$ 6,0*	32,0 $\pm$ 5,4*	30,0 $\pm$ 4,2*

\*GN < GD (início); GN < GD para P<0,05, com 1, 3 e 6 meses de seguimento

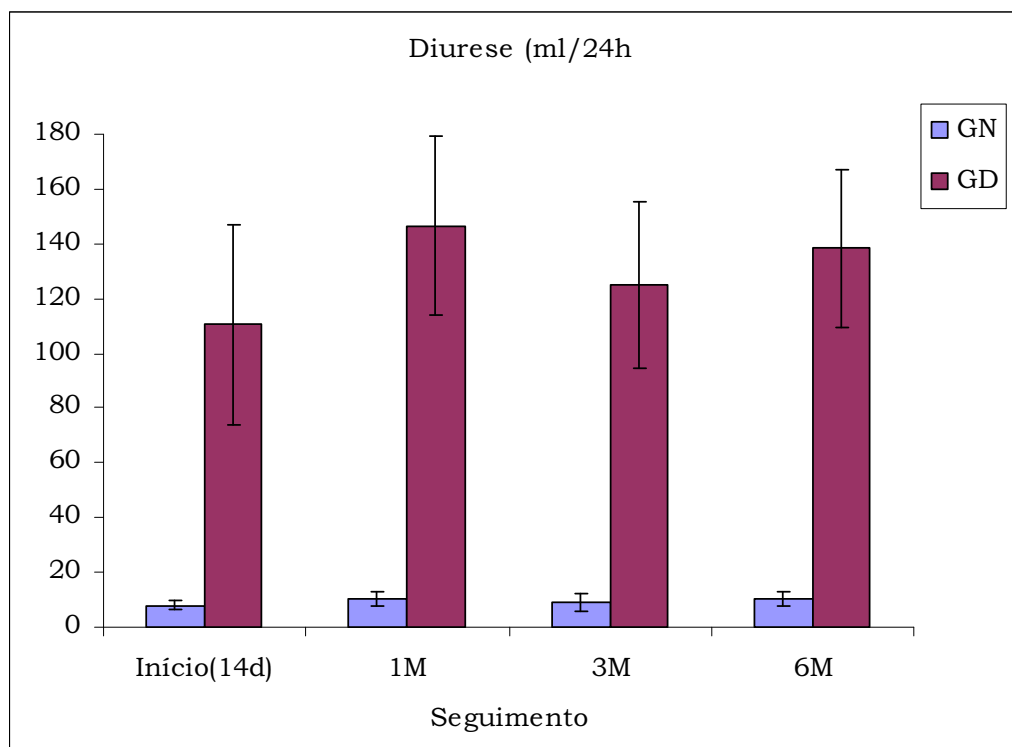


**Figura 5** – Evolução da ingestão alimentar (g/12h) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

**Tabela 4** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da diurese (ml/24h) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início (14d)	1M	3M	6M
GN	8,0 $\pm$ 1,8	10,2 $\pm$ 2,5	8,8 $\pm$ 3,2	10,5 $\pm$ 2,5
GD	110,6 $\pm$ 36,5*	146,6 $\pm$ 32,8*	125,0 $\pm$ 30,3*	138,4 $\pm$ 28,8*

\* GN < GD (início); GN < GD para P<0,01, com 1, 3 e 6 meses de seguimento

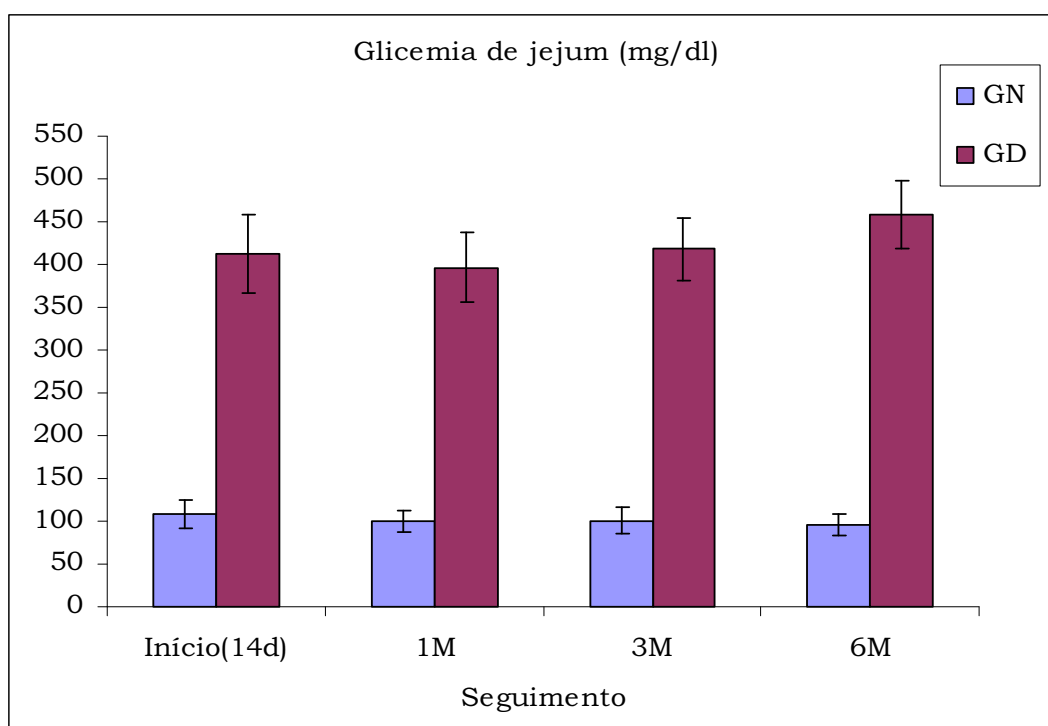


**Figura 6** – Evolução da diurese (ml/24h) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

**Tabela 5** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da glicemia de jejum (mg/dl) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início (14d)	1M	3M	6M
GN	108,0 $\pm$ 16,6	100,5 $\pm$ 12,6	100,6 $\pm$ 15,4	96,0 $\pm$ 12,4
GD	412,6 $\pm$ 46,5*	396,4 $\pm$ 40,3*	417,8 $\pm$ 36,4*	458,4 $\pm$ 40,2*

\*GN < GD (início); GN < GD para P<0,01, com 1, 3 e 6 meses de seguimento

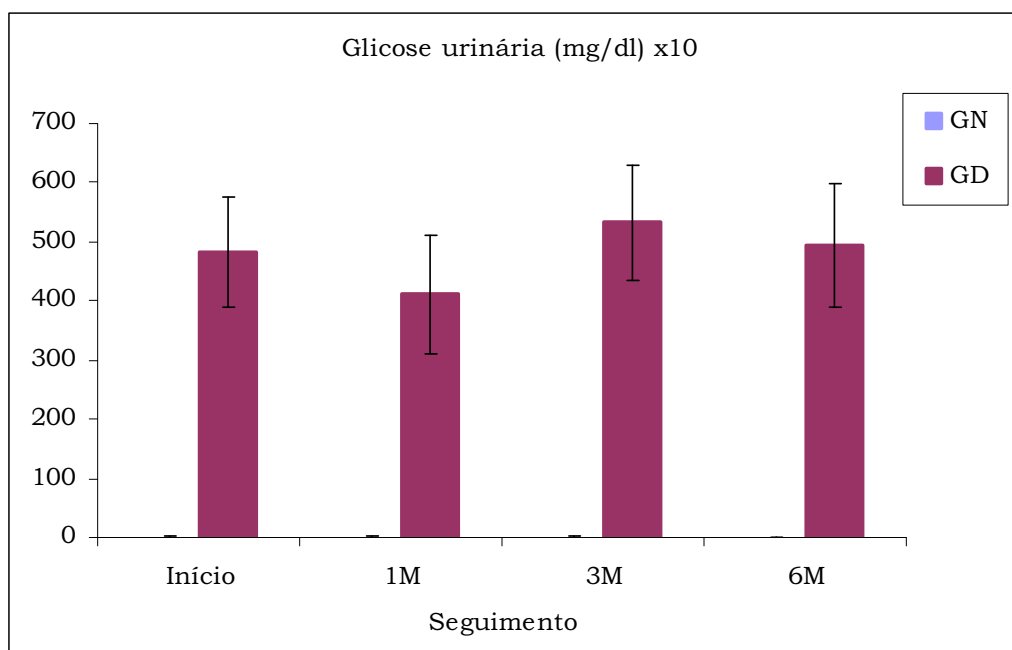


**Figura 7** – Evolução da glicemia de jejum (mg/dl) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

**Tabela 6** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da glicose urinária (mg/dl) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento							
	Início (14d)		1M		3M		6M	
GN	10,4 $\pm$ 6,5	10,8 $\pm$ 4,6	9,6 $\pm$ 5,0	8,8 $\pm$ 4,6				
GD	4830,0 $\pm$ 930,0*	4112,6 $\pm$ 1005,0*	5326,4 $\pm$ 978,0*	4946,5 $\pm$ 1040,0*				

\*GN < GD (início); GN < GD para  $P < 0,01$ , com 1, 3 e 6 meses de seguimento

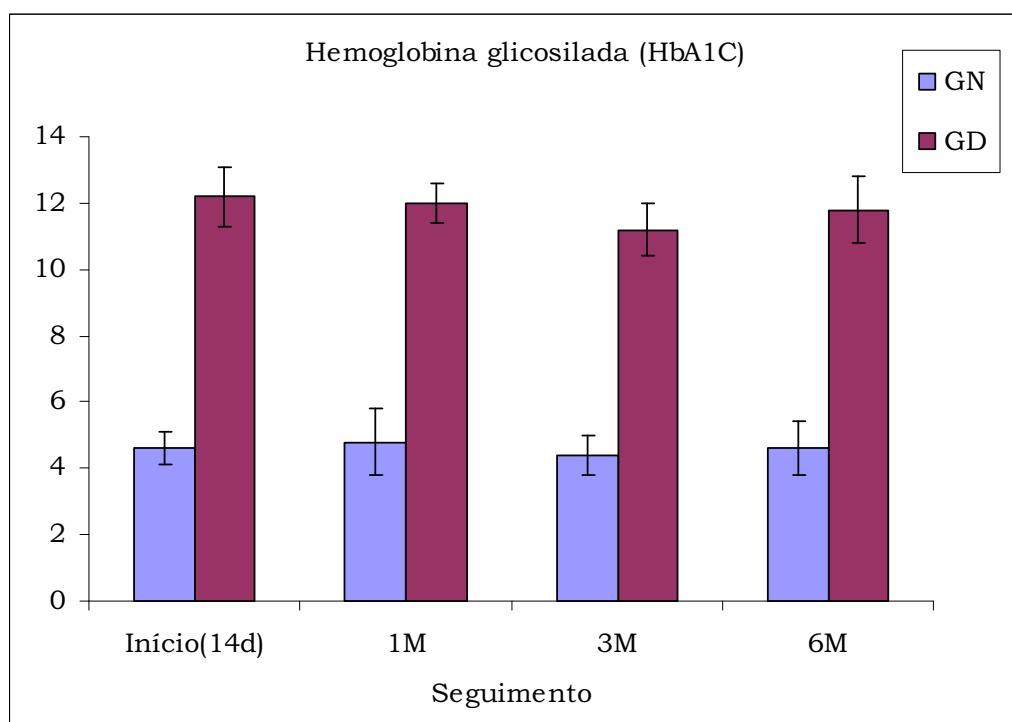


**Figura 8** – Evolução da glicose urinária (mg/dl) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

**Tabela 7** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1C</sub>) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início (14d)	1M	3M	6M
GN	4,6 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 1,0	4,4 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 0,8
GD	12,2 $\pm$ 0,9*	12,0 $\pm$ 0,6*	11,2 $\pm$ 0,8*	11,8 $\pm$ 1,0*

\*GN < GD (início); GN < GD para P<0,01, com 1, 3 e 6 meses de seguimento



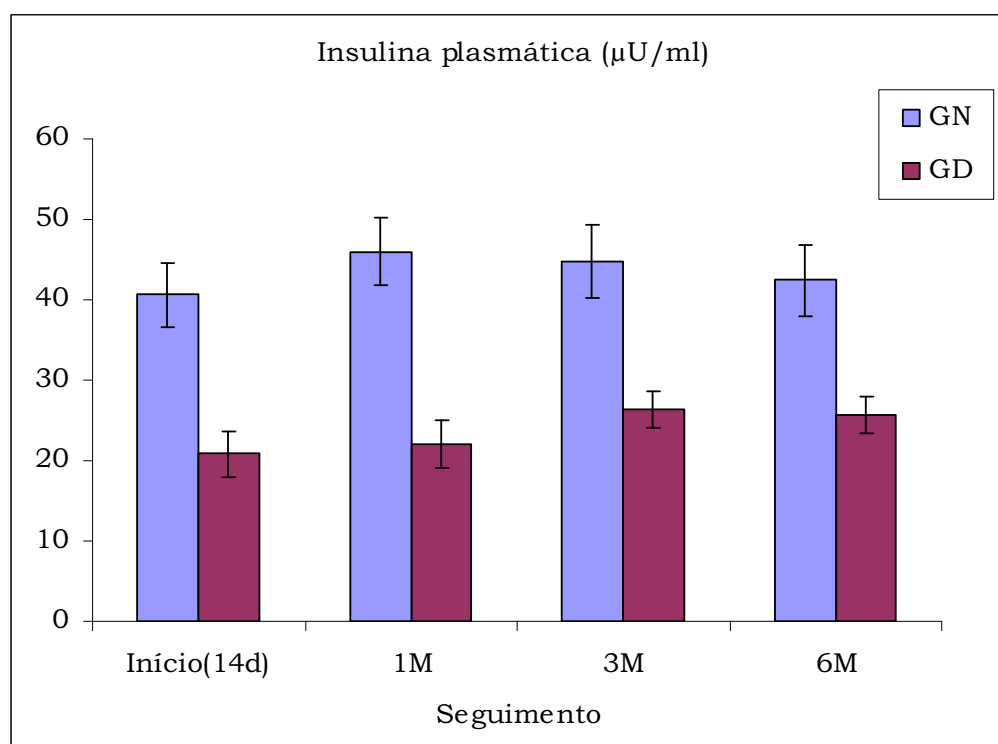
**Figura 9** – Evolução da porcentagem de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1C</sub>) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento



**Tabela 8** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da insulina plasmática ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ ) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

Grupos	Seguimento			
	Início (14d)	1M	3M	6M
GN	40,6 $\pm$ 4,0	46,0 $\pm$ 4,2	44,8 $\pm$ 4,5	42,4 $\pm$ 4,5
GD	20,8 $\pm$ 2,8*	22,0 $\pm$ 3,0*	26,4 $\pm$ 2,2*	25,6 $\pm$ 2,3*

\* GN > GD (início); GN > GD com 1, 3 e 6 meses de seguimento, para  $P < 0,01$



**Figura 10** – Evolução da insulina plasmática ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ ) em animais dos 2 grupos experimentais, ao longo do seguimento.

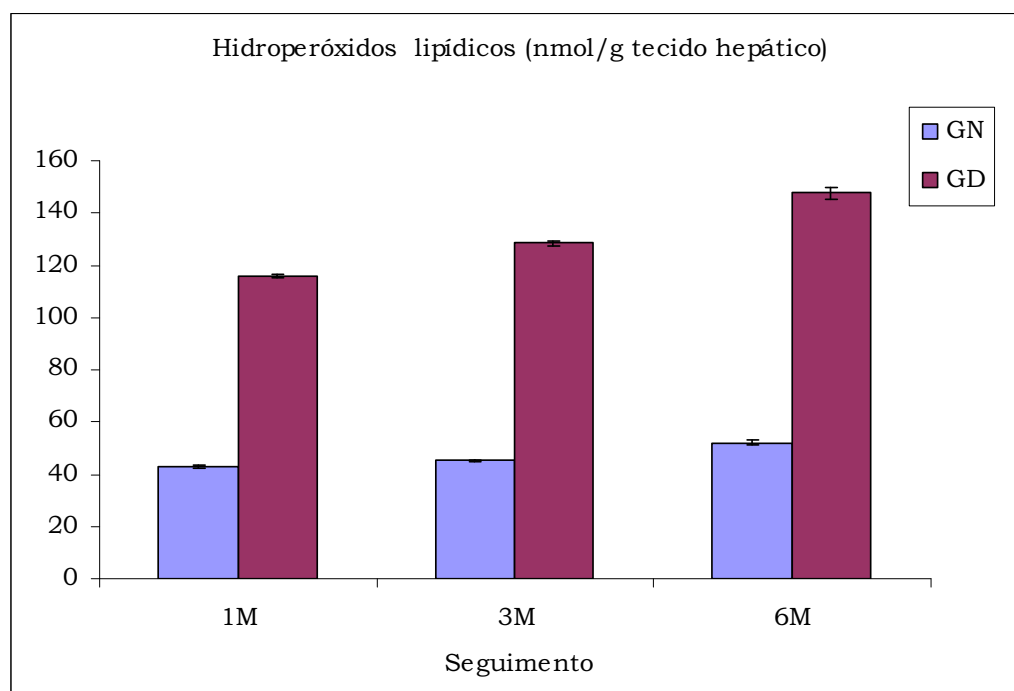
## **2. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo hepatocelular**

A concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPO) no tecido hepático foi significativamente elevada ( $P < 0,01$ ) em animais do grupo 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 hepático ligada às enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) foram reduzidas nestes períodos, sendo significativamente baixas ( $P < 0,01$ ) em todos os períodos de sacrifício. Observou-se, também, que a atividade antioxidante da CAT teve aumento no 3º mês de seguimento, muito possivelmente para compensar a queda significativa dos níveis de GSH-Px. Este aumento, no entanto, não foi estatisticamente significativo. O estresse oxidativo do tecido hepático também guardou relação positiva com a duração do estado hiperglicêmico, sendo mais intenso nos animais sacrificados mais tardiamente, independentemente da variação dos valores glicêmicos. As Tabs. 9 a 12 e as Figs. 11 a 14 mostram os resultados encontrados em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de sacrifício.

**Tabela 9** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da concentração de hidroperóxidos lipídicos (nmol/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, durante o período de seguimento.

Grupos	Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	42,92 $\pm$ 0,65	45,23 $\pm$ 0,53	52,14 $\pm$ 0,93
GD	115,82 $\pm$ 0,74*	128,36 $\pm$ 1,18*	147,63 $\pm$ 2,43 *

\* GD > GN para P= 0,0002 com 1, 3 e 6 meses de seguimento.

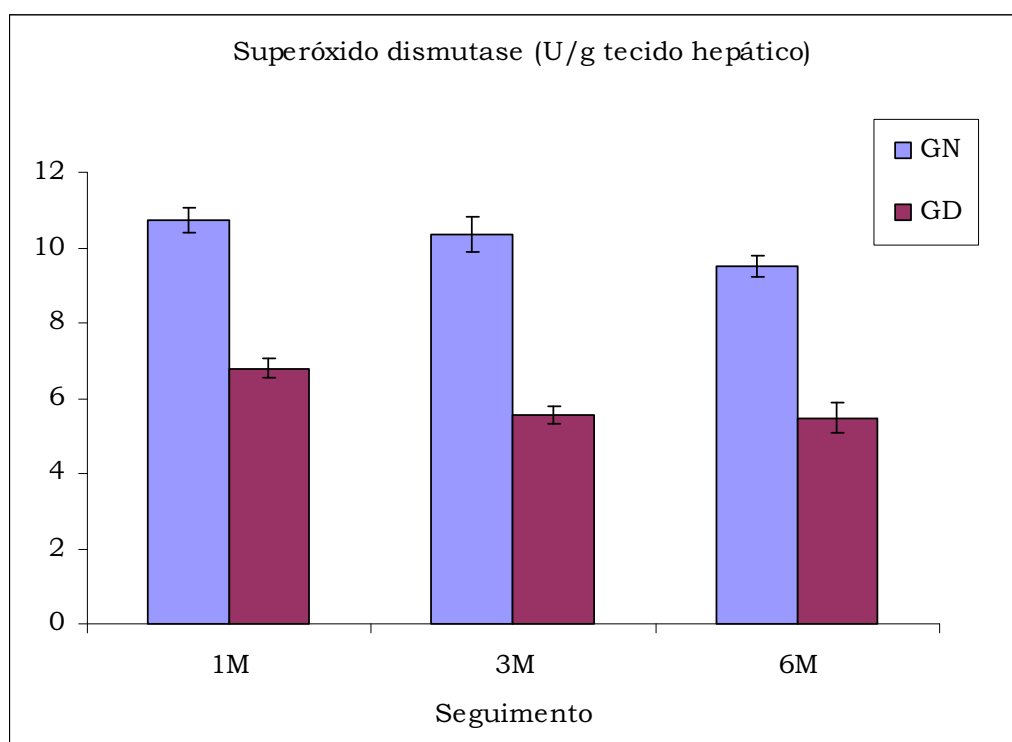


**Figura 11** – Variação da concentração de hidroperóxidos lipídicos (nmol/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

**Tabela 10** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da atividade superóxido dismutase (U/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, durante o período de seguimento.

Grupos	Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	10,72 $\pm$ 0,33	10,36 $\pm$ 0,47	9,51 $\pm$ 0,28
GD	6,79 $\pm$ 0,25 *	5,54 $\pm$ 0,24*	5,48 $\pm$ 0,42*

\*GD < GN para P= 0,0002 com 1, 3 e 6 meses de seguimento

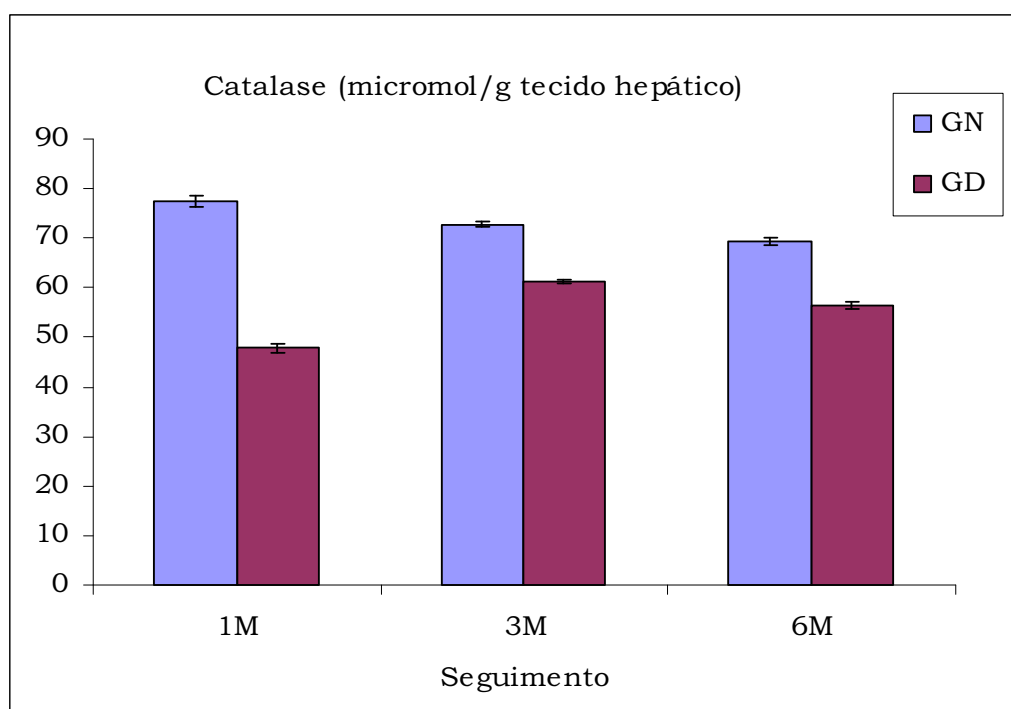


**Figura 12** – Variação da atividade da superóxido dismutase (U/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

**Tabela 11** - Médias  $\pm$  desvios-padrão da atividade da catalase (micromol/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, durante o período de seguimento.

Grupos	Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	77,47 $\pm$ 1,05	72,73 $\pm$ 0,60	69,27 $\pm$ 0,69
GD	47,79 $\pm$ 0,99*	61,25 $\pm$ 0,43*	56,41 $\pm$ 0,84 *

\* GD < GN para P= 0,0002 com 1, 3 e 6 meses de seguimento

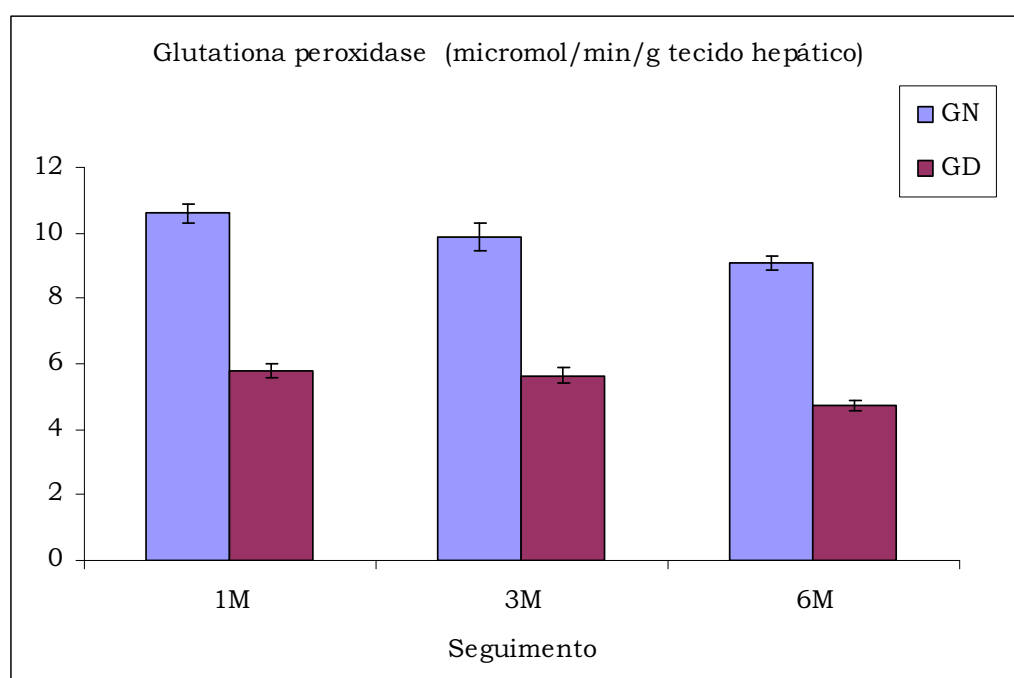


**Figura 13** - Variação da atividade da catalase (micromol/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

**Tabela 12** – Médias  $\pm$  desvios-padrão da atividade da glutatona peroxidase (micromol/min/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, durante o período de seguimento.

Grupos	Seguimento		
	1M	3M	6M
GN	10,61 $\pm$ 0,29	9,87 $\pm$ 0,44	9,07 $\pm$ 0,20
GD	5,80 $\pm$ 0,20*	5,65 $\pm$ 0,25*	4,75 $\pm$ 0,16*

\* GD < GN para P= 0,0002 com 1, 3 e 6 meses de seguimento



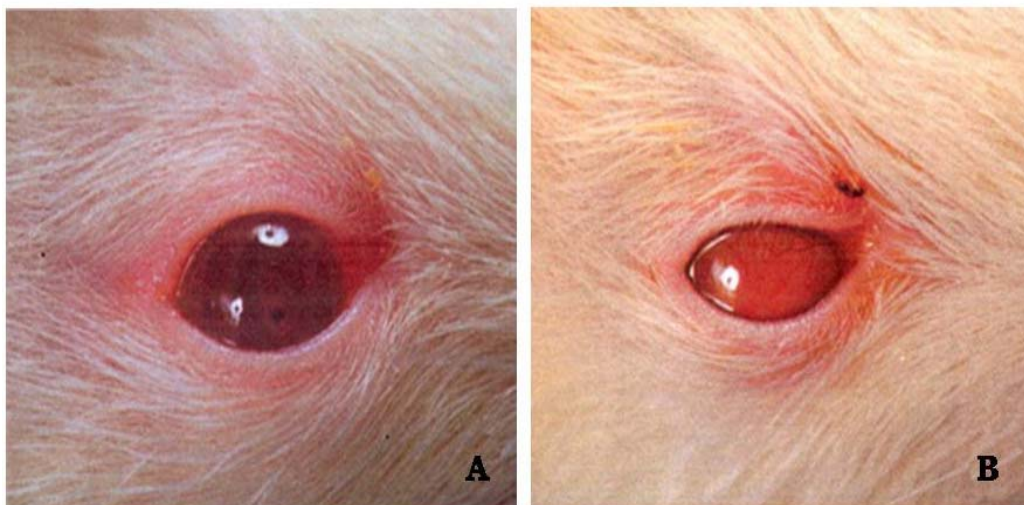
**Figura 14** – Variação da atividade da glutatona peroxidase (micromol/min/g tecido hepático) em animais dos 2 grupos experimentais, nos respectivos períodos de seguimento.

### **3. Achados macroscópicos de necrópsia**

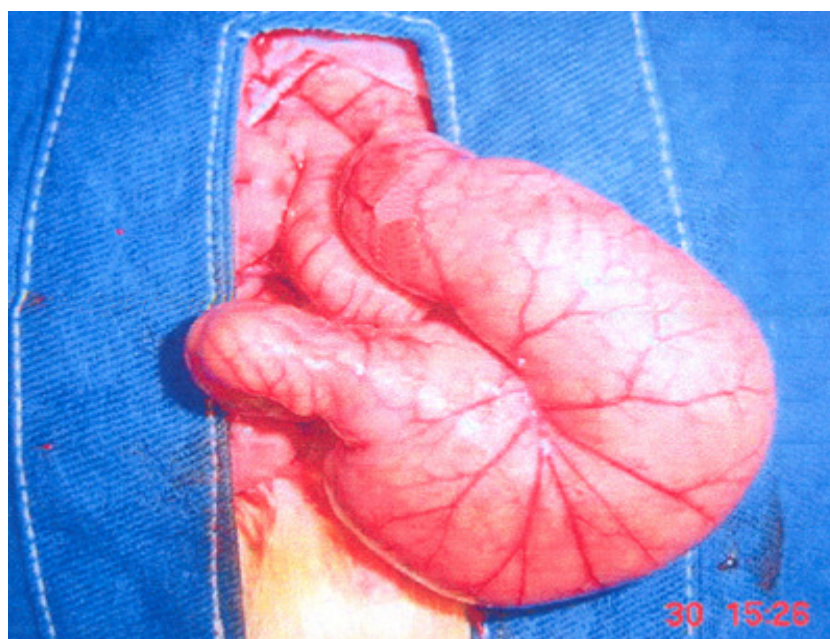
Durante a necrópsia observou-se que ratos do GD apresentaram significativa redução da massa muscular e gordurosa de todo o corpo, quando comparados com ratos do GN. Esta debilidade da massa corpórea foi mais evidente em animais sacrificados com 6 meses de seguimento. Ratos do GD também apresentaram episódios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

Em cerca de 83% 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 (megacolon), preponderantemente mais intensa no cólon direito, também foi um achado freqüente na necrópsia dos animais diabéticos deste estudo, acometendo quase que a totalidade dos animais sacrificados a partir do 3º mês de doença. A Fig. 15 ilustra comparativamente o aspecto geral dos olhos de um animal normal e de um diabético, sacrificados com 6 meses de seguimento. A Fig. 16 ilustra o aspecto usual do intestino grosso de um animal sacrificado com 6 meses de diabetes.



**Figura 15** - 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 16** - Aspecto geral do cólon de um animal diabético sacrificado com 6 meses de diabetes. Observe a grande dilatação do cecum deste animal.



## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

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 37,5%, 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 41%, observado um jejum de 12 horas.

Cerca de 22% 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 & PRIETO-DIAZ (1946) 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. Estes autores 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 no longo prazo (MAUER et al., 1976).

A aloxana também não produz diabetes com gravidade vinculada à dose de substância utilizada, como observado com a estreptozotocina, (JUNOD et al., 1969), o que inviabiliza a obtenção de um índice constante de DM com gravidade leve ou moderada. Todavia, a obtenção de diabetes com estes níveis 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., 2005).

A questão que prevalece, todavia, é como o DM determina a variedade de alterações que afeta indistintamente todos os órgãos e sistemas de homens e animais, tendo como pressuposto básico um estado de hiperglicemia crônica.

O estresse oxidativo celular é considerado, hoje, um dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese e evolução das complicações diabéticas crônicas, incluindo a degeneração gordurosa do fígado, de etiologia não-alcoólica (DGFNA) e suas formas evolutivas. Todavia, estes mecanismos não são completamente conhecidos, principalmente em relação à seqüência de eventos que resulta na lesão diabética crônica.

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.

Muito embora os radicais livres de oxigênio tenham papel relevante na etiopatogenia das lesões diabéticas crônicas, existem evidências suficientes na literatura para afirmar que estes compostos e os produtos avançados da glicação protéica (AGEs) não são os únicos mecanismos responsáveis pela agressão celular no paciente diabético.

Um mecanismo de agressão celular muito conhecido é a ativação da via dos polióis. Segundo KHAN et al. (2006), os tecidos corporais que não dependem de insulina para captar a glicose, como o sistema nervoso, podem, em consequência dos altos níveis de glicose circulante observados nos indivíduos diabéticos, levar também a um aumento da glicose no meio intracelular. Esta hiperglicemia intracelular, por sua vez, pode ativar a oxidação de fosfato de adenosina dinucleotídio (NADPH<sup>+</sup>), o qual atua na conversão de glicose em sorbitol. O acúmulo de sorbitol no meio intracelular aumenta a osmolaridade celular que pode ocasionar dano e morte da célula. A ativação da via dos polióis no indivíduo diabético também pode indiretamente diminuir a formação da enzima antioxidante glutationa peroxidase (GSH-Px), uma vez que este processo depende de níveis normais de NADPH reduzido, o qual pode ter sido consumido na transformação de glicose em sorbitol. Como consequência, a atividade antioxidante exercida pela GSH-Px pode estar diminuída no paciente diabético, secundariamente à ativação da via dos polióis, podendo em parte explicar os baixos níveis da atividade desta enzima no tecido hepático de nossos animais diabéticos.

O aumento da glicose intracelular nos tecidos que independem de insulina também pode ativar a via das hexosaminas. Nesta via a glicose é transformada em compostos derivados da acetilglicosamina (UDP-N-

acetilglicosamina), os quais são responsáveis pela modulação da expressão de proteínas que regulam a produção do fator inibidor do plasminogênio-I (PAI-I) e do fator de crescimento transformador beta TGF- $\beta$ ). O PAI-I ativado pela via das hexosaminas pode favorecer a formação de trombos dentro dos vasos, uma vez que este composto é um potente inibidor da fibrinólise. O TGF- $\beta$ 1 ativado atua na produção excessiva de matriz colagênica no endotélio vascular, contribuindo para o estreitamento dos vasos, a trombose e a esclerose vascular.

A hiperglicemia crônica também pode ativar a via da proteína C quinase (PKC), um outro mecanismo responsável pelas alterações microvasculares do diabetes. Esta proteína pode ser ativada em resposta à produção aumentada de diacilglicerol, um composto formado a partir da oxidação dos ácidos graxos livres, na impossibilidade de o organismo obter energia a partir da glicose intracelular. A ativação da PKC, porém, diminui as concentrações de óxido nítrico (NO), um composto vasodilatador, aumentando as concentrações de endotelina-1 e, também, do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) os quais são responsáveis pela vasoconstrição vascular, diminuição do fluxo sanguíneo e estreitamento do lúmen vascular da rede capilar da retina, rins, nervos e artérias periféricas do paciente diabético, configurando a macro e a microangiopatia diabética crônica.

Desta forma, é provável que na gênese e evolução da DGFNA, a exemplo do que acontece nas demais lesões diabéticas crônicas, também haja a participação de diversos mecanismos, que isolada ou associadamente, contribuam para o surgimento da lesão hepática diabética e a sua eventual progressão para esteato-hepatite e cirrose.

Em nosso estudo, observamos que o tecido hepático de ratos diabéticos, sem qualquer tratamento da doença, apresentou acentuada produção de radicais oxidantes hidroperóxidos lipídicos (HPO), associada à queda persistente da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, em todos os períodos de avaliação do experimento. Observou-se, também, que a magnitude do estresse

oxidativo hepático guardou estreita relação com a duração do estado diabético, indicando que a intensidade das alterações está mais propriamente relacionada ao tempo de doença, do que com a magnitude dos valores glicêmicos.

A persistência de um estado diabético, segundo MÉNDEZ-SANCHEZ et al. (2004), parece ser um dos fatores preditivos mais importantes para o desenvolvimento de cirrose em pacientes obesos com DGFNA.

Diversos mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos para explicar o dano hepatocelular nesses pacientes, os quais têm como fator comum o aumento da capacidade do fígado em oxidar substratos.

Segundo HAQUE & SANYAL (2002), o aumento da oxidação de ácido graxos livres (AGL) pelo fígado pode gerar radicais livres do oxigênio, ou espécies reativas do oxigênio (EROs), os quais pelos mecanismos já descritos, podem induzir aos processos de peroxidação lipídica, alterações estruturais das células, alterações funcionais e morte celular.

Em condições fisiológicas as defesas antioxidantes do organismo conseguem neutralizar os efeitos nocivos destas substâncias. Em condições patológicas, porém, como no diabetes, o equilíbrio metabólico é rompido, iniciando-se o estresse oxidativo.

A manutenção do estresse oxidativo ao nível hepático desencadeia respostas de adaptação do fígado ao estresse crônico, que incluem a ativação e/ou inibição de vários sítios moleculares responsáveis pela transdução e transcrição de sinais que comandam o ciclo biológico celular (YANG et al., 2001). As alterações do ciclo biológico celular, por sua vez, acabam por comprometer a capacidade de replicação e regeneração hepática, levando à apoptose ou morte celular.

Por outro lado, o excesso de AGL no fígado, por si só pode levar à apoptose dos hepatócitos, o qual é um dos mecanismos de injúria celular rotineiramente descrito em pacientes com DGFNA (FELDSTEIN et al., 2003).

Adicionalmente, vários estudos a respeito da fisiopatologia da DGFNA têm demonstrado que o fígado de homens e animais obesos é muito mais sensível aos estímulos nocivos do estresse oxidativo crônico, especialmente em resposta à agressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e às endotoxinas bacterianas (FELDSTEIN et al., 2004; VALENTI et al., 2002; WIGG et al., 2001).

Evidências na literatura, porém, sugerem que o estresse oxidativo crônico do fígado não só é capaz de iniciar as alterações moleculares que levam ao acúmulo de gordura no órgão, como também é capaz de promover as alterações que levam à esteato-hepatite e à cirrose.

SANYAL et al. (2001) reportaram que a resistência à insulina também tem importante papel na evolução da DGFNA para a esteato-hepatite, haja vista ter influência negativa sobre diversas vias metabólicas intracelulares no hepatócito. Esta hipótese é compartilhada com os relatos de CHITURI & FARREL (2001) e ROBERTSON et al. (2001), os quais descreveram a associação da resistência à insulina com a hipertrofia da função oxidante microsomal do fígado, devido ao aumento da atividade do sistema de citocromo P-450 intramitocondrial, que está relacionada à perda do efeito inibitório da insulina, nos mecanismos de regulação do estresse oxidativo celular.

É certo, porém, que na evolução da DGFNA para a esteato-hepatite, e desta para a cirrose, concorrem fatores que agem dentro e fora do fígado. Um exemplo disto é o aumento da resistência à ação da insulina ao nível periférico, a qual aumenta a oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo, incrementando a liberação de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado, e conseqüentemente, a geração de EROs (PORTINCASA et al., 2005; SANYAL et al., 2001).

Estudo experimental realizado por JENSEN et al. (1989) já sugeria que a relação entre obesidade, resistência à insulina e esteato-hepatite tem como fator comum o aumento da liberação de AGL do



tecido adiposo, principalmente daquele localizado nas vísceras. O aumento da obesidade visceral favorece a liberação de AGL diretamente no sistema venoso portal, e deste, imediatamente para o fígado.

No fígado, os AGL estimulam a neoglicogênese e a síntese de triglicérides, comprometendo a habilidade da insulina em suprimir a liberação de glicose hepática, o que agrava a hiperglicemia (KHAN & FLIER, 2000).

Por outro lado, o acúmulo de lipídeos no fígado, e sua posterior oxidação, também estão sob a influência da quantidade secretada de leptina e do nível de sensibilidade dos tecidos a esta substância. A leptina é uma proteína codificada por um gene (*ob*) encontrado em indivíduos obesos, a qual é expressa predominante nos adipócitos, e que tem a capacidade de regular o peso corporal, o metabolismo e a função reprodutiva (FRIEDMAN & HALHAS, 1998).

Segundo esses autores, alterações na secreção de leptina podem contribuir para mudanças na sensibilidade dos tecidos à insulina, surgindo à resistência. O aumento da insulino-resistência no fígado e a elevação da concentração de leptina neste órgão são dois fatores que favorecem a entrada de AGL para dentro do sistema mitocondrial hepático. Uma vez no fígado, os AGL se ligam ao receptor de uma proteína ativadora da proliferação celular chamada PPAR $\alpha$  da sigla em inglês, peroxisomal proliferation-activator receptor-alpha, o qual é responsável pela transcrição de alguns genes que codificam enzimas com funções importantíssimas no metabolismo lipídico, principalmente envolvendo o processo de oxidação peroxisomal beta, que resulta na formação dos radicais livres do oxigênio, com a participação da atividade microsomal do sistema citocromo P-450 induzida pela resistência à insulina.

Segundo ADAMS & ÂNGULO (2005), uma vez estabelecida a DGFNA, outros fatores, incluindo o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a produção de lipopolissacarídeos e adipocitocinas derivadas do intestino, podem promover o dano hepatocelular, a inflamação, a cirrose, e eventualmente, o carcinoma do fígado.

Para PORTINCASA et al. (2005), o início e progressão da DGFNA para esteato-hepatite e cirrose hepática envolvem dois pontos cruciais: o primeiro relacionado aos fatores de risco dos pacientes, como os defeitos genéticos, a insulino-resistência, a hiperinsulinemia, a obesidade e o estilo de vida; o segundo relacionado às alterações dos mecanismos moleculares intra-e extracelulares que levam ao dano hepático, incluindo a  $\beta$ -oxidação dos AGL, a formação das espécies reativas do oxigênio, a peroxidação lipídica e a liberação das citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela inflamação, necrose e fibrose hepatocelular.

Segundo DOWMAN et al. (2010), o acúmulo de triglicérides no fígado, ou a esteatose, aumenta a suscetibilidade deste órgão à injúria mediada por citocinas/adipocitocinas inflamatórias ou pelo estresse oxidativo hepatocelular, favorecendo a evolução da DGFNA para esteatohepatite e/ou fibrose. Segundo estes pesquisadores, os AGL também são capazes de agir diretamente no fígado, promovendo a lesão hepática. Estes compostos tanto podem ser submetidos à  $\beta$ -oxidação, como serem esterificados com glicerol para formar os triglicérides, que conduzem ao acúmulo de gordura no fígado. No interior deste órgão, os AGL também podem aumentar o estresse oxidativo hepático e/ou ativar diversas vias inflamatórias que contribuem para a progressão da DGFNA. ROSKAMS et al. (2003) postularam, porém, que em indivíduos sadios as células hepáticas mortas estimulam a replicação dos hepatócitos maduros, no sentido de reconstituir o tecido hepático lesado. No entanto, na presença de DGFNA, o estresse oxidativo hepático pode inibir a replicação dos hepatócitos maduros, resultando na expansão das células progenitoras hepáticas (células ovais), as quais podem se diferenciar em células semelhantes aos hepatócitos (hepatocyte-like cells, do inglês), mas que não são hepatócitos. O aumento da quantidade de células ovais e de células “hepatocyte-like”, por sua vez, está fortemente correlacionado com a evolução da DGFNA para fibrose hepática, e também com a carcinogênese hepatocelular.

NEUSCHWANDER-TETRI (2007) também acredita que o retículo endoplasmático pode ter-se tornado um importante alvo da injúria hepática que se segue à DGFNA. Segundo este autor, em condições como o diabetes, a obesidade e em várias formas de doença hepática, incluindo a DGFNA, o estresse do retículo endoplasmático pode ser responsável pela ativação das junções terminais da C-quinase (c-Jun N terminal-kinases, do inglês), as quais têm importante papel na gênese da esteatohepatite, por atuarem na resposta celular ao estresse e nos processos de diferenciação e apoptose celular. CUSI (2009), por sua vez, afirma que não é a esteatose, por si, que conduz à evolução da DGFNA para esteatohepatite e fibrose, e sim, a lipotoxicidade induzida pela disfunção mitocondrial causada pelo estresse do retículo endoplasmático, que ao lado de diversas vias inflamatórias, conduzem ao dano hepático mais severo.

Todavia, o fato de a esteato-hepatite ser observada somente em uma parcela de pacientes diabéticos sugere que outros fatores, como a predisposição genética, podem estar envolvidos na gênese desta patologia. Reforçam esta hipótese os relatos de acometimento do fígado por esteatohepatite e cirrose em membros de uma mesma família (WILLNER et al., 2001), e também o achado de várias anormalidades envolvendo genes que controlam a atividade da citocinas, derivadas das células gordurosas ou adipócitos, como a leptina, a resistina, a adiponectina, o TNF- $\alpha$  e a interleucina 6 (MARRA, 2004). Estas substâncias modulam a sensibilidades à insulina nos tecidos sensíveis a este hormônio, como o tecido gorduroso, o músculo e o fígado.

Estudo realizado por ERION et al. (2009) em ratos com diabetes tipo 2, induzido pela estreptozotocina, associada à nicotinamida, que foram alimentados com dieta com alto teor de gordura, mostrou que a diminuição da expressão genética da proteína que regula a neoglicogênese hepática, comandada pelo mediador cAMP (CREB – da sigla em inglês: cAMP response element binding protein), pode diminuir tanto a hiperglicemia destes animais, como também as concentrações séricas de colesterol e triglicérides e a concentração

hepática de triglicérides, devido à redução da lipogênese hepática. Os resultados destes autores sugerem que o CREB parece ser um alvo terapêutico atraente para corrigir a insulino-resistência e dislipidemia associadas à DGFNA e ao DM.

Assim, considerando a importância atual da DGFNA no curso do diabetes, o trabalho ora apresentado abre perspectivas para a investigação de cada uma das vias moleculares implicadas em sua gênese e evolução, bem como para o uso de agentes químicos e nutrientes capazes de proteger os hepatócitos da agressão provocada pelas EROs e por outros compostos.

## **CONCLUSÕES**

## **CONCLUSÕES**

1 - A aloxana a 2%, administrada por via endovenosa, induz DM no rato, caracterizado por um estado de hiperglicemia e hipoinsulinemia permanentes, associado a altos níveis de hemoglobina glicosilada e sinais clínicos e anatomopatológicos evidentes de diabetes grave, demonstrado por desnutrição, polidipsia, poliúria, polifagia e catarata ocular;

2 - O diabetes aloxânico determina aumento da concentração de radicais livres (HPO) no tecido hepático deste animal, com redução significativa da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px;

3 - O estresse oxidativo hepático se correlaciona muito mais propriamente com a duração do estado diabético, do que com o grau de hiperglicemia observado.

4 - O estresse oxidativo celular possivelmente exerce papel de grande importância na gênese e evolução das lesões hepáticas diabéticas crônicas.

**RESUMO**

## RESUMO

**Racional:** O diabetes mellitus (DM) é tido como um problema de saúde pública mundial. No Brasil ele atinge mais de 14 milhões de pessoas, sendo acompanhado de altos índices de morbidade e mortalidade. Entretanto, os mecanismos primariamente responsáveis pela agressão dos tecidos e órgãos pelo DM ainda não são completamente conhecidos, o que explica a dificuldade em se estabelecer um tratamento eficaz para prevenir ou controlar a progressão das lesões diabéticas crônicas. O estresse oxidativo celular é tido como um dos mecanismos importantes na gênese do dano tecidual relacionado à hiperglicemia. Através deste mecanismo, o DM poderia aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) ao nível celular, que pela sua toxicidade, seria capaz de promover o desenvolvimento das lesões diabéticas crônicas. Evidências clínicas sugerem que o fígado de indivíduos diabéticos também poderia sofrer a ação das EROs, no longo prazo, levando a uma seqüência de eventos capaz de determinar a doença gordurosa do fígado de etiologia não-alcoólica (DGFNA), com progressão para esteato-hepatite e cirrose. Todavia, a presença de estresse oxidativo no tecido hepático de portadores de DM, ainda não está bem estabelecida na literatura, o que justifica a realização de novas investigações em modelos-animais de diabetes, no intuito de melhor esclarecer a real participação deste mecanismo na gênese e evolução das lesões hepáticas diabéticas crônicas. **Material e Métodos:** Neste estudo foram utilizados 60 ratos machos Lewis, distribuídos em 2 grupos experimentais, com 30 animais cada um, assim designados: GN - Grupo Controle: constituído de ratos normais, não-diabéticos; GD - Grupo Diabético: constituído por animais diabéticos induzidos pela aloxana, sem qualquer tratamento. Cada um dos grupos experimentais foi dividido em 3 subgrupos de ratos, com 10 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados, respectivamente, em 4 momentos do experimento, a saber: M1- animais dos 3 subgrupos, no momento inicial do experimento (14º dia), para obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais; M2 - animais sacrificados com 1



mês de seguimento normal ou com diabetes; M3 – animais sacrificados com 3 meses de seguimento normal ou com diabetes; M4 – animais sacrificados com 6 meses de seguimento normal ou com diabetes. Em todos os momentos de sacrifício, parâmetros clínicos (peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese), laboratoriais (glicose sanguínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada e insulina plasmática) e os marcadores bioquímicos do estresse oxidativo hepatocelular (concentração de hidroperóxidos lipídicos - HPO, e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutathiona peroxidase - GSH-Px) foram analisados em todos os animais. **Resultados:** Ratos controles (GN) apresentaram parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com o observado em ratos saudáveis da mesma espécie e idade, em todos os períodos avaliados do experimento. Não houve óbitos neste grupo. Em contraste, ratos diabéticos, sem qualquer tratamento (GD) evoluíram com perda de peso corporal e aumento significativo da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparado com os animais do grupo GN ( $P < 0,01$ ). O índice de mortalidade foi elevado nos animais que receberam aloxana. Dos animais tratados com esta droga, cerca de 37,5% morreram nos primeiros 14 dias após a indução do diabetes, devido a alterações metabólicas e/ou, pela ação tóxica da droga, tendo sido os mesmos repostos de modo a não comprometer o número final de ratos da amostra. Dos 30 animais diabéticos colocados em seguimento no GD, cerca de 16,7% (5 animais) morreram até os 6 meses de seguimento, devido a desnutrição e/ou infecção pulmonar; 100% dos animais diabéticos apresentaram catarata em ambos os olhos, aos 6 meses de seguimento, além de sinais evidentes de neuropatia diabética autonômica, revelada macroscopicamente por megacólon. Animais diabéticos também apresentaram aumento significativo da glicose sanguínea, glicose urinária e da porcentagem de hemoglobina glicosilada, com níveis muito baixos de insulina plasmática em relação ao GN ( $P < 0,01$ ). O estresse oxidativo hepatocelular também esteve presente no tecido hepático de todos os animais diabéticos do estudo,

demonstrado pelo aumento significativo da concentração de HPO e redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, quando comparado com os valores observados em ratos do GN ( $P < 0,01$ ), em todos os períodos de avaliação do experimento. O estresse oxidativo hepatocelular se correlacionou muito mais propriamente com a duração do estado diabético, do que com a gravidade da hiperglicemia.

**Conclusões:** Nós concluímos que: 1) A aloxana a 2%, administrada por via endovenosa, induz DM no rato, caracterizado por um estado de hiperglicemia e hipoinsulinemia permanentes, associado a altos níveis de hemoglobina glicosilada e sinais clínicos e anatomopatológicos evidentes de diabetes grave, demonstrado por desnutrição, polidípsia, poliúria, polifagia, catarata ocular e megacólon; 2) O diabetes aloxânico determina aumento da concentração de radicais livres (HPO) no tecido hepático deste animal, com redução significativa da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px; 3) O estresse oxidativo hepático se correlaciona muito mais propriamente com a duração do estado diabético, do que com o grau de hiperglicemia observado. 4) O estresse oxidativo celular possivelmente exerce papel de grande importância na gênese e evolução das lesões hepáticas diabéticas crônicas.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus; Aloxana; Síndrome Metabólica; Doença Gordurosa do Fígado de Etiologia Não-Alcoólica; Estresse Oxidativo; Antioxidantes.

## **SUMMARY**

## SUMMARY

**Background:** Diabetes mellitus (DM) is considered to be a public-health problem worldwide. In Brazil, it affects 14 million people, and it is accompanied by high morbidity and mortality rates. However, the mechanisms primarily responsible for tissue and organ aggression by DM are not yet fully known, which explains the difficulty in establishing effective treatment to prevent or control the progression of chronic diabetic lesions. Cellular oxidative stress is considered to be one of the important mechanisms in the genesis of hyperglycemia-related tissue damage. Through this mechanism, DM could increase the production of reactive oxygen species (ROS) in the cellular level, which, due to their toxicity, could promote the development of chronic diabetic lesions. Clinical evidence suggests that the liver of diabetic individuals could also suffer the action of ROS in the long term, thus leading to a sequence of events that can determine non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), with progression to steatohepatitis and cirrhosis. However, the presence of oxidative stress in the hepatic tissue of individuals with DM has not been yet well established in the literature, which justifies the performance of new investigations in diabetes animal models with the purpose to clarify the actual participation of such mechanisms in the genesis and development of chronic diabetic hepatic lesions. **Material and Methods:** In this study, 60 males Lewis rats were used. They were distributed into 2 experimental groups, each containing 30 animals and designated as follows: GN – Control Group: consisting of non-diabetic control rats; GD – Diabetic Group: consisting of alloxan-induced diabetic rats without any treatment. Each experimental group was divided into 3 subgroups of rats with 10 animals each to be evaluated and sacrificed respectively at 4 experimental moments, namely: M1– animals from the 3 subgroups, at the initial moment of the experiment (14<sup>th</sup> day) for collection of clinical and laboratory parameters; M2 – animals sacrificed one month after normal or diabetic follow-up; M3 – animals sacrificed 3 months after normal or diabetic follow-up; M4 –

animals sacrificed 6 months after normal or diabetic follow-up. At all sacrifice moments, clinical parameters (body weight, water intake, food intake, urine output), laboratory parameters (blood glucose, urinary glucose, glycosylated hemoglobin, plasma insulin) and biochemical markers of hepatocellular oxidative stress (concentration of lipid hydroperoxides – HPO, activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase - SOD, catalase – CAT, glutathione peroxidase - GSH-Px) were analyzed in all animals. **Results:** Control rats (GN) showed clinical and laboratory parameters that were compatible with those observed for healthy rats of the same species and age at all evaluated experimental periods. No deaths occurred in this group. In contrast, diabetic rats without any treatment (GD) developed with weight loss and significantly increased water intake, food intake and urine output as compared to animals in the GN group ( $P < 0.01$ ). A high mortality rate was observed for rats receiving alloxan. Of the animals treated with that drug, approximately 37.5% died in the first 14 days after diabetes induction due to metabolic alterations and/or to the toxic action of the drug. Those animals were replaced so as not to compromise the final number of rats in the sample. Of the 30 diabetic animals placed under follow-up in GD, approximately 16.7% (5 animals) died after 6 months of follow-up due to starvation and/or pulmonary infection; 100% of the diabetic animals showed cataract in both eyes at 6 months of follow-up, in addition to evident signs of autonomic diabetic neuropathy, which was macroscopically revealed by megacolon. Diabetic animals also showed significantly increased blood glucose, urinary glucose and glycosylated hemoglobin percentage, with very low levels of plasma insulin in relation to GN ( $P < 0.01$ ). Hepatocellular oxidative stress was also observed in the hepatic tissue of all diabetic animals under study, which was shown by the significantly increased concentration of HPO and reduced activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px as compared to the values found for GN rats ( $P < 0.01$ ) in all experimental periods evaluated. Hepatocellular oxidative stress was much more correlated with the duration of the diabetic condition itself than with

hyperglycemia severity. **Conclusions:** It was concluded that: 1) 2% alloxan administered endovenously induces DM in rats, which is characterized by a state of permanent hyperglycemia and hypoinsulinemia associated with high levels of glycosylated hemoglobin and evident clinical and anatomopathological signs of severe diabetes shown by starvation, polydipsia, polyuria, polyphagia, ocular cataract and megacolon; 2) Alloxanic diabetes determines increased concentration of free oxygen radicals (HPO) in the hepatic tissue of such animals, with significantly reduced activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px; 3) Hepatic oxidative stress is much more correlated with the duration of the diabetic state itself than with the level of hyperglycemia observed. 4) Cellular oxidative stress possibly plays a major role in the genesis and development of chronic diabetic hepatic lesions.

**Key words:** Diabetes Mellitus; Alloxan; Metabolic Syndrome; Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; Oxidative Stress; Antioxidants.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS

ADAMS, L.A.; ANGULO, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabet. Med.**,v.22, p.1129-33, 2005.

ALVAREZ-MARTÍNEZ, H.E. et al. Pathogenic molecular mechanisms in non-alcoholic steatohepatitis. **Rev. Gastroenterol. Mex.**,v.69, p.176-183, 2004.

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

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

ANDICAN, G.; BURÇAK, G. Oxidative damage to nuclear DNA in streptozotocin-diabetic rat liver. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**,v.23,p.663-666.

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

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

---

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.



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

BRASIL, Ministério da Saúde. **Cadernos de atenção básica**. Diabetes Mellitus, Brasília, DF, nº 16, 2006.

CALAMITA, G.; PORTINCASA, P. Present and future therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. **Expert. Opin. Ther. Targets**,v.11, p.1231-1249, 2007.

CANNY, C.L. et al. Comparison of stereofundus photographs in patients with insulin-dependent diabetes during conventional insulin treatment or continuous subcutaneous insulin infusion. **Diabetes**, v. 34, Suppl 3, p. 50-55, 1985.

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.

CHITTURI, S.; FARRELL, G.C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Semin. Liver Dis.**; v. 21, p. 27-41, 2001.

CLARK, J.M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. **J. Clin. Gastroenterol.**,v. 40 Suppl 1, S5-10, 2006.

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

CUSI, K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. **Clin. Liver Dis.**, v.13, p. 545-563, 2009.

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

DANDONA, P. et al. Rapid development and progression of proliferative retinopathy after strict diabetic control. **Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)**, v.290, p.895-896, 1985.

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

DAVIDSON, M.B. **Diabetes Mellitus: diagnóstico e tratamento**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 389p.

DE OLIVEIRA, J.E.P.; MILECH, A. **Diabetes mellitus**. Clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. São Paulo: Atheneu, 2004. 363p.

DOWMAN, J.K.; TOMLINSON, J.W.; NEWSOME, P.N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **Int. J. Med.**, v.103, p.71-83, 2010.

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

DUVNJAK, M. et al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. **World J. Gastroenterol.**, v.13, p. 4539-4550, 2007.

ERION, D.M. et al. Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by knockdown of AMP Response Element Binding Protein (CREB). **Cell. Metab.**; v.10, p.499-506, 2009.

EVANS, J.L. Antioxidants: Do they have a role in the treatment of insulin resistance? **Indian J Med Res.**, v.125, p. 355-372, 2007.

EVELSON, P. et al. Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats. **Ann. Hepatol.**, v.4, p.115-120, 2005.

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.2, Suppl, p.5535-5552, 2005.

FELDSTEIN, A.E. et al. Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology.**, v.125, p.437-443, 2003.

FELDSTEIN, A.E. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathways GJ. **Hepatology.**, v.40, p.185-194, 2004.

FRAENKEL, E.; LAZÚROVÁ, I.; FEHÉR, J. Role of lipid peroxidation in non-alcoholic steatohepatitis. **Orv. Hetil.**, v.145, p. 611-618, 2004.

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

FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v.395, p.763-770, 1998.

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

GENUTH, S. et al. Follow - up report on the diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Care.**, v. 26, p.3160-7, 2003.

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

GRUESSNER, A.C.; SUTHERLAND, D.E. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. **Clin. Transplant.**, v.19, p.433-455, 2005.

HAQUE, M.; SANYAL, A.J. The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 16, p.709-731, 2002.

HARRISON, S.A.; DIEHL, A.M. Fat and the liver – a molecular overview. **Semin. Gastrointest. Dis.**, v.13, p. 3-16, 2002.

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, p.1717-1723, 2001.

JENSEN, M.D. et al. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. **J. Clin. Invest.**, v.83, p.1168-1173, 1989.

JOHANSSON, L.H.; BORG, L.A.H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Anal. Biochem.**, v.174, p.331-336, 1988.

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. Bio.**, v.38, p.782-793, 2006.

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

KIM, S.M et al. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in Korea: Korean National Health and Nutrition Survey 2001. **Diabetes Care.**, v.29, p.226-231, 2006.

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

LECLERCQ, I.A. et al. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. **J. Hepatol.**, v.47, p. 142-156, 2007.

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

LI, Z.; CLARK, J.; DIEHL, A.M. The liver in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Clin. Liver Dis.**, v.6, p. 867-877, 2002.

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

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, p. 86-93, 2000.

MAIER, C.M.; CHAN, P.H. Role of superoxide dismutase in oxidative damage and neurodegenerative disorders. **Neuroscientist.**, v.8, p.323-334, 2002.

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, 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, 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. (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

MARRA, F. NASH: are genes blowing the hits? **J. Hepatol.**, v.40, p. 781-786, 2004.

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

McCULLOUGH, A.J. Update on nonalcoholic fatty liver disease. **J. Clin. Gastroenterol.**, v.34, p. 255-262, 2002.

MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N.; CHÁVEZ-TAPIA, NC.; URIBE, M. An update on non-alcoholic fatty liver disease. **Rev. Invest. Clin.**, v.56, p. 72-82, 2004.

MIHALJEVIC, B.; KASUSIN-RAZEM, B.; RAZEM, D. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanism aspects of the response. **Free Radic. Biol. Med.**, v.21, p.53-63, 1996.

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

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

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. Fatty liver and the metabolic syndrome. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.32, p. 193-198, 2007.

PEREIRA, B. et al. Changes in the TBARs content superoxid dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscle of adrenalectomized rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.827-833, 1998.

PORTINCASA, P. et al . Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management. **Clin. Biochem.**, v.38, p. 203-217, 2005.

PORTINCASA, P. et al. The emerging problem of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). **Rom. J. Gastroenterol.**, v.14, p. 43-51, 2005.

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

ROSKAMS, T. et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. **Am. J. Pathol.**, v.163, p.1301-1311,2003.



ROBERTSON, G.; LECLERCQ, I.; FARRELL, G.C. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. cytochrome P-450 enzymes and oxid. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**,v.281, p. G1135-G1139, 2001.

RYAN, E.A. et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. **Diabetes.**, v.50, p. 710-719, 2001.

SANYAL, A.J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. **Gastroenterology.**, v.120, p.1183-1192, 2001.

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

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes**, São Paulo, 2000.

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

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

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

TAMBORLANE, W.V.; PRESS, C.M. Insulin infusion pump treatment of type I diabetes. **Pediatr. Clin. North.** v.31, p. 721-734, 1984.

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

THE 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 Eng. J. Med.**, v.318, p. 246-250, 1988.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.**, v.25, Suppl. p.S5-S20, 2003.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; GREGOLIN, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.839, p.62-70, 1985.

VALENTI, L. et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v.122, p. 274-280, 2002.

VARAS-LORENZO et al. Prevalence of glucose metabolism abnormalities and cardiovascular co-morbidity in the US elderly adult population. **Pharmacoepidemiol. Drug. Sat.**, v.15, 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.

VIBERTI, G.C. et al. Long-term correction of hyperglycaemia and progression of renal failure in insulin dependent diabetes. **Br. Med. J. Clin. Res. Ed.**,v.286, p.598-602, 1983.

WIGG, A.J. et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Gut.**, v.48, p.206-211, 2001.

WILLNER, I.R. et al. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. **Am J Gastroenterol.**,v.96, p.2957-2961, 2001.

YANG, S.Q. et al. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. **Hepatology**,v. 34, p. 694-706, 2001.

YEH, M.M.; BRUNT, E.M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.128, p. 837-847, 2007.