

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DO FLUXO  
SANGÜÍNEO NA ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATOS  
DIABÉTICOS POR INDUÇÃO DE ESTREPTOZOTOCINA**

**ALEXANDRE SIMÕES DIAS**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> NORMA POSSA MARRONI**

**CO-ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SUSANA LLESUY**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISILOGIA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO  
SUL, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS - FISILOGIA .**

**Porto Alegre**

**2001**

*Quando se viaja em direção a um objetivo é muito importante prestar atenção no caminho. O caminho é que sempre nos ensina a melhor maneira de chegar, e nos enriquece, enquanto o estamos cruzando.*

*Paulo Coelho*

*Dedico este trabalho a três mulheres especiais,*

*Minha mãe Gisela*

*Minha orientadora Norma*

*Minha esposa Adriane*

*À minha família, que apesar da distância esteve presente.  
Mãe, Pai, Ana e Rô, obrigado pelo incentivo e pelo amor que  
vocês transmitem.*

*À minha namorada, amiga, companheira e esposa Adriane,  
pela força e incentivo que conseguiu transmitir.  
Esteve presente em todos os momentos especiais,  
pois quando olhava para o lado tinha a certeza que estava ali.  
Obrigado por estar comigo.*

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais, Antônio Paulo Simões Dias e minha mãe Gisela Maria Superti Dias pelo exemplo de dedicação e por terem me ensinado o que é mais precioso na pessoa humana, a educação.**

**Às minhas irmãs Ana Paula e Rosângela, o amor e a alegria que possuem contagia a todos e apesar de estarem distante estiveram sempre comigo.**

**Ao meus cunhados Amerson e Cíntia e a minha sogra Ana, o apoio de vocês foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.**

**Ao professor Henrique Záchia Leão, responsável pelo primeiro contato com a fisiologia humana e por demonstrar que o estudo pode ser agradável.**

**Aos alunos e monitores de fisiologia do Instituto Porto Alegre, Rafael Bueno Orcy, Márcio Vinícius Donádio e Bárbara Matzembacher, pelas dúvidas e pelos questionamentos.**

**À Universidade Luterana do Brasil, em especial a coordenadora do curso de fisioterapia, Andrea Jansen.**

**Aos meus colegas fisioterapeutas e fisiologistas Pedro Dall'Ago, Guilherme Toscani e Denizar Melo, pelos questionamentos e esclarecimentos de inúmeras dúvidas, além de poder contar com o companheirismo.**

**Aos meus amigos e colegas Marta Lorenzini, Alan Silveira e Mariane Monteiro, pela amizade e pelo incentivo.**

**À professora Rejane do Nascimento, pela árdua revisão ortográfica e pelo esforço dispensado a mim em relação aos difíceis termos existentes na língua portuguesa.**

**Ao Dr. Cláudio Augusto Marroni, pelo apoio científico e pelas críticas bem fundamentadas sobre este trabalho.**

**Aos professores e as demais pessoas que trabalham no departamento de fisiologia desta universidade, na pessoa do Coordenador Aldo Bolten Lucion e da secretária Mirian.**

**À funcionária do laboratório de Fisiologia Digestiva Maria Inês Rodrigues, uma presença amiga, constante e eficiente nesta pesquisa.**

**Aos meus colegas de Laboratório de Fisiologia Digestiva, Maria Amália Pavanato, Henrique Filmann, Denizar Melo, Wilma Mendonça, Ricardo Cremonese, Aline Frota, Nelson Pereira Filho, Germano de Carli, Adriane Souza, Dr<sup>a</sup>. Marilene Garrido, Dr. Willian Peres, Dr<sup>a</sup>. Stela Maris, Rafael Vercelino, Aline Milterstainer, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração, onde todos, de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.**

**À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susana Llesuy, pela amizade e pela constante disposição prestada em todos os momentos do trabalho. Pela sua alta capacidade intelectual e por mostrar que a pesquisa pode ser realizada de maneira séria e agradável.**

**À minha amiga, orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Marroni, por demonstrar que a vida e a amizade pode ser conciliada com a pesquisa. És um exemplo para todos nós, e se Deus coloca em nosso caminho pessoas que servem como anjos, certamente és um deles. Obrigado por tudo o que me possibilitou. Agradeço pelo crescimento profissional e pessoal e espero um dia retribuí-la de alguma maneira.**

Este trabalho de pesquisa foi realizado nas instalações do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, no Laboratório de Fisiologia Digestiva do Departamento de Fisiologia e com recursos concedidos pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação desta Universidade, através do convênio UFRGS/CAPES.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	X
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XII
<b>RESUMO</b> .....	XIV
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 - DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL.....	8
1.2 - FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO (EAO) .....	11
1.3 - LIPOPEROXIDAÇÃO.....	13
1.4 - DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	16
1.5 - ESTRESSE OXIDATIVO NO DIABETES MELLITUS .....	19
1.6 - ALTERAÇÕES VASCULARES NO DM .....	20
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	25
2.1- OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
3.1 - ANIMAIS .....	26
3.2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	26
3.3 - INDUÇÃO DO DIABETES .....	27
3.4 - REAGENTES.....	28
3.5 - OBTENÇÃO DO PLASMA E DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA .....	29
3.6 - PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS DE ESTÔMAGO E FÍGADO .....	29
3.7 - MEDIDA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ACIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS).....	30
3.8 - DETERMINAÇÃO DA QUIMILUMINESCÊNCIA (QL) INICIADA POR HIDROPERÓXIDO DE <i>TERT-BUTILA</i> .....	30
3.9 - ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE .....	31
3.10 - ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) PELO SISTEMA DE DETECÇÃO ADRENALINA-ADRENOCROMO .....	32
3.11 - ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GTx).....	33
3.12 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	33



3.13 - FLUXO SANGÜÍNEO NA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR.....	34
3.14 - CARACTERÍSTICA DO FLUXÔMETRO .....	35
3.15 - ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>4- RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 - LIPOPEROXIDAÇÃO NO ESTÔMAGO.....	43
4.2 - ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO ESTÔMAGO.....	46
4.3 - LIPOPEROXIDAÇÃO NO FÍGADO .....	49
4.4 - ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO FÍGADO .....	52
4.5 - FLUXO NA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR .....	54
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Mecanismo e consequência patogênica do estresse oxidativo no nervo periférico no DM .....	3
<b>FIGURA 2:</b> Via final dos polióis (sorbitol) e glicose-6-fosfato.....	5
<b>FIGURA 3:</b> Redução da molécula de oxigênio a água e a transferência de elétrons.....	6
<b>FIGURA 4:</b> Atuação da estreptozotocina nas células pancreáticas beta (produtoras de insulina). .....	10
<b>FIGURA 5:</b> Fases da lipoperoxidação, início, propagação e término.....	15
<b>FIGURA 6:</b> Destruição dos fosfolipídios da membrana, formação de malondealdeído (MDA) e prostaglandinas.....	16
<b>FIGURA 7:</b> Decomposição do peróxido de hidrogênio e atuação enzimática .....	19
<b>FIGURA 8:</b> Desenho do esquema da artéria mesentérica superior e inferior e relação anatômica com o intestino. ....	23
<b>FIGURA 9:</b> Desenho do esquema da artéria mesentérica superior e relação anatômica com a veia cava inferior.....	23
<b>FIGURA 10:</b> Aquisição do fluxo sanguíneo do animal vista de cima.....	35
<b>FIGURA 11:</b> Representação dos transdutores e do refletor. ....	35
<b>FIGURA 12:</b> Peso dos animais diabéticos e controle no dia do sacrifício. ....	40
<b>FIGURA 13:</b> Glicemia dos animais diabéticos e controle no dia da indução do diabetes (T0) e no dia do sacrifício .....	42
<b>FIGURA 14:</b> Resultado da medida de TBARS em estômago de animais-controle e diabéticos.....	44
<b>FIGURA 15:</b> Resultado da medida de QL em estômago de animais-controle e diabéticos .....	45
<b>FIGURA 16:</b> Medida da atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de estômago de animais-controle e diabéticos.....	47
<b>FIGURA 17:</b> Medida da atividade da enzima glutathiona transferase (GTx) em homogeneizado de estômago de animais-controle e diabéticos.....	48
<b>FIGURA 18:</b> Resultado da medida de TBARS em fígado de animais-controle e diabéticos. ....	50
<b>FIGURA 19:</b> Resultado da medida de QL em fígado de animais-controle e diabéticos .....	51
<b>FIGURA 20:</b> Medida da atividade da enzima glutathiona transferase em homogeneizado de fígado de animais-controle e diabéticos. ....	53
<b>FIGURA 21:</b> Medida do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior dos animais-controle e diabéticos com 90 dias .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Meia vida estimada dos radicais livres presentes nos sistemas biológicos.....	7
<b>TABELA 2</b> - Reagentes e respectivos pesos moleculares ou quantidades equivalente e fornecedores .....	28
<b>TABELA 3</b> - Peso dos animais no momento da indução do diabetes (T0).....	38
<b>TABELA 4</b> - Peso dos animais no momento do sacrifício nos diferentes grupos estudados. ....	39
<b>TABELA 5</b> - Glicemia dos animais controle e animais diabéticos no momento da indução do diabetes (T0) e no momento do sacrifício.....	41
<b>TABELA 6</b> - Resultados da lipoperoxidação obtidos pelas técnicas do TBARS e QL no estômago dos animais controle e diabéticos nos diferentes grupos. ....	43
<b>TABELA 7</b> - Resultados da quantificação das enzimas antioxidantes no estômago dos animais controle e dos diabéticos nos diferentes grupos.....	46
<b>TABELA 8</b> - Resultados da lipoperoxidação obtidos pelas técnicas do TBARS e QL em fígado dos animais controle e diabéticos nos diferentes grupos. ....	49
<b>TABELA 9</b> - Resultados da quantificação das enzimas antioxidantes no fígado dos animais controle e diabéticos nos diferentes grupos.....	52
<b>TABELA 10</b> - Resultados da mensuração do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior de animais controle e diabéticos. ....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – trifosfato adenosina  
ADP - adenosina difosfato  
AGE -advanced glycosylation end = glicosilação avançada final  
ATPase – adenosina trifosfatase  
Ca<sup>++</sup> - íons cálcio  
CAMs - cell adhesion molecules = moléculas de adesão celular  
CAT – catalase  
Cl<sup>-</sup> - íons cloreto  
CO<sub>2</sub> - gás carbônico  
cps – contas por segundo  
Cu<sup>+</sup> - íon cuproso  
Cu<sup>++</sup> - íon cúprico  
CuZnSOD - superóxido dismutase cobre e zinco  
DM - diabetes mellitus  
DMID - diabetes mellitus insulino dependente  
DMNID - diabetes mellitus não insulino dependente  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
EAO – espécies ativas de oxigênio  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
EPM - erro padrão da média  
Fe - ferro  
Fe<sup>++</sup> - íon ferroso  
Fe<sup>+++</sup> - íon férrico  
Fig(s) – figura(s)  
g – gramas  
g – gravidade  
g/dL - grama por decilitro  
Glicose-6-P - glicose 6 fosfato  
GPx – glutationa peroxidase  
GR – glutationa reductase  
GSH – glutationa reduzida  
GSSG – glutationa oxidada  
GTx – glutationa transferase  
h – hora  
H<sup>+</sup> - íons hidrogênio  
H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – ácido carbônico  
H<sub>2</sub>O - água  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - íons bicarbonato  
i.p. - intraperitoneal  
K' - constante de velocidade  
K<sup>+</sup> - íons potássio  
L - litro  
LOO<sup>•</sup> – radical peroxil lipídico  
LOOH - hidroperóxido  
LPO – lipoperoxidação  
M – molaridade (medida molar da concentração, moles de soluto por litro de solvente)  
MDA - malondealdeído  
mg – miligrama

mg proteína - miligrama de proteína  
mg/Kg - miligrama por quilograma  
min – minutos  
mL – mililitros  
mL/min - mililitros por minuto  
mm – milímetros  
mM – milimolar  
Mn – manganês  
MnSOD - superóxido dismutase manganês  
N – normal  
Na<sup>+</sup> - íons sódio  
NaCl – cloreto de sódio  
NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido  
NADP<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido  
NaHCO<sub>3</sub> –bicarbonato de sódio  
NaOH – hidróxido de sódio  
NFκ-B - fator de transcrição nuclear κ-B  
nm – nanômetro  
nmol – nanomol  
nmol/mg prot - nanomol por miligrama de proteína  
NO - óxido nítrico  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - oxigênio *singlet*  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – radical superóxido  
OH<sup>•</sup> – radical hidroxil  
ONOO<sup>-</sup> - peroxinitrito  
PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonila  
prot. – proteína  
PUFA - ácidos graxos polinsaturados  
QL – quimiluminescência  
QL BASAL - quimiluminescência basal  
R – radical livre  
rpm – rotações por minuto  
SOD – superóxido dismutase  
t-BOOH – hidroperóxido de *tert-butila*  
t<sub>(1/2)</sub> - meia vida  
Tab(s) – tabela(s)  
TBA - ácido tiobarbitúrico  
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCA – ácido tricloroacético  
TNF-α -fator de necrose tumoral alfa  
U/mg - unidades de superóxido dismutase (SOD) por miligrama de proteína  
UI – unidades internacionais  
-SH - grupo sulfidril  
μL - microlitro  
μM - micromolar  
°C – grau Celsius

## RESUMO

Os sintomas gastrointestinais são freqüentes no diabetes mellitus, e podem estar relacionados com a produção das espécies ativas de oxigênio (EAO). Pacientes diabéticos apresentam alterações no sistema gastrintestinal, sendo que os principais distúrbios ocorrem com a motilidade gástrica e intestinal, além de mudanças na estrutura do tecido hepático. Essas fenômenos podem ser causadas pelo aumento na produção de radicais livres (lipoperoxidação) e diminuição das enzimas antioxidantes.

Neste trabalho objetivamos avaliar a lipoperoxidação em estômago e fígado de animais diabéticos e controles em diferentes tempos de estudo, além de verificar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione transferase (GTx). Avaliamos o fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior para determinar uma possível alteração vascular.

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 250-350g e foram divididos em quatro grupos: grupo 1 - 7 dias de diabetes, grupo 2- 30 dias de diabetes, grupo 3 - 60 dias de diabetes e grupo 4 - 90 dias de diabetes. O diabetes foi realizado por indução de estreptozotocina 70 mg/Kg intra-peritonealmente. A lipoperoxidação foi avaliada através das medidas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBA-RS (nmoles/mg de proteína) e por quimiluminescência-QL (cps/mg de proteína). Para a avaliação do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior utilizamos o aparelho Transonic Flowmeter (T106).

Observamos através de nossos resultados que há um aumento significativo na lipoperoxidação em estômago e fígado de animais diabéticos somente no tempo de 90 dias. Este aumento foi verificado através das duas técnicas utilizadas. No estômago foi encontrado uma diminuição significativa na atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione transferase. No fígado somente a enzima glutathione transferase apresentou diminuição significativa. Houve um aumento no fluxo da artéria mesentérica superior dos animais diabéticos com 90 dias quando comparados aos animais-controle.

Pelos dados obtidos neste trabalho é possível supor que a alteração tecidual encontrada no estômago e fígado, avaliada através da lipoperoxidação, e o fluxo sanguíneo aumentado na artéria mesentérica superior sejam influenciados pelo tempo de diabetes e pela hiperglicemia encontrada nos animais estudados.

# 1- INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma enfermidade endócrino-metabólica freqüente, que afeta mais de 30 milhões de pessoas em todo o mundo (THOMPSON & GODIN, 1995). É caracterizada pela poliúria (emissão de quantidade exagerada de urina), polidipsia (sede exagerada), perda de peso apesar da polifagia (ingesta de alimentos), hiperglicemia, glicosúria (presença de açúcar na urina), cetose, acidose e, em casos mais graves, o coma. Apresenta uma variedade de alterações bioquímicas, mas a fundamental é a redução da entrada de glicose nos tecidos periféricos e o aumento na liberação de glicose circulante pelo fígado (GANONG, 1995). Antes de 1921, a principal causa de morte entre os pacientes diabéticos era a cetoacidose diabética. Entretanto, desde o descobrimento da insulina, em 1921, a principal causa de morte entre os pacientes diabéticos envolveu as alterações dos grandes e pequenos vasos sanguíneos (KING et. al., 1996).

A definição do DM está baseada em critérios descritos por Harris e Cahill (1978), e pode ser dividida em duas classes: Diabetes Mellitus tipo I e DM tipo II.

O DM tipo I ou insulino-dependente (DMID) é caracterizado pela deficiência das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, na produção ou secreção de insulina, mas com participação intensa de fatores genéticos e ambientais. Ocorre geralmente em pessoas jovens e é necessária a utilização de insulina para o tratamento delas.

O DM tipo II ou não insulino-dependente (DMNID) é caracterizada por uma resistência à estimulação ao captar glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo determinado pela insulina. Isto contribui para um acúmulo de glicose no meio extracelular e conseqüentemente no sangue, causando um quadro de hiperglicemia.

Apesar de um número muito grande de pessoas acreditarem que possa haver uma associação entre o DM e o aumento na suscetibilidade para infecções, estudos demonstram que em geral não há uma forte evidência (WHEAT,1980; THORNTON, 1971). Muitas infecções específicas são mais

comuns nos pacientes diabético, e outros tipos de infecções ocorrem por estarem associadas ao risco aumentado que este tipo de paciente apresenta.

Diversos aspectos da imunidade também estão alterados nos pacientes com DM. A função dos leucócitos polimorfonucleados está diminuída, particularmente quando a acidose está presente. A aderência leucocitária, quimiotaxia e a fagocitose também estão alteradas (DELAMAIRE et. al., 1997 e GALLACHER et. al., 1995).

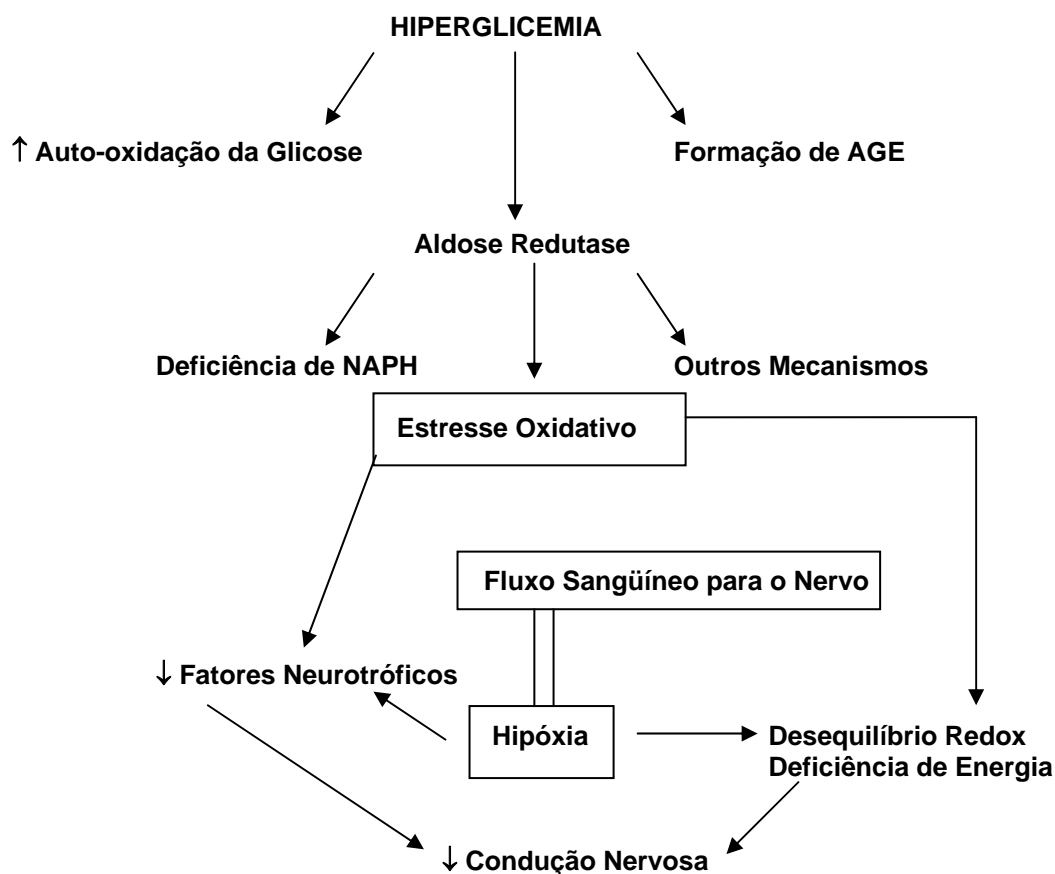
Alguns estudos realizados *in vitro* mostram a evidência de que uma melhora no controle glicêmico de pacientes diabéticos resulta na conseqüente melhora da função imune. Isso foi demonstrado por Muchova e colaboradores (1999), mas necessita de maiores comprovações por meio da realização de estudos clínicos. A maioria das alterações do estado imune parece estar relacionada com o aumento da diarreia crônica que os pacientes com DM apresentam, a qual recebe a definição de infecção intestinal.

As complicações que o DM determina em diversos tecidos podem ser causadas pelo estresse oxidativo, em que podemos incluir a alteração da condução nervosa, auto-oxidação da glicose sangüínea, formação de glicozilação avançada e um aumento na atividade da enzima aldose redutase. (LOW & NICKANDER, 1997).

A contribuição do estresse oxidativo para o estabelecimento de um quadro de neuropatia periférica tem sido bem estabelecida por estudos realizados por Cameron e colaboradores (1998), as quais determinaram que o estresse oxidativo causado pelo DM leva a uma diminuição do fluxo de sangue para a região endoneural, resultando em hipoxia para essa região. Este aumento na formação de espécies ativas de oxigênio impede um adequado suporte neurotrófico e causa uma alteração no balanço intracelular, deficiência no aporte energético, culminando na diminuição do mecanismo de transporte iônico.

As conseqüências que o estresse oxidativo determina no DM podem ser melhor entendidas na **Figura 1**.





**FIGURA 1:** mecanismo e consequência patológica do estresse oxidativo no nervo periférico no dm. (PACKER et. al., 2000) AGE-Advanced Glycosylation End =Glicosilação Avançada Final, NADPH-Nicotinamida Adenonucleotídeo Fosfato Reduzido.

O fígado executa um papel central na manutenção da glicemia, pois está envolvido no metabolismo dos carboidratos, dos lipídios e mais especificamente na gliconeogênese e na glicogenólise. Devido a sua essencial participação no controle do metabolismo corporal, esse órgão pode ser afetado no DM e na hiperlipidemia (GITLIN, 1997).

Pacientes diabéticos apresentam uma série de alterações na histologia hepática, bem como outras alterações clínicas, entre as quais destacam-se a esteatohepatite não alcoólica e a obesidade. Muitos estudos avaliaram a relação entre o DM e o dano hepático, neles a prioridade foi a de determinar a hepatite causada por vírus. Entretanto os achados mais consistentes entre o DM e a alteração hepática foram determinados pela deposição de glicogênio nuclear e citoplasmático, esteatose hepática, fibrose perisinusoidal e a possibilidade dos pacientes diabéticos apresentarem esteatohepatite e cirrose (GITLIN, 1997).

A prevalência de DM está aumentada em pacientes cirróticos (CONN & ATTERBURY, 1987), pois o comportamento clínico deles é semelhante ao dos não insulino-dependentes, podendo ser controlado inicialmente pela dieta e posteriormente com antidiabéticos orais, eventualmente necessitando de insulina (MARRONI, 1996).

Para alguns autores, os níveis de glicemia em pacientes cirróticos encontram-se nos limites normais de referência, em contraste com os achados de hiperinsulinemia e hiper glucagonemia em jejum de praticamente todos eles. Esse mecanismo poderia estar relacionado com a diminuição do catabolismo da insulina pelo fígado doente e pela provável hipersecreção de insulina, implicando um estado de resistência à insulina.

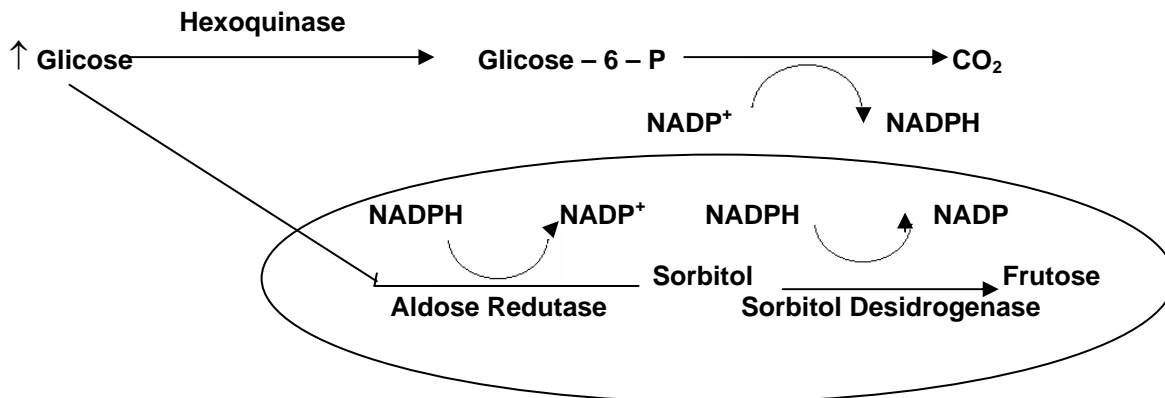
Um número cada vez maior de trabalhos vem sendo publicado relacionando alterações no sistema gastrintestinal em consequência do DM, em que as complicações variam entre as porções do sistema digestivo como estômago, intestino delgado e intestino grosso podem estar correlacionadas com a produção de espécies ativas de oxigênio, disfunção na motilidade gástrica e/ou intestinais ou na produção de fatores relaxantes do endotélio, como o óxido nítrico (TAKAHASHI et. al., 1997).

Complicações gastrintestinais são comuns em pacientes com DM, dentre elas está a gastropatia diabética, que é um termo utilizado quando existe uma disfunção no estômago, incluindo anormalidades da contratilidade gástrica, tônus e atividade mioelétrica. (KOCH, 1999).

Diversos autores têm demonstrado as anormalidades existentes no DM, como a diminuição da velocidade de condução nervosa, distúrbio da atividade motora gastrointestinal, diminuição no esvaziamento gástrico, anorexia, vômitos, diarreia e constipação (BÜTTOW et. al., 1997).

Estas manifestações podem ser causadas por distúrbios metabólicos que acontecem nos neurônios e na bainha de mielina que os circunda. A deficiência insulínica, característica do DM, é responsável por um excesso na produção de frutose no interior das células da bainha de mielina, ocasionando uma elevação na concentração do sorbitol, edema e ruptura destas células, diminuindo assim a propagação dos impulsos e determinando a lesão neuronal.

Os processos que ocorrem com o aumento da glicemia, estado característico do DM, a elevação do sorbitol e o conseqüente acúmulo de frutose estão demonstrados na **Figura 2**.



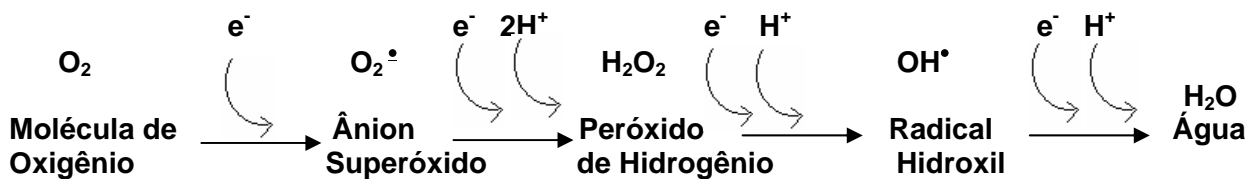
**FIGURA 2:** via final dos polióis (sorbitol) e glicose-6-fosfato. (NISHIMURA, 1998).

Para que o metabolismo celular ocorra, faz-se necessário o uso de energia derivada da oxidação dos nutrientes, a qual é dirigida para a formação de compostos fosfatados de alta energia, dentre os quais o mais importante é o adenosina trifosfato (ATP). Para a realização de exercícios, a energia é fornecida quimicamente pela hidrólise da molécula de ATP (MAUGHAN et. al., 2000). As espécies ativas de oxigênio (EAO) se formam principalmente durante a redução dessa molécula a água na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

Nas membranas mitocondriais se encontram as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente os citocromos, que reduzem uma molécula de oxigênio a água durante o processo da respiração celular. Essa redução requer quatro sucessivas transferências de um elétron cada uma. Esta teoria foi proposta por Michaelis (1946) e é denominada de redução univalente. Dois destes intermediários são chamados de radicais livres. São eles o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). **Figura 3.**

A maior parte do oxigênio (aproximadamente 95%) recebe estes quatro elétrons de uma só vez, pelo sistema oxidativo citocromo-oxidase, redução tetravalente. Porém, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez,

proporcionando a formação de intermediários reativos e tóxicos denominados espécies ativas de oxigênio (EAO).



**FIGURA 3:** redução da molécula de oxigênio a água e a transferência de elétrons. (MENEGUINI, 1987)

O termo radical livre é usado quando uma espécie química, que pode ser um átomo, como o hidrogênio ou o cloro, um metal de transição ou uma molécula, possui um elétron não pareado no seu último orbital (BOVERIS, 1998).

O elétron não pareado neste orbital confere uma alta reatividade da molécula, a qual apresenta uma forte tendência a adquirir um segundo elétron para este orbital. Essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Quantidades aumentadas de metabólitos oxidados destas moléculas têm sido detectadas em pacientes com uma variedade significativa de doenças (MAXWELL, 1995).

A estabilidade é adquirida por remoção de elétrons de moléculas vizinhas, produzindo um par eletrônico. A reatividade química dos radicais livres é determinada pela molécula que possui o elétron não pareado, podendo apresentar grande variedade nos diferentes tipos de radicais. Uma forma que expressa a reatividade química está determinada pelo tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da espécie química, ou seja, um curto tempo de meia vida indica uma alta reatividade, em que o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>) parece ser o mais atuante.

Alguns radicais livres existentes nos meios biológicos e suas respectivas meia vidas ( $t_{1/2}$ ) são demonstrados na **Tabela 1**.

<b>Radical Livre</b>		<b>t<sub>1/2</sub> segundos</b>
<b>Radical Hidroxil</b>	<b>HO<sup>•</sup></b>	<b>10<sup>-9</sup></b>
<b>Radical Alcoxil</b>	<b>OR<sup>•</sup></b>	<b>10<sup>-8</sup></b>
<b>Óxido Nítrico</b>	<b>ON<sup>•</sup></b>	<b>1<sup>-10</sup></b>
<b>Radical Peroxil</b>	<b>ROO<sup>•</sup></b>	<b>10<sup>-1</sup></b>
<b>Ubesemiquinona</b>	<b>UQH<sup>•</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>
<b>Melanina</b>	<b>Complexo</b>	<b>Dias</b>
<b>Semiquinona</b>	<b>Complexo</b>	<b>Dias</b>

**TABELA 1:** Meia vida (t<sub>1/2</sub>) estimada dos radicais livres presentes nos sistemas biológicos. (BOVERIS, 1998).

Em condições fisiológicas, pequenas quantidades destas moléculas reativas estão sendo formadas continuamente a partir de oxigênio molecular, em que as mesmas não apresentam um número de elétrons pareados nos seus orbitais. Como mecanismo compensador, os tecidos dispõem de um arsenal de enzimas, como a glutatona peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase, além de outras moléculas encarregadas de manter o equilíbrio da célula. (PÓVOA FILHO, 1995).

Em determinadas patologias, como a doença inflamatória intestinal, a pancreatite, os processos de isquemia-reperfusão (McCORD & FRIDOVICH, 1985), a infecção por bactérias como o *Helicobacter pylori* e mais recentemente na esofagite por refluxo (PANÉS & GRANGER, 1996), as espécies ativas do oxigênio são geradas em quantidades que ultrapassam as dos mecanismos compensadores e acabam exercendo efeito deletério sobre os sistemas biológicos (SALAS et. al., 1999).

Quando nos referimos a estas substâncias que são formadas, a expressão mais adequada é espécies ativas de oxigênio, pois é o oxigênio que está com um número alterado de elétrons, em que, em condições patológicas, a quantidade destas espécies ativas está muito aumentada, seja por diminuição das defesas antioxidantes ou por um aumento dos pró-oxidantes (REILLY et. al. 1991).

## 1.1 - DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL

Diversos modelos animais, utilizados no estudo do diabetes mellitus experimental contribuíram para um melhor entendimento das causas, conseqüências e tratamento dessa doença. Minkoski e Von Mering removeram o pâncreas de um cão e produziram uma condição semelhante àquela apresentada em quadro de diabetes mellitus em humanos. O mesmo modelo animal foi empregado trinta anos mais tarde por Frederick Banting e Charles Best na Universidade de Toronto e determinou o início crucial no descobrimento da insulina e os primeiros estudos em busca da terapêutica (PICKUP & WILLIAMS, 1997).

Como o DM é transmitido geneticamente e se desenvolve muitos anos mais tarde, os modelos experimentais também apresentam a pré-disposição genética para desenvolver o DM (HERBERG, 1982).

Atualmente é aceito que o diabetes mellitus insulino dependente (DMID) se caracteriza pela destruição auto-imune das células beta no pâncreas, que são as responsáveis pela produção de insulina. Isso só acontece em pessoas que são geneticamente suscetíveis a apresentar o DMID no momento em que estas reagem com meio ambiente. A descoberta de animais com DM espontânea auto-imune, e mais recentemente o desenvolvimento de modelos experimentais transgênicos que apresentam a expressão imune para desenvolvimento da doença, tem ajudado a esclarecer as condições moleculares em que ocorrem em humanos (PICKUP & WILLIAMS, 1997).

Um dos principais problemas na geração do diabetes experimental em roedores foi resolvido há muitos anos atrás com a utilização da estreptozotocina, que atua diretamente na indução da morte das células beta do pâncreas. Entretanto para o desenvolvimento da neuropatia diabética os animais utilizados nos experimentos devem sobreviver por um longo período de tempo, mas a incidência de morte destes animais torna-se muito grande, o que determina um atraso nos estudos e provavelmente o não desenvolvimento da neuropatia periférica. (HOUNSOM & TOMLISON, 1997).

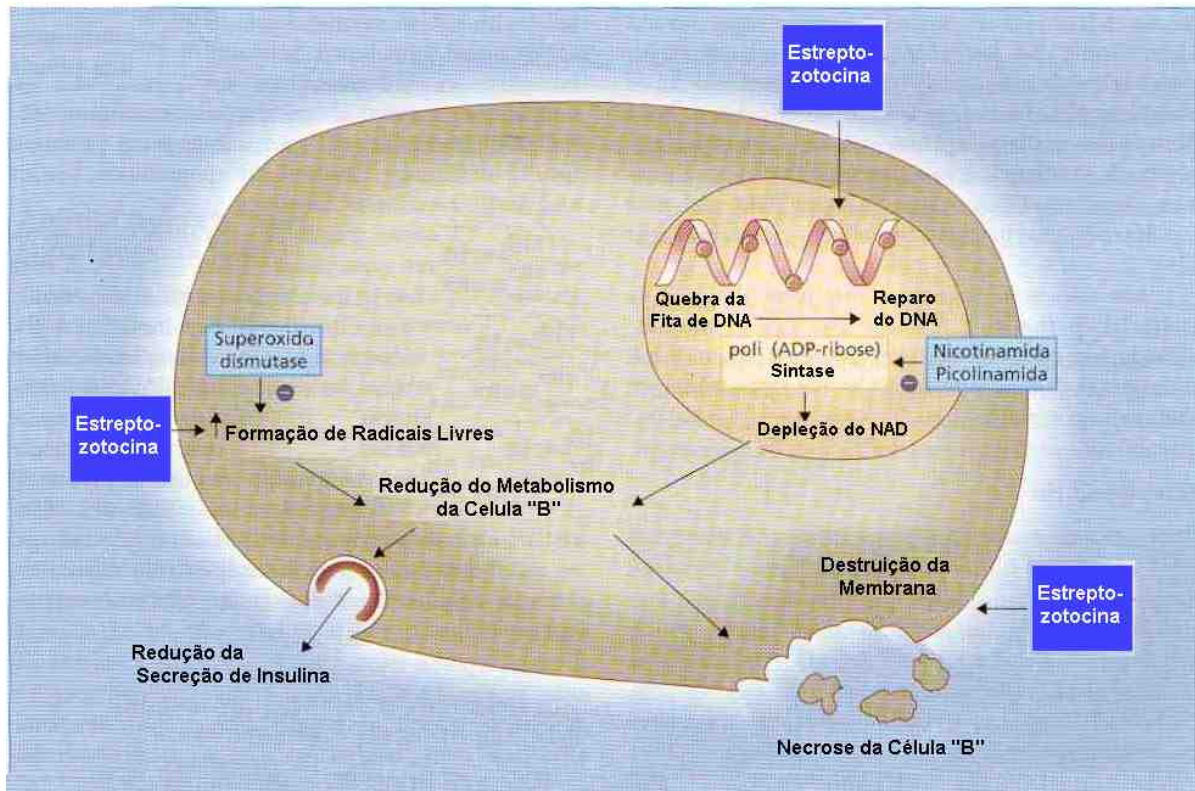
A droga chamada estreptozotocina, que atualmente é chamada de estreptozocina nos Estados Unidos, é uma nitrosurea isolada derivada da *Streptomyces griseus*. Quando utilizada em animais

determina uma severa deficiência de insulina e o quadro de hiperglicemia. Pode ser aplicada somente em uma dose, que pode variar de 50 a 100 mg/Kg de peso corporal ou ainda em múltiplas pequenas doses. Quando administrada em altas doses pode induzir à profunda deficiência de insulina e resultar em cetose espontânea e morte. As doses de estreptozotocina causam necrose das células beta, e o diabetes é desenvolvido em um ou dois dias.

O mecanismo de ação da estreptozotocina é semelhante ao de outra droga utilizada, o aloxano. Com eles ocorre uma destruição das membranas celulares e uma indução na quebra do DNA, levando a ativação da enzima poli (ADP-ribose) sintase e a uma depleção do NAD (YAMAMOTO et. al., 1981). Essa enzima está localizada no núcleo e necessita de NAD para realizar o reparo do DNA nuclear. O aumento desta enzima pode levar a uma depleção do NAD intracelular, sendo impossível impedir a produção de insulina pelas células beta no pâncreas. Essas ocorrências citadas anteriormente podem ser prevenidos através da administração de nicotinamida e picolinamida, pois são substâncias que inibem a ação da poli (ADP-ribose) sintase, levando a uma homeostase dos níveis de NAD intracelular (UCHIGATA et. al., 1983).

A formação de radicais livres pode parcialmente mediar a destruição da células beta, pois uma das enzimas que consegue neutralizar a formação desses radicais, chamada de superóxido dismutase (SOD), quando administrada em animais que receberam a estreptozotocina, pode proteger dos efeitos diabetogênicos da droga (ROBBINS et.al., 1980). **Figura 4.**

No ano de 1976, Like e Rossini demonstraram o desenvolvimento do DM em camundongos após a aplicação de repetidas doses sub-diabetogênicas de 5 mg/Kg de estreptozotocina. Estas alterações que ocorreram nesse tipo de animais foram semelhantes ao ocorrido em humanos, pois houve uma grande infiltração de células monocelulares nas ilhotas pancreáticas. Isso sugere que possa haver um envolvimento patogênico dessas células do sistema auto-imune, influenciando os fatores genéticos que os animais apresentavam. Foi então que começou a ser criada uma nova linhagem de animais geneticamente alterados para desenvolver o DM (LIKE & ROSSINI, 1976).



**FIGURA 4:** Atuação da estreptozotocina nas células pancreáticas beta (produtoras de insulina). (PICKUP & WILLIAMS, 1997).

Como o DM é considerado uma doença auto-imune, estudos recentes sugerem que as EAO podem participar no desenvolvimento desta doença (HOTTA et. al., 2000). A tioredoxina (TRX) é uma pequena proteína (12 KDa) que participa na manutenção da homeostase das células e apresenta um efeito protetor contra o estresse oxidativo, pois é uma "varredora" dos produtos das EAO, atuando na reparação do DNA e bloqueando a apoptose (morte celular programada) causada pelas EAO (BAKER et. al., 1997). Como o mecanismo proposto para a destruição das células beta é a produção das EAO, a TRX parece ter papel fundamental na proteção dessas células.



## 1.2 - FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO (EAO)

A formação das EAO em sistemas biológicos está bem estabelecida. Nas células animais, comprovou-se a geração destas espécies em diversos locais como a mitocôndria, lisossomas, peroxissomas, membrana plasmática, membrana nuclear e retículo endoplasmático, bem como no citosol.

Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não radical. Eles também podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada, ou seja, se cada um dos átomos ficar com um elétron. Esse processo é denominado de fissão homolítica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pode ser produzido pelas células inflamatórias como os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos. A partir do superóxido são formadas outras EAO que são utilizadas pelas células fagocitárias para matar os microorganismos invasores (MENEHINI, 1987; SOUTHORN & POWIS, 1988).

Nos pacientes acometidos de granulomatose crônica, as células fagocitárias são incapazes de produzir EAO, embora estejam aptas para realizar a fagocitose. O fato desses pacientes apresentarem processos inflamatórios graves mostra que a produção de EAO é importante no combate à bactéria invasora (BABIOR, 1982).

Muitos sistemas enzimáticos catalisam a redução univalente do oxigênio molecular à radical superóxido. Como exemplo podemos citar: xantina oxidase, aldeído oxidase, di-hidro-orótico desidrogenase (FRIDOVICH, 1976), flavina desidrogenase e peroxidases.

Outras enzimas como aquelas que catalisam a formação de prostaglandinas (cicloxigenase) e leucotrienos (lipoxigenase) também são fontes de superóxido (MACHLIN & BENDICH, 1987). A redução univalente do oxigênio também ocorre com catecolaminas, flavinas e ferridoxinas reduzidas (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

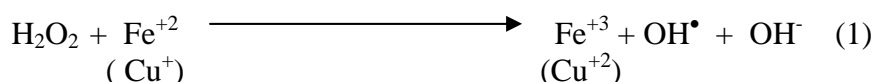
A auto-oxidação das catecolaminas leva à produção de EAO e estas podem causar danos ao coração, como a necrose do miocárdio, observada após a administração de altas doses de catecolaminas (BELLÓ KLEIN, 1993). Uma fonte substancial de radical superóxido é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é produzido por duas fontes básicas: indiretamente pela redução univalente do oxigênio, seguida por dismutação do ânion radical superóxido ou diretamente pela redução divalente do oxigênio molecular. O processo indireto é catalisado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) cobre-zinco (CuZn-SOD) que se encontra no citosol celular e pela isoforma dependente de manganês (Mn-SOD) que fica na mitocôndria. O processo direto é realizado por oxidases como a D-aminoácido oxidase, xantina oxidase, uricase, alfa-hidroxiácido oxidase e glicolato oxidase (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

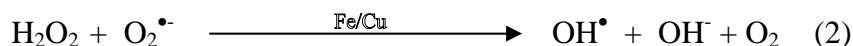
A geração mitocondrial de  $H_2O_2$  é um evento fisiológico sob condições aeróbias e depende do estado metabólico em que a célula se encontra. O aumento da pressão parcial de oxigênio produz uma elevação proporcional na formação de  $H_2O_2$  pela mitocôndria. (BOVERIS & CHANCE, 1973).

Os peroxissomas contêm grande número de enzimas geradoras de  $H_2O_2$ , as quais estão envolvidas em importantes funções fisiológicas como a oxidação dos ácidos graxos, produção de hormônios esteróides, produção de lipídios em glândulas sebáceas, fagocitose, termogênese e esterificação da vitamina A em células da retina (CHANCE et. al., 1979).

As reações que produzem o radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ) são mais raras e necessitam da presença de metais de transição como o ferro e o cobre. A reação de  $H_2O_2$  com íons ferroso ou cuproso é a chamada reação de Fenton (1894) que leva à produção do radical hidroxil, o qual é extremamente reativo (reação 1).



Este radical também pode ser formado a partir de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  em presença de íons ferro ou cobre, reação esta descrita por Haber e Weiss em 1934 (reação 2).



O ferro necessário para a catálise da reação de Fenton pode ser derivado da ferritina, hemoglobina ou mioglobina (WERNIS & LUCCHESI, 1990). Os radicais livres derivados da interação do  $H_2O_2$  com a metamioglobina podem desencadear o processo de lipoperoxidação, que pode levar ao dano celular (KANNER & HAREL, 1985).

### 1.3 - LIPOPEROXIDAÇÃO

A formação de radicais livres lipídicos e peróxidos lipídicos é considerada uma importante forma de injúria celular. Esse tipo de reação, denominada auto-oxidação dos radicais livres, requer um elemento (principalmente o radical hidroxil -  $OH^{\bullet}$ ) para dar início à cascata de reações. A lipoperoxidação geralmente inicia com a extração dos átomos de  $H^+$  que contêm um elétron para ser conjugado à ligação dupla da cadeia dos ácidos graxos da membrana.

Como consequência dos efeitos tóxicos diretos que os radicais exercem sobre as moléculas de importância biológica, o dano intestinal e o inflamatório podem ser promovidos por mecanismos indiretos. Dentre outras ações que os radicais livres podem causar no organismo, mais especificamente sobre o sistema gastrointestinal, a ação dos metabólitos oxidantes pode alterar o equilíbrio protease/antiprotease.

Está bem estabelecido que durante os episódios de inflamação intestinal, aguda ou crônica, a proteólise (danos as proteínas) descontrolada é uma das vias mais importantes, na qual as células inflamatórias produzem danos à mucosa intestinal, causando erosão e ulceração (BERN et. al., 1989).

Quando um radical livre reage com um composto não-radical, pode ser formado outro radical livre, é neste momento que as reações em cadeia começam a ocorrer. Esse mecanismo é o que ocorre na lipoperoxidação, a qual envolve os ácidos graxos polinsaturados (SOUTHORN & POWIS, 1988).

Halliwell & Gutteridge (1999) define a lipoperoxidação (LPO) como sendo uma deterioração oxidativa dos lipídios polinsaturados, ou seja, lipídios que contêm, no mínimo, dois carbonos unidos por ligações covalentes duplas.

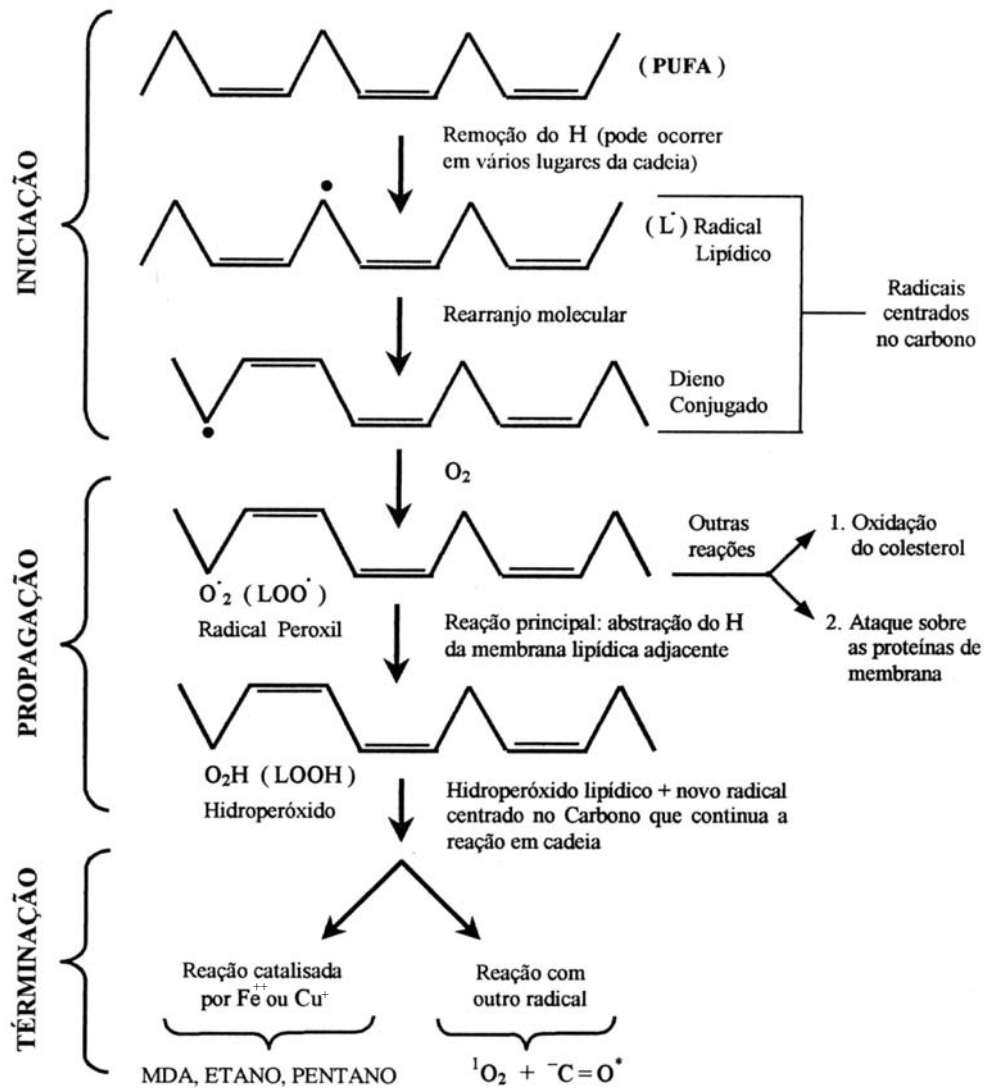
As membranas das células e das organelas são mais suscetíveis à LPO, pois contêm grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. Assim, o processo de lipoperoxidação envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, consumo de oxigênio e determina um rearranjo das duplas ligações nos lipídios instaurados. A eventual destruição dos lipídios da membrana, faz surgir uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres. (BUEGE & AUST, 1978).

A lipoperoxidação é um processo natural de renovação das membranas celulares. Entretanto, o estresse oxidativo aumenta a LPO e provoca severo dano nas membranas celulares, promovendo um aumento na fluidez da membrana, quebra das funções secretórias e dos gradientes iônicos.

A reação de oxidação pode ser iniciada pelo radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), pois ele é o mais reativo dos radicais (SOUTHORN & POWIS, 1988). Ao iniciar a lipoperoxidação, o radical livre remove um átomo de hidrogênio de um ácido graxo polinsaturado, como o átomo de hidrogênio possui um elétron, resta um elétron desemparelhado no átomo de carbono. Na fase de propagação acontecem duas outras reações:

- 1) O carbono radical do lipídio polinsaturado tende a se estabilizar por rearranjo molecular, produzindo dienos conjugados, estes, por sua vez, rapidamente reagem com o oxigênio, formando um radical peroxil ( $\text{LOO}^\bullet$ );
- 2) O radical peroxil formado capta um próton de outra molécula de lipídio, surgindo assim um hidroperóxido ( $\text{LOOH}$ ).

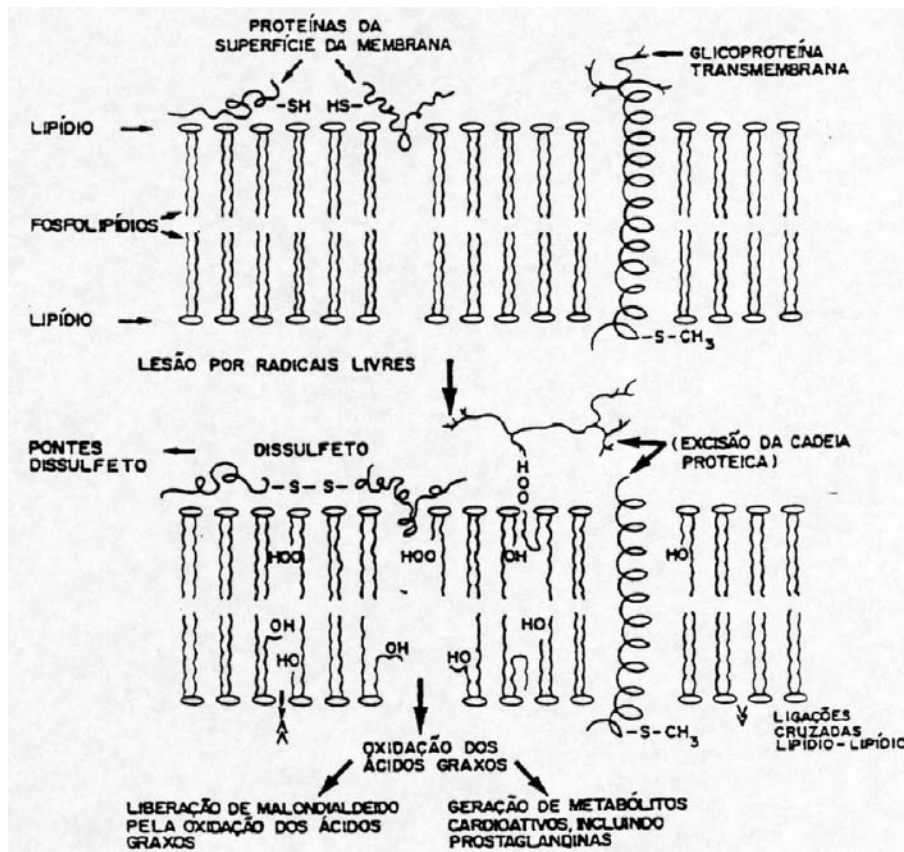
Essa última reação torna a se repetir inúmeras vezes como se fosse um processo em cadeia. Na etapa final, dois radicais peroxil reagem entre si, formando um tetróxido instável que se decompõe, dando origem ao oxigênio singlete e às carbonilas excitadas, os quais podem emitir luz e serem medidos em detectores de quimiluminescência. **Figura 5.**



**FIGURA 5:** Reação de lipoperoxidação, apresentando as fases de iniciação, propagação e terminação. (PUFA- Ácidos graxos poliinsaturados, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>- Oxigênio singlet, <sup>-</sup>C=O\* - Carbonila excitada)

Os efeitos da lipoperoxidação sobre as biomembranas podem ser classificadas em quatro grupos:

- 1) mudanças no microambiente lipídico de enzimas ligadas à membrana e nos canais iônicos e receptores, ativando ou inibindo a atividade destas proteínas;
- 2) formação de novos canais de permeabilidade;
- 3) formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, inativando-os irreversivelmente;
- 4) oxidação dos grupos -SH nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, ocasionando perda de suas funções. **FIGURA 6.**



**FIGURA 6:** Destruição dos fosfolípidios da membrana e formação de malondialdeído (MDA) e prostaglandinas.

Junto com as alterações de permeabilidade da membrana poderá haver um acúmulo de cálcio intracelular, o que ativaria outras enzimas cálcio-dependentes, como a fosfolipase, ocasionando um ciclo vicioso. Além disso haverá um aumento na síntese de prostaglandinas, leucotrienos e fagocitose, o que pode gerar aumento na destruição das membranas celulares. (MEERSON et. al., 1982).

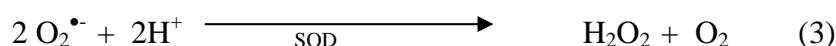
## 1.4 - DEFESAS ANTIOXIDANTES

As defesas antioxidantes são compostas de :

1º) Agentes que removem os radicais livres e outras espécies reativas. Como exemplo disso podemos destacar as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases e antioxidantes específicos com tióis.

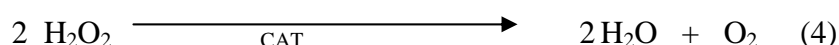
O sistema enzimático de defesa contra as espécies ativas de oxigênio (EAO) inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione transferase (GTx). (MARKS et. al., 1996).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) para formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio (reação 3). Essa reação pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico, porém, a velocidade dela é  $10^4$  vezes maior com a presença da SOD (SHOUTORN & POWIS, 1988).

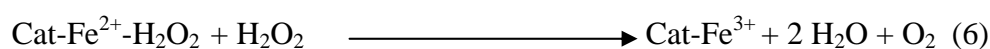
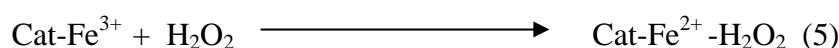


Essa enzima está amplamente distribuída e apresenta uma variedade de isoformas. Uma delas contém cobre e zinco (CuZn-SOD) em seu sítio de ativação e é encontrada no citosol das células eucarióticas. Sua atividade enzimática foi descoberta por McCord e Fridovich (McCORD & FRIDOVICH, 1969). Dentro da mitocôndria um outro tipo de SOD está presente, é a SOD que contém manganês (Mn-SOD) e está localizada na matriz mitocondrial. Além disso, também uma ferro-enzima (Fe-SOD) foi identificada em bactérias (CHANCE et. al., 1979).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), formado pela dismutação do superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), pode ser transformado em água ( $H_2O$ ) pela reação da enzima catalase (CAT), (reação 4).



A CAT está presente em todos os tipos de tecidos de células de mamíferos. Ela é uma hemoproteína com atividade de peroxidase específica para peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), este atuando simultaneamente como hidroperóxido e como doador de hidrogênio (reações 5 e 6).

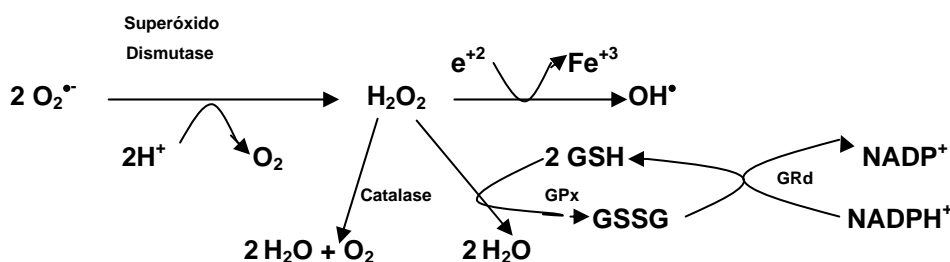


Devido a seu mecanismo catalítico, é muito difícil a enzima ser saturada pelo seu substrato, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), além de que sua velocidade de reação é muito alta. Ela se encontra fundamentalmente nos peroxissomas, de onde remove o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) gerado pela  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos ou pela oxidação dos alcanos. Também está presente nos eritrócitos e em menor quantidade no plasma. Devido a sua alta atividade catalítica é a responsável pela regulação dos níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

A enzima glutatona peroxidase (GPx) pode reagir com uma grande variedade de peróxidos e hidroperóxidos, além do  $H_2O_2$  e os hidroperóxidos derivados dos ácidos graxos. (GAETANI et. al., 1989). Só que para isso necessita da glutatona reduzida (GSH) como co-substrato. A glutatona oxidada (GSSG) se reduz à glutatona reduzida (GSH) através da reação catalisada pela enzima glutatona redutase (GRd).

A glutatona transferase (GTx) é uma enzima que catalisa a reação entre a glutatona reduzida (GSH) e diversos componentes eletrofílicos. A metabolização de xenobióticos, como as toxinas carcinogênicas hepáticas, por conjugação com a glutatona reduzida (GSH), também é realizada pela glutatona transferase (GTx) (KELNER & BAGNELL, 1990). Está presente nas células hepáticas e detoxifica o fígado da glutatona oxidada (GSSG) quando este órgão sofre dano oxidativo, além de eliminar as drogas e componentes endógenos, incluindo prostaglandinas, leucotrienos e hidroperóxidos orgânicos (TUÑON et. al., 1992).

Por ser um mecanismo complexo e apresentar inúmeras enzimas envolvidas, a decomposição do  $H_2O_2$  pode ser realizada também por outras enzimas. Um resumo das reações que ocorrem na redução do  $H_2O_2$  pode ser melhor identificado na **Figura 7**.



**FIGURA 7:** Decomposição do super e atuação enzimática. GPx= glutatona peroxidase, GRd= glutatona redutase. (MARKS et. al., 1996).



2º) Proteínas que diminuem a eficácia de pró-oxidantes como os íons ferro e cobre, como as transferrinas e proteínas que oxidam íons ferrosos como a ceruplasmina.

3º) Proteínas que protegem biomoléculas contra danos, inclusive aqueles oxidativos, causados por outros mecanismos como proteínas de choque térmico.

4º) Agentes de baixo peso molecular que são *scavengers*. Como exemplo temos os carotenóides, bioflavonóides, indóis, catecóis (MURPHY & SIES, 1991), glutathiona,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (vitamina A), bilirrubina, ácido ascórbico (vitamina C) e ácido úrico (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

## 1.5 - ESTRESSE OXIDATIVO NO DIABETES MELLITUS

O termo estresse oxidativo é definido quando há uma alteração no balanço pró-oxidante e antioxidante. Poderia ser também definido como “uma medida nos níveis de espécies ativas de oxigênio (AEO) no sistema biológico” (PACKER, et. al., 2000). Essa definição pode ser completada quando relacionamos a formação e o consumo de espécies ativas de oxigênio. Como os metabólitos produzidos pelas EAO se estabelecem em diversos locais subcelulares, tipos de células, estágios de crescimento e desenvolvimento celular e regiões dentro da mesma célula, fica difícil dar um conceito sobre o estresse oxidativo.

Hoje em dia, há forte evidência científica de que existe formação de inúmeros marcadores de estresse oxidativo e que estes estão aumentados no DM. Em estudo realizado com pacientes diabéticos, foi demonstrado que a concentração de hidroperóxidos lipídicos, isoprostanos, malondialdeído e lipoproteínas oxidadas plasmáticas estava elevada quando comparada à observada em pessoas sem DM (NOUROOZ-ZADEH et. al.,1995;BELLOMO et. al.,1991).

Os níveis intracelulares dos antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol e a glutathiona estão reduzidos no DM, entretanto a atividade enzimática dos antioxidantes parece estar levemente aumentada

(NOUROOZ-ZADEH et. al.,1997; BELLOMO et. al.,1997). Similarmente, existem muitos estudos sobre as conseqüências do balanço pró-oxidantes e antioxidantes que atuam nas células e a importância deste mecanismo no desenvolvimento das complicações vasculares.

A hipótese de que a modificação das lipoproteínas de baixa densidade presentes no sangue, por meio de sua oxidação ou glicosilação e a reação citotóxica que esta determina nas células endoteliais é sustentada por diversos autores como sendo o mecanismo responsável pelo estresse oxidativo (STEIMBERG et. al., 1989).

As alterações bioquímicas que ocorrem durante o estresse oxidativo servem para melhorar o entendimento sobre o processo fisiopatológico, mas é muito difícil de obter a mensuração destas alterações *in vivo*. Uma das alternativas para a determinação do estresse oxidativo é a mensuração de seus produtos em fluidos biológicos ou das provenientes da peroxidação dos lipídios da membrana celular (lipoperoxidação), modificação do DNA, destruição das proteínas e pela depleção dos agentes antioxidantes (NOUROOZ-ZADEH, 2000).

Um aumento na lipoperoxidação em pacientes com DM pode ser determinado usando a técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (VELAZQUES et. al., 1991), mas ainda não está determinado se esse método pode ser realmente associado com as alterações causada pelo estresse oxidativo (NOUROOZ-ZADEH, 2000).

## **1.6 – ALTERAÇÕES VASCULARES NO DM**

A circulação sangüínea do trato gastrintestinal é responsável pelo aporte de nutrientes para o organismo. A circulação específica de cada órgão desse trato é responsável pela nutrição daquela região, incluindo-se a manutenção de uma adequada oxigenação.

Auto-regulação é o termo usado para descrever a habilidade intrínseca de um órgão para manter um fluxo sangüíneo relativamente constante face às flutuações de pressão arterial (JOHNSON, 1964).

O fluxo sanguíneo está bem definido para as regiões esplâncnicas; intestino delgado (JOHNSON, 1960); estômago (JACOBSON et. al., 1962); fígado (HANSON & JOHNSON, 1966) e cólon (HANSON & JOHNSON, 1967).

As complicações vasculares representam a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos e ocorrem na micro e macrovasculatura. As doenças cardiovasculares são as principais causas da mortalidade em pacientes diabéticos (STAMLER et. al., 1993), sendo responsáveis pelo infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, que ocorre em 80% de todas as mortes em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (SHARPE et. al., 1998).

A hiperglicemia determina inúmeras alterações na vasculatura ou em células neuronais nos modelos experimentais ou em pacientes diabéticos. A natureza destas alterações é múltipla, mas a elevação da glicose sanguínea e diversos metabólitos desconhecidos podem ser os responsáveis pela alteração celular. O principal desafio está em identificar as alterações bioquímicas induzidas pela hiperglicemia e determinar o que realmente causa disfunção vascular (BURSELL & KING, 2000).

Múltiplas teorias têm sido propostas para explicar a patogênese das várias complicações envolvendo a retina, o glomérulo, os nervos periféricos e componentes do sistema cardiovascular (BURSELL & KING, 2000).

A injúria vascular produzida pelo DM não é simplesmente causada pela hiperglicemia. Recentes estudos sobre a aterosclerose experimental sustentam que a hiperglicemia acelera a aterosclerose em determinado grupo de animais, mas não em outros (KUNJATHOOR et. al., 1996).

A doença vascular diabética também não se apresenta de forma única, pois as variações fenotípicas vistas na prática clínica provavelmente refletem as interações entre o desarranjo metabólico (hiperglicemia, resistência à insulina, insulina circulante, elevado número de ácidos graxos), dieta, variação individual dos genes, controle do metabolismo lipídico, biologia da parede vascular e as modificações das lipoproteínas sanguíneas (SEMENKOVICH & HEINECKE, 1997).

Como a vasculopatia no DM é multifatorial, diversos estudos sugerem que a hiperglicemia pode ser a responsável pela produção das espécies ativas de oxigênio (EAO). A hiperglicemia pode

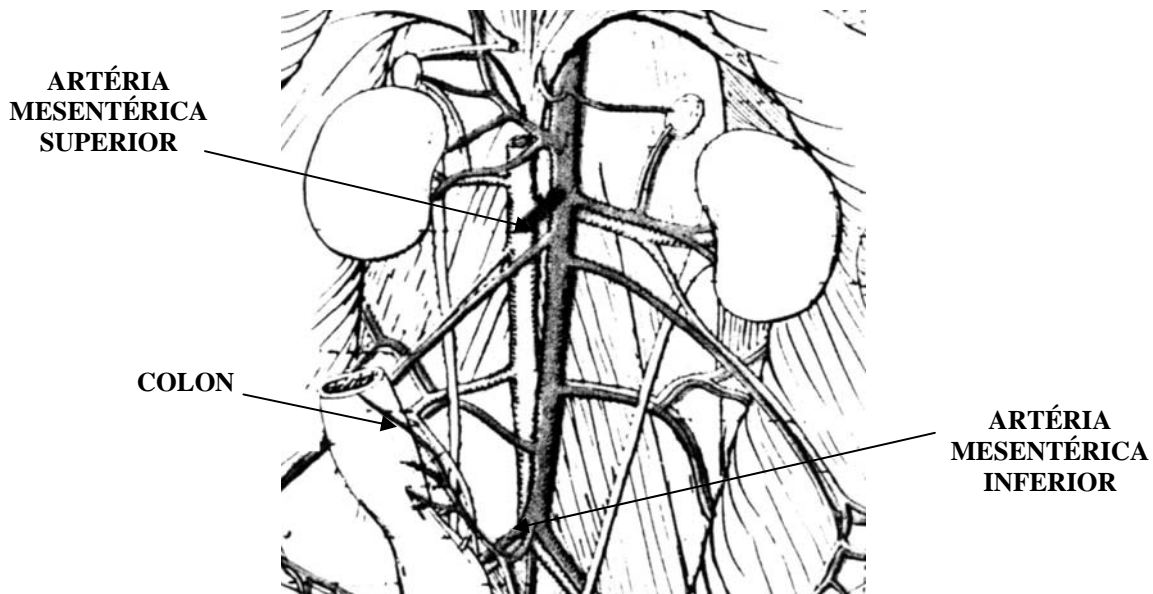
aumentar a geração das EAO pela autoxidação da glicose, ativação da proteína quinase C e pelo aumento do metabolismo na via dos polióis, causando uma pseudohipóxia (WILLIAMSON et. al., 1993).

A alteração vascular existente nos nervos periféricos pode ser causada pelo *déficit* na perfusão da região do endoneurium do nervo periférico, que está diminuído em aproximadamente 50% e leva a uma isquemia na região e, conseqüentemente, a uma redução do fluxo arteriovenoso e da nutrição. Segundo estudos experimentais (TUCK et. al., 1984), essa isquemia ocorre em uma semana, o mesmo acontecendo com pacientes diabéticos (NEWRICK et. al., 1986).

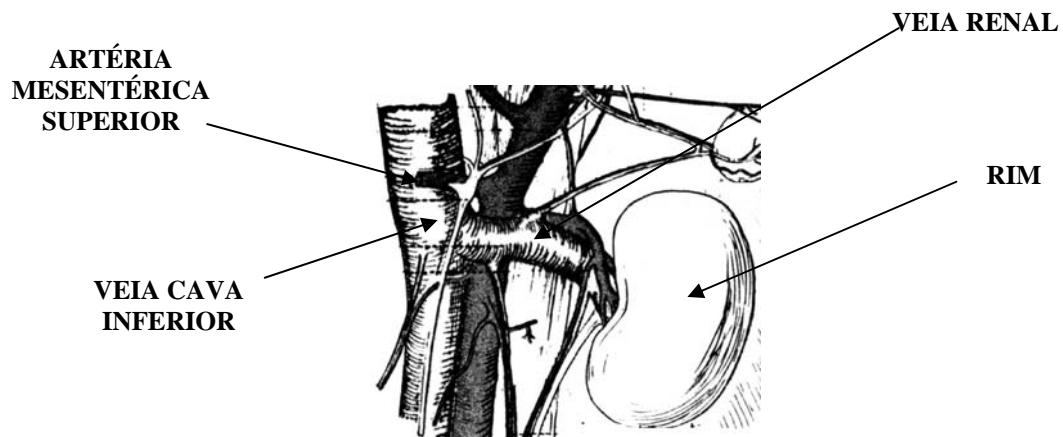
Anormalidades na hemodinâmica têm sido bem documentadas na nefropatia diabética. Elevadas taxas de filtração glomerular e um aumento no fluxo sanguíneo renal são características encontradas em pacientes com diabetes mellitus insulino-dependentes e em modelos experimentais (BURSELL & KING, 2000). O fator responsável por isso pode estar relacionado ao aumento da atividade do óxido nítrico nos vasos de pequeno calibre, característica dos vasos renais.

A intensificação de pesquisas para desvendar as alterações do fluxo sanguíneo em diversas patologias levou a uma popularização da técnica de medida ultra-sônica de fluxo sanguíneo. A vantagem desta técnica é que a sonda não é dependente do diâmetro, como na técnica da fluxometria por laser Doppler. A sonda é de fácil colocação e com o encapsulamento dele ao redor do vaso a ser medido, o que melhora a qualidade do sinal. Assim, o fluxo pode ser estudado por um período bastante grande. O desenvolvimento desta técnica levou à produção de pequenas sondas para o estudo em pequenos animais, em que a mensuração da artéria gástrica, artéria renal e artéria mesentérica superior pode ser realizada (MYERS et. al., 1992).

Um melhor esclarecimento sobre a localização da artéria mesentérica superior pode ser obtido com a observação das **Figuras 8 e 9**.



**FIGURA 8:** Desenho do esquema da artéria mesentérica superior e inferior e relação anatômica com o intestino.



**FIGURA 9:** Desenho do esquema da artéria mesentérica superior e relação anatômica com a veia cava inferior.

Neste estudo foi utilizada a mensuração do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior segundo a técnica desenvolvida por D'Almeida e colaboradores (1995), na qual a validação da sonda para a artéria mesentérica superior foi realizada. A escolha dessa artéria foi preferida porque possui grande importância para a nutrição do intestino delgado, e juntamente com a artéria mesentérica inferior, é um dos ramos que participa do suprimento sanguíneo para o intestino (GANONG, 1995).

Tendo em vista essas considerações, este trabalho se propõe a avaliar as alterações gastrintestinais e do fluxo sanguíneo nestes animais, a partir do modelo experimental de diabetes mellitus em ratos.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- OBJETIVO GERAL

Estabelecer as alterações gastrointestinais no modelo experimental de diabetes mellitus em diferentes tempos dessa doença, bem como caracterizar o estresse oxidativo e as enzimas antioxidantes.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os índices de glicemia de ratos-controle e ratos diabéticos em diferentes períodos de DM.
- Avaliar a lipoperoxidação em estômago e fígado de ratos-controle e diabéticos através das técnicas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e de quimiluminescência (QL).
- Avaliar as enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e glutathione transferase (GTx) no estômago e fígado de animais controles e animais diabéticos em diferentes períodos.
- Avaliar o fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior dos ratos como indicativo de alteração vascular.

## 3- MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 - ANIMAIS

Na realização deste trabalho foram utilizados ratos machos, Wistar, com peso variando entre 250 e 350 gramas, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

Os animais foram agrupados (5 animais por caixa) em caixas plásticas medindo 27x26x31 cm, com assoalho contendo maravalha e mantidos em ambiente com temperatura controlada (22° - 24° C). A luminosidade foi controlada em ciclo de 12 horas com luz e 12 horas de escuridão (ciclo claro-escuro). Receberam água e ração (Moinhos Purina, Porto Alegre - RS) *ad libitum*, e a dieta foi normoprotéica (12% de proteínas).

Todos os procedimentos realizados no presente trabalho estão de acordo com as normas contidas na "Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais", estabelecidas pela comissão de pesquisa e ética em saúde, de autoria do grupo de pesquisa e pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. (GOLDIM e RAYMUNDO, 1997).

### 3.2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 4 grupos de animais. Em cada um havia animais-controle (CO) e animais diabéticos (DM). O determinante na divisão dos grupos foi o tempo de indução do diabetes por estreptozotocina (STZ).



**GRUPO 1 - Animais que foram mantidos por 7 dias após a indução do diabetes.**

7 CO - Animais que receberam somente tampão citrato intraperitoneal

7 DM - Animais que receberam STZ intraperitoneal.

**GRUPO 2 - Animais que foram mantidos por 30 dias após a indução do diabetes.**

30 CO - - Animais que receberam somente tampão citrato intraperitoneal

30 DM - Animais que receberam STZ intraperitoneal.

**GRUPO 3 - Animais que foram mantidos por 60 dias após a indução do diabetes.**

60 CO - - Animais que receberam somente tampão citrato intraperitoneal

60 DM - Animais que receberam STZ intraperitoneal.

**GRUPO 4 - Animais que foram mantidos por 90 dias após a indução do diabetes.**

90 CO - - Animais que receberam somente tampão citrato intraperitoneal

90 DM - Animais que receberam STZ intraperitoneal.

### **3.3 - INDUÇÃO DO DIABETES**

O diabetes mellitus foi induzido por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina - STZ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) 70 mg/Kg. (TAKEUCHI et. al., 1994).

A estreptozotocina foi dissolvida em tampão citrato de sódio (0,01 M, pH 4,5) e injetada cerca de 10 minutos após a diluição dessa substância. Os animais-controle receberam intraperitonealmente somente o mesmo volume de tampão citrato de sódio.

### 3.4 - REAGENTES

Nos experimentos realizados foram utilizados diversos reagentes, os quais estão listados na **Tabela 2**. Nela também estão citados os pesos moleculares de cada um desses reagentes ou de seu equivalente e dos seus fornecedores.

**TABELA 2.** REAGENTES E RESPECTIVOS PESOS MOLECULARES OU QUANTIDADES EQUIVALENTES E FORNECEDORES

<i>REAGENTES</i>	<i>PESO</i>	<i>FORNECEDOR</i>
Ácido Cítrico	210,14	SYNTH
Ácido Metafosfórico	79,98	VETEC
Ácido Tiobarbitúrico	144,10	SIGMA
Ácido Tricloroacético	163,39	MERCK
Albumina	> 95 %	SIGMA
Azida Sódica	65,12	SYNTH
Butanol	74,12	SYNTH
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	147,02	QUIMIBRAS
CH <sub>3</sub> CHOH	74,12	REAGEN
Cianeto de Potássio	65,12	SYNTH
Citrato de Sódio	294,11	NUCLEAR
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	249,69	BERZOG
Estreptozotocina	265,2	SIGMA
Ferricianeto de Potássio	329,18	MERCK
Fluoreto de Fenilmetilsulfonila	174,2	SIGMA
Glutationa Redutase	200 units/mg prot	SIGMA
Glutationa Reduzida	307,3 units/mg prot	SIGMA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34,01	MERCK
HCl concentrado	36,50	USINA COMBINA
KCl	74,50	ECIBRA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	LABSYNTH
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	282,23	BERZOG
MgSO <sub>4</sub>	120,00	INLAB
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	268,07	REAGEN
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	177,99	MERCK
NaCl	58,45	ECIBRA
NADPH	833,4	SIGMA
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	138,00	REAGEN
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	ECIBRA
NaOH	40,00	MERCK

### **3.5 - OBTENÇÃO DO PLASMA E DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA**

O sangue foi retirado do animal através do seio orbital e colocado num tubo de ensaio com heparina (Liquemine<sup>®</sup>), para evitar a coagulação. Após realizou-se a centrifugação do material em centrífuga com 4.000 rpm pelo tempo de 10 minutos. O precipitado foi desprezado, e o plasma retirado com pipeta (Labsystems 4500, 200-100 µl) para ser congelado em freezer à temperatura de -70° C para posterior determinação dos índices de glicemia.

Para determinação da glicemia foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit ENZI-COLOR, Bio Diagnóstica), no qual um reagente era misturado a 20 µl de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 500 nm. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentavam a concentração de glicose sanguínea acima de 250 mg/dL. (PACKER et. al., 2000).

### **3.6 - PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS DE ESTÔMAGO E FÍGADO**

No dia seguinte após o tratamento utilizado em cada grupo, foram retirados os estômagos e os fígados dos animais. No homogeneizado de estômago, foram colocados 9 mL de tampão fosfato (KCL 140 mM, fosfato 20 mM pH 7,4) por grama de tecido. Acrescentou-se ao homogeneizado fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) na concentração de 100 nM em isopropanol e na quantidade de 10 µL para cada mL de tampão adicionado. Foi utilizado o PMSF, um inibidor de proteases, para que não houvesse degradação das enzimas posteriormente medidas. Os órgãos foram homogeneizados em Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante um minuto para estômago e 40 segundos para o fígado, à temperatura de 0 a 2° C. Esse homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) por 10 min a 3000 rpm (1.110 x g). O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado, congelado em freezer em temperatura de -70° C para posteriormente, ser usado para as dosagens.

### **3.7 - MEDIDA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ACIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS)**

A técnica de TBA-RS consiste no aquecimento do homogeneizado com ácido tiobarbitúrico e na conseqüente formação de um produto corado, medido em espectrofotômetro a 535 nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondealdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 0,25 mL do homogeneizado, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e ), 25 mL de água destilada. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA tem a função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio da reação. A seguir agitou-se cada tubo e eles foram aquecidos a uma temperatura de 100 ° C. Após, os tubos foram resfriados e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Eles foram então colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último o produto corado foi retirado e lido em espectrofotômetro (CARY 3E - UV - Visible Spectrophotometer Varian ) com um comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBA-RS obtida foi expressa em nmol por mg de proteína ( BUEGE & AUST, 1978).

### **3.8 - DETERMINAÇÃO DA QUIMILUMINESCÊNCIA (QL) INICIADA POR HIDROPERÓXIDO DE *TERT-BUTILA***

O método para determinar a quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butila consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de *tert-butila*) ao homogeneizado de tecido em estudo. Avalia-se a capacidade de resposta mediante a determinação de quimiluminescência (QL) produzida pela amostra. Em tecidos submetidos a estresse oxidativo, o valor da QL iniciada por hidroperóxido de *tert-butila* (t-BOOH) é maior que o valor correspondente a esse tecido em condições fisiológicas (pré-estresse).

A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado e utilizado o canal de trítio (Liquid Scintillation Correnter, 1209 RACKBETA, LKB WALLAR) operando como um luminômetro. Adicionou-se 3,5 mL de tampão fosfato em vials de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos vials ativada pela luz fluorescente, eles foram protegidos da luz até o momento do uso e os dados foram medidos em sala escura. Realizou-se apenas a leitura dos vials com o tampão (QL Basal). Após, adicionou-se 0,5 mL de homogeneizado de tecido e fez-se a leitura, que corresponde a QL espontânea. Após, foi adicionado o hidroperóxido de *tert-butila* que aumenta a QL (QL máxima). A reação total consistiu de uma solução reguladora de tampão fosfato e de t-BOOH 3 mM.

Para o cálculo de QL iniciada por t-BOOH, foi considerada a emissão máxima (QL máxima), descontada a emissão da QL espontânea (a QL do vial contendo o tampão e a amostra). Os resultados foram expressos em contagem por segundo (cps) por mg de proteína (GONZALEZ-FLECHA et al., 1991).

### **3.9 - ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE**

A atividade da enzima antioxidante catalase é avaliada pela determinação, em espectrofotômetro, da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  0,3 M) adicionado à amostra. A decomposição de peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem, sendo sua constante de velocidade ( $K'$ ) calculada experimentalmente e igual a  $K'=K \times [CAT]$ . Nela K corresponde à constante específica da reação e tem valor de  $4,6 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ . Colocou-se 955  $\mu$ L de tampão fosfato 50mM (pH 7,0), 10  $\mu$ L de homogeneizado de tecido em cubeta de quartzo de 1 mL e estabilizou-se o aparelho contra um branco de tampão fosfato 50 mM. A quantidade de tampão para o fígado foi a 955 $\mu$ L e 10 $\mu$ L de amostra. Para o estômago a proporção de amostra ou de tampão variou de acordo com o traçado alcançado durante a leitura, contudo o volume final sempre foi de 1mL. A seguir adicionou-se 35  $\mu$ L de  $H_2O_2$  (0,3 M) e fez-

se a leitura da velocidade inicial da decomposição do  $H_2O_2$  com um comprimento de onda de 240 nm. A atividade enzimática foi expressa em nmol por mg de proteína (BOVERIS & CHANCE, 1973).

### **3.10 - ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) PELO SISTEMA DE DETECÇÃO ADRENALINA-ADRENOCROMO**

A determinação da enzima SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido através do sistema de detecção. Como não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adenocromo, detectado através do espectrofotômetro. A atividade da SOD foi determinada medindo a velocidade de formação do adenocromo em um meio de reação contendo tampão glicina (50mM, pH 10) e adrenalina (60 mM). (BOVERIS et. al., 1983). Adicionou-se 1mL de tampão glicina (50 mM pH 10) em cubeta de quartzo e zerou-se o aparelho. Após foi colocado 17  $\mu$ L de adrenalina (60 mM pH 2,0) e iniciou-se a leitura da amostra com aparelho apresentando um comprimento de onda de 480 nm (a).

Para cada amostra medida repetiram-se os seguintes passos:

1. Colocou-se 950  $\mu$ L de tampão junto com 50  $\mu$ L de amostra e 17  $\mu$ L de adrenalina, após o aparelho ser zerado.
2. Introduziu-se 975  $\mu$ L de tampão junto com 25  $\mu$ L de amostra e 17  $\mu$ L de adrenalina, após o aparelho ser zerado.
3. Acrescentou-se 990  $\mu$ L de tampão junto com 10  $\mu$ L de amostra. Com os 17  $\mu$ L de adrenalina procedeu-se da mesma forma que os itens anteriores.

Todas essas medidas, anteriormente citadas correspondem ao (b). Ao valor de (a) somente corresponde a leitura até ser zerado o aparelho

As inclinações das retas obtidas foram anotadas e calculado o logaritmo de b/a para cada amostra. A partir do gráfico, calculou-se quantos microlitros correspondem a uma inibição de 50% (b/a= 0,5). Os resultados foram expressos em unidades de SOD por mg de proteína.

### **3.11 - ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GTx)**

A atividade da enzima glutathione S-transferase (GTx) foi quantificada no estômago e no fígado dos animais diabéticos e também nos animais-controle nos diferentes tempos estudados. A análise foi realizada com homogeneizado de estômago e de fígado adicionado em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,5, 20 mM de glutathione reduzida e 20 mM de 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno. A formação da 2,4-dinitrofenil-S-glutathione pela GTx foi avaliada em espectrofotômetro (marca Varian, modelo Cary) com comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína (MANNERVIK & GUTHENBERG, 1981).

### **3.12 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

A concentração de proteínas dos homogeneizados de estômago e fígado foi determinada utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1 mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 µL). Colocava-se uma alíquota de plasma ou do homogeneizado (20µL) em 780 µL de água destilada e 2,0 mL do reativo C que era preparado com 50 mL de NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mL do reativo B<sub>1</sub> (CuSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O 1%) e 0,5 mL do reativo B<sub>2</sub> (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, aguardava-se 10 min e colocava-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após 30min, aparecia a coloração azul, que era medida em espectrofotômetro a 625 nm (LOWRY et al., 1951).

### **3.13 - AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGÜÍNEO NA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR**

Para avaliação do fluxo sangüíneo na artéria mesentérica superior os animais foram anestesiados com cloridrato de Ketamina (Ketalar®) e cloridrato 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum®), numa proporção de 180 mg/Kg de Ketalar® para 50 mg/Kg de Rompum®. A profundidade da anestesia era controlada pelos reflexos plantares e oculopalpebrais quando se realizava algum tipo de pressão na região das patas dos animais.

Os animais foram colocados em decúbito dorsal e permaneceram sob ventilação espontânea, respirando normalmente. Foi realizada uma laparotomia exploradora para exteriorização do estômago e da artéria a ser estudada.

As vísceras foram mantidas umedecidas com soro fisiológico. Uma vez localizada a artéria mesentérica superior, procedia-se à colocação do sensor para medir o fluxo sangüíneo. O fluxo na artéria mesentérica superior foi avaliado pelo fluxômetro ultra-sônico (Transonic System Inc. modelo T106) conectado a um conversor analógico-digital (STEMTECH, INC) e esse a um computador (PC 486) com o software (CODAS/WINDAQ), permitindo a análise de dados numa frequência de 1KHz.

Após a exposição da artéria mesentérica superior, a sonda foi colocada sobre a artéria. A colocação foi feita manualmente e ela ficou sustentada até o final do experimento por uma base fixa. Aplicou-se um gel para melhorar a aquisição do sinal, também foi realizada a calibração do aparelho.

#### **Figura 10.**

O tempo de gravação do sinal foi de 10 minutos a partir da estabilização dele. Em seguida, foi retirada a sonda e retirado os órgãos (estômago e fígado) para a realização do homogeneizado.



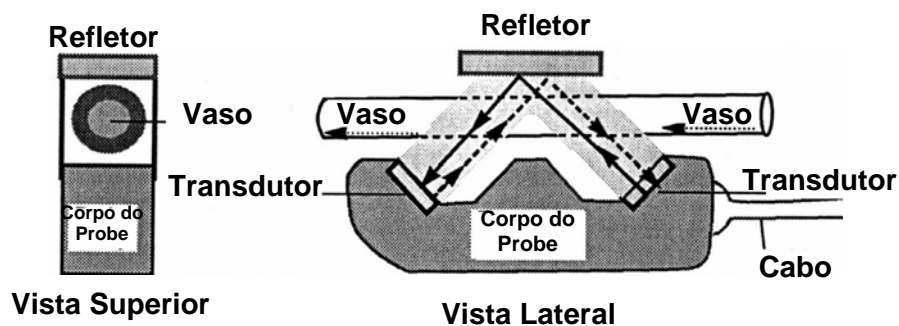


**FIGURA 10:** Aquisição do fluxo sanguíneo do animal vista de cima.

### 3.14 - CARACTERÍSTICA DO FLUXÔMETRO

O aparelho *Transonic® Animal Research Flowmeter* (T106) é constituído por uma unidade para detecção eletrônica do fluxo. Serve também para aumentar a frequência de resolução. O princípio ultrassônico é que o aparelho é sensível ao volume presente no vaso sanguíneo, independente da turbulência, do hematócrito ou de seu tamanho.

A sonda é composta por dois transdutores ultra-sônicos e por um refletor acústico. Os transdutores são posicionados em um dos lados do vaso sanguíneo, e o refletor está posicionado entre os dois transdutores. Uma melhor elucidação pode ser obtida com a observação da **Figura 11**.



**FIGURA 11:** Representação dos transdutores e do refletor. (Transonic Systems Inc, 1997).

### 3.15 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a determinação de todos os parâmetros experimentais, os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para cada grupo experimental.

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad InStat, versão 3.0 para Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Na avaliação paramétrica e não paramétrica dos dados foi utilizado o método de Bartlett. A avaliação da normalidade (Distribuição Gaussiana) dos dados foi realizada com o emprego do método de Kolmogorov e Smirnov.

Para os dados não pareados utilizou-se a análise da variância simples (ANOVA), a fim de comparar as diferenças observadas em cada parâmetro estudado. Foi aplicado também o teste complementar de Tukey-Kramer para comparações múltiplas.

Ao se afirmar no texto que existe diferença estatisticamente significativa entre as variáveis estudadas, utilizou-se o nível de significância de cada uma delas de, pelo menos, 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 - RESULTADOS

A apresentação dos resultados segue a seguinte ordem:

1º) Determinação do peso dos animais diabéticos e dos animais-controle, nos diferentes grupos, antes da indução do DM e no dia do sacrifício.

2º) Determinação dos níveis de glicemia nos animais diabéticos e nos controles nos diferentes grupos antes da indução do DM e no dia do sacrifício.

3º) Medida da lipoperoxidação do estômago pelo uso de técnicas de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL).

4º) Quantificação das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione transferase (GTx) presentes no estômago dos animais-controle e nos diabéticos.

5º) Medida da lipoperoxidação do fígado pelo uso de técnicas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL).

6º) Quantificação das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione transferase (GTx) presentes no fígado dos animais-controle e nos diabéticos.

7º) Mensuração do fluxo sanguíneo presente na artéria mesentérica superior dos animais-controle e diabéticos.

Os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos nos diferentes grupos experimentais e nos diferentes tempos de indução do diabetes mellitus.

A partir da análise do peso corporal, utilizamos somente um grupo-controle (7 animais) para todas as variáveis estudadas, pois no momento do sacrifício não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais nos diferentes tempos de diabetes.

Na **tabela 3** estão expressos os pesos dos animais, estes estão divididos em controle e diabéticos no momento da indução do DM, antes do início do experimento.

Notamos que não havia diferença significativa no que diz respeito ao peso entre os animais que iriam compor os diferentes grupos a serem estudados.

**TABELA 3** - Peso dos animais no momento da indução do diabetes (T0).

<b>Grupo</b>	<b>Controle (g)</b>	<b>Diabético (g)</b>
Tempo 7 (7)	329 ± 9,2	310 ± 10,7
Tempo 30 (7)	315 ± 5,1	293 ± 4,5
Tempo 60 (7)	320 ± 14,9	305 ± 16,5
Tempo 90 (7)	340 ± 9,3	302 ± 12,5

Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM).

Os valores entre parênteses indicam o número de animais que compunham cada grupo ( ).

Não houve diferença significativa entre os grupos no momento da indução do diabetes. (NS)

A **tabela 4** e a **figura 12** nos apresentam os pesos dos referidos animais no momento do sacrifício. Notamos uma diminuição significativa nos pesos dos animais diabéticos em todos os momentos estudados, tendo um  $p < 0,001$ .

**TABELA 4-** Peso dos animais no momento do sacrifício nos diferentes grupos estudados.

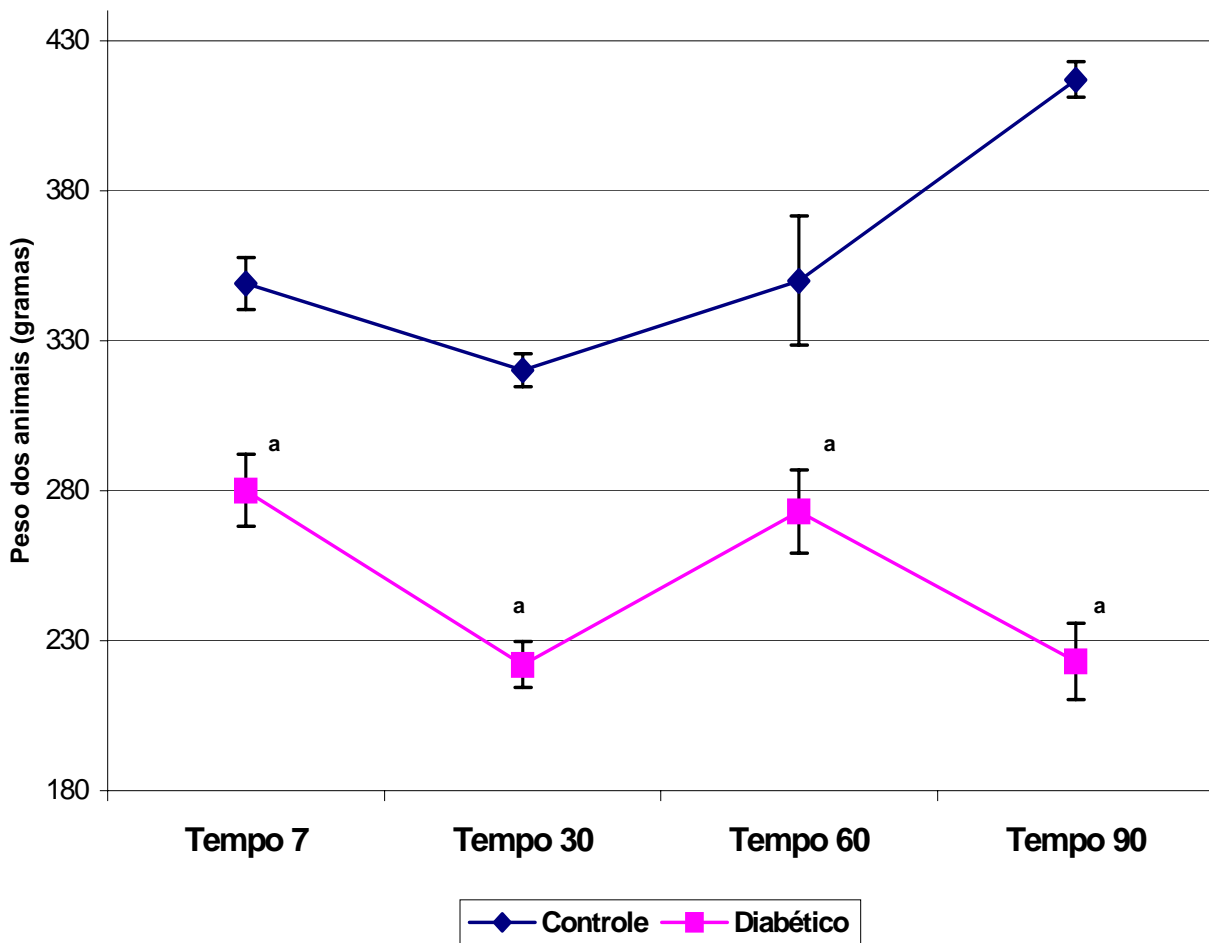
<b>Grupo</b>	<b>Controle (g)</b>	<b>Diabético (g)</b>
Tempo 7 (7)	349 ± 8,8	280 ± 12,0 <sup>a</sup>
Tempo 30 (7)	320 ± 5,5	222 ± 7,6 <sup>a</sup>
Tempo 60 (7)	350 ± 21,4	273 ± 13,9 <sup>a</sup>
Tempo 90 (7)	417 ± 6,0	223 ± 12,8 <sup>a</sup>

Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM).

Os valores entre parênteses indicam o número de animais existentes em cada grupo ( ).

As notações da letra sobrescrita apresentam a seguinte significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ )



**Figura 12:** Peso dos animais diabéticos e controle no dia do sacrifício. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Fez-se uso de notações de significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético e o grupo controle ( $p < 0,001$ ).

Na **tabela 5** e **figura 13** estão expressos em mg/dL as glicemias dos animais em diferentes tempos de diabetes. Nota-se que no tempo zero (T0) não há diferença significativa entre os grupos e os animais diabéticos apresentam um aumento na glicemia, sendo este aumento significativo em todos os tempos estudados, sendo  $p < 0,001$ .

**TABELA 5-** Glicemia dos animais controle e diabéticos no momento da indução do diabetes (T0) e no momento do sacrifício.

<b>Grupo</b>	<b>GLICEMIA T0 (mg/dL)</b>	<b>GLICEMIA SACRIFÍCIO (mg/dL)</b>
Controle (7)	120 ± 4,4	126 ± 1,9
Diabético 7 (7)	123 ± 3,6	328 ± 7,6 <sup>a</sup>
Diabético 30 (7)	118 ± 2,8	387 ± 9,3 <sup>a</sup>
Diabético 60 (7)	117 ± 3,2	406 ± 24,8 <sup>a</sup>
Diabético 90 (7)	117 ± 3,6	480 ± 34,8 <sup>a,b,c</sup>

Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM).

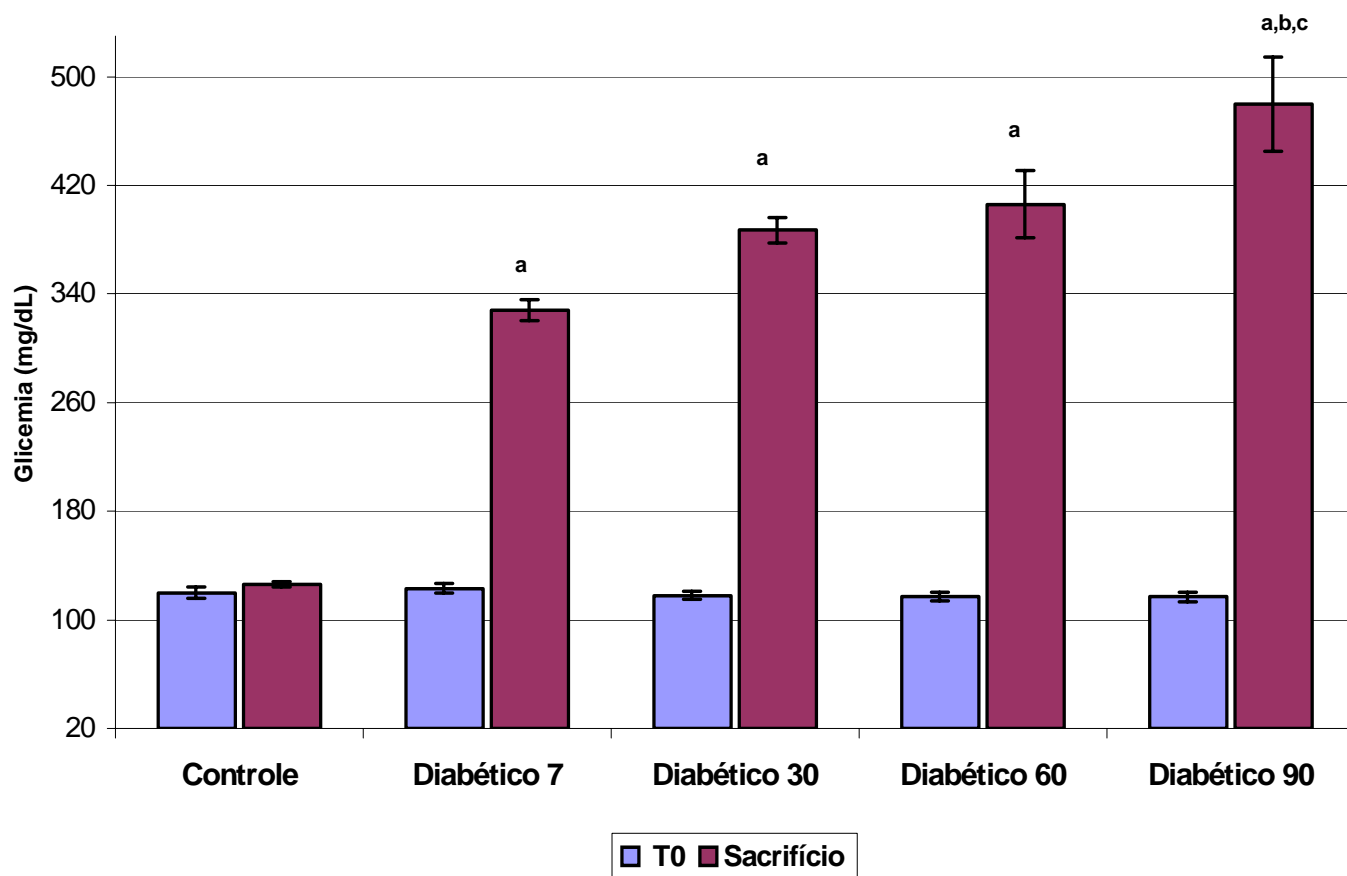
Os valores entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo ( ).

As notações da letra sobrescrita têm a seguinte significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre os grupos diabéticos 7, 30, 60 e 90 respectivamente e o grupo controle ( $p < 0,001$ ).

<sup>b</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o diabético 7 ( $p < 0,001$ ).

<sup>c</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o diabético 30 ( $p < 0,001$ ).



**Figura 13:** Glicemia dos animais diabéticos e controle no dia da indução do diabetes (T0) e no dia do sacrifício. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foram utilizadas algumas notações de significância:

- <sup>a</sup> - diferença significativa entre os grupos diabéticos 7, 30, 60 e 90 respectivamente e o grupo controle no dia do sacrifício ( $p < 0,001$ ).
- <sup>b</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o diabético 7 ( $p < 0,001$ ).
- <sup>c</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o diabético 30 ( $p < 0,001$ ).



## 4.1 - LIPOPEROXIDAÇÃO NO ESTÔMAGO

Na **tabela 6** e nas **figuras 14** e **15** estão expressos e representados os valores da lipoperoxidação nos estômagos dos animais do grupo controle e dos diabéticos em diferentes tempos de indução. Nota-se que os animais diabéticos com o tempo de 90 dias de DM apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle tanto na técnica de TBARS quanto na QL, sendo o  $p < 0,01$  e que o grupo diabético de 7 dias também mostrou diferença significativa em relação ao grupo diabético de 90 dias na técnica de QL, sendo um  $p < 0,05$ .

**TABELA 6-** Resultados da lipoperoxidação obtidos pelas técnicas do TBARS e QL no estômago dos animais controle e diabéticos nos diferentes grupos.

Grupo	TBA-RS (nmol/ mg proteína)	QL (cps/mg proteína)
Controle (7)	0,22 ± 0,02	247,2 ± 16,0
Diabético 7 (7)	0,24 ± 0,07	243,1 ± 21,8
Diabético 30 (7)	0,33 ± 0,09	345,8 ± 25,2
Diabético 60 (7)	0,20 ± 0,03	246,2 ± 12,2
Diabético 90 (7)	0,44 ± 0,02 <sup>a</sup>	391,2 ± 32,6 <sup>a,b</sup>

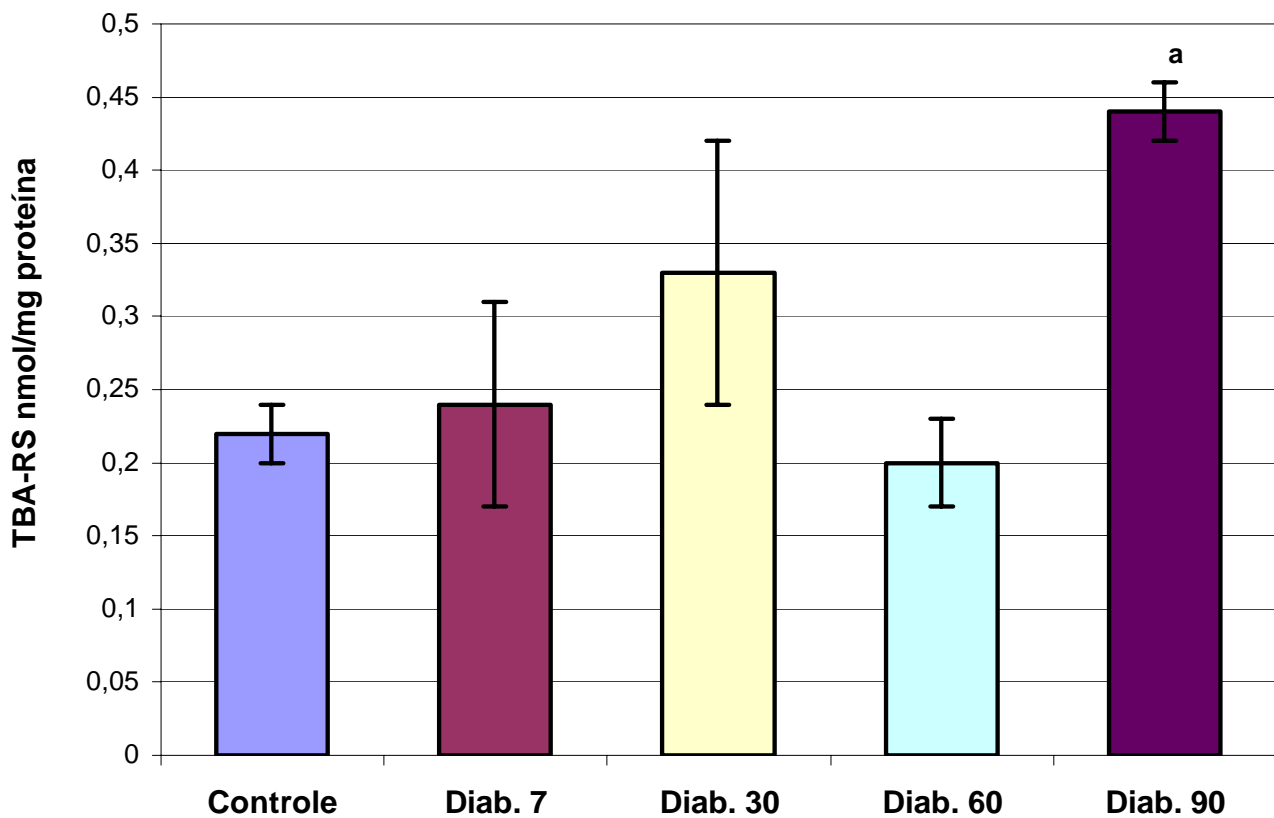
Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM).

Os valores entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo ( ).

As notações das letras sobrescritas têm o seguinte significado:

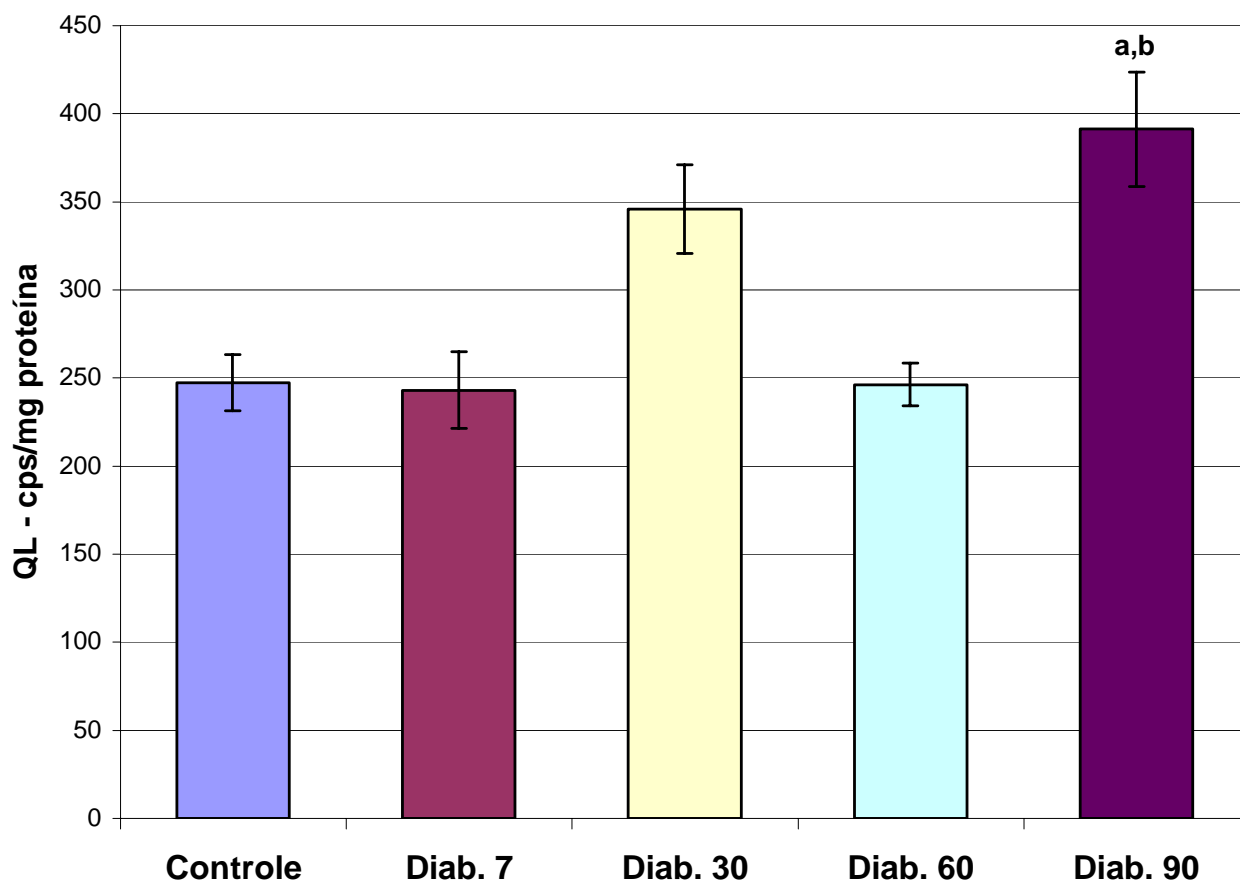
<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o grupo controle ( $p < 0,01$ ).

<sup>b</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o diabético 7 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14:** Resultado da medida de TBARS em estômago de animais controle e diabéticos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para obter esse dado foram utilizadas notações de significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o grupo controle ( $p < 0,01$ ).



**Figura 15:** Resultado da medida de QL em estômago de animais controle e diabéticos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para registro desse resultado foram usadas as seguintes notações de significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o grupo controle ( $p < 0,01$ ).

<sup>b</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o diabético 7 ( $p < 0,05$ ).

## 4. 2 - ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO ESTÔMAGO

Na **tabela 7** estão expressos os valores avaliados de todas as enzimas antioxidantes presentes no estômago de animais controles e nos diabéticos em diferentes tempos em estudo. Notamos uma redução nas quantidades de todas as enzimas quando comparadas às do grupo controle, mas somente com diferença significativa na enzima catalase dos animais diabéticos de 7, 60 e 90 dias de indução, sendo o  $p < 0,05$  e da enzima glutathione transferase aos 7 e 90 dias de diabetes, sendo o  $p < 0,05$ . **Figuras 16 e 17.**

**TABELA 7-** Resultados da quantificação das enzimas antioxidantes no estômago dos animais controle e dos diabéticos nos diferentes grupos.

<b>Grupo</b>	<b>CAT</b> (nmol.mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>SOD</b> (U/mg proteína)	<b>GTx</b> (nmol.mg proteína <sup>-1</sup> )
Controle (7)	110,0 ± 4,6	2,9 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Diabético 7 (7)	72,8 ± 5,6 <sup>a</sup>	2,05 ± 0,1	2,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
Diabético 30 (7)	87,7 ± 6,3	2,5 ± 0,4	2,6 ± 0,2
Diabético 60 (7)	83,4 ± 3,7 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,2	2,9 ± 0,2
Diabético 90 (7)	75,8 ± 3,4 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3	2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>

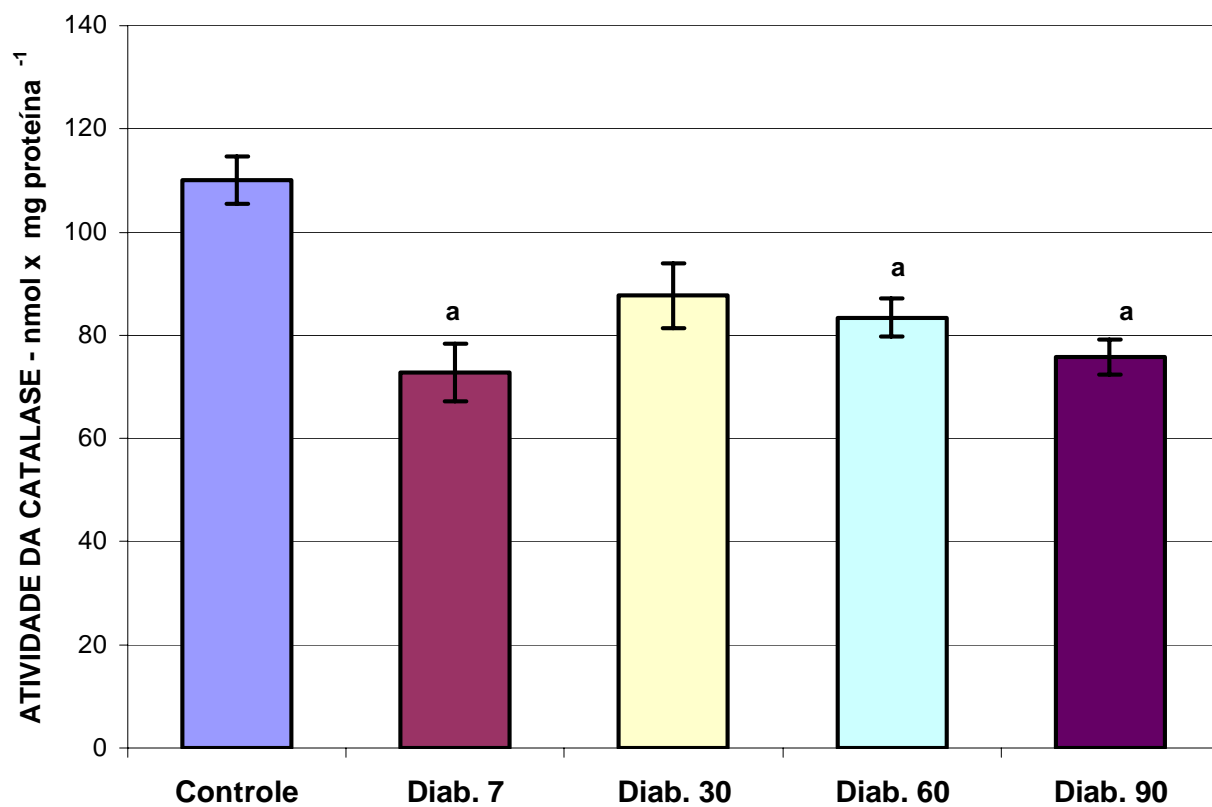
Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM).

Os valores entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo ( ).

As letras sobrescritas têm seguinte significado:

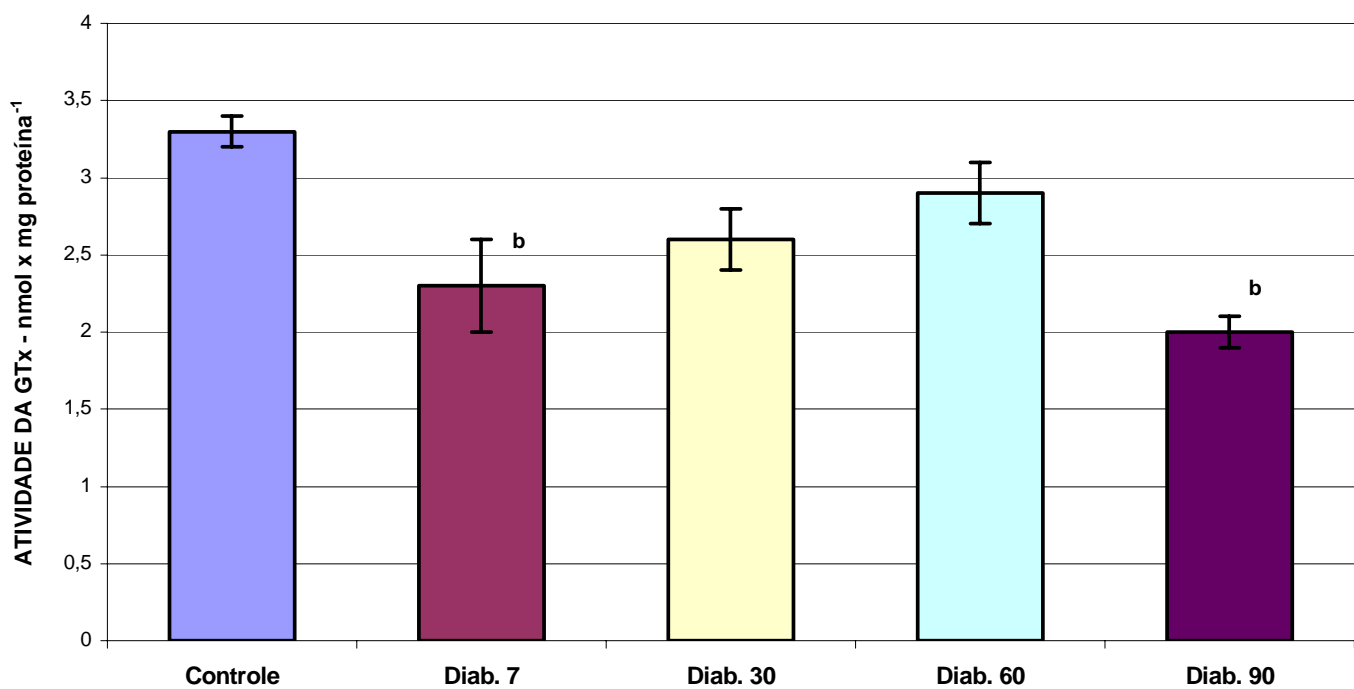
<sup>a</sup> - diferença significativa entre os grupos diabéticos 7, 60 e 90 respectivamente e o grupo controle na medida da enzima catalase ( $p < 0,05$ );

<sup>b</sup> - diferença significativa entre os grupos diabéticos 7 e 90 respectivamente e o grupo controle na medida da enzima glutathione transferase ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 16:** Medida da atividade da enzima catalase (CAT) em homogeneizado de estômago de animais controle e diabéticos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Utilizou-se notações de significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre os grupos diabéticos 7, 60 e 90 respectivamente e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17:** Medida da atividade da enzima glutathione transferase (GTx) em homogeneizado de estômago de animais controle e diabéticos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Utilizou-se notações de significância:

<sup>b</sup> - diferença significativa entre os grupos diabéticos 7 e 90 respectivamente e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 - LIPOPEROXIDAÇÃO NO FÍGADO

Na **tabela 8** e nas **figuras 18** e **19** estão expressos os valores da lipoperoxidação do fígado dos animais controles e diabéticos nos diferentes tempos de indução. Notou-se que a peroxidação lipídica dos animais diabéticos aos 90 dias tinha aumentado significativamente quando comparada à do grupo controle, tanto pela técnica de TBARS quanto por QL, sendo  $p < 0,001$ . Observa-se também que os animais diabéticos de 90 dias diferem dos outros tempos de indução, tempo 7, 30 e 60, sendo  $p < 0,01$  para TBARS e  $p < 0,001$  para QL.

**TABELA 8-** Resultados da lipoperoxidação obtidos pelas técnicas do TBARS e QL em fígado dos animais controle e diabéticos nos diferentes grupos.

<b>Grupo</b>	<b>TBA-RS</b> (nmol/ mg proteína)	<b>QL</b> (cps/mg proteína)
Controle (7)	1,51 ± 0,06	1669,1 ± 58,9
Diabético 7 (7)	1,34 ± 0,02	1892,2 ± 97,2
Diabético 30 (7)	1,46 ± 0,25	1567,6 ± 71,2
Diabético 60 (7)	1,13 ± 0,09	1538,6 ± 135,3
Diabético 90 (7)	2,45 ± 0,21 <sup>a,b</sup>	2660,8 ± 108,1 <sup>a,c</sup>

Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM).

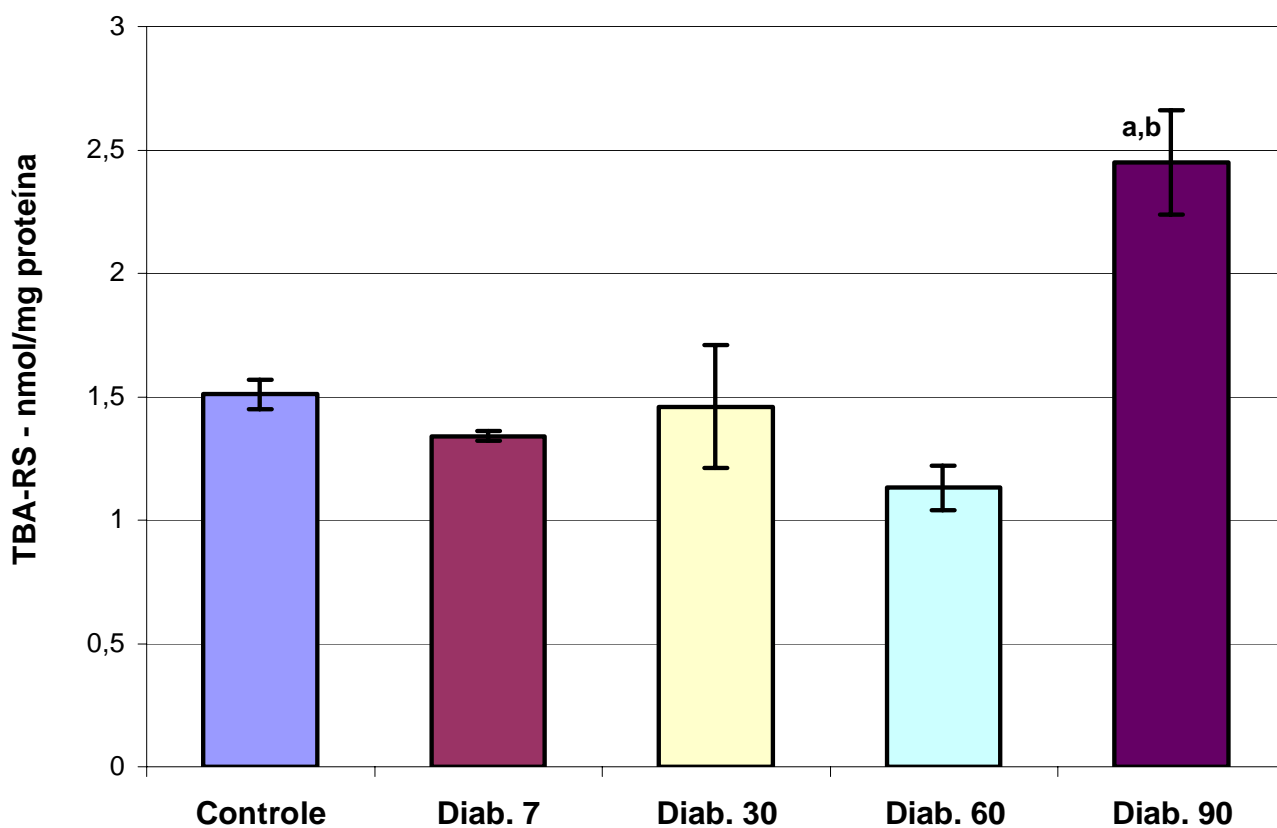
Os valores entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo ( ).

As notações da letra sobrescrita apresentam a seguinte significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o grupo controle ( $p < 0,001$ ).

<sup>b</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e os grupos diabéticos 7, 30 e 60 respectivamente na medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ( $p < 0,01$ ).

<sup>c</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o diabético 7, 30 e 60, respectivamente na medida da quimiluminescência ( $p < 0,001$ ).

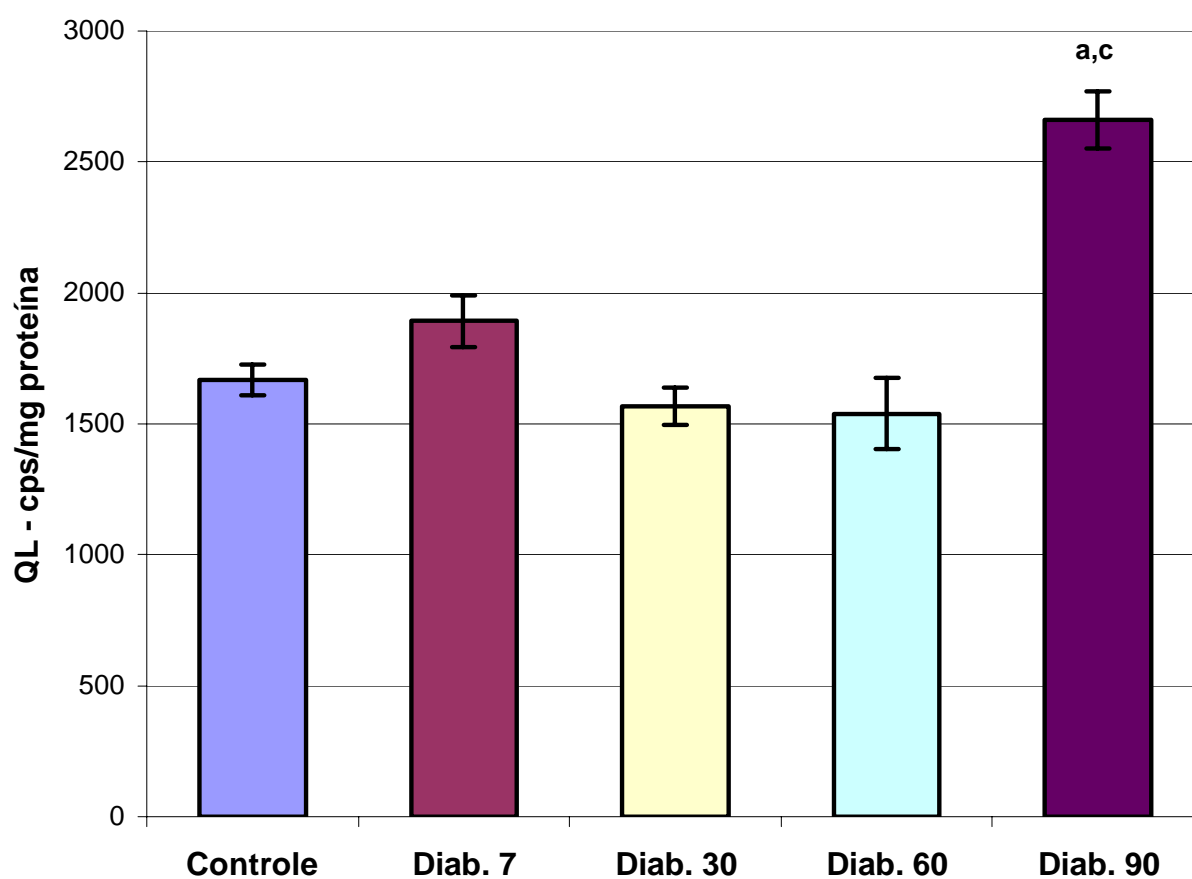


**Figura 18:** Resultado da medida de TBARS em fígado de animais controle e diabéticos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Utilizou-se notações de significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o grupo controle ( $p < 0,001$ ).

<sup>b</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e os grupos diabéticos 7, 30 e 60 respectivamente ( $p < 0,01$ ).





**Figura 19:** Resultado da medida de QL em fígado de animais controle e diabéticos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Utilizou-se notações de significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o grupo controle ( $p < 0,001$ ).

<sup>c</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o diabético 7, 30 e 60, respectivamente ( $p < 0,001$ ).

#### 4.4 - ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO FÍGADO

A **tabela 9** e **figura 20** apresentam os valores das enzimas antioxidantes presentes no fígado dos animais controle diabéticos nos diferentes tempos de estudo.

Observou-se uma redução significativa da enzima glutatona transferase (GTx) nos animais diabéticos aos 60 e 90 dias de estudo, sendo  $p < 0,05$ . Nas demais enzimas antioxidantes presentes no fígado houve uma tendência a redução, mas não apresentou diferença estatisticamente significativa.

**TABELA 9-** Resultados da quantificação das enzimas antioxidantes no fígado dos animais controle e diabéticos nos diferentes grupos.

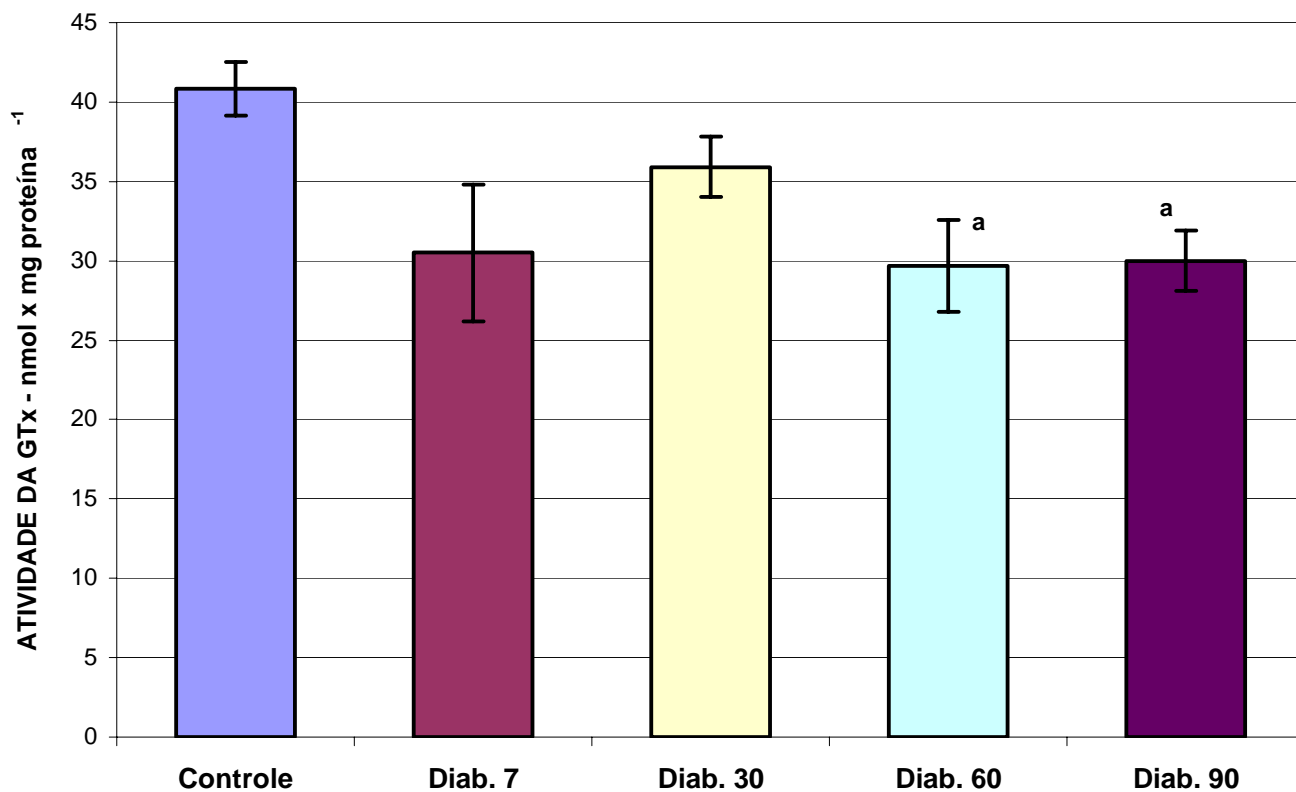
<b>Grupo</b>	<b>CAT</b> (nmol. mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>SOD</b> (U/mg proteína)	<b>GTx</b> (nmol.mg proteína <sup>-1</sup> )
Controle (7)	150,0 ± 5,3	4,1 ± 0,3	40,85 ± 1,7
Diabético 7 (7)	150,0 ± 20,4	3,6 ± 0,7	30,5 ± 4,3
Diabético 30 (7)	121,3 ± 15,3	3,0 ± 0,3	35,9 ± 1,9
Diabético 60 (7)	133,0 ± 20,0	2,3 ± 0,2	29,7 ± 2,9 <sup>a</sup>
Diabético 90 (7)	133,0 ± 10,2	3,1 ± 0,5	30,0 ± 1,9 <sup>a</sup>

Os resultados acima são expressos como a média ± erro padrão da média (EPM).

Os valores entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo ( ).

As notações da letra sobrescrita têm a seguinte significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre os grupos diabéticos 60 e 90 respectivamente e o grupo controle na medida da enzima glutatona transferase ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20:** Medida da atividade da enzima glutathione transferase em homogeneizado de fígado de animais controle e diabéticos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Utilizou-se notações de significância:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre os grupos diabéticos 60 e 90 respectivamente e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

## 4.5 - FLUXO NA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR

A medida do fluxo sanguíneo foi realizada na artéria mesentérica superior, sendo expressa em mL/min e apresentada na **tabela 10** e **figura 21**.

Observou-se um aumento significativo no fluxo dos animais diabéticos aos 90 dias quando comparado ao do grupo controle, sendo  $p < 0,001$ . Nos demais tempos estudados, não houve diferença significativa entre os animais diabéticos e controle em relação a esse parâmetro.

**TABELA 10-** Resultados da mensuração do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior de animais controle e diabéticos.

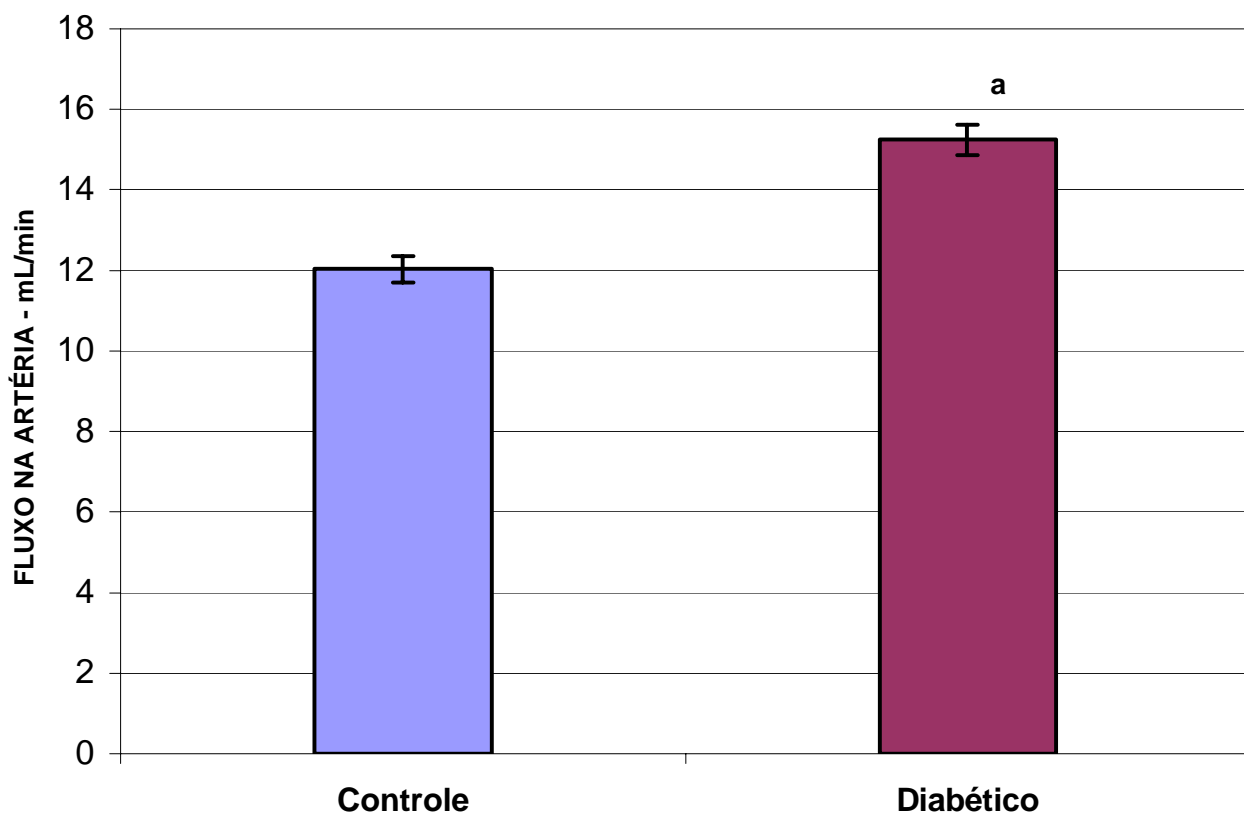
Grupo	FLUXO (mL/min)
Controle (7)	12,03 $\pm$ 0,32
Diabético 7 (7)	13,84 $\pm$ 0,61
Diabético 30 (7)	12,30 $\pm$ 1,16
Diabético 60 (7)	13,77 $\pm$ 0,61
Diabético 90 (7)	15,24 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>

Os resultados acima são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

Os valores entre parênteses indicam o número de animais em cada grupo ( ).

As notações da letra sobrescrita têm a seguinte significação:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o grupo controle ( $p < 0,001$ ).



**Figura 21:** Medida do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior entre os animais controles e diabéticos com 90 dias. Não houve diferença estatística entre os animais-controle e os demais grupos diabéticos. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As notações indicadas pela letra sobrescrita têm o seguinte significado:

<sup>a</sup> - diferença significativa entre o grupo diabético 90 e o grupo controle ( $p < 0,001$ ).

## 5 - DISCUSSÃO

O modelo experimental do DM vem sendo largamente utilizado e tem contribuído para um melhor entendimento do quadro fisiopatológico apresentado em humanos. Diversos agentes químicos são utilizados para desenvolver o DM em animais, dentre os quais se destacam o aloxano e a estreptozotocina (PICKUP & WILLIAMS, 1997).

A estreptozotocina (STZ) é provavelmente a substância mais utilizada para estudar o diabetes mellitus insulino dependente ou diabetes mellitus tipo I em animais. A partir de seu descobrimento, o modelo experimental de DM se tornou mais fácil para ser desenvolvido. Seu mecanismo de ação está baseado na destruição das células beta do pâncreas, e a grande vantagem de sua utilização é que possui alta afinidade com essas células.

Originalmente, na sua descoberta, serviu como um antibiótico, e com o passar dos anos, começou a ser utilizada em diversas patologias que afetavam o pâncreas. Essa substância é age como agente anti-tumoral em carcinoma das células pancreáticas em humanos, mas sua principal ação é gerar o DM em animais (GILMAN et. al., 1990).

A indução do DM por uma simples injeção intravenosa ou intraperitoneal é provavelmente o meio mais utilizado nos modelos experimentais. Quando aplicada em doses de 50 a 60 mg/Kg, os níveis de insulina diminuem em 30% do normal, levando à hiperglicemia, poliúria, polidipsia e perda de peso. Entretanto a severa cetose que ocorre em humanos parece não acontecer nos animais, determinando assim uma sobrevivência por um período de várias semanas sem a reposição da insulina (PICKUP & WILLIAMS, 1997).

Muitos estudos realizados em animais puderam demonstrar os variados efeitos que a STZ pode ocasionar. Em estudos feitos por Dall' Ago e colaboradores (1997), observaram-se alterações na frequência cardíaca e pressão arterial, bem como na sensibilidade dos baro e quimiorreceptores quando comparados animais diabéticos com animais-controle.

Bertolucci e colaboradores (1996), utilizaram o modelo diabético com ratos Wistar para investigar a produção e a distribuição da proteína TGF- $\beta$ 1 e avaliaram os níveis de RNA mensageiro (RNAm) em glomérulo e córtex renal após instalada a nefropatia diabética.

Um grande avanço no estudo do DM experimental foi alcançado quando foi verificado que o aumento do sorbitol intracelular poderia ocorrer em animais. Essa alteração teria consequência direta na utilização da via dos polióis e seria a responsável pelas alterações nas células da retina, glomérulos renais e principalmente nos nervos periféricos (NISHIMURA, 1998).

As alterações decorrentes da maior utilização da via dos polióis seria a responsável pelo aumento na produção de radicais livres e pela redução do NADPH intracelular. A redução na quantidade de NADPH se dá porque a enzima aldose redutase, enzima chave na via dos polióis, o utiliza como substrato para transformar glicose em sorbitol (NISHIMURA, 1998).

Recentes estudos histoquímicos sugerem que deva existir algum mecanismo de apoptose celular quando as células beta pancreáticas são destruídas. Isso se deve a uma diminuição na concentração da proteína tioredoxina (TRX), responsável pela neutralização dos radicais livres, onde a superprodução das EAO pode determinar a morte das células beta (HOOTA et. al., 2000).

Neste estudo, utilizamos o modelo diabético induzido pela estreptozotocina 70 mg/Kg intraperitoneal e avaliamos a produção de radicais livres no estômago e no fígado.

O catabolismo dos aminoácidos e a sua consequente utilização na formação de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O estão aumentados no DM. Muitos aminoácidos são captados da corrente sanguínea e convertidos à glicose no fígado. Este mecanismo parece ser uma das principais anormalidades intermediárias presentes no metabolismo hepático (GANONG, 1995).

Em nossos estudos os animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, no momento do sacrifício, manifestaram uma diminuição significativa no peso corporal, apresentando uma variação de 19% a 46% de diferença em relação ao dos animais do grupo-controle. A maior alteração ocorreu nos animais com 90 dias de diabetes. Houve uma diminuição de peso corporal apesar de estarem recebendo

alimentação e água *ad libitum*. **Tabela 4** e **figura 12**. No momento da indução do diabetes (T0) não havia diferença significativa no peso dos animais estudados. **Tabela 3**.

Em animais que permanecem por um período muito prolongado em jejum, o glicogênio hepático está diminuído e o glicerol é convertido a glicose, mas como esse mecanismo é muito limitado, o substrato para a formação da glicose sanguínea passa a ser as proteínas, justificando assim a diferença encontrada no nosso estudo no peso corporal dos animais diabéticos. Alguns autores demonstraram que há um aumento na formação da uréia no DM, bem como uma diminuição na incorporação do aminoácido leucina no plasma e no fígado, onde o grau de incorporação foi reduzido em 50% quando comparado com o dos animais normais (GITLIN, 1997).

Outro estudo realizado por McNurlan & Garlick (1981) confirmou que a síntese das proteínas estava diminuída em aproximadamente 50%, além de constatar certa baixa de níveis na síntese protéica por unidade de RNA.

A provável causa responsável pela diminuição na síntese protéica pode estar relacionada com a diminuição que existe na estrutura do retículo endoplasmático de animais diabéticos. Esses achados foram confirmados por diversos estudos, em um deles foi encontrado um aumento na degradação do retículo endoplasmático, determinando um aumento na autofagia da organela. Entretanto esta alteração não se fazia presente quando os animais eram tratados com insulina (GITLIN, 1997).

As alterações acima citadas e o aumento na conversão das proteínas em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e glicose, além da diminuição na síntese das proteínas geram um balanço negativo do nitrogênio e uma depleção das proteínas (GANONG, 1995).

Os efeitos da hiperglicemia no funcionamento motor do intestino têm sido estudados em pacientes diabéticos e em pessoas normais. A hiperglicemia induzida experimentalmente pode levar a uma diminuição na atividade mioelétrica gástrica e a um impedimento no esvaziamento gástrico. (SOOFFER et. al., 1999). Por essa razão, acreditamos que existe uma associação entre a hiperglicemia e as alterações no sistema gastrintestinal.



A hiperglicemia é um fator de risco conhecido na patogênese do DM, podendo levar a diversas complicações, mas o exato mecanismo dos efeitos que o excesso de glicose determina nos tecidos permanece desconhecido. Diversos estudos demonstram que a hipótese mais provável é a de que o acúmulo de glicose pode levar ao estresse oxidativo e que isso seria responsável pelas complicações tardias do DM (PACKER et. al., 2000).

Em nosso trabalho utilizamos somente um grupo controle para todas as variáveis estudadas, ou seja comparamos os animais diabéticos dos diferentes tempos de indução com apenas um grupo controle. Isso foi realizado porque os valores apresentados pelos animais do grupo-controle no momento do sacrifício não apresentava diferença significativa entre os diferentes grupos. Utilizamos este procedimento ao quantificar a glicemia, a lipoperoxidação no estômago e no fígado, a atividade das enzimas antioxidantes no estômago e no fígado e quando avaliamos o fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior.

Na **tabela 5** e **figura 13** notamos um aumento progressivo na glicemia quando avaliamos os tempos estudados, sendo que aos 90 dias houve um aumento de 280% em relação ao valor inicial apresentado pelo grupo-controle.

O estresse oxidativo pode estar associado à hiperglicemia crônica, à via dos polióis, síntese dos prostanóides, à autoxidação da glicose e à glicolização das proteínas determinando, uma elevação das espécies ativas do oxigênio (NAWROTH et. al., 2000).

Uma forte relação entre o estresse oxidativo e o controle da glicemia tem sido descrita atualmente, quando há uma correlação positiva entre o malondealdeído (produto da lipoperoxidação) e o açúcar presente no sangue determinando a glicolização da hemoglobina. Entretanto um dos efeitos da hiperglicemia é que ela pode alterar a função das células endoteliais, bem como o retardo na sua replicação e causar a ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NAWROTH et. al., 2000).

Uma forte relação com o desenvolvimento de complicações vasculares no DM pôde ser observada por Rösen e colaboradores (1998); (1995), pois encontraram um aumento na geração de intermediários das EAO associado às doenças vasculares. Contudo, o mecanismo responsável pelo

aumento dos intermediários dos radicais parece ser a elevação da glicemia plasmática (RÖSEN et. al., 2000).

Existem evidências de que os vasos sanguíneos são uma importante fonte para a formação das EAO, bem como da hiperglicemia que ativa a NADPH-oxidase endotelial, determinando a liberação de ânions superóxidos que reagem com o óxido nítrico e formam o peroxinitrito. Este último é o responsável por prejuízos na vasodilatação dependente do endotélio e causa uma variedade de efeitos citotóxicos na célula vascular, ativando o fator de transcrição nuclear kappa-B e induzindo à apoptose celular (RÖSEN et. al., 2000).

Muitos estudos têm mostrado que as reações ocorridas com os radicais livres, como a peroxidação lipídica, estão aumentadas em diversos estados patológicos. A alteração gastrointestinal causada pela administração de aloxano, outra droga usada para produzir o DM experimental, também pode provocar um aumento na produção de radicais livres (CROSS et. al., 1987).

Essas reações podem determinar a destruição celular e morte tecidual. Acredita-se que a peroxidação lipídica seja a causa primária para a destruição dos tecidos envolvidos e que a prevenção desse problema possa ser realizada com a administração de antioxidantes, conforme preconizado por diversos autores.

Muitos procedimentos têm sido usados para quantificar a peroxidação lipídica, mas todos os métodos tratam-se de medidas indiretas. Nenhum deles reúne os critérios necessários, tais como sensibilidade, seletividade e praticabilidade para fazer essa quantificação, não havendo uma técnica completamente adequada para realizar tal processo.

Em nosso estudo foram utilizados dois métodos para avaliar a lipoperoxidação no estômago e no fígado dos animais diabéticos e controle: a técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a quimiluminescência (QL). Embora estes dois métodos possam ser úteis para estimar a lipoperoxidação, a QL parece ser mais sensível e específica e vem sendo utilizada em vários grupos de pesquisa.

Quanto aos resultados apresentados em relação ao estômago (**tabela 6**) pôde-se notar um aumento significativo na lipoperoxidação nos animais diabéticos com 90 dias. Um aumento também existiu aos 30 dias, mas não houve diferença significativa quando comparada ao ocorrido no grupo-controle. Estes resultados foram observados tanto quando utilizamos a técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (**figura 14**) quanto a quimiluminescência (**figura 15**).

Os radicais livres são altamente instáveis e reativos, existe por essa razão, a dificuldade de mensurá-los *in vivo*, mas como possuem um elétron não pareado na última camada eletrônica podem ser detectados pela técnica da ressonância paramagnética eletrônica (SANO et. al., 1998). Essa técnica, relativamente nova e não muito difundida, é pouco utilizada para o estudo do estresse oxidativo no DM. Neste mesmo estudo foi identificado um aumento na geração dos radicais livres nos animais diabéticos por indução de estreptozotocina quando comparados com os do grupo-controle.

Em recente trabalho publicado por De Angelis e colaboradores (2000) avaliou-se o estresse oxidativo no músculo grande dorsal de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina utilizando a técnica da quimiluminescência pelo período de 5 dias. Os resultados demonstraram que houve um aumento na lipoperoxidação no músculo estudado, semelhante aos resultados obtidos em nossa pesquisa.

Nesse mesmo estudo, quando avaliada a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona transferase (GTx) ficou demonstrado que houve um aumento significativo na atividade da enzima catalase e glutatona transferase, mas uma diminuição, não significativa, na enzima superóxido dismutase.

Em nosso trabalho, quando analisamos a atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutatona transferase e superóxido dismutase no estômago dos animais diabéticos encontramos uma diminuição em todas as enzimas nos diversos tempos e grupos estudados. Ocorreu uma diminuição significativa somente na enzima catalase e glutatona transferase nos animais diabéticos com 7 e 90 dias. **Tabela 7 e figuras 16 e 17.**

Estes resultados são diferentes dos encontrados por De Angelis e colaboradores (2000), em que a atividade da enzima catalase aumentou no grupo diabético. Parece que nesse estudo ocorreu um mecanismo compensatório produzido pelo estresse oxidativo, no qual o aumento da lipoperoxidação no músculo grande dorsal dos animais diabéticos determinou também um aumento na atividade das enzimas catalase e glutathione transferase.

Em nosso estudo, as defesas antioxidantes nos animais diabéticos aos 90 dias estavam reduzidas, possivelmente pelo aumento na produção do ânion superóxido, que é um radical livre. O mecanismo proposto é de que o ânion superóxido se transformaria em peróxido de hidrogênio e formaria radical hidroxil (MENEHINI, 1987). Como o radical hidroxil é o principal iniciador da lipoperoxidação, removeria um átomo de hidrogênio de um ácido graxo polinsaturado presente na membrana celular e determinaria um aumento na lipoperoxidação (**figura 5**), a qual foi avaliada pela técnica de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico e pela quimiluminescência (**Tabela 6, figuras 14 e 15**). Este aumento na lipoperoxidação também poderia ser o responsável pelo aumento na formação do óxido nítrico (NO), o qual determinaria um aumento no peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). O mecanismo para a diminuição na atividade da enzima catalase poderia ser ocasionado também pelo aumento do óxido nítrico (HALLIWELL, 2000).

Em outro estudo avaliou-se o malonaldeído (MDA) plasmático em ratos diabéticos, foram observados níveis mais elevados que os encontrados no grupo-controle. Outro resultado interessante é que ao avaliar a destruição da mucosa gástrica a glutathione reduzida (GSH) apresentava níveis mais baixos. O mecanismo proposto para explicar este achado seria a pressuposição de que a diminuição da (GSH) não é ocasionada pela sua oxidação, mas em decorrência do estresse oxidativo aumentado (GOLDIN et. al., 1997).

Acreditamos que os resultados encontrados no nosso trabalho, no que se refere ao estômago, possam estar relacionados com o estresse oxidativo, pois encontramos uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione transferase nos animais diabéticos, além de ter identificado um aumento na lipoperoxidação, principalmente aos 90 dias.

As anormalidades hepáticas que acompanham as alterações existentes no DM tem sido motivo de grande curiosidade e estudo nos últimos anos. A obesidade e as complicações metabólicas parecem ser as principais responsáveis por esse interesse.

Em estudo clínico realizado com 13 pacientes que apresentavam um quadro de DM foi possível demonstrar a deposição de colágeno e fibrose pericelular presente nas células hepáticas. Esse estudo foi realizado utilizando a microscopia eletrônica como método de avaliação, e quando a alteração mostrava-se presente era denominada de "destruição das células hepáticas" (HALL, 1994).

Diversas alterações hepáticas podem estar associadas ao DM tipo II, no qual podemos destacar a esteatose, a esteatohepatite não alcoólica e a cirrose. A microangiopatia sinusoidal parece ser o principal mecanismo fisiopatológico existente. A alta prevalência de esteatohepatite e cirrose em pacientes com DM sugere que os portadores da DM possuem um fator de risco para desenvolver algum tipo de doença hepática (HALL, 1994).

As principais alterações existentes são o depósito de glicogênio no núcleo e no citoplasma dos hepatócitos, cirrose e fibrose perisinusoidal (GITLIN, 1997).

O estresse oxidativo apresenta um papel específico na patogênese da fibrose e nas doenças hepáticas. Tsukamoto e colaboradores (1993) avaliaram a peroxidação lipídica ocorrida no tecido hepático e encontraram uma correlação entre a lipoperoxidação e a fibrose.

O fígado, como é um órgão responsável pelo metabolismo e pela destoxificação de diversos agentes agressores, surge como um importante tecido a ser avaliado no diabetes experimental.

Na **tabela 8** e **figuras 18** e **19**, podemos demonstrar que houve um aumento significativo na lipoperoxidação do tecido hepático nos animais diabéticos de 90 dias quando comparados aos do grupo-controle pelos testes das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e quimiluminescência.

Poucos estudos existem demonstrando o efeito que o diabetes mellitus experimental determina no tecido hepático em relação às espécies ativas de oxigênio (EAO). Goldin e colaboradores (1997) demonstraram que houve um aumento na lipoperoxidação em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, o qual foi determinado pelo aumento do malondaldeído (MDA) plasmático.

Foi visto por Gonzalez e colaboradores (2000) que o óxido nítrico aparece como um possível modulador do estresse oxidativo no pâncreas de animais diabéticos com indução de estreptozotocina. O provável mecanismo de ação do óxido nítrico é que ele age na destruição das células pancreáticas produtoras de insulina, além de ser um dos causadores do estresse oxidativo.

Quando avaliamos a atividade da enzima antioxidante (GTx) no fígado de ratos diabéticos notamos que houve uma diminuição significativa na atividade da enzima glutathione transferase no fígado de ratos diabéticos aos 60 e 90 dias (**tabela 9 e figura 20**), coincidindo com o aumento da lipoperoxidação aos 90 dias quando avaliamos pela técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e pela quimiluminescência. Isso pôde ser observado em nosso estudo através de nossos resultados.

Essa constatação poderia ser explicada também pelo aumento da lipoperoxidação, mas a estrutura da enzima estudada (GTx) parece colaborar para que haja uma baixa atividade no fígado dos animais diabéticos estudados.

O papel fisiológico da enzima glutathione transferase é iniciar a destoxificação de potenciais agentes alcalizantes, incluindo os componentes farmacologicamente ativos. Esta enzima apresenta em sua estrutura um grupo sulfidril (-SH), o qual utiliza para seu substrato a glutathione reduzida (GSH).

Em estudo apresentado por Pickup & Williams (1997) utilizando o modelo experimental de diabetes mellitus induzido por aloxano demonstrou que a neutralização do grupo sulfidril pelos radicais livres seria o mecanismo responsável pela destruição das células beta pancreáticas.

Hermenegildo e colaboradores (1993) estudaram a enzima glutathione peroxidase (GPx) e verificaram que ela está reduzida na neuropatia experimental realizada em animais diabéticos induzidos por aloxano. No período de 7 a 21 dias após a indução do diabetes a atividade da enzima mostrou uma relação inversa, tendo havido o retorno da glicemia aos níveis normais.

Outros estudos também demonstraram que há uma diminuição das enzimas antioxidantes no diabetes mellitus experimental. As defesas contra os radicais livres estão reduzidas no cérebro e no fígado de animais diabéticos, onde a glutathione está diretamente envolvida (CAMERON et. al., 1986).

A enzima CuZnSOD também está reduzida no nervo ciático de animais diabéticos, diminuição esta que se relaciona com o controle da glicemia e a administração de insulina (CAMERON et. al., 1989).

Segundo observações feitas em nossa pesquisa, parece existir uma inibição na atividade da enzima glutathione transferase no fígado, pois nos ratos diabéticos com 90 dias aumentou a lipoperoxidação avaliada pelas duas técnicas descritas, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e quimiluminescência e houve uma diminuição significativa na atividade da enzima acima citada.

Uma diminuição nas enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione plasmática foi encontrada quando comparados pacientes com DM tipo I com aqueles que não possuíam a doença (ELHADD et. al., 1999). Isso, de certa forma, poderia explicar a diminuição da enzima catalase e da superóxido dismutase no fígado dos animais diabéticos.

A disfunção vascular tem sido motivo de muitos estudos em modelos animais (um dos modelos mais utilizados é o diabético induzido por estreptozotocina). O efeito da hiperglicemia na microvasculatura tem sido encontrado em 4 a 12 semanas de indução da doença. Os níveis aumentado de açúcar encontrado no DM podem levar a alterações nas células endoteliais e participar do estresse oxidativo, determinando assim uma alteração no fluxo sanguíneo (PACKER et. al., 2000)

Os resultados de nossas análises indicam um aumento significativo do fluxo medido na artéria mesentérica superior nos animais diabéticos de 90 dias quando comparados com os do grupo-controle, permanecendo inalterado nos outros tempos estudados. **Tabela 10 e figura 21.** Esse mecanismo parece estar relacionado com o aumento no estresse oxidativo e na hiperglicemia apresentada nos animais diabéticos com 90 dias de indução.

Marroni (1994), encontrou alteração no fluxo sanguíneo para a região da mucosa gástrica em ratos anêmicos, o que nos leva a acreditar que o sistema gastrointestinal é passível de mudanças sanguíneas frente a diferentes situações experimentais.

A hiperglicemia ativa a síntese do óxido nítrico. Isso determina uma vasodilatação local e causa uma hiperemia (WILLIANSO et. al., 1993). Quando há formação aumentada do óxido nítrico, ele pode se transformar em peroxinitrito e causar alteração vascular.

Um dos efeitos do peroxinitrito é que ele pode acelerar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e ativar as metaloproteinases. Isso sugere que a geração das EAO induzidas pela hiperglicemia é uma das maiores causas da transformação do endotélio em agentes pró-inflamatórios e no estado trombogênico observado no DM. A ativação ou disfunção endotelial é a base para o surgimento da aterosclerose e o desenvolvimento de diversas complicações vasculares existentes no DM e pode contribuir para o estabelecimento de placas ateroscleróticas presentes no infarto do miocárdio ou na angina pectoris (FALK et. al., 1995).

A ativação das células endoteliais vasculares pelo aumento da hiperglicemia ou pelos produtos da glicolização avançada, expressa em suas superfícies as moléculas de adesão celular -*cell adhesion molecules*- (CAMs), as quais são estimuladas pelas citoquinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas-1. As moléculas de adesão celular são os marcadores da interação entre as células de defesa e as células do endotélio, pois essa ligação facilita a migração dos glóbulos brancos pelo espaço subendotelial (SMITH et.al., 1989).

O mecanismo da disfunção endotelial em pacientes diabéticos não está muito clara, mas a geração do estresse oxidativo tem sido indicada como um dos fatores responsáveis (ELHADD et. al., 1999).

Dessa maneira, pelos dados obtidos neste trabalho é possível pensar que o estresse oxidativo produzido seja o responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior, contribuindo também para o aumento na lipoperoxidação e diminuição das enzimas antioxidantes. Além disso, supõe-se que tempo de instalação do diabetes mellitus também pode influir no metabolismo gastrointestinal neste modelo experimental. Além disso, supõe-se que o tempo de instalação do diabetes mellitus pode influir no metabolismo gastrointestinal neste modelo experimental



## 6- CONCLUSÕES

1. Os animais diabéticos, no momento do sacrifício, apresentaram uma diminuição significativa no peso corporal ao serem comparados ao grupo-controle.
2. Houve um aumento progressivo da glicemia nos animais diabéticos quando comparados aos valores apresentado pelo grupo-controle, sendo estatisticamente significativo em todos os tempos estudados.
3. Os animais diabéticos mostraram um aumento na peroxidação lipídica no estômago e no fígado, apresentando uma diferença significativa aos 90 dias de indução.
4. As enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathione transferase (GTx) apresentaram diminuição significativa na sua atividade no estômago dos animais diabéticos aos 90 dias.
5. As enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (SOD) apresentaram diminuição na sua atividade no fígado dos animais diabéticos nos diversos tempos estudados, mas houve diferença significativa somente na atividade da enzima glutathione transferase aos 90 dias de diabetes.
6. O fluxo sanguíneo medido na artéria mesentérica superior dos animais diabéticos aumentou significativamente aos 90 dias e permaneceu inalterado nos outros tempos estudados.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABIOR, B. M. The enzymatic basis for  $O_2^{\bullet-}$  production by human neutrophils. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.60, p. 1353-1358, 1982.
- BAKER, A.; PAYNE, C. M.; BRIEHL, M. M. Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, v.15, p.5162-5167, 1997.
- BAUERMANN, L. F. *Estudo das alterações cardiovasculares e do metabolismo de oxigênio na anemia e na sobrecarga de ferro*. Porto Alegre, 2000. 141 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia - Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- BELLÓ-KLEIN, A. *Ação da vitamina A e do trolox sobre o stress oxidativo produzido pelo peróxido de hidrogênio no miocárdio isolado de rato*. Porto Alegre, 1993. 200 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia - Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- BELLOMO, G.; MAGGI, E.; PALLADINE, G.; PERUGINI,; SECCIA, M. Oxidation of low density lipoproteins and vitamin E status in non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes*, v.6 (suppl. 2), p. 29-33, 1997.
- BELLOMO, G.; MAGGI, E.; POLLI, M.; AGOSTA, F. G.; BOLLATI, P.; FINARDI, G. Auto antibodies against oxidatively modified low density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes*, v. 44, p. 60-66, 1991.
- BERN, M. J.; STURBAUM, C. W.; KARAYALSIN, S. S.; BERSCHNEIDER, H. M.; WACSMAN, J. T.; POWELL, D. W. Immune system control of rat and rabbit colonic electrolyte transport. Role of prostaglandins and enteric nervous system. *J. Clin. Invest.*, v.83, p. 1810-1820, 1989.
- BERTOLUCI, M. C.; SCHMID, H.; LACHAT, J. J.; COIMBRA, T. M. Transforming growth factor in the development of rat diabetics nephropathy. *Nephron*, v.74, p. 89-196, 1996.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina*, v.58, p.350-356, 1998.
- BOVERIS, A., CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, v.134, p.707-716, 1973.
- BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A. I.; & KOCH. *Acta. Biochem. Biophys.*, v.227, p. 534-541, 1983.
- BUEGE, J. A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzimol.* v.52, p. 302-309, 1978.
- BURSELL, S. E.; KING, G. L. Protein Kinase C activation, development of diabetic vascular complications, and role of vitamin E in preventing these abnormalities. In: PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. *Antioxidants in diabetes management*. Ed. Marcel Dekker, N. Y., 2000, p. 241-263.

- BÜTTOW, N. C.; MIRANDA-NETO, M. H.; BAZZOTTE, R. B. Morfological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq. Gastroenterol.*, v.34, nº 1, p. 34-42, 1997.
- CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.; HORROBIN, D. H.; TRITSCHLER, H. J. Effects of alpha-lipoic acid on neuro-vascular function in diabetic rats: interaction with essential fatty acids. *Diabetologia*, v. 41, p. 390-399, 1998.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Reviews.*, v. 59, p. 527-605, 1979.
- CONN, H. O.; ATTERBURY, C. E. Cirrhosis. -In: SCHIFF, L.; SCHIFF, E. R. (Eds)- *Disease of Liver*. Philadelphia. Lippincott, cap. 20, p. 725-864, 1987.
- CROSS, C. E.; HALLIWELL, B.; BORISH, E. T.; PRYOR, W. A.; AMES, B. N.; SAUL, R. L.; McCORD, J. M.; HARMAN, D. Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*. v. 107(4), p. 526-545, 1987.
- DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. G.; MACHADO, U. F.; BELLÓ, A. A.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz. J. Biol. Res.* v. 30(1), p. 119-124, 1997.
- D'ALMEIDA, M. S.; GAUDIN, C.; LEBREC, D. Validation of 1- and 2-mm transit-time ultrasound flow probes on mesenteric artery and aorta f rats. *Am. J. Physiol.*, v. 268. (Heart Circ. Physiol. 37), p. H1368-H1372, 1995.
- De ANGELIS, K. L. D.; CESTARI, I. A.; BARP, J.; DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. G.; HOMEM DE BITTENCOURT, P. I.; BELLÓ-KLEIN, A.; BELLÓ, A. A.; LLESUY, S.; IRIGOYEN, M. C. Oxidative stress in the latissimus dorsi muscle of diabetic rats. *Braz. J. Biol. Res.*, v. 33(11), p. 1363-1368, 2000.
- DEL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scan. Suppl.*, v.492, p.153-167, 1980.
- DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF, M. C.; ALLANIC H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet. Med.*, v.14, p.29-34,1997.
- DeMAIO, S. J.; KING, S. B.; LEMBO, N. J.; ROUBIN, G. S.; HEARN, J. A.; BLIAGAVAN, H. N.; SGOUTASD. S. Vitamin E supplementation, plasma lipids and incidence of re-estenosis after percutaneous transluminal, coronary angioplasty(PTCA). *J. Am. Col. Nutr.*, v.11, p.68-73, 1992.
- ELHADD, T. A.; KENNEDY, G.; HILL, A.; McLAREN, M.; NEWTON, R. W.; GREENE, S.A.; BELCH, J. J. F. Abnormal markers of endothelial cell activation and oxidative stress in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes with no clinical vascular disease. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, v. 15, p.405-411, 1999.
- FALK, E.; SHAH, P. K.; FUSTER, V. Coronary plaque disruption. *Circulation*, v. 92, p.657-671, 1995.

- FRIDOVICH, I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In: PRYOR, W. A. *Free radicals in biology*. , New York:Academic Press, 1976, p. 239-277.
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science.*, v. 201, p.875-880, 1978.
- GAETANI, G. F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A. M. E KIRKMAN, H. N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, v. 73, p.334-339, 1989.
- GALLACHER, S. J.; THOMSON G.; FRASER, W. D.; FISHER, B. M.; GEMMELL C. G.; MAC-CUISH A. C. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. *Diabet. Med.*, v. 12, p.916-920, 1995.
- GANONG, W.F. *Review of Medical Physiology*. 17 ed. USA. Appleton & Lange, 1995.
- GILMAN, A. G.; NIES, A. S.; TAYLOR, P.; RALL, T. *Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. 8<sup>th</sup> Ed. Pergamon Press, 1990.
- GITLIN, N. *The Liver and systemic disease*. Ed. Churchill Livingstone, New York, 1997.
- GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*. 2<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.
- GOLDIN, E.; ARDITE, E.; ELIZALDE, J. I.; ODRIOZOLA, A.; PANÉS, J.; PIQUÉ, J. M.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Gastric mucosal damage in experimental diabetes in rats: role of endogenous glutathione. *Gastroenterology*, v. 112, p.855-863, 1997.
- GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide - initiated chemiluminescence: an assay for oxydative stress in biopses of liver, heart and muscle. *Free Rad. Biol. Med.*, v.10, p.41-47, 1991.
- GONZÁLEZ, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J.; JAWERBAUM, A.; SINNER, D.; PUSTOVHR, C.; VELA, J.; WHITE, V.; XAUS, C.; PERALTA, C.; GIMENO, M. Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *Braz. J. Biol. Res.* v. 33(11), p.1335-1342, 2000.
- HALL, P. *Alcoholic liver disease*. 2<sup>nd</sup> Edition. Ed. Edward Arnold. Boston, 1995.
- HALLIWELL, B. Free radicals and oxidative damage in biology and medicine: an introduction. In REZNIEK, A. Z. *Oxidative stress in skeletal muscle*, p. 1-27, 1998.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. C. In: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc. N. Y. 3th ed., 1999.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. C. In: *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc. N. Y. 2th ed., 1989.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, v.16, p.33-50, 1996a.

- HALLIWELL, B. Commentary: oxidative stress, nutrition, health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Rad. Res.*, v.25, p.57-74, 1996b.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. p. 33-52, 2000 In: PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. *Antioxidants in diabetes management*. Ed. Marcel Dekker, N. Y., 2000.
- HANSON, K. M.; JOHNSON, P. C. Local control of hepatic arterial and portal venous flow in the dog. *Am. J. Physiol.*, v. 212(3), p. 712-720, 1966.
- HANSON, K. M.; JOHNSON, P. C. Pressure-flow relationship in isolated dog colon. *Am. J. Physiol.*, v. 212, (3), p. 574-578, 1967.
- HARRIS, M.; CAHILL, G. Members of NIH Diabetes Data Group Work-shop: a draft classification of diabetes mellitus and other categories of glucose tolerance. *Diabetes*, v. 27, p. 1112-1125, 1978.
- HERBERG, L. The specific pathophysiology in spontaneously diabetic animals. *J. Obesity.*, v.6(Suppl. 1), p.1-7, 1982.
- HERMENEGILDO, C.; RAYA, A.; ROMA, J.; ROMERO, F. J. Decrease glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem. Res.*, v. 18, p. 893-896, 1993.
- HOTTA, M.; YAMATO, E.; MIYAZAKI, J. Oxidative stress and pancreatic  $\beta$ -cell destruction in insulin dependent diabetes mellitus. p. 265-274, 2000 In: PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. *Antioxidants in diabetes management*. Ed. Marcel Dekker, N. Y., 2000.
- HOUNSOM, L.; TOMLISON, D. R. Does neuropathy develop in animal models? *Clin. Neurosci.*, v.4,. 380-389, 1997.
- JACOBSON, E. D.; SCOTT, J. B.; FROHLIC, E. D. Hemodynamics of the stomach. I. Resistance-flow relationship in the gastric vascular bed. *Am. J. Dig. Dis.*, v. 7 (9), p. 779-785, 1962.
- JEFFERSON, L. S.; LIAO, W. S. L.; PEAVY, D. E.; MILLER, T. B.; APPEL, M. C.; TAYLOR, J. M. Diabetes-induced alterations in liver protein synthesis. *J. Biol. Chem.* v.258, p. 1369-1375, 1983.
- JOHNSON, P. C. Autoregulation of intestinal blood flow. *Am. J. Physiol.*, v. 199, n° 2, p. 311-318, 1960.
- JOHNSON, P. C. Origin, localization, and homeostatic significance of autoregulation in the intestine. *Circ. Res.*, v. 15, Suppl. 1., p. 225-232, 1964.
- KANNER, J. & HAREL, S. Initiation of membranous lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Arch. Biophys.*, v. 273(2), p. 314-321, 1985.

- KELNER, M. S. E BAGNELL, R. Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with a cooper-zinc superoxide dismutase expression vector. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p.10872-10875, 1990.
- KING, G. L.; KUNISAKI, M.; NISHIO, Y.; INOBUCHI, T.; SHIBA, T.; XIA, P. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes*, v45, p. S105-S108, 1996.
- KOCH, K. Gastric neuromuscular disfunction in diabetes mellitus. A review of symptoms, pathophysiology, and treatment. *Diges. Dis. Scien.*, v.44, n° 6, p.1061-1075, 1999.
- KOZLOV, A. B.; OSTRACHOVITCH, E. A.;AFANAS'EV, I. B. Mechanism of inhibitory effects of chelating drugs on lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Biochemical Pharmacology*, v.125, n.1, p.705-710, 1994.
- KUNJATHOOR, V. V.; WILSON, D. L.; LeBOUEF, R. C. Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Clin. Invest.* v. 97, p. 1767-1773, 1996.
- LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. *Science*, v.193, p.415-417, 1976.
- LOW, P. A.; NICKANDER, K. K. Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes*, v. 40, p. 873-877, 1991.
- LOW, P. A.; NICKANDER, K. K.; TRITSCHLER, H. J. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, v. 46(25), p.385-425, 1997.
- LOWRY, . H.; ROSEBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the foline reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193: p. 265-275, 1951.
- MACHLIN, L. J. & BENDICH, A. Free radicals tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* v.1, p.441-445, 1987.
- MANNERVICK, B.; GUTHNBERG, C. Glutathione transferase (human placenta). *Meth. Enzymol.*, v. 77, p. 231-237, 1981.
- MARKLUND, S. L. Role of toxic effects of oxygen in reperfusion damage. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 20(2), p. 23-30, 1988.
- MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. *Basic medical biochemistry*. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1996.
- MARRONI, C. A. *Transplante ortotópico de fígado, diabete melito e drogas imunossupressoras*. Porto Alegre, 1996. 120 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Mestrado - Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas).
- MARRONI, N. *Efeito da anemia crônica sobre a microcirculação e integridade da mucosa gástrica em ratos*. Porto Alegre, 1994. 111 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia - Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

- MAUGHANN, R.; GLESSONN, M.; GREENNHAF, P. L. *Biochemistry of exercise and training*. 1<sup>a</sup> ed. Copyright, 2000.
- MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, v. 49, p. 345-361, 1995.
- McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, v.244, p.6049-6055, 1969.
- McNURLAN, M. A.; GARLICK, P. J. Protein synthesis in liver and small intestine in protein deprivation and diabetes. *Am. J. Physiol.*, v.241, p.E238-E245, 1981.
- MEERSON, F. Z.; KAGAN, V.E.; KOSLOV, Y. P. BELKINA, L.M. & ARKIPENKO, Y. V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res. Cardiol.*, v.77, p.465-485, 1982.
- MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*, v.5, p. 57-62, 1987.
- MICHAELIS, L. Fundamentals of oxido-reduction. In: GREEN, D. E. *Currents in Biochemical Research*. New York:Interscience, 1946.
- MINOR, R. L.; MYERS, P.R.; GUERRA, R.; BATES, J. N.; HARRISONN, D. G. Diet-induced atherosclerosis increases the release of vascular relaxing factor. *J. Clin. Invest.*, v. 86, p.2109-2116, 1990.
- MUCHOVA, J.; LIPTAKOVA, A.; ORSZAGHOVA, Z. Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.*, v. 16, p.74-78, 1999.
- MURPHY, M. E.; SIES, H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 88, p.10860-10864, 1991.
- MYERS, S. I.; HERNANDEZ, M. S. Oxygen free radical regulation of rat splanchnic blood flow. *Surgery*, v. 112, p. 347-354, 1992.
- NAWROTH, P. P.; BORCEA, V.; BIERHAUS, A.; JOSWIG, M.; SCHIEKOFER, S. Oxidative stress, NF-KB activation, and late diabetic complications. In: PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. *Antioxidants in diabetes management*. 2000, p. 185-204, Ed. Marcel Dekker, N. Y.
- NEWRIK, P. G.; WILSON, A. J.; JAKUBOWSKI, J.; BOULTON, A. J.; WARD, J. D. Sural nerve oxygen tension in diabetes. *Br. Med. J.*, v. 293, p.1053-1054, 1986.
- NISHIMURA, C. Aldose reductase in glucose toxicity: A potential target for the prevention of diabetic complication. *Pharmacol. Rev.*, v. 50 (1), p. 21-33, 1998.
- NOUROOZ-ZADEH, J. ; TAJADDINI-SARMADI, J. McCARTHY, S.; BETTERIDGE, D J.; WOLFF, S. P. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*, v.44, p. 1054-1058, 1995.

- NOUROOZ-ZADEH, J. Plasma lipid hydroperoxide and vitamin E profiles in patients with diabetes mellitus. In: PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. *Antioxidants in diabetes management*. 2000, p. 53-63, Ed. Marcel Dekker, N. Y.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; HALLIWELL, B.; TRITSCHLER, H. J.; BETTERIDGE, D. J. Decreased lipid standardised plasma  $\alpha$ -tocopherol in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, v.6 (suppl. 2), p. 20-23, 1997.
- PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. *Antioxidants in diabetes management*. Ed. Marcel Dekker, N. Y., 2000.
- PANÉS, J.; GRANGER, D. N. Neutrophils generate oxygen free radicals in mesenteric microcirculation after abdominal irradiation. *Gastroenterology*, v.111, p.981-989, 1996.
- PICKUP, J. C.; WILLIAMS, C. *Textbook of diabetes*. 2<sup>nd</sup> Ed. Blacwell Science, 1997.
- PÓVOA FILHO, H. *Radicais livres em patologia humana*. Ed. Imago, Rio de Janeiro, 1995.
- RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L.; SORENSEN, O. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. *Endocrinology*, v.137, p. 2093-2099, 1996.
- REILLY, P. M.; SCHILLER, H. J.; BULKLEY, G. B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surgery*, v.161, p.488-500, 1991.
- ROBBINS, M. J.; SHARP, A. R.; SLONIN, A. E.; BURR, I. M. Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia*, v. 18, p. 55-80, 1980.
- ROMERO, F. J.; MONSALVE, E.; HERMENEGILDO, C.; PUERTAS, F. J.; HIGUERAS, V.; NIES, E.; SEGURA-AGUILAR, J.; ROMA, J. Oxygen toxicity in the nervous tissue: comparison of the defense of rat brain and sciatic nerve. *Neurochem. Res.*, v. 16, p.157-161, 1991.
- RÖSEN P.; DU, X.; SUI, G. Z. Oxidative stress in diabetes: why does hyperglycemia induce the formation of reactive oxygen species? In: PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. *Antioxidants in diabetes management*. 2000, p. 17-31, Ed. Marcel Dekker, N. Y.
- RÖSEN, P.; BALLHAUSEN, T.; BLOCK, W.; ADDICKS, K. Endothelial relaxation is disturbed in the diabetic rat by oxidative stress: the influence of tocopherol as antioxidant. *Diabetologia*, v.38, p.1157-1168, 1995.
- RÖSEN, P.; DU, X. L.; TSCHÖPE, D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by  $\alpha$ -tocopherol? *Mol. Cell Biol.*, v.188, p.103:111, 1998.
- SALAS, A.; PANÉS, J.; PIQUÉ, J. M. Estrés oxidativo y daño gastrointestinal. *Gastroenterol Hepatol.*, v. 22, p.309-317, 1999.



- SANO,T.; UMEDA, F.; HASHIMOTO, H.; NAWATA, H.; UTSUMI, H. Oxidative stress measurement by in vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v.41, p. 1355-1360, 1998.
- SEMENKOVICH, C. F. & HEINECKE, J. W. Perspectives in diabetes - The mystery of diabetes and atherosclerosis- Time for a new plot. *Diabetes*, v. 46, p. 327-334, 1997.
- SHAH, S. V.; WALLIN, J. D.; EILEN, S. D. Chemiluminescence and superoxide anion production by leucocytes from diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 57, p. 402-409, 1983.
- SHARPE, P. C.; LIU, W. H.; YUE, K. K. M.; McMASTER, D.; CATHERWOOD, M. A.; McGINTY, A. M.; TRIMBLE, E. R. Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells - Comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes. *Diabetes*, v.47, pg. 801-809, 1998.
- SMITH, C. W.; MARLIN, S. D.; RHLEIN, R.; TOMAN, C. AMDERSON, D. C. Cooperative interaction of LFA and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.*, v. 83, p. 2008-2017, 1989.
- SOFFER, E. E.; THONGSAWAT, S.; HOOGWERF, B. J.; SHAH, A. Effect of acute hyperglycemia on jejunal compliance and peristaltic reflex in healthy humans. *Dig. Dis. Scien.*, v. 44(1), p. 50-55, 1999.
- SOUTHORN, P.A. & POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.*, v.63, p.381-389, 1988.
- STAMLER, J.; VACCARO, .; NEATON, J. D.; WENTWORTH, D. The multiple risk factor intervention trial research group: diabetes, other risk factors and 12 years cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care*, v. 16, p. 343-444, 1993.
- STASSI, G.; MARIA, R. D.; TRUCCO, G. Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Exp. Med.*, v. 186, p.1193-1200, 1997.
- STEIMBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Beyond cholesterol: modification of LDL that increase atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, p. 915-924, 1989.
- TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, K.; ITOH, H.; SIMA, A. A. F.; OWYANG, C. Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. *Gastroenterology*, v. 113, p. 1535-1544, 1997.
- TAKEUCHI, K.; UESHIMA, K.; OHUCHI, T.; OKABE, S. Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. *Dig. Dis. Sci.*, v. 39(3), p. 626-634, 1994.
- THOMPSON, K. H.; GODIN, D.V. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutr. Res.*, v. 15, p. 1377-1410, 1995.

- THORNTON, G. F. Infections and diabetes. *Med. Clin. North Am.*, v. 55, p. 931-938, 1971.
- TSUKAMOTO, H.; KIM, C. M.; LUO, Z. Z.; HORN, W.; SU, L. C.; BRITTENHAM, G. M. Role of lipid peroxidation in vivo and in vitro models of liver fibrogenesis. *Gastroenterology* v. 104, p.1012 A, 1993.
- TUCK, R. R.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A. Endoneural blood flow and oxygen tension in the sciatic nerves of rats with experimental diabetic neuropathy. *Brain*, v.107, p.935-950, 1984.
- TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ, P.; LÓPEZ, P.; SALIDO, G. M.; MADRID, J. A. Circadian rhythms in glutathione and glutathione-S transferase activity of rat liver. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique*, v. 100, p. 83-87, 1992.
- UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H.; NAGAI, H.; OKAMOTO, H. Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. *Diabetes*, v.32, p.316-318, 1983.
- VELAZQUES, E.; WINOCOUR, P. H.; KESTEVEN, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; LAKER, M. F. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetic. Med.*, v.10, p. 331-335, 1991.
- WERNIS, S. W. & LUCCHESI, B. R. Free radicals and ischemic tissue injury. *TIPS*, v. 11, p. 161-166, 1990.
- WHEAT, L. J. Infection and diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 3, p. 187-197, 1980.
- WILLIAMSON, J. R.; CHANG, K.; FRANGOS, M.; HASAN, K. S.; IDO, Y.; KAWAMURA, T.; NYENGAARD, J. R.; VAN-DEN ENDEN, M.; KILO, C.; TILTON, R. G. Hyperglycaemic pseudohypoxia and diabetes complications. *Diabetes*, v. 42, p. 801-813, 1993
- YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, v.294, p.284-286, 1981.
- YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z.W.; SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonol *in vitro*. *Phytotherapy Research*, v.11,p.446-449,1997.