



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Jemima Fuentes Ribeiro da Silva

**A microcirculação da bolsa da bochecha do hamster sob a influência do diabetes mellitus experimental induzido por estreptozotocina: aspectos morfofuncionais**

Rio de Janeiro  
2009

Jemima Fuentes Ribeiro da Silva

**A microcirculação da bolsa da bochecha do hamster sob a influência do diabetes mellitus experimental induzido por estreptozotocina: aspectos morfofuncionais**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.



Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Maria Dreyer Breitenbach

Rio de Janeiro  
2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Jemima Fuentes Ribeiro da.  
A microcirculação da bolsa da bochecha do hamster sob a influência do diabetes mellitus experimental induzido por estreptozotocina: aspectos morfofuncionais / Jemima Fuentes Ribeiro da Silva.- 2009.  
xv, 89f. : il.

Orientador : Jorge José de Carvalho.  
Co-orientador : Marisa Maria Dreyer Breitenbach.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.  
Bibliografia: f. 80-89.

1. Diabetes - Teses. 2. Microcirculação - Teses. 3. Imunohistoquímica - Teses. 4. Citoesqueleto - Teses. 5. Matriz extracelular - Teses. 6. Estreptozotocina - Teses. 7. Diabetes Mellitus experimental - Teses. I. Carvalho, Jorge José de. II. Breitenbach, Marisa Maria Dreyer. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.379-008.64

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

Jemima Fuentes Ribeiro da Silva

**A microcirculação da bolsa da bochecha do hamster sob a influência do diabetes mellitus experimental induzido por estreptozotocina: aspectos morfofuncionais**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de maio de 2009.

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Marisa Maria Dreyer Breitenbach

Banca Examinadora:

.....  
Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Helene Santos Barbosa  
FIOCRUZ

.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Nadja Lima Pinheiro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Laís de Carvalho  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

.....  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Celly Cristina Alves do Nascimento Saba  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro  
2009

## DEDICATÓRIA

À minha família.

## AGRADECIMENTOS

À Deus!

À minha família!

Ao meu orientador, Prof Dr Jorge José de Carvalho, pelos ensinamentos fundamentais para a minha formação, por participar de cada etapa deste trabalho, por ser um excelente pesquisador que influenciou muito a minha vida e também por sua amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marisa Maria Dreyer Breitenbach, minha co-orientadora, por colaborar no aprimoramento do meu conhecimento científico e pelo exame minucioso do artigo e da tese.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliete Bouskela, por abrir as portas do seu Laboratório de Pesquisas em Microcirculação, cedendo gentilmente os animais e parte dos materiais utilizados nessa tese. Pela revisão dessa tese.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laís de Carvalho, exemplo de dedicação ao trabalho e ao ser humano. Obrigada pela força que você sempre me deu nos vários momentos que precisei de apoio e por me orientar na vida sempre mostrando o melhor caminho a seguir.

Aos Professores do Departamento de Histologia e Embriologia, Dr<sup>a</sup> Mara Íbis Apfel, Dr<sup>a</sup> Andréa Monte Alto Costa, Dr Luis Cristóvão de Mello Porto Sobrino, e Prof<sup>a</sup> Alessandra Alves Thole, pelos ensinamentos.

A minha primeira e inesquecível mentora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neide Lemos de Azevedo, que me ensinou os conhecimentos básicos da pesquisa durante a iniciação científica e mestrado, reforçando a ética, amizade e a honestidade necessárias à arte de ser cientista.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Stumbo, pela prova de amizade no momento que mais precisei.

Ao Prof Dr Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda pela orientação nos procedimentos de morfometria.

À Dr<sup>a</sup> Helene dos Santos Barbosa e à Dr<sup>a</sup> Suzana Corte-Real, por ceder gentilmente os horários no microscópio eletrônico de transmissão do Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular da Fundação Oswaldo Cruz.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Augusta Arruda, pelo super apoio.

Aos os professores do CLINEX, pela riqueza de informações ofertadas durante as aulas.

À Fátima Zeli, mestre do Laboratório de Pesquisas em Microcirculação, pelo apoio na preparação dos experimentos e pelas trocas de conhecimento que foram de fundamental importância para o desenvolvimento dessa tese.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniele Bezerra e a doutoranda Caroline Fernandes, pelo ajuda na estereologia.

Ao Jonas Brito, Alan César, Jorge Luiz e Ana Lúcia Nascimento, pelo suporte nos procedimentos de microscopia eletrônica e no microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Prof Dr Luiz Antônio Silva, pela revisão deste trabalho na língua portuguesa.

À Amélia, secretária do CLINEX, profissional de muita competência que de vez em quando é psicóloga também.

Aos funcionários do DHE, Kátia Lima, Josefa Alves, Fábio Barbosa, Roberto Perez, Marcelo Gualter, Angélica Alves, Dalva Neves que sempre fizeram deste departamento um excelente ambiente de trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual, Aline Félix, Angélica Pinto, Rodrigo Ferreira, Vinícius Rocha, Verônica Mattos, Moysés Santanna, Jéssica Teixeira, Valeska de Souza, Cherley Borba, Márcia Gianfredoni e Andréa Fortes.

As amigas de departamento Ana Paula Gadelha e Moema Hausen que muito me ajudaram nesta causa chamada doutorado!

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Uma grande caminhada começa  
sempre com um pequeno passo.  
Allan Kardec

## RESUMO

SILVA, Jemima Fuentes Ribeiro. *A microcirculação da bolsa da bochecha do hamster sob a influência do Diabetes Mellitus experimental induzido por estreptozotocina: Aspectos morfofuncionais*. 2009. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências – Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

O Diabetes Mellitus é uma doença metabólica crônica com múltiplos fatores etiológicos (genético, viral e imunológico) que condiciona deficiência absoluta ou relativa de insulina, causando persistência de níveis elevados de glicose no sangue. Atualmente, o Diabetes Mellitus é considerado um importante problema de saúde devido a sua prevalência e alta morbimortalidade. Sua importância clínica resulta essencialmente de suas graves complicações, especialmente as microvasculares. A hiperglicemia crônica ou intermitente tem sido identificada como o fator indutor de lesão endotelial, sendo este, o agente desencadeante das complicações microvasculares. As células endoteliais, por serem influenciadas pela força hemodinâmica local, respondem com a transdução de sinais (mecanotransdução), as quais podem ser responsáveis pelo início de processos patológicos na parede dos vasos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar a microcirculação da bolsa da bochecha do hamster sob a influência do Diabetes Mellitus tipo 1 experimental induzido por estreptozotocina, avaliando seus aspectos morfofuncionais aos 6 e 15 dias de evolução da doença. As características morfológicas de arteríolas e vênulas foram estimadas por medidas do diâmetro do lúmen e da espessura da parede; pela densidade de volume e de área destes vasos na bolsa da bochecha; pela análise imunohistoquímica da expressão de actina, talina, alfa-actina de músculo liso, vimentina, laminina e colágeno IV através da microscopia de luz com a utilização um sistema semiquantitativo baseado em uma escala de intensidade de imunomarcção; e por microscopia eletrônica de transmissão. Também foi avaliado o relaxamento dependente do endotélio, medido pela variação do diâmetro do lúmen antes e após a aplicação de acetilcolina e a permeabilidade de vênulas pós-capilares à histamina, determinada pelo número de pontos de extravasamento plasmático. Nossos resultados mostraram que arteríolas e vênulas não apresentaram diferenças entre os grupos para o espessamento da parede, diâmetro luminal, densidade por área e de volume. A permeabilidade vascular, após 2 minutos da administração de histamina, foi diminuída significativamente nos grupos diabéticos, entretanto este achado não foi observado após 5 minutos da administração, o mesmo ocorrendo com a reatividade vascular. A expressão de actina, talina, laminina e vimentina esteve aumentada em arteríolas do grupo diabético com 6 dias de evolução da doença, sendo esta alteração persistente no grupo diabético de 15 dias de evolução para a laminina e a vimentina. Na microscopia eletrônica, partículas de ouro coloidal conjugadas a talina e a laminina se distribuíram no citoplasma e ao longo da superfície basal das células endoteliais. Na membrana basal, a laminina mostrou-se formando aglomerados. Essas evidências sugerem que aos 6 dias de evolução do diabetes as proteínas relacionadas a adesão com a matriz extracelular sofrem alteração possivelmente em resposta a mudanças na força hemodinâmica local promovida pela nova condição fisiológica induzida pela hiperglicemia.

Palavras-chave: Diabetes. Microcirculação. Imunohistoquímica. Citoesqueleto. Matriz extracelular. Estreptozotocina. Diabetes Mellitus experimental.

## ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a chronic metabolic disease with multiple etiologic factors (genetic, viral and immunological) that results in absolute or relative insulin deficiency, causing persistent elevated blood glucose levels. Nowadays, Diabetes Mellitus is considered as an important health concern due to its increasing prevalence and high morbimortality. Its clinical importance comes from the complications, especially microvascular. Chronic or transitory hyperglycemia has been identified as endothelial harm inductor factor, being this the first outcome of microvascular complications. Endothelial cells, under local hemodynamic strength, produce signal transduction (mechanotransduction), which can be responsible for the beginning of pathological events in vessels wall. In this regard, the objective of this study was to analyze hamster cheek pouch microcirculation under the influence of type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin, evaluating its morpho-functional aspects at 6 and 15 days of diseases evolution. Morphological characteristics of arterioles and venules were estimated by the measurement of lumen diameter and wall thickness; the volume density and area of these vessels from cheek pouch; immunohistochemistry of the expression of actin, talin, smooth muscle alpha-actin, vimentin, laminin and type IV collagen through light microscopy with the utilization of a semi-quantitative score system based on the intensity of the immunostaining; and transmission electron microscopy. It was also evaluated the endothelium dependent relaxation, measured by the variation of lumen diameter before and after acetylcholine administration and post-capillary venules permeability to histamine, determined by number of points of plasma extravasation. Our results reveal that arterioles and venules do not show differences between the groups concerning wall thickness, luminal diameter, density per area and volume density. Vascular permeability, after 2 minutes of histamine administration, was reduced significantly in diabetic groups. However, this finding was not observed after 5 minutes of administration, the same occurring with vascular reactivity. The expression of actin, talin, laminin and vimentin was higher in arterioles of diabetic group with 6 days of evolution, being this alteration persistent in diabetic group at 15 days of evolution for laminin and vimentin. In electron microscopy, colloidal gold particles conjugated with talin and laminin were distributed at cytoplasm and basal surface of endothelial cells. In basement membrane, the laminin was forming clusters. These evidences suggest that at 6 days of diabetes course the proteins related to extracellular matrix adhesion were altered possibly due to changes in local hemodynamic forces caused by the new physiologic condition induced by hyperglycemia.

**Key Words:** Diabetes. Microcirculation. Immunohistochemistry. Cytoskeleton. Extracellular matrix. Streptozotocin. Experimental Diabetes Mellitus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Esquema 1 - Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.....	22
Esquema 2 - Representação da unidade microcirculatória.....	25
Figura 1 - Etapas da microscopia intravital.....	37
Figura 2 - Sistema de microscopia intravital.....	38
Figura 3 - Análise da microvasculatura da bolsa da bochecha do hamster.....	39
Figura 4 - Fotografias dos vasos da microcirculação mostrando os pontos de extravasamento antes e após a aplicação de histamina.....	40
Figura 5 - Massa Corporal nos animais dos grupos controle e diabéticos com 6 dias e 15 dias ao final do período experimental.....	47
Figura 6 - Níveis glicêmicos nos grupos controle e diabéticos com 6 dias e 15 dias ao final do período experimental.....	48
Figura 7 - Resposta microvascular dois e cinco minutos após a administração de histamina em animais controle e diabéticos com 6 e 15 dias de evolução da doença.....	50
Figura 8 - Relaxamento induzido pela acetilcolina em arteríolas e vênulas em animais controle e diabéticos com 6 e 15 dias de evolução da doença.....	51
Figura 9 - Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-actina.....	55
Figura 10 - Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-talina.....	56
Figura 11 - Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti- $\alpha$ -actina de músculo liso.....	57
Figura 12 - Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-vimentina.....	58
Figura 13 - Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-laminina.....	59
Figura 14 - Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-colágeno IV.....	60
Figura 15 - Eletromicrografias de célula endotelial dos grupos controle, diabético de 6 dias e diabético de 15 dias imunomarcadas com anticorpo anti-actina.....	62
Figura 16 a - Eletromicrografia de célula endotelial do grupo controle, imunomarcada com anticorpo anti-talina.....	63

Figura 16 b - Eletromicrografia de célula endotelial e células musculares lisas do grupo diabético de 6 dias imunomarcadas com anticorpo anti-talina.....	64
Figura 16 c - Eletromicrografia de célula endotelial do grupo diabético de 15 dias imunomarcada com anticorpo anti-talina.....	65
Figura 17 - Eletromicrografias de células musculares lisas dos grupos controle, diabético de 6 dias e diabético de 15 dias imunomarcadas com anticorpo anti- $\alpha$ -actina de músculo liso.....	66
Figura 18 - Eletromicrografias de célula endotelial dos grupos controle, diabético de 6 dias e diabético de 15 dias imunomarcadas com anticorpo anti-vimentina.....	67
Figura 19 a e b - Eletromicrografias de célula endotelial e da matriz extracelular do grupo controle imunomarcadas com anticorpo anti-laminina.....	68
Figura 19 c e d - Eletromicrografias de célula endotelial e da matriz extracelular do grupo diabético de 6 dias imunomarcadas com anticorpo anti-laminina.....	69
Figura 19 e e f - Eletromicrografias de célula endotelial e da matriz extracelular do grupo diabético de 15 dias imunomarcadas com anticorpo anti-laminina.....	70

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Identificação, fonte e diluições dos anticorpos utilizados.....	44
Tabela 2 - Medidas morfométricas e estereológicas dos vasos da microcirculação de hamsters diabéticos e controles.....	52
Tabela 3 - Padrão de distribuição da expressão imunohistoquímica de actina, talina, alfa-SMA, vimentina, laminina e colágeno IV entre os grupos diabéticos e controle por análise semiquantitativa ( <i>Score</i> ).....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

Actina F – actina filamentosa  
Actina G – actina globular  
ADA - American Diabetes Association  
AGEs - Produtos Finais da Glicação Avançada  
alfa-SMA –Alfa actina de músculo liso  
ANOVA- análise de variância *one-way*  
cGMP - guanosina 3', 5' - monofosfato cíclico  
DAB - 3,3 – diaminobenzidina tetrahidroclorido  
DAG - diacilglicerol  
DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1.  
DM15 – Diabetes Mellitus com 15 dias de evolução  
DM1A – Diabetes Mellitus tipo 1 autoimune  
DM1B – Diabetes Mellitus tipo 1 idiopática  
DM6 – Diabetes Mellitus com 6 dias de evolução  
EPM- erro padrão da média  
FITC - Isotiocianato de Fluoresceína  
GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GLUT 2 -transportador de glicose 2  
HLA – Antígenos leucocitários humanos  
IDDM - Diabetes Mellitus insulino-dependente  
IgG – Imunoglobulina G  
NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido  
NIDDM - Diabetes Mellitus não insulino-dependente  
M.L – Microscopia de Luz  
M.E.T – Microscopia Eletrônica de Trasmissão  
p. ex. – por exemplo  
PBS – Tampão fosfato de sódio  
PKC - proteína quinase C  
PTN A- ouro – Proteína A conjugada com ouro coloidal  
 $Q_A$  - Densidade de número  
RAGE – Receptor de AGEs  
SNP - *single-nucleotide polymorphism*  
STZ - estreptozotocina  
TGF $\beta$  - Fator de crescimento tumoral  
UDPGlcNAc - uridina difosfato-N-acetil glucosamina  
Vv – Densidade de volume

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Objetivos</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>19</b>
<b>2.1. O Diabetes Mellitus tipo 1</b>	<b>20</b>
<b>2.2. O Diabetes Mellitus tipo 1 experimental</b>	<b>24</b>
<b>2.3. A microcirculação</b>	<b>25</b>
<b>2.4. O modelo de microcirculação</b>	<b>28</b>
<b>2.5. O citoesqueleto</b>	<b>29</b>
2.5.1. <u>Actina</u>	<b>29</b>
2.5.2. <u>Talina</u>	<b>30</b>
2.5.3. <u>Vimentina</u>	<b>31</b>
<b>2.6. A matriz extracelular</b>	<b>31</b>
2.6.1. <u>Laminina</u>	<b>32</b>
2.6.2. <u>Colágeno IV</u>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Animais e indução do Diabetes Mellitus experimental</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Procedimentos do experimento</b>	<b>36</b>
3.2.1. <u>Microscopia intravital</u>	<b>36</b>
3.2.2. <u>Parâmetros funcionais microcirculatórios</u>	<b>38</b>
3.2.2.1. Reatividade vascular	<b>38</b>
3.2.2.2. Permeabilidade vascular	<b>39</b>
3.2.3. <u>Eutanásia e preparação técnica do material</u>	<b>40</b>
3.2.4. <u>Morfometria</u>	<b>41</b>
3.2.5. <u>Estereologia</u>	<b>42</b>
3.2.6. <u>Imunohistoquímica para microscopia de luz</u>	<b>42</b>
3.2.7. <u>Imunohistoquímica para microscopia eletrônica de transmissão</u>	<b>43</b>
3.2.8. <u>Quantificação imunohistoquímica (Score)</u>	<b>44</b>
3.2.9. <u>Análise estatística</u>	<b>44</b>

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Glicemia e massa corporal</b>	<b>46</b>
<b>4.2. Parâmetros funcionais microcirculatórios</b>	<b>49</b>
4.2.1. <u>Permeabilidade vascular</u>	49
4.2.2. <u>Reatividade vascular</u>	49
<b>4.3. Análise morfométrica e estereológica</b>	<b>52</b>
<b>4.4. Imunohistoquímica à microscopia de luz</b>	<b>53</b>
4.4.1. <u>Citoesqueleto</u>	53
4.4.2. <u>Matriz extracelular</u>	54
<b>4.5. Imunohistoquímica à microscopia eletrônica de transmissão</b>	<b>61</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>77</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>79</b>
<b>8. ANEXO</b>	<b>88</b>
<b>8.1. Carta de aprovação no comitê de ética para o cuidado e uso de animais experimentais</b>	<b>89</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

A microcirculação é a porção do leito vascular composta por arteríolas, capilares e vênulas que constitui um sistema integrado transportador de oxigênio e nutrientes para as células <sup>(1)</sup>. O endotélio é o componente chave da microcirculação e se encontra interposto entre o sangue e os tecidos. Dessa forma, as células endoteliais são influenciadas pela força hemodinâmica local respondendo com a transdução de sinais (mecanotransdução), os quais podem ser responsáveis pela manutenção da função fisiológica ou pelo início de processos patológicos na parede dos vasos. A mecanotransdução é um processo dinâmico e constantemente adaptado ao fluxo sanguíneo local <sup>(2)</sup>.

A interação dos componentes do citoesqueleto da célula endotelial com a matriz extracelular desempenha importante papel no processo de mecanotransdução <sup>(3)</sup>. O endotélio, através da liberação de diversas substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras, reorganiza o seu citoesqueleto e cria novas conexões com a matriz extracelular <sup>(2)</sup>. Por essa razão, regula os aspectos morfofuncionais vasculares agindo principalmente na permeabilidade e no tônus vascular, e na composição, integridade e estabilidade do microvaso <sup>(4)</sup>. A fisiologia, bioquímica e farmacologia da microcirculação variam de acordo com a porção estudada e localização nos diferentes tecidos <sup>(1)</sup>.

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM 1) é uma doença inflamatória crônica causada por auto-imunidade humoral e celular dirigida contra as células beta produtoras de insulina das ilhotas pancreáticas, destruindo-as seletivamente <sup>(5)</sup>. O modelo de história natural do DM 1 sugere estágios que se iniciam com uma suscetibilidade genética, auto-imunidade sem doença clínica e finalmente o diabetes clínico <sup>(6);(7)</sup>. A doença é caracterizada por um estado hiperglicêmico crônico e por complicações microvasculares, que são responsáveis pela alta taxa de morbidade e mortalidade <sup>(8)</sup>.

O estado hiperglicêmico crônico causa lesão endotelial, mesmo quando a normoglicemia é alcançada <sup>(9)</sup>, sendo este, possivelmente, o fator desencadeante na patogênese das complicações microvasculares <sup>(10)</sup>. Vários mecanismos são propostos para explicar a disfunção endotelial decorrente da hiperglicemia, entre eles destacam-se os produtos finais de glicação não enzimática (AGEs). Estes reagem principalmente com proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular, aumentando o estresse oxidativo e mecânico na parede do vaso, afetando a integridade, estabilidade, permeabilidade e a reatividade vascular <sup>(5)</sup>.

## 1.1 Objetivos

O objetivo deste estudo foi analisar a microcirculação da bolsa da bochecha de hamster sob a influência do Diabetes Mellitus tipo 1 experimental induzido por estreptozotocina aos 6 e 15 dias de evolução, abordando os seguintes aspectos:

1. A permeabilidade de vênulas pós-capilares através da análise dos pontos de extravasamento após a aplicação de histamina.
2. A reatividade vascular (relaxamento derivado do endotélio) por medição do diâmetro luminal de arteríolas e vênulas antes e depois da administração de acetilcolina.
3. As dimensões vasculares como diâmetro do lúmen, espessura das túnicas e relação parede: lúmen, por método morfométrico.
4. A densidade por área e a densidade de volume dos vasos na bolsa da bochecha, através de técnicas estereológicas.
5. A expressão de proteínas do citoesqueleto das células endoteliais e musculares lisas (actina, talina,  $\alpha$ -actina de músculo liso e vimentina) através da microscopia de luz e ultraestruturalmente por microscopia eletrônica de transmissão.
6. A expressão das proteínas da matriz extracelular, colágeno IV e laminina, através da microscopia de luz e ultraestruturalmente por microscopia eletrônica de transmissão.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 O Diabetes Mellitus tipo 1

A American Diabetes Association (ADA) em cooperação com o Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus propuseram em 1997, uma nova classificação para o Diabetes Mellitus tipo 1, de acordo com critérios de diagnóstico padrão relacionados à etiologia e aos estágios clínicos em dois subgrupos: 1. Diabetes Mellitus tipo 1A ou auto-imune (DM1A) e 2. Diabetes Mellitus tipo 1B ou idiopática (DM1B), forma mais rara sem um agente etiológico conhecido Erro! Fonte de referência não encontrada.. O Diabetes Mellitus tipo 1A (DM1A) é uma doença inflamatória crônica causada por auto-imunidade humoral e celular dirigida contra as células beta produtoras de insulina das ilhotas pancreáticas, destruindo-as seletivamente Erro! Fonte de referência não encontrada.. A destruição progressiva e específica das células beta-pancreáticas por mecanismo auto-imune é a base fisiopatológica do DM1A. O modelo de história natural sugere estágios que se iniciam com uma suscetibilidade genética, auto-imunidade sem doença clínica (estágios pré-clínicos) e finalmente Diabetes Mellitus clínico Erro! Fonte de referência não encontrada.. Experimentalmente, esses estágios podem ser reproduzidos em diversos modelos animais através da indução do Diabetes Mellitus durante uma até aproximadamente 10 semanas Erro! Fonte de referência não encontrada..

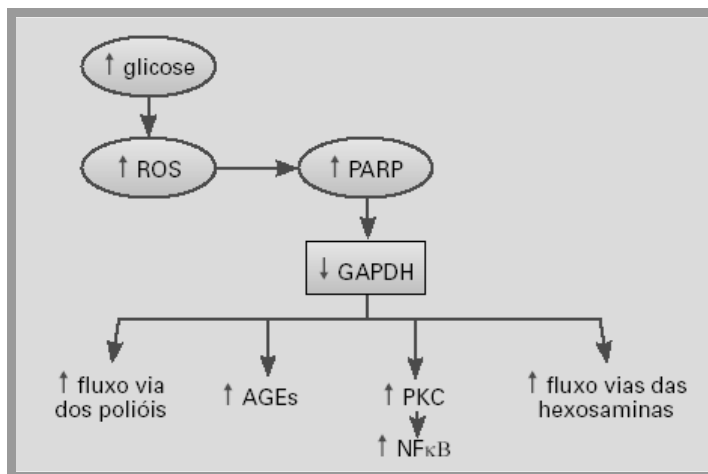
Existe no DM1A, um polimorfismo de cinco genes conhecido por influenciar a doença: HLA-DQ $\alpha$ , HLA-DQ $\beta$ , HLA-DR, pré-pró-insulina e o gene PTPN22. Uma predisposição genética está mais relacionada aos haplótipos DR3,DQB1\*0201 ou DR4,DQB1\*0302, denominados de Genes IDDM1 (cromossomo 6p21), que determinam em mais de 90% dos casos, susceptibilidade para o Diabetes Mellitus tipo 1A, caracterizando o primeiro estágio desta patologia (estágio pré-clínico) Erro! Fonte de referência não encontrada.. Entretanto a associação negativa mais forte para o DM1A está relacionada ao genótipo HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 Erro! Fonte de referência não encontrada.. Outros genes não-HLA, (IDDM2, IDDM12 e IDDM3 a IDDM13) também contribuem para uma alteração na produção de insulina e/ou sua ação, por estimular a ativação de linfócitos, de citocinas ou a apresentação de antígenos Erro! Fonte de referência não encontrada.. Recentemente, análises preliminares confirmam que o HLA-B e o HLA-A estão associados ao DM1A independentemente dos genes classe II, HLA-DRB1 e HLA-DQB1. Além disso, uma segunda região do complexo classe II, a *single-nucleotide polymorphism* (SNP), rs439121 e o locus HLA-DPB1 classe II, foram identificados com forte efeito de suscetibilidade para o DM1A Erro! Fonte de referência não encontrada..

De acordo com Atkinson & Eisenbarth (2001)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> os agentes ambientais atuam como modificadores da patogênese da doença, podendo servir como “gatilhos” para o seu desenvolvimento. Até o momento, três hipóteses são levantadas com relação aos agentes ambientais que influenciam o desenvolvimento do DM1A: 1. infecção por vírus (síndrome da rubéola congênita, citomegalovírus, caxumba, sarampo); 2. dieta precoce na infância (introdução precoce do leite de vaca, cereais e glúten) e 3. ação de toxinas (derivados do N-nitroso)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>

A interação inicial entre os genes e os fatores ambientais (p.ex. vírus) parece disparar, via citocinas pró-inflamatórias, uma resposta imune que envolve diferentes sub-populações de linfócitos e células apresentadoras de antígenos. Estas apresentam auto-antígenos específicos das células beta-pancreáticas (anti-ácido glutâmico descarboxilase- GAD, anti-ilhota- ICA, anti-insulina- IAA) aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, constituindo o primeiro evento no processo de auto-imunidade, com conseqüente insulite. O processo de insulite é amplificado via liberação de citocinas e ativação de numerosos tipos celulares (linfócitos B e T, células NK, macrófagos, entre outras) que secretam radicais livres extremamente tóxicos às células beta-pancreáticas, levando a um quadro de intolerância a glicose<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> após reconhecimento dos auto-antígenos pancreáticos efetuam a destruição das células beta por citólise (perforinas e granzimas) e por indução de apoptose (via inativação do ativador do gene da insulina – Pdx-1)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> Após um quadro de intolerância a glicose, a expressão do ligante Fas nas células citotóxicas induz apoptose das células beta e promove um infiltrado celular nas ilhotas. O último estágio no desenvolvimento do Diabetes Mellitus é a perda do peptídeo C plasmático e um quadro de hiperglicemia pré-prandial  $\geq 126\text{mg/dl}$ <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>

Achenbach *et al.*, (2005)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> indicam que a condição hiperglicêmica é promovida pela diminuição da razão dos níveis de insulina/glucagon, com elevação glicêmica aguda e quadro clássico de DM1A. Isto altera toda a via insulínica normal de captação de glicose ativando outros mecanismos bioquímicos de transdução de sinais. O ponto chave da alteração metabólica da glicose sob condição de hiperglicemia é a diminuição da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Essa enzima é responsável pela metabolização final da glicose, e sua diminuição acarreta o desvio metabólico da glicose com ativação de todas as vias bioquímicas da hiperglicemia, tais como: 1. formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs); 2. aumento da atividade da aldose-redutase (sorbitol-frutose); 3. aumento da produção de radicais livres e do estado de oxidação (estresse oxidativo); 4. aumento do fluxo da via da hexosamina e 5. aumento da ativação da proteína

quinase C (PKC) e diacilglicerol (DAG) (Esquema 1) Erro! Fonte de referência não encontrada.;Erro! Fonte de referência não encontrada.;Erro! Fonte de referência não encontrada.



Esquema 1. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.

ROS = espécies reativas de oxigênio; PARP = poli ADP-ribose polimerase; GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; AGEs = produtos avançados da glicosilação não-enzimática; PKC = proteína quinase C; NFκB = fator nuclear κB. Retirado de Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications – unifying mechanism. Diabetes. 2005;56:1615-1625 Erro! Fonte de referência não encontrada.

Os AGEs são formados não enzimaticamente por reações de oxidação ou redução de glicose, lipídeos, ácidos nucleicos e ou certos aminoácidos de proteínas presentes tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos e de seus intermediários de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou da interação com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, 1. estresse oxidativo com redução dos níveis de óxido nítrico; 2. alterações morfofuncionais de proteínas intracelulares e plasmáticas, de componentes da matriz extracelular e da interação destes com seus respectivos receptores, as integrinas Erro! Fonte de referência não encontrada.; 3. aumento da expressão de mediadores inflamatórios e adesão leucocitária Erro! Fonte de referência não encontrada.. A ligação das AGEs ao seu receptor (RAGE) presente nos diversos tipos celulares (célula endotelial, células mesangial e macrófago), ativam fatores transcricionais pleiotrópicos que causam mudanças na expressão gênica e em eventos da sinalização celular Erro! Fonte de referência não encontrada.

Pela via dos polióis, a redução do óxido nítrico, ativa a enzima aldose-redutase que converte a glicose em sorbitol. O sorbitol é oxidado à frutose com redução do  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ , gerando estresse oxidativo Erro! Fonte de referência não encontrada.;Erro! Fonte de referência não encontrada.

encontrada. A via do polioli induz indiretamente a formação de AGEs e ativa a proteína kinase C (PKC) Erro! Fonte de referência não encontrada. A proteína kinase C (PKC) é uma família de kinases que são normalmente ativadas por um segundo mensageiro lipídico, o diacilglicerol (DAG). A hiperglicemia intracelular aumenta a quantidade de DAG e ativa algumas isoformas da PKC. Como resultado, essas moléculas de sinalização intracelular desregulam direta ou indiretamente a permeabilidade vascular Erro! Fonte de referência não encontrada. e o fluxo sanguíneo; induzem o espessamento da membrana basal por aumento da síntese de colágeno IV e fibronectina; regulam a liberação de vasodilatadores e a ativação endotelial Erro! Fonte de referência não encontrada.

Na via da hexosamina, o aumento da glicose intracelular tem como consequência a metabolização final de frutose-6-fosfato a uridina difosfato-N-acetil glucosamina (UDPGlcNAc), resultando em alterações patológicas na expressão gênica, aumentando a produção de citocinas Erro! Fonte de referência não encontrada. tais como TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  e de fatores de transcrição Erro! Fonte de referência não encontrada.

Vários ensaios clínicos, em pacientes com DM1A, demonstraram a relação direta entre os níveis de hiperglicemia e o dano tecidual Erro! Fonte de referência não encontrada. A hiperglicemia promove alterações estruturais em vasos distribuídos por vários tecidos e órgãos. A produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, associada a uma diminuição dos mecanismos antioxidantes endógenos, gera estresse oxidativo que lesa as células endoteliais causando sua ativação seguida de disfunção e posterior necrose Erro! Fonte de referência não encontrada. Este mecanismo parece ser o primeiro alvo das complicações estruturais promovida pela hiperglicemia.

A Pesquisa de Shaan (2004) mostra que, em pacientes com estado avançado de complicação microvascular, a célula endotelial apresenta-se disfuncional e a expressão de várias proteínas do citoesqueleto está modificada levando a modificação da forma, da adesão das células à matriz, hipertrofia Erro! Fonte de referência não encontrada., e por consequência hiperplasia das células. Em outro estudo, o espessamento das membranas basais também decorre da disfunção endotelial e se origina a partir do aumento da expressão e depósito de proteínas como fibronectina, laminina e colágeno IV Erro! Fonte de referência não encontrada. As células musculares também sofrem as consequências da hiperglicemia e mostram poucas junções intercelulares, tamanho reduzido com diminuição de miofilamentos e aumento do retículo endoplasmático e aparelho de Golgi Erro! Fonte de referência não encontrada.

Como alterações funcionais, podemos citar: 1. anormalidades no fluxo sanguíneo, devido ao aumento da viscosidade sanguínea que origina um estresse mecânico na parede

vascular e aumento da resistência vascular <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>; 2. diminuição da reatividade vascular, após administração de acetilcolina e nitroprussiato de sódio, por redução na secreção pelo endotélio de dois importantes vasodilatadores: óxido nítrico e prostaglandinas, causando a desregulação da vasculatura arterial e venosa, e diminuição dos vasodilatadores dependentes e independentes do endotélio <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>; 3. aumento da permeabilidade vascular pela liberação de histamina, bradicinina e prostaglandinas <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. No DM1A, a adesão leucocitária está aumentada devido ao processo inflamatório gerado pela liberação de citocinas teciduais através das células apresentadoras de antígeno e linfócitos. Este quadro inflamatório, além de gerar aumento da diapedese dos leucócitos, estimula o extravasamento do fluido sanguíneo para o interstício, e a liberação de substâncias vasoativas, que estimula a formação de junções *gaps* transitórias e reversíveis entre as células endoteliais de vênulas pós-capilares. Como consequência o transporte paracelular e transcelular é estimulado, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular e formação de edema <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>.

Esses são alguns exemplos de eventos que culminam nas complicações do DM1A tanto no nível microvascular como no macrovascular <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Os efeitos da hiperglicemia crônica incluem lesão, disfunção e falência de vários órgãos.

## 2.2 O Diabetes Mellitus tipo 1 experimental.

A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico sintetizado pela cepa *Streptomyces achromogenes* que apresenta o grupo 2-deoxi-2(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glicopirranose, cujo radical nitrosuréia tem efeito citotóxico sobre as células beta-pancreáticas enquanto o radical deoxiglicose facilita sua entrada nas mesmas <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup><sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Essa substância é usada para induzir o Diabetes Mellitus, tanto insulino-dependente (IDDM) como não insulino-dependente (NIDDM), de acordo com a dose e número de vezes que a droga é administrada (dose única ou múltiplas doses) <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. A ação da estreptozotocina na célula beta-pancreática é acompanhada por alterações características nas concentrações de glicose e insulina sanguíneas. Logo nas primeiras 2 horas após a administração, é possível observar uma hiperglicemia concomitante à queda na insulina sanguínea. Em seguida, um episódio de hipoglicemia ocorre devido ao aumento dos níveis de insulina com posterior desenvolvimento de um quadro de hiperglicemia persistente <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>.

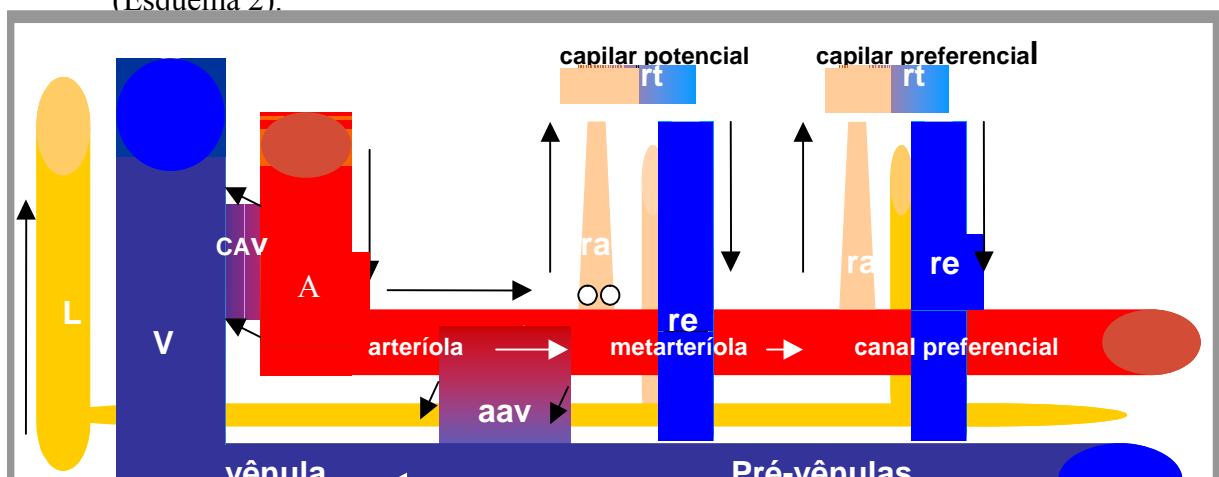
Um mecanismo de ação proposto para a estreptozotocina (STZ) se baseia na sua

captura, pelas células beta-pancreáticas, através do transportador GLUT 2, sendo facilitado pelo radical de oxigênio da STZ. No interior da célula, a nitrosuréia é capaz de promover uma alquilação do DNA com conseqüente fragmentação do mesmo <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Esta destruição pode ser avaliada através da glicemia de jejum e níveis séricos de insulina. Se a perda celular for menor que 60%, a insulina basal e níveis séricos de glicose permanecem normais; se a destruição celular ficar entre 70-90%, haverá hiperglicemia de jejum <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Outros efeitos deletérios podem ser observados sobre a célula beta-pancreática após administração da STZ: 1. produção de espécies reativas do oxigênio pela sua ação nas mitocôndrias; 2. ação na atividade da xantina-oxidase e guanilil-ciclase, responsáveis pelo clearance de radicais livres na célula; <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> 3. destruição imune das células beta-pancreática <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>.

A STZ tem sido utilizada com sucesso na obtenção do modelo de DM experimental em animais de laboratório como ratos, camundongos, hamsters, porcos e outros <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. A atividade diabetogênica da STZ, tem sido demonstrada, no DM experimental, em doses entre 25 e 100 mg/Kg, sendo que foi observado cetonúria, somente em grandes doses <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>.

### 2.3. A microcirculação

A microcirculação representa a menor unidade funcional do sistema cardiovascular onde os vasos apresentam diâmetro médio igual ou inferior a 100  $\mu\text{m}$ . Inclui as arteríolas, metarteríolas, esfíncter pré-capilar, capilares, vênulas pericíticas, vênulas musculares e linfáticos. A organização das principais estruturas que compõem a microcirculação proporciona unidades funcionais bem definidas que visam facilitar os processos fisiológicos de nutrição e oxigenação tecidual <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. (Esquema 2).



## Esquema 2. Representação da unidade microcirculatória.

L= linfático; V= veia; A= artéria; CAV= comunicação artério-venosa; aav= anastomose arteriólo-venular; ra= ramo aferente capilar; rt= ramo transversal capilar; re= ramo eferente capilar; ●● esfincter pré-capilar. Retirado de Halfoun *et al.*, (2003). Estudos morfológicos e funcionais da microcirculação da pele no Diabetes Mellitus. Arq Bras Endocrinol Metab. 2003; 47: 271-279.

As arteríolas são vasos de resistência que apresentam em média diâmetro externo de 20 a 100  $\mu\text{m}$  e diâmetro interno entre 8 e 50  $\mu\text{m}$  Erro! Fonte de referência não encontrada. De maneira geral esses microvasos são compostos de túnica íntima com um endotélio, um subendotélio e podem apresentar uma lâmina elástica interna. A túnica média consiste de duas a cinco camadas de células musculares lisas concêntricas. A túnica adventícia contém pouco tecido colagenoso ligando o vaso aos tecidos adjacentes. As metarteríolas apresentam a camada muscular freqüentemente descontínua, podendo conter esfíncteres pré-capilares. Uma metarteríola pode funcionar como um canal preferencial até a vênula pós-capilar (desvio da rede capilar) ou como um canal para abastecer a rede capilar Erro! Fonte de referência não encontrada. A área de secção transversal das arteríolas é de aproximadamente 40  $\text{cm}^2$  Erro! Fonte de referência não encontrada.

A área seccional transversal ocupada pelos capilares é de aproximadamente 2.500  $\text{cm}^2$ . Os capilares apresentam diâmetro médio variando entre 5 -10 $\mu\text{m}$ , podendo chegar até 25 $\mu\text{m}$ . São formados por uma parede que varia de um a dois micrômetros constituídos por uma única camada contendo de uma a três células endoteliais concêntricas, justapostas, altamente permeáveis, circundada por uma fina lâmina basal. De acordo com a presença ou não de pequenos poros ou fenestras, tanto nas células endoteliais como na lâmina basal, os capilares podem ser classificados em contínuos, fenestrados (encontrados na microcirculação da bochecha do hamster) ou sinusóides. É no leito capilar que ocorre a troca de fluidos e solutos passivamente com os tecidos Erro! Fonte de referência não encontrada.

As vênulas pós-capilares e musculares são vasos de capacitância. Sua complacência é em torno de 24 vezes a da artéria correspondente. Apresentam baixa resistência, pois sua parede é muito delgada e por isso, constituem o reservatório de sangue do sistema vascular

juntamente com as veias Erro! Fonte de referência não encontrada. As vênulas pós-capilares apresentam diâmetro entre 10-50  $\mu\text{m}$ , sendo formadas por células endoteliais sustentadas por uma lâmina basal e seus pericítos, podendo apresentar uma fina adventícia com fibroblastos Erro! Fonte de referência não encontrada. O endotélio das vênulas pós-capilares são os mais permeáveis do sistema circulatório porque as junções celulares nesta região são mais amplas, permitindo um extravasamento maior de fluido sanguíneo e de células inflamatórias Erro! Fonte de referência não encontrada. Na inflamação, a liberação de mediadores como a bradicinina e a histamina causam a dilatação destes vasos por promover abertura nas junções intercelulares, junções GAP transitórias e reversíveis (100nm) com conseqüente aumento da permeabilidade vascular Erro! Fonte de referência não encontrada. O extravasamento de proteínas depende do gradiente da pressão hidrostática na parede do vaso, da permeabilidade e do tônus de resistência dos vasos Erro! Fonte de referência não encontrada. São exemplos de potentes vasodilatadores: a histamina, bradicinina, prostaglandinas, peptídeo intestinal vasoativo e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. A histamina foi um dos primeiros mediadores a serem descritos Erro! Fonte de referência não encontrada. Ela produz vasodilatação e edema, atuando em receptores específicos pela liberação de óxido nítrico Erro! Fonte de referência não encontrada.

As vênulas musculares apresentam diâmetro entre 50-100  $\mu\text{m}$  e são formadas por uma túnica média contendo uma ou duas camadas de músculo liso enquanto as vênulas pós-capilares não apresentam uma túnica média efetiva. A camada íntima é formada por um endotélio típico, mas sem válvulas. Esses vasos também apresentam uma delgada túnica adventícia, com fibras colágenas Erro! Fonte de referência não encontrada. As veias têm diâmetro interno três vezes maiores que as artérias correspondentes Erro! Fonte de referência não encontrada.

A irrigação dos leitos vasculares é influenciada pela associação de diferentes forças participantes entre o sangue e a parede vascular, tais como fluxo, resistência, viscosidade, diâmetro luminal, tensão mecânica, mecanotransdução e vasomoção. O fluxo sanguíneo é dependente da relação entre pressão sanguínea e resistência vascular Erro! Fonte de referência não encontrada. A resistência vascular é o reflexo da interação de todos os componentes da parede vascular (células endoteliais, adesão célula-célula e célula - matriz, matriz extracelular e células musculares) em resposta a pressão exercida pelo fluxo sanguíneo. Por essa razão, é diretamente proporcional ao comprimento do vaso e inversamente proporcional à quarta potência do raio dos vasos sanguíneos Erro! Fonte de referência não encontrada.

Na microcirculação, como o diâmetro luminal dos vasos diminui, a resistência ao fluxo aumenta consideravelmente. Isto provoca uma força mecânica tangencial sob a parede vascular denominada de estresse mecânico. Resumidamente, o estresse mecânico é sentido

por moléculas da superfície luminal da célula endotelial, como por exemplo, receptores ligados à proteína G. Uma vez ativadas, as moléculas geram um segundo mensageiro intracelular ou ativam mecanoreceptores que interagem com os elementos do citoesqueleto Erro! Fonte de referência não encontrada. O estresse mecânico é então sentido pelo endotélio e por todas as estruturas que se relacionam com ele ou sofrem sua influência (matriz extracelular, adesão célula-célula, adesão célula-matriz, células musculares lisas) Erro! Fonte de referência não encontrada.

Hakim *et al.*, (2008) Erro! Fonte de referência não encontrada., descreveram a presença e a estrutura de junções comunicantes tipo GAP entre as células endoteliais, entre células musculares lisas, bem como entre células endoteliais e musculares lisas. Essa característica é de suma importância para os processos de condução de sinais vasoativos entre essas células, na resistência vascular e no estresse mecânico ao longo da rede vascular. A resposta endotelial e vascular ao estresse mecânico é chamada de mecanotransdução. Para que isso ocorra, o citoesqueleto das células endoteliais e musculares se reorganiza polimerizando e despolimerizando os filamentos de actina, redistribuindo as fibras de estresse e criando novas conexões entre o citoesqueleto e a matriz extracelular Erro! Fonte de referência não encontrada. No que tange à adesão célula-matriz, as proteínas encontradas nos contatos focais (actina, talina, vinculina, integrinas, fibronectina, e laminina) se reposicionam adaptando a célula endotelial e os outros componentes da parede vascular à nova condição fisiológica Erro! Fonte de referência não encontrada. A integridade e a forma da célula devem-se em grande parte à estrutura do citoesqueleto, entretanto a integridade do tecido relaciona-se à comunicação do citoesqueleto com a matriz extracelular Erro! Fonte de referência não encontrada. Além disso, o endotélio também responde liberando diversos fatores tais como: fator de necrose tumoral alfa, tromboxano, endotelina, bradicinina e histamina que promovem alterações estruturais adaptativas, funcionais, remodelação da parede arterial e alteração na expressão de genes e proteínas Erro! Fonte de referência não encontrada.

Os vasos da microcirculação são submetidos à influência de fatores químicos e neuro-hormonais que mantém a parede do vaso respondendo continuamente através do fenômeno de contração e dilatação espontânea e rítmica (reatividade vascular). Através desse mecanismo, arteríolas e vênulas controlam a distribuição de sangue para o leito vascular, a perfusão dos capilares, o fluxo e a pressão sanguínea Erro! Fonte de referência não encontrada. Diversas substâncias controlam a microcirculação: óxido nítrico, prostaciclina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, autacóides, etc. Essas substâncias provocam vasodilatação ou vasoconstricção e modulam a resposta vascular frente a alterações fisiológicas ou patológicas Erro! Fonte de referência não encontrada. Erro! Fonte de referência não encontrada.

O óxido nítrico é o principal vasodilatador liberado pelo endotélio, sob estímulo de um agonista como a acetilcolina. A vasodilatação é promovida por difusão do óxido nítrico (um gás) para as células musculares adjacentes ao endotélio que estimula a guanilato-ciclase a produzir guanosina 3', 5' - monofosfato cíclico (cGMP) que leva ao relaxamento vascular

Erro! Fonte de referência não encontrada.;Erro! Fonte de referência não encontrada.

## 2.4 O modelo de microcirculação.

O hamster (*Mesocricetus auratus*) é uma espécie de mamífero, comumente utilizada em pesquisas biológicas e médicas. O hamster possui em cada lado das bochechas da cavidade oral uma membrana acessível, relativamente transparente com espessura em torno de 0,4µm, a bolsa jugal Erro! Fonte de referência não encontrada. Essas bolsas são divertículos ou invaginações saculares distensíveis das mucosas jugais, cuja função principal é o armazenamento e transporte de alimento Erro! Fonte de referência não encontrada.;Erro! Fonte de referência não encontrada. O epitélio da parede da bolsa é similar ao da pele humana, e apóia-se num tecido conjuntivo areolar frouxo com ausência de vasos linfáticos, exceto na região proximal, onde se inserem as fibras do músculo retrator da bolsa, sendo denominado "pele sem folículos e glândulas". O tecido conjuntivo da bolsa do hamster é um "Local de Privilégio Imunológico" natural Erro! Fonte de referência não encontrada. A bolsa da bochecha possui uma distribuição difusa de vasos arteriais com numerosas ramificações pequenas, mas sem padrões definidos. Muitos vasos venosos de vários tamanhos são proeminentes Erro! Fonte de referência não encontrada.

As bolsas da bochecha podem ser facilmente expostas, vertidas em uma placa e observadas sem alterar seu fluxo sanguíneo. Com a utilização da microscopia intravital, é possível avaliar *in vivo*, o fluxo sanguíneo periférico, a adesão leucocitária, a permeabilidade vascular e a resposta vascular a uma variedade de substâncias. Por esta razão, as preparações são extensivamente utilizadas nos processos de inflamação, crescimento tumoral, função das células musculares lisas e regulação do fluxo sanguíneo. Com a utilização de macromoléculas traçadoras como o FITC-dextran, é possível estudar a regulação fisiológica e farmacológica da permeabilidade das células endoteliais e a reatividade vascular estimuladas por uma série de substâncias vasoconstrictoras e vasodilatadoras tais como: nitroprussiato de sódio, acetilcolina e histamina Erro! Fonte de referência não encontrada.

## 2.5 O Citoesqueleto

Constitui uma rede tridimensional de proteínas distribuídas através do citoplasma das células eucariotas. É formado por microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários que participam do movimento celular, do suporte e resistência para a célula, da fagocitose, junção célula-célula e célula-matriz, das alterações da forma da célula e dos processos de migração e proliferação Erro! Fonte de referência não encontrada.

### 2.5.1 Actina

A actina é o principal componente dos microfilamentos. Pelo menos seis tipos de actina estão presentes nos tecidos dos mamíferos, divididos em três classes, com base nos seus pontos isoelétricos. As  $\alpha$ -actinas são encontradas em vários tipos de músculo enquanto as actinas  $\beta$  e  $\gamma$  são constituintes principais das células não musculares Erro! Fonte de referência não encontrada. São compostas de monômeros globulares, actina G, 42 kDa, os quais se polimerizam em presença de ATP para formar um longo filamento, a actina F, que tem 7nm de espessura. A cinética da polimerização da actina é um processo que envolve um mecanismo conhecido como *treadmilling* (“escada rolante”): os monômeros de actina G adicionados na extremidade “mais” (*plus*) do filamento andam ao longo do filamento até que sejam perdidos por despolimerização na extremidade “menos” (*minus*). A gelsolina, uma proteína de capeamento, impede a adição e a perda de monômeros de actina. Na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , a gelsolina fragmenta filamentos de actina e permanece ligada à extremidade “mais”, formando um capuz que impede o subsequente crescimento do filamento Erro! Fonte de referência não encontrada. Tanto gelsolina, como a profilina cortam o filamento de actina. A timosina seqüestra grupos de monômeros de actina G dentro das células, formando um *pool* de reserva, enquanto a profilina pode favorecer a organização da actina G monomérica em filamentos facilitando a troca do ADP ligado por ATP. Somente monômeros de actina ligados ao ATP podem ser organizados em filamentos. A cofilina forma um complexo dimérico com a actina G e deflagra a despolimerização da actina ligada ao ADP na extremidade “menos”. Essas proteínas são as que controlam o mecanismo de *treadmilling*. Outras proteínas tais como as citocalasinas, faloidina e latrunculinas respectivamente inibem a adição de actina G e promovem a despolimerização da actina F Erro! Fonte de referência não encontrada. Erro! Fonte de referência não encontrada. A actina F interage com a porção intracelular da subunidade  $\beta$  da integrina através das proteínas de ligação talina, vinculina e  $\alpha$ -actinina Erro! Fonte de referência não encontrada.

A actina desempenha inúmeras funções: promove o movimento celular, adapta a forma da célula à direção do fluxo sanguíneo; estabelece adesão intercelular <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>; alinha seus feixes de banda periférica em resposta ao estresse mecânico <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> e participa ativamente no transporte para-celular, fundamental para a permeabilidade endotelial <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>.

### 2.5.2 Talina

A talina é composta de 2 subunidades de 270-kDa arranjadas como homodímero anti-paralelo e está co-localizada com as integrinas em certos sítios do contato substrato-célula. É o maior componente estrutural da adesão focal junto com a actina e a vinculina. Ela consiste de uma cabeça globular com um domínio N-terminal de 50kDa e uma haste C-terminal contendo um domínio conservado de ligação a actina de 220kDa. A talina contém sítios de ligação para a actina, vinculina, kinase de adesão focal, fosfolipídeos e proteínas transmembrana <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>, <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. A talina foi a primeira proteína ligadora de actina que mostrou apresentar ligação direta com as integrinas, sendo responsável por mediar a ligação da membrana celular ao citoesqueleto através da actina. A talina liga-se à cauda do domínio citoplasmático da integrina pelas subunidades B1, B2 e B3 e mais fracamente pela subunidade B7 <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. O acúmulo de talina é o passo inicial na formação das adesões focais e requer a presença das integrinas, mas não da vinculina. A talina participa nas seguintes funções: manutenção das fibras de estresse (filamentos de actina), promoção da adesão, do espalhamento e da migração celular. A talina está presente em diversos locais, como por exemplo, nervos, discos intercalares, células musculares, fibroblastos, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, sítio das junções célula a célula e célula matriz e na superfície basal das células endoteliais em contato com a membrana basal. <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>, <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>.

### 2.5.3 Vimentina

É um filamento intermediário assim denominado devido ao seu diâmetro (10nm). Os filamentos intermediários são as estruturas mais estáveis do citoesqueleto. Como principal componente dos filamentos intermediários, a vimentina é uma molécula fibrosa e alongada com 54kDa, que possui uma cabeça amino-terminal, uma cauda carboxi-terminal e um

domínio-bastão. O domínio bastão central consiste de uma região em  $\alpha$  hélice contendo repetições em *tandem* de uma seqüência de 7 aminoácidos diferentes formando um motivo chamado repetição *hepta*, que permite a formação de estruturas diméricas torcidas entre duas  $\alpha$  hélices paralelas. Posteriormente, dois dímeros enrolados se associam de maneira antiparalela, formando uma subunidade tetramérica. Os filamentos intermediários são então formados a partir destes tetrâmeros que são estruturas não polarizadas e, portanto distinguíveis dos filamentos de actina e microtúbulos (polarizados). Por esta razão, os filamentos intermediários são proteínas muito estáveis. O domínio-bastão central medeia as interações laterais que formam o filamento montado. Já os domínios globulares da cabeça e da cauda medeiam as interações com outros componentes Erro! Fonte de referência não encontrada. A maior parte das células de origem mesenquimal e não mesenquimal e, também, células mantidas em cultura possuem filamentos de vimentina, entretanto este polipeptídeo é mais comumente encontrado em células mesenquimais, sendo utilizado como marcador para essas células Erro! Fonte de referência não encontrada. Em alguns tipos celulares, por exemplo, células endoteliais, a vimentina estabelece uma ligação estrutural com a membrana plasmática e lâminas nucleares Erro! Fonte de referência não encontrada. Experimentos utilizando anticorpos anti-vimentina apresentaram reação cruzada para muitas espécies, o que demonstra que esta proteína foi bem conservada com a evolução Erro! Fonte de referência não encontrada.

## 2.6 A Matriz Extracelular

A membrana basal é um tipo específico de matriz extracelular produzida também pelas células endoteliais e pericitos vasculares e constituída pela lâmina basal e uma lâmina reticular Erro! Fonte de referência não encontrada. A lâmina basal resulta da auto-organização de moléculas de colágeno IV, laminina, entactina, proteoglicanos e fibronectina. A lâmina reticular formada por fibras colágenas sustenta a lâmina basal e é contínua com o tecido conjuntivo Erro! Fonte de referência não encontrada. Esta é regulada por metaloproteinases e desempenha importante papel na manutenção da estrutura e função dos vasos, previne o extravasamento de proteínas plasmáticas, promovendo a manutenção da morfologia e da adesão celular Erro! Fonte de referência não encontrada.

### 2.6.1 Laminina

As lamininas são glicoproteínas heterotriméricas em forma de cruz composta de cadeias  $\alpha$ , beta e gama. Atualmente existem 5 tipos de cadeias  $\alpha$ , 4 de beta e 3 de gama. A combinação destas cadeias constitui 15 diferentes isoformas, dentre as quais pode-se destacar cinco isoformas mais presentes na parede vascular, as lamininas 4, 8, 9, 10 e 11. A laminina 4 é expressa em todos os vasos no adulto, as lamininas 8, 9, 10 e 11 são expressas no endotélio e músculo liso imaturo e maduro, sendo esta última também encontrada nas membranas basais Erro! Fonte de referência não encontrada.. Recentes trabalhos mostram que a composição da laminina de várias membranas basais influencia nos processos de adesão e migração celulares Erro! Fonte de referência não encontrada., na angiogênese Erro! Fonte de referência não encontrada. e na deposição dos outros componentes das membranas basais Erro! Fonte de referência não encontrada.. A laminina parece ser o primeiro componente a ser produzido e depositado nas membranas basais vasculares e dirige a formação e estabilização das mesmas Erro! Fonte de referência não encontrada.. Acredita-se que o *turnover* da laminina seja um processo dinâmico, pois são sensíveis à degradação por várias proteases (p. ex. metaloproteinases). Ao ser clivada após sua secreção, seus fragmentos podem apresentar novas propriedades, expondo novos sítios de ligação Erro! Fonte de referência não encontrada.. O domínio extracelular das integrinas se liga à seqüência tripeptídica RGD (Arg-Gli-Asp) presente na laminina e fibronectina. Por sua vez, a laminina e fibronectina interagem com vários tipos de colágeno (inclusive o colágeno tipo IV), proteoglicanos heparansulfato e entactina (nidogênio) Erro! Fonte de referência não encontrada.. As lamininas são o determinante primário da construção da membrana basal Erro! Fonte de referência não encontrada..

### 2.6.2 Colágeno IV

O colágeno é a proteína mais abundante em humanos. O colágeno se caracteriza por conter repetições triplas de aminoácidos glicina XY em sua molécula. O colágeno é formado por três cadeias  $\alpha$  polipeptídicas que se entrelaçam para formar a tripla hélice pró-colágeno. As moléculas de pró-colágeno quando clivadas tornam-se moléculas denominadas tropocolágeno. Em seguida as moléculas de tropocolágeno se auto-agregam em um processo de superposição, semelhante a uma escada, que é garantido pela formação de ligações cruzadas entre os grupos hidroxil Erro! Fonte de referência não encontrada.. Existem vários tipos de colágeno sendo os mais estudados os tipos I, II, III, IV, V e VI. O colágeno IV (que apresentam cadeias  $\alpha$  1-5) é o tipo presente exclusivamente nas membranas basais e se

localiza na lâmina lúcida dessa camada. É um colágeno não fibrilar que à microscopia eletrônica se apresenta como uma matriz poligonal amorfa. Encontra-se associado a laminina e a outras moléculas da matriz, fornecendo uma rede estrutural para a sustentação das outras macromoléculas, formando uma membrana basal única. O *turnover* do colágeno é muito lento sendo degradado por metaloproteinases 2 e 9 <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>

As alterações que o Diabetes Mellitus provoca na microcirculação têm sido amplamente investigadas em vários modelos animais e em diferentes estágios de evolução da doença <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>, na esperança de que essas alterações encontradas possam reproduzir algumas das modificações na microcirculação em humanos, levando ao melhor entendimento sobre o mecanismo da doença. Atualmente, sabe-se que a disfunção vascular acompanha o estado hiperglicêmico e que a interação dos componentes do citoesqueleto com a matriz extracelular é um importante aspecto que direciona a resposta vascular a muitos fatores externos ao qual são permanentemente submetidas <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. No entanto, pouco se sabe sobre as alterações ocorridas nos estágios iniciais do quadro hiperglicêmico. Por essa razão, torna-se importante compreender melhor os efeitos do Diabetes Mellitus experimental em seus estágios iniciais na microcirculação, utilizando para isso, o modelo da bolsa da bochecha do hamster.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e indução do Diabetes Mellitus experimental.**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob o número de protocolo CEA/004/2009, conforme anexo I.

Foi realizado um estudo analítico experimental medido em tempos distintos e entre grupos através da comparação transversal.

Foram utilizados 30 hamsters sírios dourados (*Mesocricetus auratus*), machos, com 2 a 3 meses de idade pesando entre 100 a 130g. Os hamsters foram criados no biotério do Laboratório de Pesquisas em Microcirculação, onde a temperatura e a umidade são controladas ( $21 \pm 2$  °C e  $60 \pm 10\%$ , respectivamente, média  $\pm$  EPM). Eles foram mantidos sob ciclo de luz dia/noite de 12h (luz fria artificial de 7 às 19hs) e ciclo de exaustão de ar de 15 min/h. Obtiveram livre acesso a comida (Nuvital de Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) e água filtrada.

Para a indução do Diabetes Mellitus foi usada uma solução de estreptozotocina (Sigma Chemical Mo, St. Louis, USA) na dose de 50mg/kg dissolvida em 50mmol/l de tampão citrato de sódio pH 4.5 e aplicado intraperitonealmente. As aplicações foram feitas uma vez por dia, durante três dias seguidos.

A partir da última injeção (3<sup>a</sup> dose), os animais foram distribuídos de acordo com o medicamento recebido e a duração do tratamento, perfazendo três grupos:

- Controle: Hamsters que receberam três injeções de 50mmol/l (cada) de tampão citrato de sódio, pH 4,5. Mantidos com alimentação e água a vontade durante 6 ou 15 dias.
- Diabéticos 6 dias: Hamsters que receberam três injeções de 50mg/Kg (cada) de estreptozotocina (agente diabetogênico). Mantidos com alimentação e água a vontade durante 6 dias.
- Diabéticos 15 dias: Hamsters que receberam três injeções de 50mg/Kg (cada) de estreptozotocina (agente diabetogênico). Mantidos com alimentação e água a vontade durante 15 dias.

Durante o período de indução do Diabetes Mellitus, um (1) animal não desenvolveu hiperglicemia e cinco animais foram à óbito, sendo portanto, utilizados em cada grupo (controle e diabéticos de 6 e 15 dias) 7 animais, em um total de 21 animais.

A massa corporal foi aferida no dia anterior a administração de estreptozotocina ou veículo (tempo zero), durante o período de indução do diabetes (tempos 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> dia de administração de estreptozotocina) e após as injeções de estreptozotocina (6<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> de evolução do diabetes) em balança de precisão. Os níveis glicêmicos foram avaliados nos mesmos dias com um medidor de glicose Accu-Chek Advantage (Roche, São Paulo, Brasil). Considerando que o hamster é um roedor e por isso apresenta hábitos noturnos, a glicemia foi aferida por coleta periorbital, às 10:00hs da manhã, levando-se em conta um período de no

mínimo 4 horas de jejum. No mesmo momento foi também medido o comprimento naso-anal dos animais. Somente animais que mostraram perda de peso (por causa do Diabetes Mellitus descontrolado) e hiperglicemia (glicose maior que 210 mg/dl) foram considerados ter desenvolvido o Diabetes Mellitus tipo 1.

### 3.2 Procedimentos do experimento

#### 3.2.1 Microscopia intravital

Após o 6<sup>o</sup> ou 15<sup>o</sup> dia da administração da última dose de estreptozotocina os hamsters foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (Sanofi, France, 60mg/ml) e colocados sobre a platina do microscópio em placa aquecida conectada a um sistema térmico digital que manteve a temperatura corporal em 36,5°C (Termostato - Upsalla Process Data). Uma incisão na pele da porção interna da coxa direita foi feita para o isolamento da veia femoral, e, em seguida, foi introduzido um cateter para a administração de drogas por via intravenosa. Uma sutura foi realizada nas porções proximal e distal do catéter e foi iniciado o procedimento de traqueostomia para facilitar a respiração do animal durante o procedimento (tubo de polietileno – PE 190). Durante todo o procedimento os hamsters foram mantidos anestesiados com doses intravenosa adicionais de hidrato de cloral (Merck, Darmstadt, Germany, 100mg/Kg). A bolsa da bochecha (esquerda) foi então lavada e evertida sobre placa de perfusão sendo intermitentemente irrigada por solução Hepes-Ringer 95%N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> pH 7,35 a 37°C em uma taxa constante de 6ml/min. Em uma área de 1 cm<sup>2</sup> a bochecha foi estendida e fixada e o excesso de tecido conjuntivo foi removido para uma melhor visualização dos vasos da microcirculação através de sistema de Microscopia Intravital (Figura 1)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. O sistema é composto de câmera (Optronics), acoplada ao microscópio tri-ocular (Leica DM LFS), monitor de TV Samsung e vídeo JVC (HR-S3800V). (Figura 2).

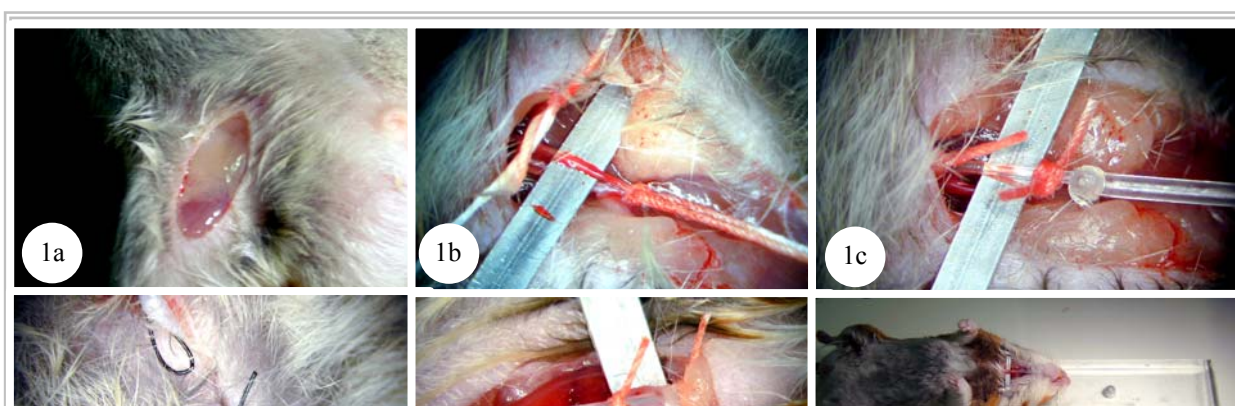


Figura 1. Etapas da Microscopia Intravital (bochecha do hamster): a. Incisão na pele. b. Isolamento da veia femoral. c. Cateterização da veia femoral. d. Sutura da pele. e. Traqueostomia. f. Animal posicionado sobre placa de perfusão. g. Exposição da bochecha. h. Fixação da bochecha. i. Extensão da bochecha. Retirado de Paulina Sannomiya. Fisiopatologia da Microcirculação. Aula Prática. Divisão de Experimentação INCOR/HC/FMUSP, 2006 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**



Figura 2. Sistema de Microscopia Intravital. Microscópio tri-ocular, câmera de televisão e monitor de vídeo. Retirado de Paulina Sannomiya. Fisiopatologia da Microcirculação. Aula Prática. Divisão de Experimentação INCOR/HC/FMUSP, 2006 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

### 3.2.2 Parâmetros funcionais microcirculatórios.

#### 3.2.2.1 Reatividade vascular

O percentual de variação dos diâmetros dos vasos sob a influência de catecolaminas foi avaliado com o uso de um vasodilatador endotélio-dependente (acetilcolina) com o objetivo de analisar a resistência vascular ao fluxo sanguíneo. O diâmetro do lúmen de arteríolas e vênulas selecionadas (diâmetro interno  $\leq 90\mu\text{m}$ ) de três campos diferentes, (borda esquerda, meio e borda direita da bolsa da bochecha) foram medidos no tempo zero, (antes da aplicação de acetilcolina) com microscópio dotado de lente ocular micrométrica, em aumento final de 100x. Em seguida, a acetilcolina foi administrada por via intravenosa na concentração de  $10^{-4}\text{mol}$  em uma infusão de  $200\mu\text{l}/\text{min}$ . Após 10 minutos da administração de acetilcolina, os mesmos vasos foram novamente medidos como descrito acima. O percentual de variação do diâmetro dos vasos sob a influência da acetilcolina foi aferido como a razão entre a medida final e a medida inicial dos diâmetros luminal, mostrando assim a reatividade vascular (Figura 3)<sup>(77)</sup>.

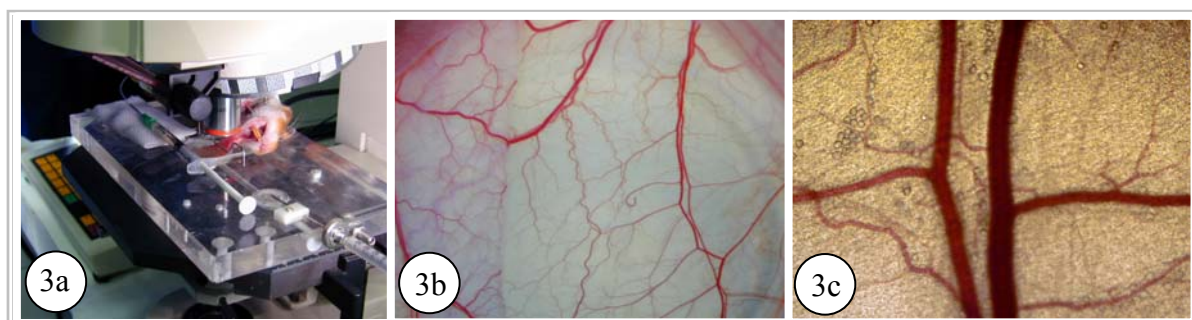


Figura 3. Análise da microvasculatura da bolsa da bochecha do hamster. a. Visualização ao microscópio. b. Microvasculatura em aumento final de 25x. c. Microvasculatura em aumento final de 50x, à esquerda veia e a direita artéria. Retirado de Paulina Sannomiya. Fisiopatologia da Microcirculação. Aula Prática. Divisão de Experimentação INCOR/HC/FMUSP, 2006 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

### 3.2.2.2 Permeabilidade vascular.

A permeabilidade da membrana vascular à histamina, um potente vasodilatador, foi examinada em vênulas pós-capilares selecionadas da bolsa da bochecha, através da contagem de pontos de extravasamento plasmático no tecido conjuntivo. Este procedimento teve por objetivo avaliar o grau de exsudação plasmática comparando o grupo controle ao grupo diabético. Para isso, durante 30 minutos, os animais foram mantidos em um período de equilíbrio, sendo posteriormente injetado intravenosamente um fluorocromo (10 mg/100 g de FITC) para a visualização da árvore microvascular no sistema de microscopia intravital. Em seguida, uma injeção tópica de histamina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, USA) foi administrada na concentração de 3,7mg/100ml diluída no tampão padrão do experimento. A análise dos pontos de extravasamento (*leaks sites*) pode ser examinada com a objetiva de 5x, a partir do 2<sup>o</sup> minuto após a administração de histamina com uma duração de 10 minutos. Foram contados o número de sítios de extravasamento nos tempos 2 e 5 minutos (Figura 4) **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

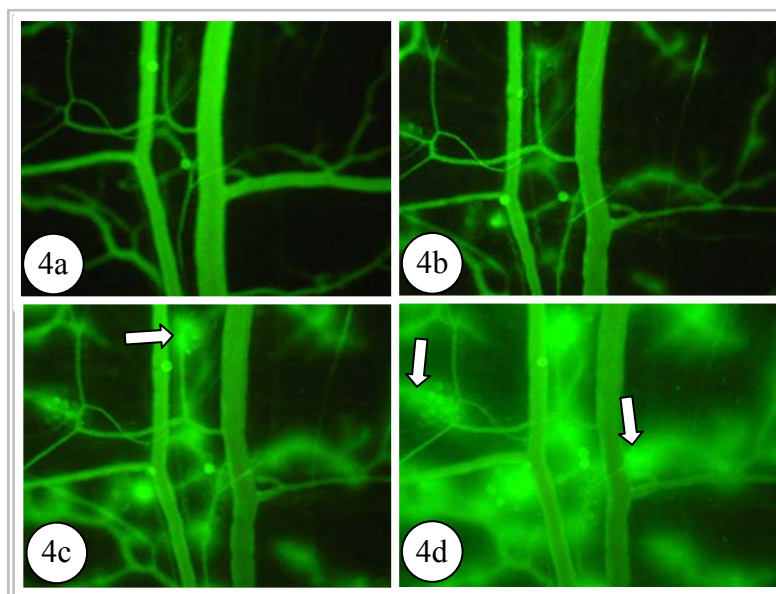


Figura 4. Fotomicrografias dos vasos da microcirculação mostrando os pontos de extravasamento (regiões em verde fluorescente difuso - setas) antes e após a aplicação de

histamina. a. Tempo 0. b. 1 minuto. c. 2 minutos. d. 5 minutos.

### 3.2.3 Eutanásia e preparação técnica do material.

Os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (Sanofi, France, 60mg/ml) e a bolsa da bochecha esquerda foi removida e fixada por imersão em fixadores apropriados para a microscopia de luz e eletrônica. A eutanásia foi realizada com uma injeção intra-cardíaca de cloreto de sódio (0,9%).

À microscopia de luz o fixador utilizado foi a formalina de Millong (formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2.)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> Nessa solução as bolsas das bochechas permaneceram por até 48 horas, sendo posteriormente desidratadas em soluções crescentes de álcool (70, 90, 100, 100%), clarificadas em 3 banhos de xilol, embebidas em soluções graduadas de xilol e parafina com inclusão em parafina pura. Este material foi utilizado para imunohistoquímica ao microscópio de luz.

À microscopia eletrônica os fragmentos retirados da bolsa da bochecha seguiram dois procedimentos:

1. Fixados em solução contendo glutaraldeído 2,5%, ácido tânico e tampão cacodilato, onde permaneceram por até 48 horas, seguido de pós fixação em tetróxido de ósmio 1% (Sigma) e ferricianeto de potássio 0,8% em tampão cacodilato à 0,1M, desidratação em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, 100, 100%), embebidos em soluções graduadas de acetona/Epon com inclusão na resina Epóxi (Epon 812). Cortes semifinos de 1µm (Leica Ultracut) foram corados com azul de toluidina 0,25% em ácido acético 1% (Vetec, Brasil) e observados no microscópio de luz Olympus BX51. Esse material foi utilizado para a análise da morfometria e estereologia dos vasos.

2. Fixados em 4% de paraformaldeído, 0,5% de glutaraldeído, 5mM de cloreto de cálcio, 0,1% de ácido pícrico em tampão cacodilato por 48 horas, à 4°C, desidratados em soluções crescentes de etanol (30, 50, 70, 90, 90%), infiltrados em soluções de etanol e resina e, incluídos na resina L.R.White em cápsulas BEEM a 37°C. Cortes ultrafinos de 70nm (Leica Ultracut) foram coletados em grades de níquel, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo para posterior observação no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906. O material resultante desse processamento foi utilizado para imunohistoquímica ultraestrutural.

### 3.2.4 Morfometria.

O espessamento da camada íntima foi medido utilizando processamento para microscopia eletrônica de transmissão com fragmentos da bochecha incluídos em Epon e corados com azul de toluidina. O espessamento da camada média foi analisado por fragmentos incluídos em parafina e imunomarcados com o anticorpo monoclonal para alfa-actina de músculo liso, com objetivo de corar somente células musculares lisas. Para ambas as camadas foram analisados três parâmetros: 1. diâmetro do lúmen do vaso, 2. espessura da camada, 3. relação espessura da camada/lúmen Erro! Fonte de referência não encontrada.;Erro! Fonte de referência não encontrada.. As análises foram feitas com auxílio de microscópio de luz (Axiophot Zeiss, Alemanha), sendo as imagens capturadas em câmera analógica CCD (CC12) e processadas em um sistema de análise morfológica Image Pró-Plus 4.5 (it Measured Cybernetics, Silver Spring, US). O diâmetro do lúmen ( $d$ ) foi medido por uma linha circunferencial interna e calculado como  $d=2\sqrt{a/\pi}$  em  $\mu\text{m}^2$  onde  $a$  é a área da circunferência e o valor de  $\pi$  é 3,14. A espessura da camada foi estimada por quatro medidas obtidas nos graus  $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  e  $270^\circ$  graus. Devido à retração que o tecido sofre ao ser incluindo em parafina, os valores obtidos com relação a túnica (camada) média sofreram correção de 1,28. Para fins de significância estatística, foram medidos cerca de 20 vasos por animal, em uma amostra de 5 animais totalizando 100 vasos (incluindo arteríolas e vênulas). Todos os cortes analisados constavam de vasos dispostos transversalmente orientados, com um diâmetro interno médio máximo de  $40 \mu\text{m}$ . As imagens foram obtidas utilizando uma objetiva de imersão em óleo, randômica e constituídas de cortes não consecutivos.

### 3.2.5 Estereologia.

Para analisar a densidade de volume dos vasos da bolsa da bochecha ( $V_v$ ) e a densidade de vasos por área ( $Q_A$ ) sob a influência do Diabetes Mellitus, a bochecha, após fixação em glutaraldeído 2,5%, ácido tânico e tampão cacodilato, foi clivada em 4 partes, cada parte foi posicionada de modo que a maioria dos vasos apresentavam-se em orientação transversal. Posteriormente, seguiram o processamento para inclusão na resina Epóxi, com a obtenção de cortes semi-finos de  $1\mu\text{m}$  de espessura. O material foi observado em um

microscópio de luz (Axiophot-Zeiss), na objetiva de 20x e as imagens transmitidas para um monitor de TV, com dimensões conhecidas (121cm<sup>2</sup>) no qual uma área-teste formada de 36 pontos com um conjunto de duas linhas denominadas proibidas e duas linhas não-proibidas foi superposta a imagem no monitor de TV <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. A densidade de volume dos vasos foi determinada por:  $V_v[\text{vasos}] = P_p[\text{vasos}] / P_t$  (Onde  $P_p$  é o número de pontos sobre os vasos;  $P_t$  é o número total de pontos-teste) <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Os valores obtidos são expressos em percentual de vasos na bolsa da bochecha. A densidade por área foi determinada como:  $Q_A[\text{vasos}] = N[\text{vasos}] / A_T (1\text{mm}^2)$ ,  $N$  é o número de estruturas contabilizadas na área-teste ( $A_T$ ) <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. O número de vasos contabilizados foi então dividido pela área total do sistema-teste (121cm<sup>2</sup>) e os valores são expressos em  $\mu\text{m}^2 \times 10^5$ .

Foram contabilizados 15 campos aleatórios por animal para cada um dos vasos estudados neste trabalho (arteríolas e vênulas). Os dados foram analisados por ANOVA *one-way* e pós-teste de Tuckey, no programa estatístico Graph Pad Prism 5.

### 3.2.6 Imunohistoquímica para microscopia de luz.

Fragmentos da bolsa da bochecha incluídos em parafina foram cortados no micrótomo com uma espessura de 5 $\mu\text{m}$ . Após aquecimento em estufa a 37°C por 15 minutos para melhor adesão dos cortes à lâmina, estes foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool. A peroxidase endógena foi inativada por solução contendo peróxido de hidrogênio (Reagen 951312) a 3% em metanol durante 15 minutos em câmara escura. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com soro normal de cabra a 1% diluído em tampão fosfato de sódio (PBS) durante 30 minutos. Em seguida, a recuperação dos sítios antigênicos ocorreu de duas maneiras: para as proteínas do citoesqueleto foi utilizado o tampão citrato de sódio em banho-maria a 98°C durante 20 minutos, enquanto os componentes da matriz extracelular, tripsina a 0,1% diluída em PBS durante 15 minutos a 37°C. A recuperação antigênica foi omitida para algumas proteínas que são preservadas evolutivamente e, dessa forma, apresentam numerosos sítios antigênicos já expostos. Subseqüentemente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários em câmara úmida, *overnight*, a 4°C. Para a revelação da reação imune utilizamos o Kit LSAB da Dako, esse kit é composto por um anticorpo secundário biotilado conjugado a enzima estreptavidina, sendo esta reação revelada pelo substrato 3,3 – diaminobenzidina tetrahydrocloridido (cromógeno –

DAB). Os controles negativos foram obtidos através da omissão do anticorpo primário. Os cortes foram corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com entelan. A tabela 1 mostra os anticorpos, clones, diluições e fabricantes utilizados em ambas as imunohistoquímicas, microscopia de luz (M.L) e microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T).

### 3.2.7 Imunohistoquímica para microscopia eletrônica de transmissão.

Para microscopia eletrônica, os fragmentos incluídos em cápsulas BEEM contendo a resina hidrofílica L.R.White, foram cortados em seções ultrafinas (70nm) no ultramicrotomo e coletados em grades de níquel de 200 mesh. Durante trinta minutos, os cortes foram incubados em cloreto de amônio 50mM, lavadas em PBS/BSA 1 e 3% para bloqueio de sítios inespecíficos por 30 minutos e incubados com os anticorpos primários. O anticorpo secundário utilizado seguiu a especificidade do anticorpo primário; para anticorpo primário do tipo monoclonal, o anticorpo secundário utilizado foi IgG conjugado com ouro coloidal (SIGMA); para anticorpo primário policlonal, o anticorpo secundário utilizado foi a Proteína A- conjugada com ouro coloidal. Após as lavagens as grades foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo por 1h e visualizados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906.

**TABELA 1.**

Identificação, fonte e diluições dos anticorpos utilizados.						
Anticorpo	Clone	Marca	Espécie e tipo	Recuperação antigênica	Diluição M.L	Diluição M.E.T
Actina	A2066	Sigma (St. Louis CO)	Anti-coelho Policlonal	Não	01:50	01:25
Talina	8d4	Sigma (St. Louis CO)	Anti-camundongo Monoclonal	Sim	01:25	01:10
$\alpha$ – actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)	1A4	Dako Ltd	Anti-camundongo Monoclonal	Não	01:25	01:10
Vimentina	V9	Novo Castra (Newcastle, UK)	Anti-camundongo Monoclonal	Sim	01:25	01:10

Laminina	4C7	Dako Ltd	Anti-camundongo Monoclonal	Sim	01:100	01:50
Colágeno IV	CIV 22	Dako Ltd	Anti-camundongo Monoclonal	Sim	01:100	01:50

---

M.L – Microscopia de luz

M.E.T – Microscopia eletrônica de transmissão

---

### 3.2.8 Quantificação imunohistoquímica (Score)

A expressão dos componentes do citoesqueleto e da matriz extracelular foi avaliada por microscopia de luz, através de um sistema semiquantitativo baseado em uma escala de intensidade de imunomarcção. A escala consistia em 4 graus numerados de 0 a 3, no qual, 0 significa nenhuma marcação; 1 pouca marcação, 2 marcação moderada e 3 forte marcação. Em cada grupo foram analisadas 50 imagens, na objetiva de imersão em óleo com número de abertura de 1,4. Erro! Fonte de referência não encontrada. A quantificação imunohistoquímica (*score*) foi definida quando um número mínimo de cinquenta por cento dos vasos apresentavam intensidade de imunomarcção que correspondiam à classificação estimada.

### 3.2.9 Análise estatística.

Todos os dados são apresentados em médias com seus erros padrões e testados com a análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de Tuckey no programa estatístico Graph Pad Prisma versão 5.0 (GraphPad Software San Diego, USA). Para todos os casos o nível de significância escolhido foi de 95% ( $p < 0,05$ ) Erro! Fonte de referência não encontrada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Glicemia e massa corporal

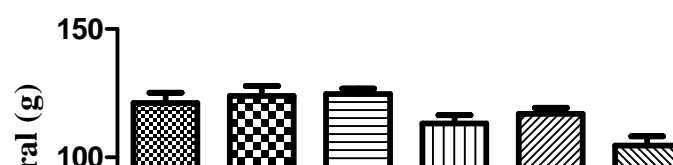
A glicemia e a massa corporal dos animais estudados foram medidas imediatamente antes do experimento (dia zero) e no 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> dia de indução do diabetes, 6<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia de evolução da doença. Somente animais que apresentavam peso entre 100-130g e glicemia  $\leq$  110 mg/dl foram selecionados para o presente trabalho. Todos os animais que receberam injeção de estreptozotocina na dose de 50mg/kg desenvolveram hiperglicemia após o terceiro (3<sup>o</sup>) dia de administração.

A massa corporal média dos animais durante o período experimental apresentou uma variação de cerca de 5% no grupo controle ( $121 \pm 3,9$ g no dia zero e  $128,4 \pm 4,1$  g no 15<sup>o</sup> dia)

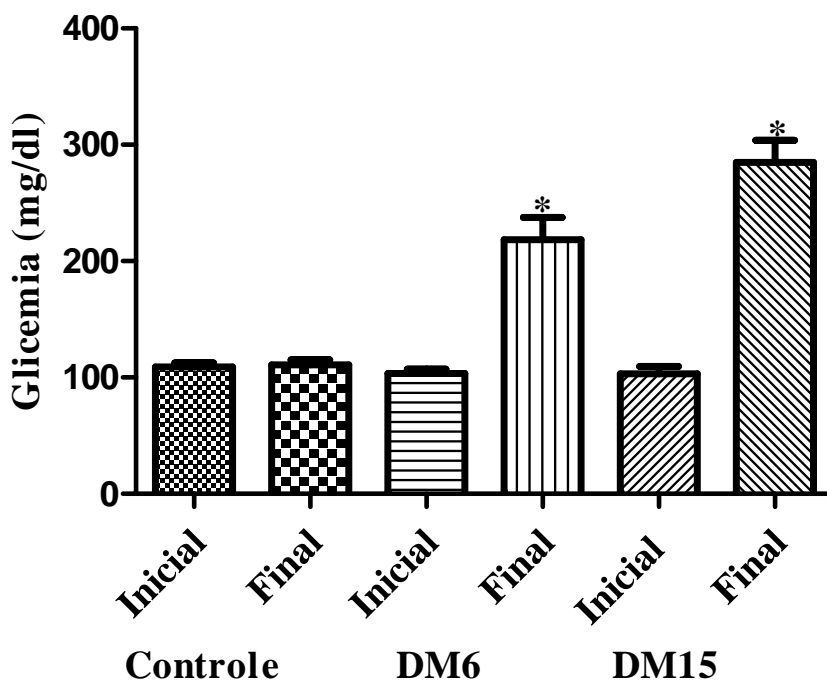
$P= 0,004$ . No grupo diabético houve uma diminuição significativa na massa corporal em ambos os grupos (Grupo DM6:  $123,5 \pm 4,1$ g no dia zero e  $115 \pm 2,4$  g no 6º dia; Grupo DM15:  $116,0 \pm 1,8$  e  $102 \pm 2,6$  g no 15º dia). Os valores de  $P$  para todas medidas acima citadas foi significativo  $P \leq 0,05$  (Figura 5).

Com relação à glicemia, animais do grupo controle iniciaram o experimento com uma glicemia média de  $109$  mg/dl  $\pm 3,6$  e glicemia média de  $110$  mg/dl  $\pm 4,1$  ao final do período experimental. Entretanto, no grupo diabético encontramos glicemia duas a três vezes maiores em relação aos animais controle (Grupo DM6:  $103$ mg/dl  $\pm 4,2$  no dia zero e  $218,0 \pm 18,00$  mg/dl no 6º dia; Grupo DM15:  $103$ mg/dl  $\pm 6,2$  e  $290 \pm 18,9$  mg/dl no 15º dia). Os valores de  $P$  para todas as medidas acima citadas foi significativo  $P \leq 0,05$  (Figura 6).

A significância estatística foi determinada usando teste T de *Student* pareado entre dois grupos e entre tempos (inicial x final) e *one-way* ANOVA para comparação entre os três grupos.







**Figura 6.** Níveis glicêmicos nos grupos controle e diabéticos com 6 dias (DM6) e 15 dias (DM15) de evolução da doença, medida ao final do período experimental. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão e um  $n= 8$  animais. A significância estatística foi determinada usando ANOVA *one-way* seguido de pós- teste de Tuckey. (\*) Significância estatística com  $P= 0,002$  quando comparado ao grupo controle.

## 4.2 Parâmetros funcionais microcirculatórios.

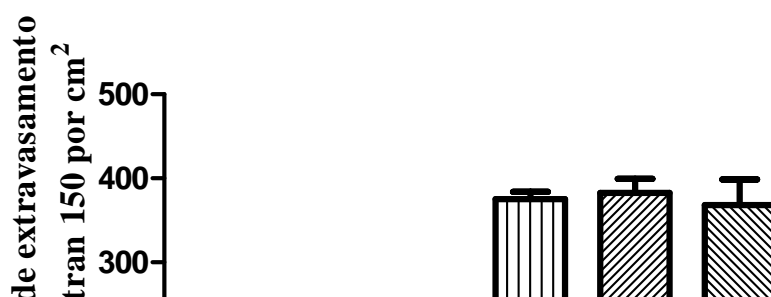
### 4.2.1 Permeabilidade vascular

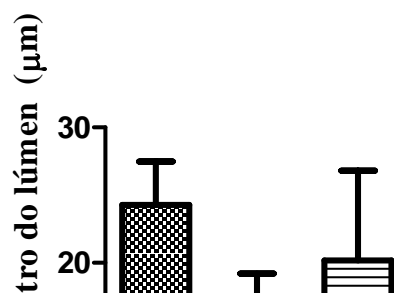
A permeabilidade da membrana vascular à histamina foi medida nas vênulas pós-capilares por determinação do número de pontos de extravasamento (*leaks sites*). O número de pontos de extravasamento foi medido em dois e cinco minutos após aplicação intravenosa de histamina, e revelado pela medida de intensidade de fluorescência do FITC. Nos animais diabéticos, a resposta à histamina foi menor em relação aos animais controle, no tempo de dois minutos. Diabéticos com 6 e 15 dias de evolução apresentaram respectivamente  $105\pm 3$  e

112±8 pontos de extravasamento/cm<sup>2</sup> (*leaks sites*) enquanto nos animais controle medimos 158±13 pontos de extravasamento ( $P=0,0035$ ). Embora com dois minutos após a aplicação de histamina seja possível a visualização de pontos de extravasamento, o pico de resposta vascular normalmente ocorre entre 3 e 5 minutos, seguido por diminuição do extravasamento entre 10 e 20 minutos após a administração de histamina. A resposta à histamina não foi significativamente diferente entre os grupos diabético e controle após cinco minutos da aplicação de histamina ( $P=0,88$ ). O número de pontos de extravasamento foi de 375±8 para o grupo controle, 382,6±16 para o grupo diabético com 6 dias e 368,2±30 para os diabéticos com 15 dias (Figura 7).

#### 4.2.2 Reatividade vascular

A reatividade vascular foi analisada através da medição do diâmetro da luz dos vasos antes e 10 minutos após a aplicação de acetilcolina a 10<sup>-4</sup> mmol em arteríolas e vênulas com diâmetro interno ≤ 90µm. Após a administração de acetilcolina, uma diminuição no diâmetro do lúmen foi observada em arteríolas de animais do grupo diabético embora este resultado não tenha encontrado significância estatística ( $P= 0,7$ ). Também não houve significância estatística em vênulas ( $P= 0,3$ ) (Figura 8).





**Figura 8.** Relaxamento induzido pela acetilcolina ( $10^{-4}$ mmol) em arteríolas e vênulas em animais controle e diabéticos com 6 (DM6) e 15 dias (DM15) de evolução da doença. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão das diferenças do diâmetro do lúmen antes e 10 minutos após a administração da acetilcolina,  $n= 5$  animais. A significância estatística foi determinada usando o ANOVA *one-way* seguido de pós-teste de Tuckey. Valor de  $P= 0,7$  para arteríolas e  $P= 0,3$  para vênulas.

### 4.3 Análises morfométrica e estereológica.

O espessamento da parede vascular foi determinado por análise morfométrica das camadas íntima e média de arteríolas e vênulas, considerando três parâmetros: diâmetro do lúmen, espessura da camada, relação espessura da camada/lúmen. Os vasos analisados apresentavam diâmetro interno entre 25 e 44  $\mu\text{m}$ , o que contribuiu para a homogeneidade da amostra. A tabela 2 mostra todos os dados obtidos nesta análise. Não houve diferença significativa nos parâmetros morfométricos analisados. De maneira similar, os resultados concernentes à densidade por área ( $QA$ ) e densidade de volume ( $Vv$ ) também não mostraram significância estatística.

**TABELA 2.**

	Controle				Diabéticos de 6 dias				Diabéticos de 15 dias									
	Arteriolas		Vênulas		Arteriolas		Vênulas		Arteriolas		Vênulas							
<i>Espessamento da túnica íntima e média (<math>\mu\text{m}</math>)</i>																		
<i>Diâmetro do lúmen</i>	31	±	2,7	40	±	3	33	±	1,2	42	±	2,4	25	±	2,5	35	±	3,1
<i>Espessura da parede</i>	5,7	±	0,7	3,6	±	0,6	5,4	±	0,9	2,7	±	0,4	3,8	±	0,4	2,4	±	0,2
<i>Taxa parede:lúmen</i>	0,2		0	0,1		0	0,2		0	0,1		0	0,2		0	0,1		0
<i>Espessamento da túnica média (<math>\mu\text{m}</math>)</i>																		
<i>Diâmetro do lúmen</i>	38	±	3,7	41	±	2,4	30	±	3,8	32	±	2,1	28	±	7,4	39	±	5,4
<i>Espessura da parede</i>	5,3	±	0,3	2,6	±	0,2	5,4	±	0,2	2,5	±	0,1	5,0	±	0,8	2,4	±	0,1
<i>Taxa parede:lúmen</i>	0,1		0	0,1		0	0,2		0	0,1		0	0,2		0	0,1		0
<i>Densidade por área (QA) (<math>\mu\text{m}^2 \cdot 10^2</math>)</i>																		
<i>QA</i>	3,2	±	0,7	8,8	±	1,3	3,2	±	0,5	7,2	±	1	3,5	±	0,7	9,7	±	1
<i>Densidade de volume (Vv) (%)</i>																		
<i>Vv</i>	5,5	±	1,3	11	±	1,5	5,3	±	1,1	11	±	1,6	5,2	±	1,4	10	±	1,9

Os dados são mostrados como médias e seus erros padrões (EPM). O valor de *P* não foi significativo para nenhum parâmetro analisado.

#### 4.4 Imunohistoquímica à microscopia de luz.

Para investigar as possíveis alterações das proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular nos vasos da microcirculação de hamsters diabéticos e controles, um sistema semiquantitativo foi construído com base em uma escala de intensidade de imunomarcção (*score*). A tabela 3 mostra a distribuição imunohistoquímica dos componentes do citoesqueleto em arteriolas e vênulas dos grupos diabéticos e controle.

##### 4.4.1 Citoesqueleto

A expressão da actina foi fracamente aumentada no endotélio e células musculares lisas de arteríolas do grupo com 6 dias de Diabetes Mellitus, quando comparado ao grupo controle. No grupo com 15 dias de Diabetes Mellitus não houve alteração da expressão da actina em relação ao grupo controle (GC), porém ocorreu um decréscimo da marcação em relação ao grupo diabético de 6 dias (GC, score 1; DM6, score 2; DM15 score 1). As células endoteliais e musculares lisas apresentaram imunoreatividade para actina em todos os grupos, entretanto no grupo controle é possível observar uma marcação descontínua pela parede vascular. No grupo DM 6 dias a parede vascular foi homoganeamente reativa para actina. A intensidade da marcação foi diminuída na parede de arteríolas do grupo DM15, que se apresentou descontínua (Figura 9 a-c). Nas vênulas, a actina foi igualmente expressa em todos os grupos (Figura 9 d-f).

Um importante aumento na expressão de talina no endotélio, nas células musculares lisas e fibroblastos foi observado em arteríolas do grupo DM6, quando comparado com os demais grupos. A expressão dessa mesma proteína foi semelhante entre o grupo controle e DM15 (CG, score 1; DM6, score 3; DM15, score 1) sendo principalmente expressa na camada íntima e adventícia (Figura 10 a-c). Nas vênulas as células endoteliais foram pouco reativas para a talina em todos os grupos não apresentando diferenças (CG, score 1; DM6, score 1; DM15, score 1) (Figura 10 d-f).

Não foi encontrada diferença significativa na reatividade para  $\alpha$ -actina de músculo liso entre as arteríolas (CG, score 2; DM6, score 2; DM15, score 2) (Figura 11 a-c). Células musculares lisas venulares do grupo diabético de 6 dias mostraram maior reatividade para  $\alpha$ -actina de músculo liso, quando comparado com os demais grupos. É possível observar o citoplasma das células musculares lisas fortemente marcado (CG, score 1; DM6, score 3; DM15, score 1) (Figura 11 d-f).

A vimentina apresentou expressão moderadamente aumentada em arteríolas e vênulas em ambos os grupos de animais diabéticos (CG, score 1; DM6, score 2; DM15, score 2). No grupo controle as células endoteliais arteriolas foram positivas para vimentina, entretanto, nos grupos diabéticos as células endoteliais apresentaram imunoreatividade maior para vimentina, caracterizando um aumento moderado desta proteína nos vasos da microcirculação de animais diabéticos (Figura 12 a-c). Para as vênulas o mesmo padrão de marcação foi observado (Figura 12 d-f). Tanto nas arteríolas quanto nas vênulas ocasionalmente algumas células musculares lisas mostraram fraca positividade para vimentina.

#### 4.4.2 Matriz extracelular

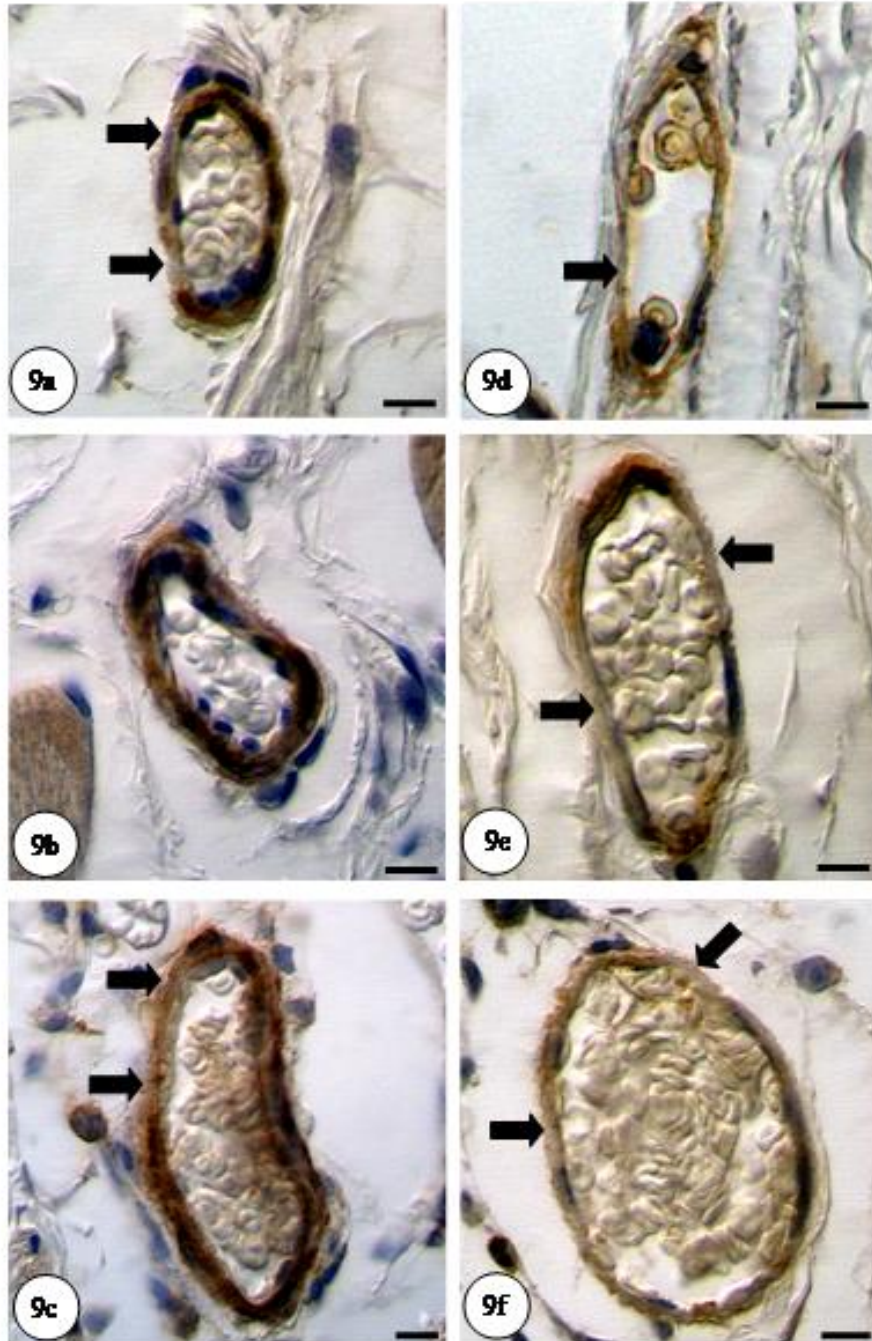
Uma forte marcação para laminina foi detectada em arteríolas de animais dos dois grupos diabéticos. No grupo controle, somente a túnica íntima foi positivamente marcada para laminina. Nos grupos diabéticos a expressão da laminina se estendeu para as outras duas túnicas (médica e adventícia), sendo observado células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos intensamente marcados (CG, score 2; DM6, score 3; DM15, score 3) (Figura 13 a-c). Para as vênulas embora a marcação tenha sido restrita a camada íntima para todos os grupos analisados, esta túnica foi mais reativa nos vasos de animais diabéticos (CG, score 1; DM6, score 2; DM15, score 2) (Figura 13 d-f).

A camada endotelial e subendotelial de arteríolas e vênulas mostrou uma forte marcação para o colágeno IV em todos os grupos analisados, não sendo observada diferença na imunoreatividade entre os grupos diabéticos e controle. Nas vênulas pode-se observar uma marcação descontínua na camada íntima, não havendo diferença entre os grupos. (Figura 14 a-f).

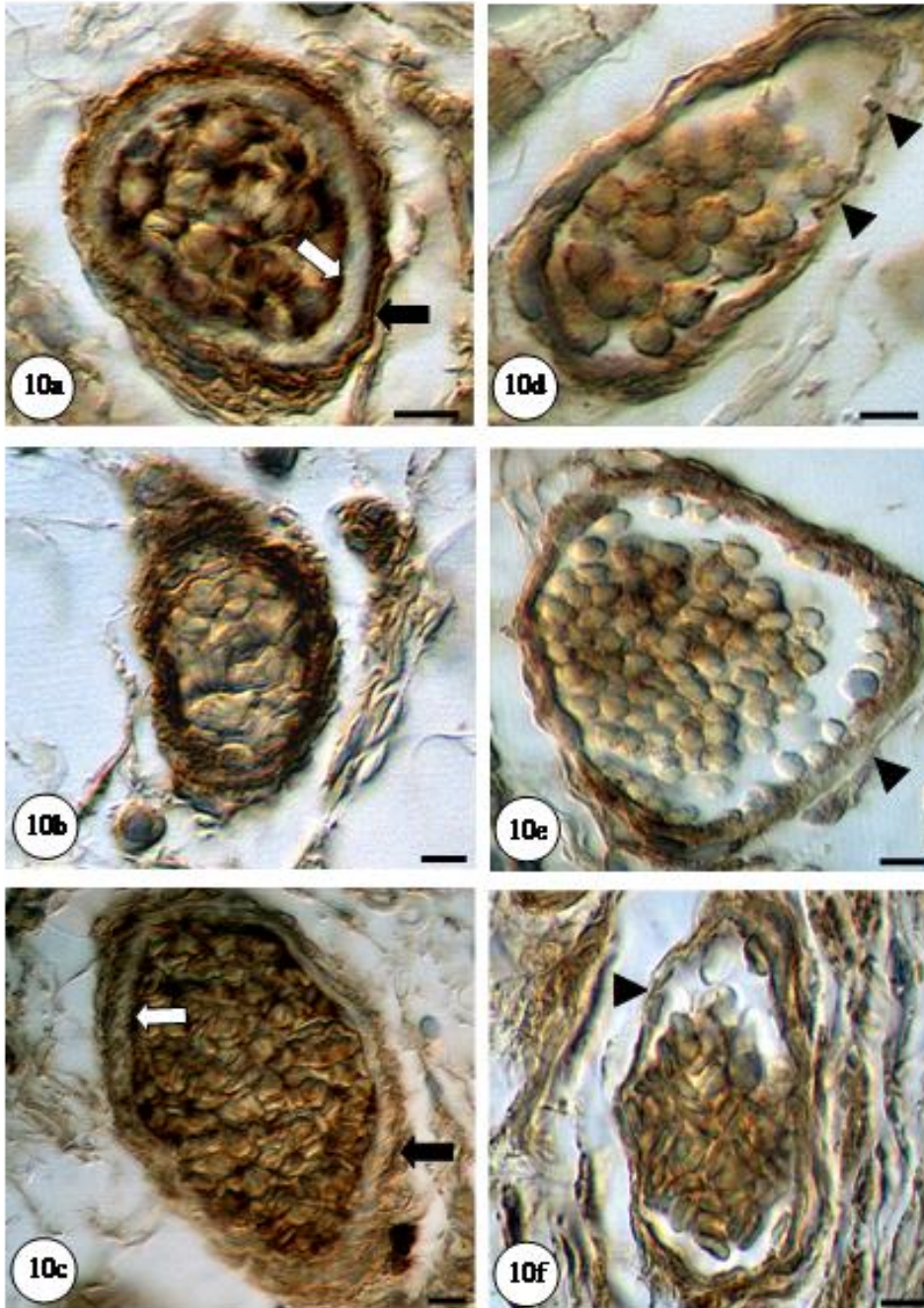
**TABELA 3.**

Padrão de distribuição da expressão imunohistoquímica de actina, talina,  $\alpha$ -SMA, vimentina, laminina e colágeno IV entre os grupos diabéticos e controle por análise semiquantitativa (Score)

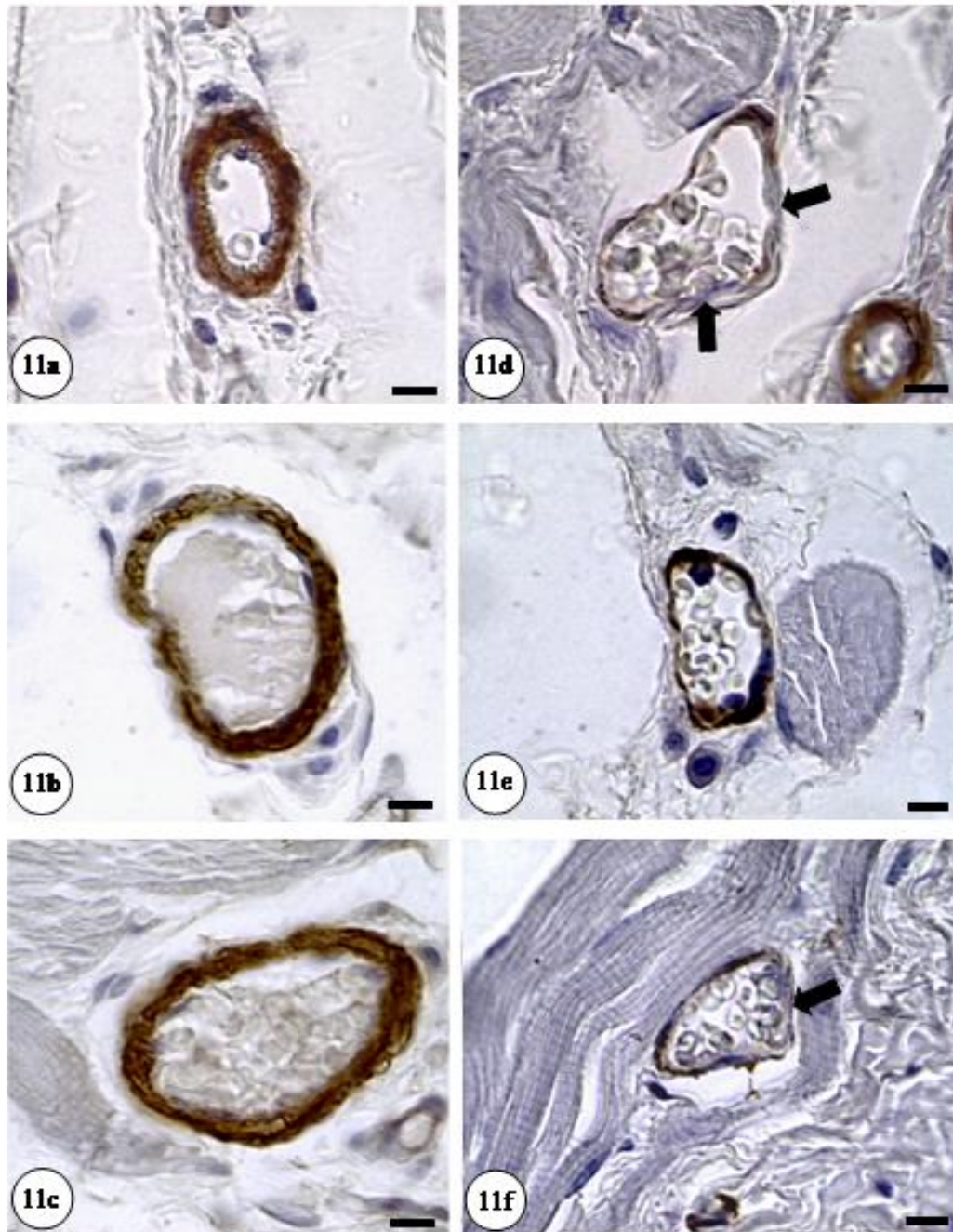
<i>Anticorpos</i>	<i>Controle</i>		<i>Diabéticos com 6 dias</i>		<i>Diabéticos com 15 dias</i>	
	<i>Arteriola</i>	<i>Vênula</i>	<i>Arteriola</i>	<i>Vênula</i>	<i>Arteriola</i>	<i>Vênula</i>
Actina	+	+	++	+	+	+
Talina	+	+	+++	+	+	+
$\alpha$ - SMA	++	+	++	+++	++	+
Vimentina	+	+	++	++	++	++
Laminina	++	+	+++	++	+++	++
Colágeno IV	++	++	++	++	++	++



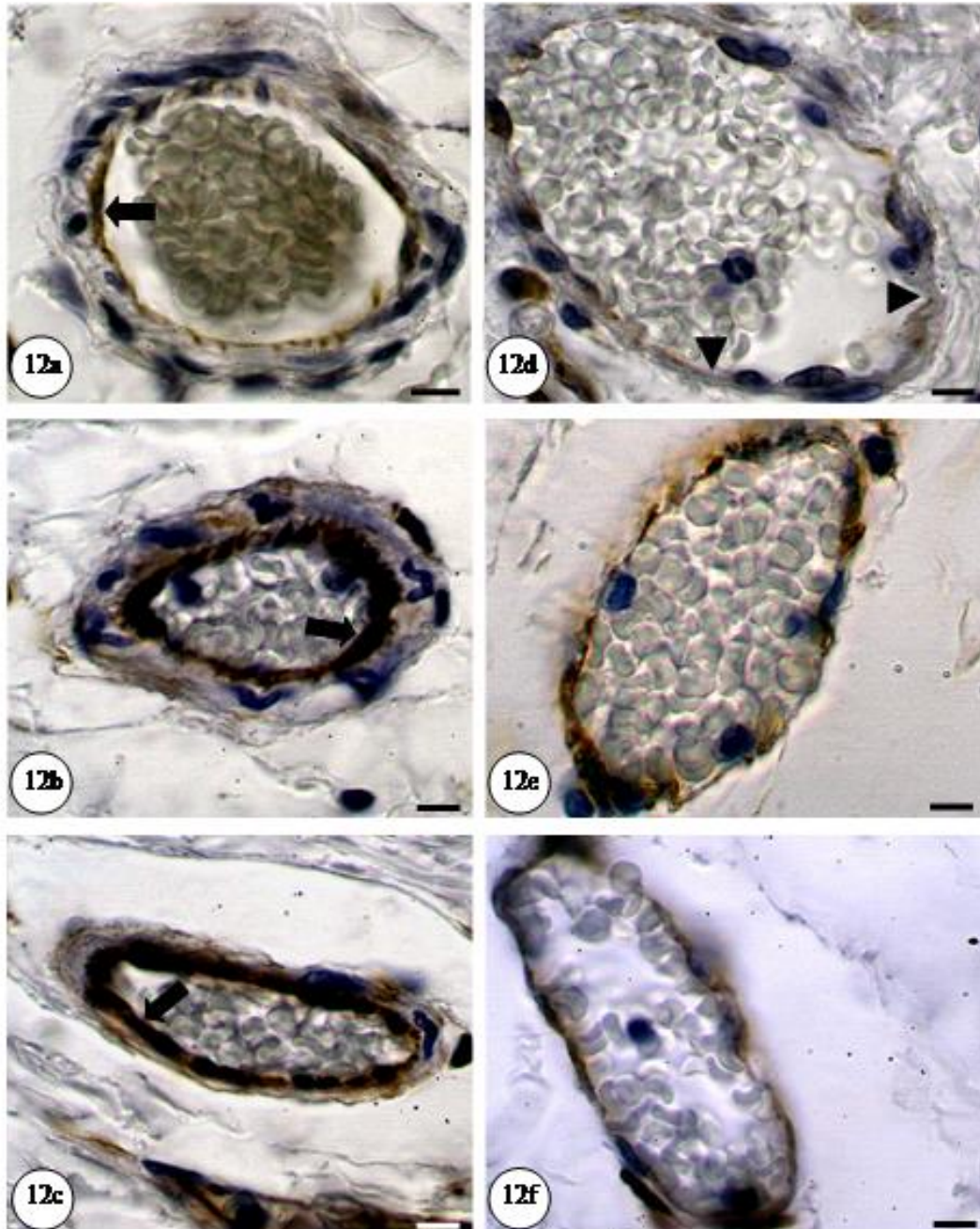
**Figura 9.** Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-actina (tons de marrom). **a.** arteríola do grupo controle. **b.** arteríola do grupo diabético de 6 dias (DM6). **c.** arteríola do grupo diabético de 15 dias (DM15). **d.** vênula do grupo controle. **e.** vênula do grupo diabético de 6 dias. **f.** vênula do grupo diabético de 15 dias. Nas arteríolas aumento da expressão de actina no grupo DM6 com marcação homogênea por toda a parede, nos grupos controle e DM15 marcação descontínua (setas). Nas vênulas, marcação descontínua (setas) e de mesma intensidade na parede vascular de todos os grupos. Barras = 10 $\mu$ m



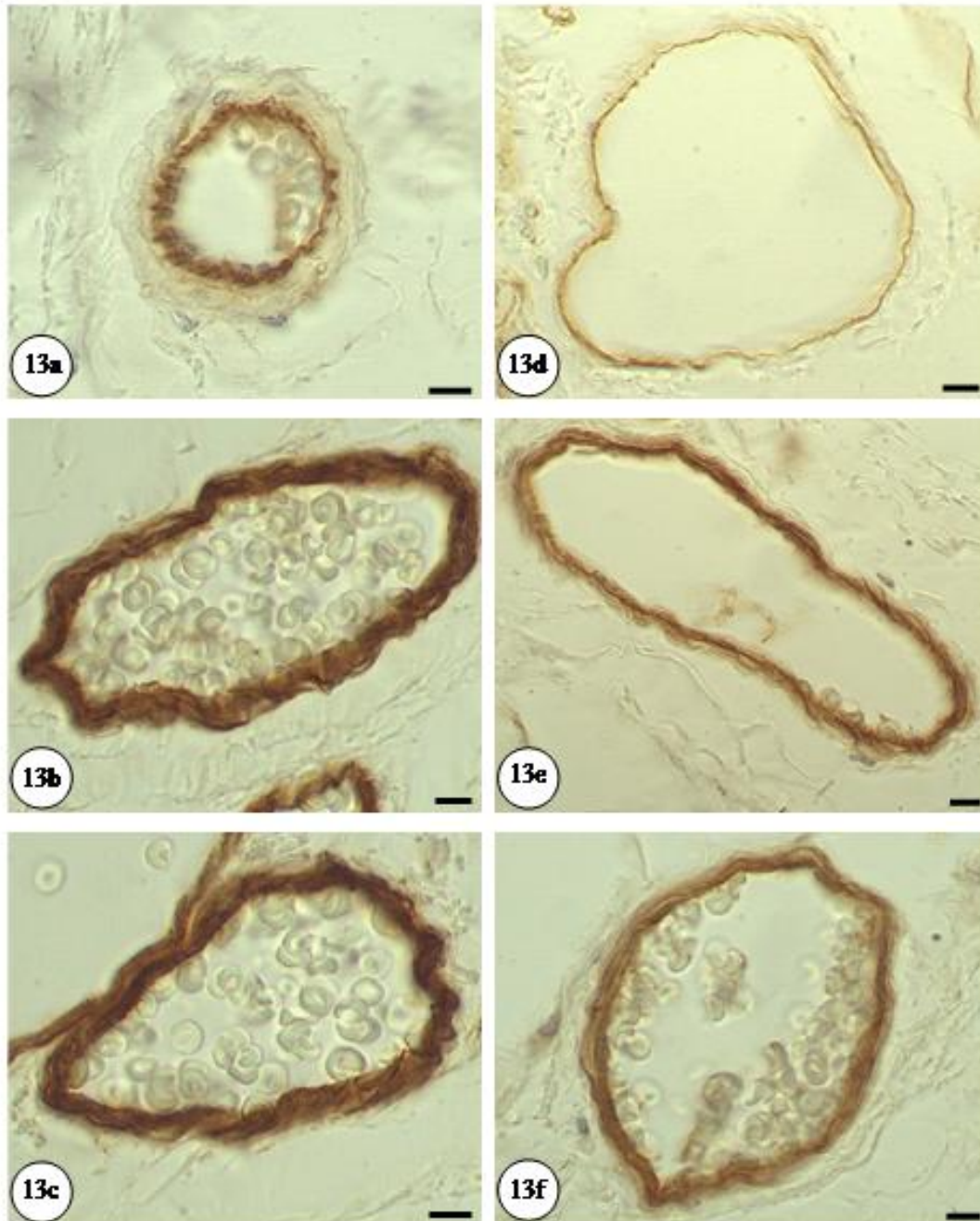
**Figura 10.** Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-talina (tons de marrom). **a.** arteríola do grupo controle. **b.** arteríola do grupo diabético de 6 dias (DM6). **c.** arteríola do grupo diabético de 15 dias (DM15). **d.** vênula do grupo controle. **e.** vênula do grupo diabético de 6 dias. **f.** vênula do grupo diabético de 15 dias. Nas arteríolas aumento da expressão de talina no grupo DM6 com marcação em todas as camadas, nos grupos controle e DM15 marcação restrita às camadas íntima e adventícia (setas). Nas vênulas, marcação descontínua (cabeça de seta) e de mesma intensidade na parede vascular de todos os grupos. Barras = 10 $\mu$ m



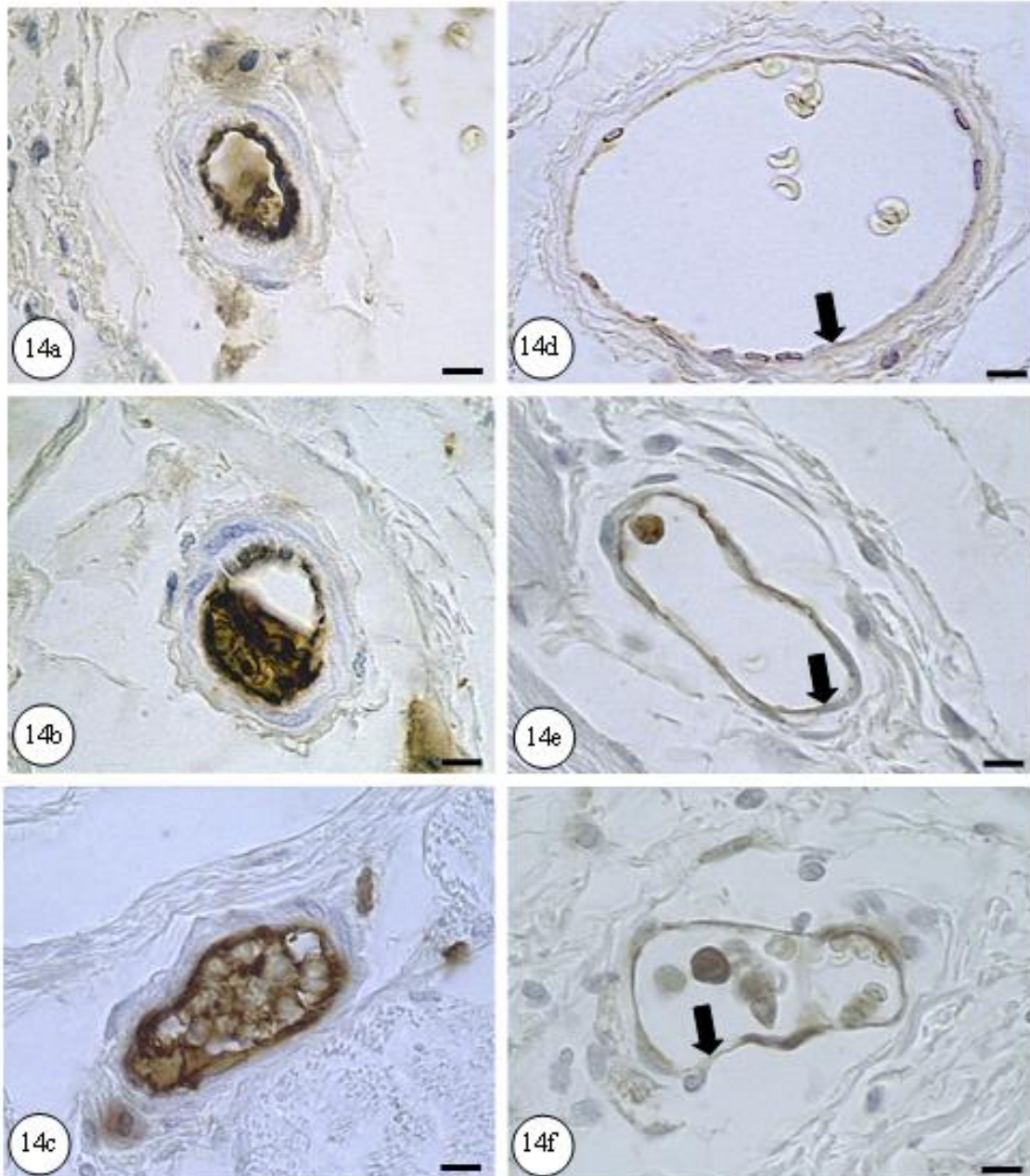
**Figura 11.** Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-alfa actina de músculo liso (alfa-SMA) (tons de marrom). **a.** arteríola do grupo controle. **b.** arteríola do grupo diabético de 6 dias (DM6). **c.** arteríola do grupo diabético de 15 dias (DM15). **d.** vênula do grupo controle. **e.** vênula do grupo diabético de 6 dias. **f.** vênula do grupo diabético de 15 dias. Nas arteríolas observa-se uma marcação homogênea por toda a camada muscular, sem diferença entre os grupos. Nos grupos controle e DM15 as células musculares lisas venulares expressam a alfa-SMA de maneira descontínua (setas), com aumento no grupo DM6, onde a camada muscular apresenta-se homogeneamente imunomarcada. Barras = 10 $\mu$ m.



**Figura 12.** Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-vimentina (tons de marrom). **a.** arteríola do grupo controle. **b.** arteríola do grupo diabético de 6 dias (DM6). **c.** arteríola do grupo diabético de 15 dias (DM15). **d.** vênula do grupo controle. **e.** vênula do grupo diabético de 6 dias. **f.** vênula do grupo diabético de 15 dias. Nas arteríolas as células endoteliais (camada íntima) mostram forte reatividade para vimentina nos grupos DM6 e DM15 sendo esta pouco reativa nas células endoteliais do grupo controle (setas). Nas vênulas, uma marcação descontínua pode ser visualizada nas células endoteliais do grupo controle (cabeças de seta), entretanto esta marcação é homogênea nos grupos DM6 e DM15. Observa-se também imunoreatividade para poucas células musculares lisas em ambos os vasos. Barras = 10 $\mu$ m.



**Figura 13.** Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-laminina (tons de marrom). **a.** arteríola do grupo controle. **b.** arteríola do grupo diabético de 6 dias (DM6). **c.** arteríola do grupo diabético de 15 dias (DM15). **d.** vênula do grupo controle. **e.** vênula do grupo diabético de 6 dias. **f.** vênula do grupo diabético de 15 dias. Nas arteríolas, toda a parede vascular mostra imunoreatividade para laminina nos grupos diabéticos de 6 e 15 dias (DM6) e (DM15), no grupo controle apenas a camada íntima apresenta-se imunomarcada. Vênula do grupo controle com fraca marcação para laminina, entretanto um aumento na imunoreatividade à laminina é observado nos grupos diabéticos de 6 e 15 dias. Barras = 10µm.



**Figura 14.** Fotomicrografias da bochecha do hamster mostrando arteríolas e vênulas imunomarcadas com anticorpo anti-colágeno IV (tons de marrom). **a.** arteríola do grupo controle. **b.** arteríola do grupo diabético de 6 dias (DM6). **c.** arteríola do grupo diabético de 15 dias (DM15). **d.** vênula do grupo controle. **e.** vênula do grupo diabético de 6 dias. **f.** vênula do grupo diabético de 15 dias. A camada íntima foi homoganeamente imunoreativa para o colágeno IV em arteríolas, não havendo diferença entre os grupos. Nas vênulas, pode-se observar marcação descontínua na camada íntima (setas), não havendo diferença entre os grupos. Barras = 10 $\mu$ m.

#### 4.5 Imunohistoquímica à microscopia eletrônica de transmissão.

A análise ultraestrutural da célula endotelial do grupo controle mostrou partículas de ouro coloidal conjugadas à anti-actina próximas a fibras de estresse. No grupo DM6 essas partículas são visualizadas próximo ao envoltório nuclear, a membrana plasmática basal e também ao longo do citoplasma. No grupo DM 15 as partículas aparecem dispersas no citoplasma (Figura 15 a-c).

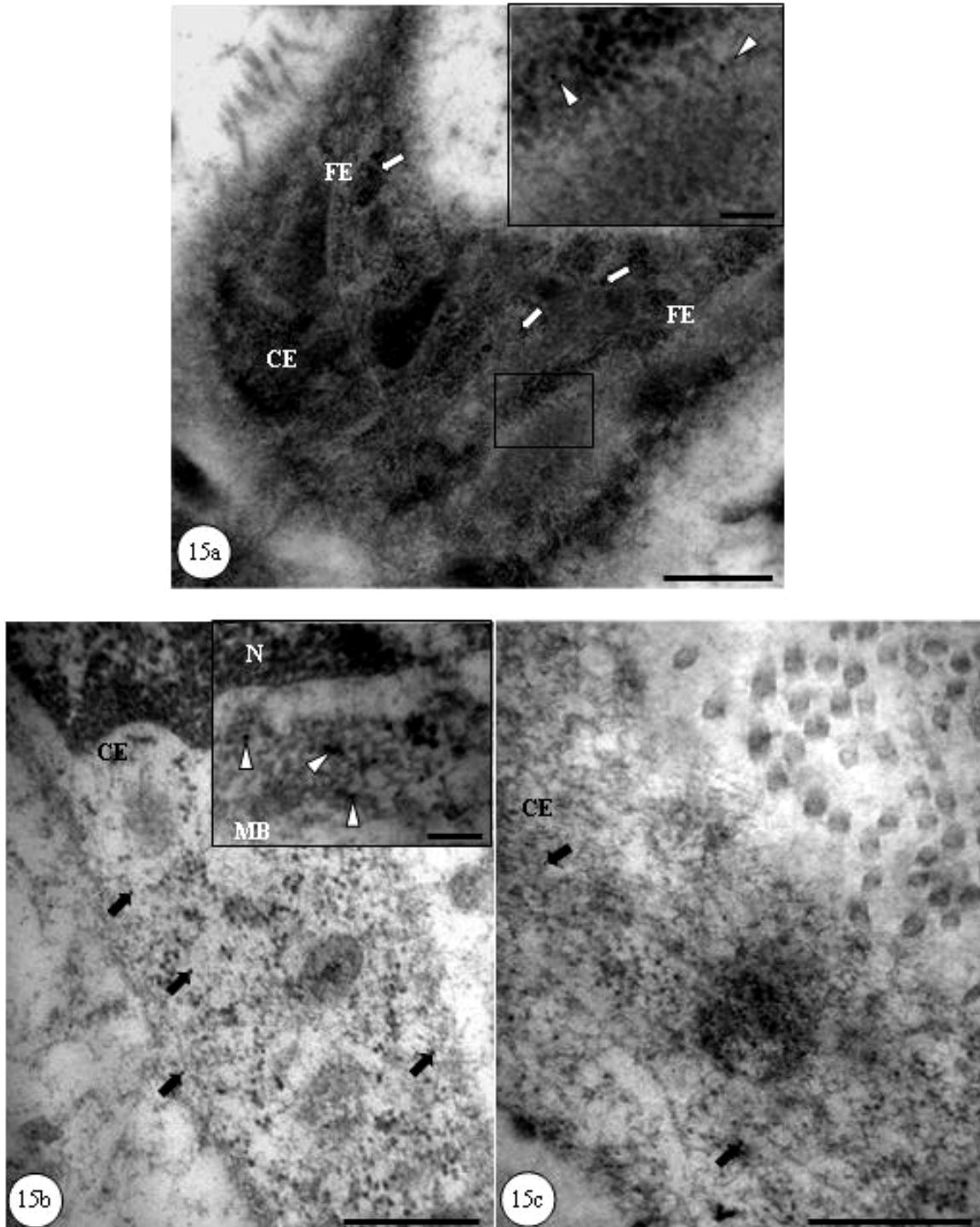
A imunolocalização ultraestrutural da talina revela que no grupo controle, esta proteína se apresenta dispersa no citoplasma e, em região próxima ao núcleo da célula endotelial em aglomerados (*clusters*). Entretanto, no grupo DM6 as partículas de ouro coloidal mostram uma distribuição em faixa próxima à membrana celular. As células musculares lisas também apresentam imunoreatividade para a talina no grupo DM6. No grupo DM15 a talina apresenta distribuição entre vesículas e prioritariamente na membrana celular, formando *clusters* (Figura 16 a-c).

Partículas de ouro coloidal conjugadas a  $\alpha$ -actina de músculo liso são observadas dispersas no citoplasma das células musculares em todos os grupos. Entretanto, no grupo DM6 as partículas são visualizadas em maior número (Figura 17 a-c).

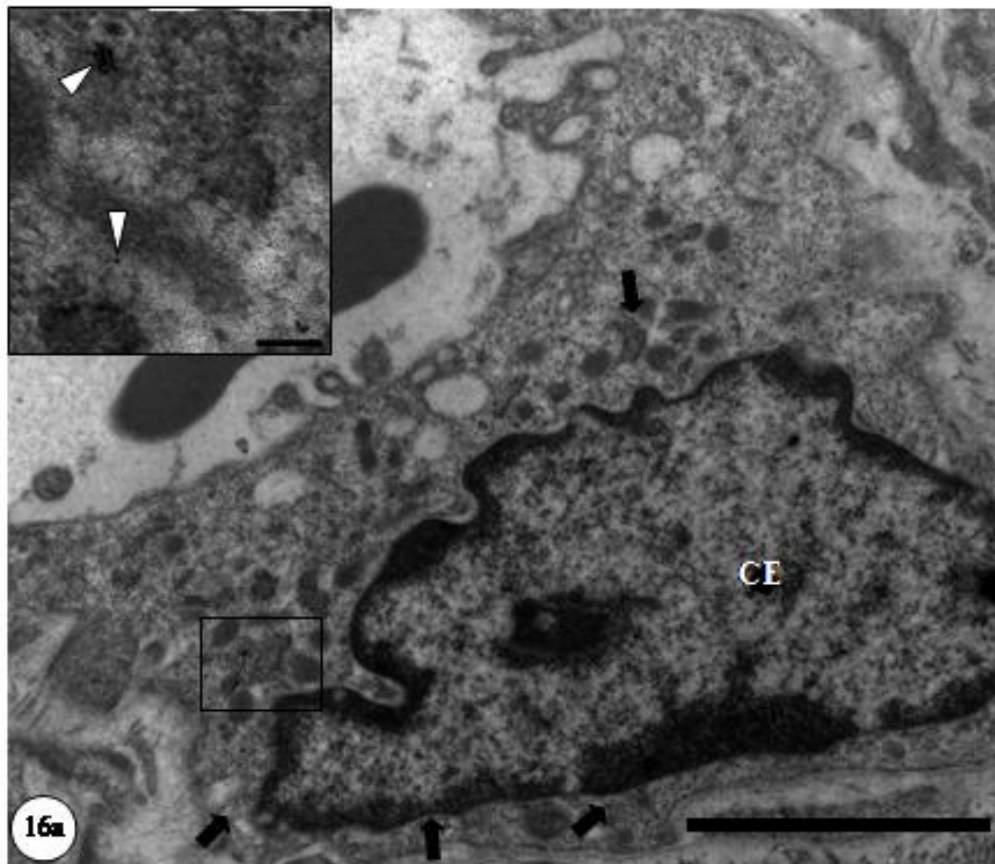
A imunolocalização ultraestrutural da vimentina mostrou em todos os grupos partículas de ouro coloidal dispersas no citoplasma e próximas a membrana celular sendo, essas partículas em maior número nos grupos diabéticos de 6 e 15 dias (Figura 18 a-c).

No grupo controle a célula endotelial e a matriz extracelular apresenta pouca marcação para laminina. Partículas de ouro coloidal são visualizadas dispersas no citoplasma da célula endotelial e na matriz extracelular. No grupo diabético de 6 dias, as partículas de ouro coloidal conjugadas a laminina são evidenciadas em *clusters* na célula endotelial e na matriz extracelular. No grupo diabético de 15 dias a célula endotelial mostra partículas de ouro coloidal no citoplasma e na membrana plasmática formando *clusters*. Na matriz extracelular, muitas partículas de ouro coloidal são visualizadas formando *clusters* (Figura 19 a-f).

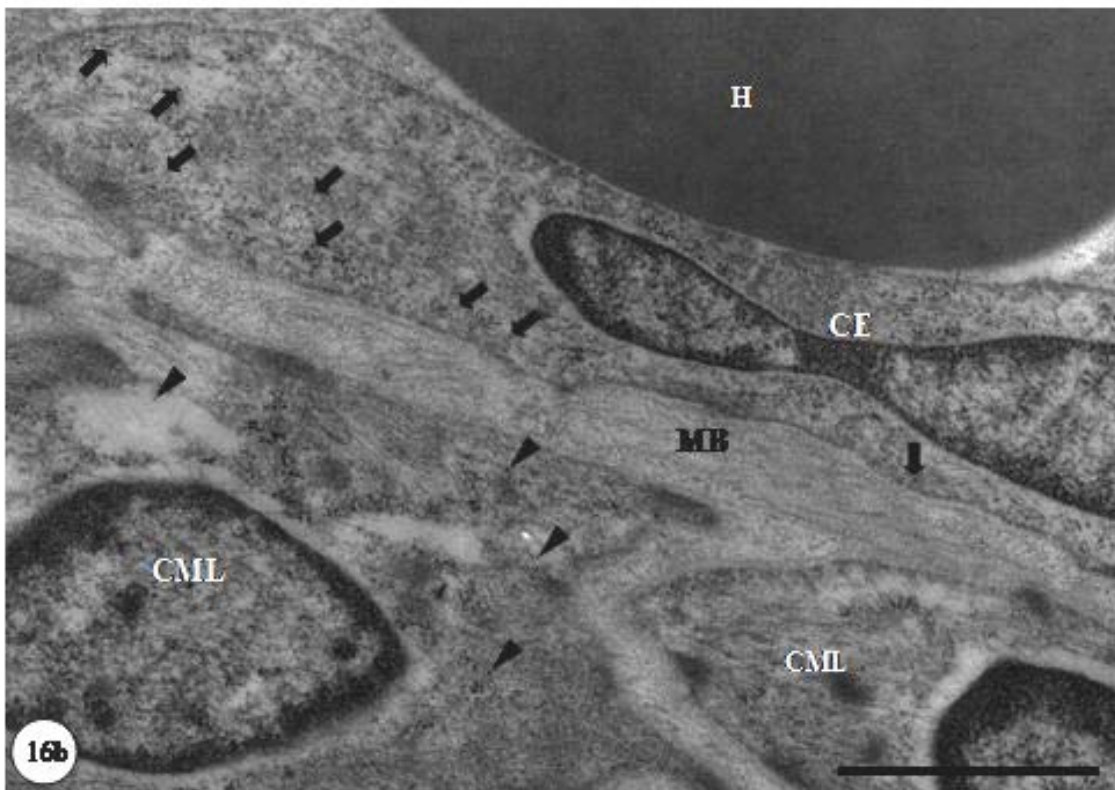
A imunohistoquímica ultraestrutural para o colágeno IV não foi realizada, pois não foi observada diferença na imunoreatividade entre os grupos na microscopia de luz para arteríolas e vênulas.



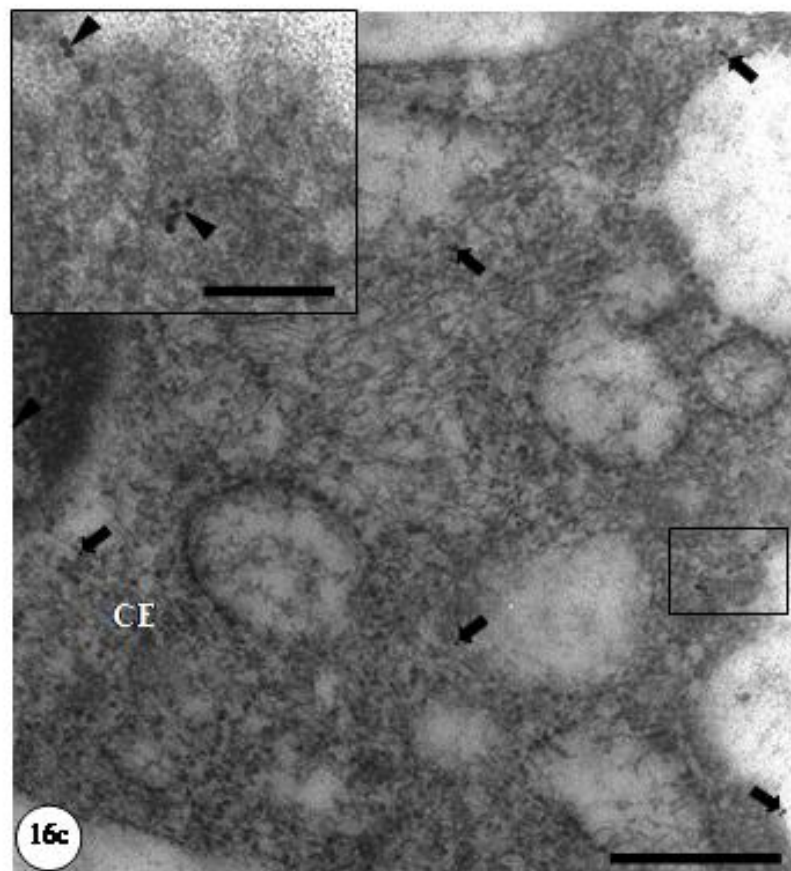
**Figura 15.** Eletromicrografias de célula endotelial (CE) dos grupos controle (15a), diabético de 6 dias (15b) e diabético de 15 dias (15c) imunomarcadas com anticorpo anti-actina conjugada a proteína A-ouro. **15a.** Partículas de ouro coloidal (8-10nm) próximas a fibras de estresse (FE) (setas). Insert mostrando em detalhe a imunomarcagem (cabeças de setas). **15b.** Actina mostra-se dispersa por todo o citoplasma (setas), no insert, próxima ao envoltório nuclear (N) e membrana basal (MB) (cabeças de setas). **15c.** Partículas de ouro coloidal aparecem dispersas no citoplasma (setas). Barras (a)1 $\mu$ m e insert 100nm; (b)0,5 $\mu$ m e insert 100nm; (c)0,5 $\mu$ m.



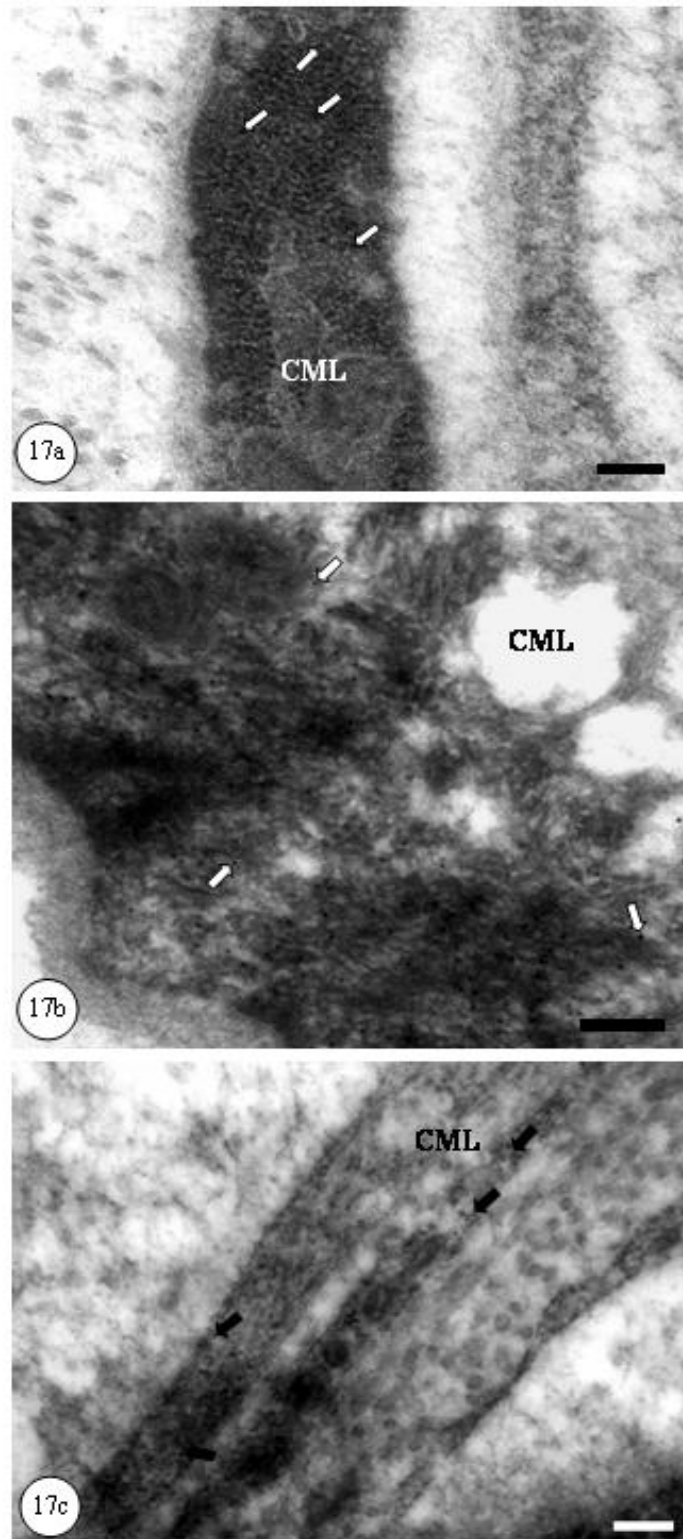
**Figura 16a.** Eletronmicrografia de célula endotelial (CE) do grupo controle (16a), imunomarcada com anticorpo anti-talina conjugada a IgG-ouro. Partículas de ouro coloidal (8-10nm) dispersas no citoplasma próximas ao envoltório nuclear e a organelas citoplasmáticas (setas). Insert mostrando a formação de *clusters* em região próxima ao núcleo (cabeças de setas). Barras = 5  $\mu$ m e insert 100nm.



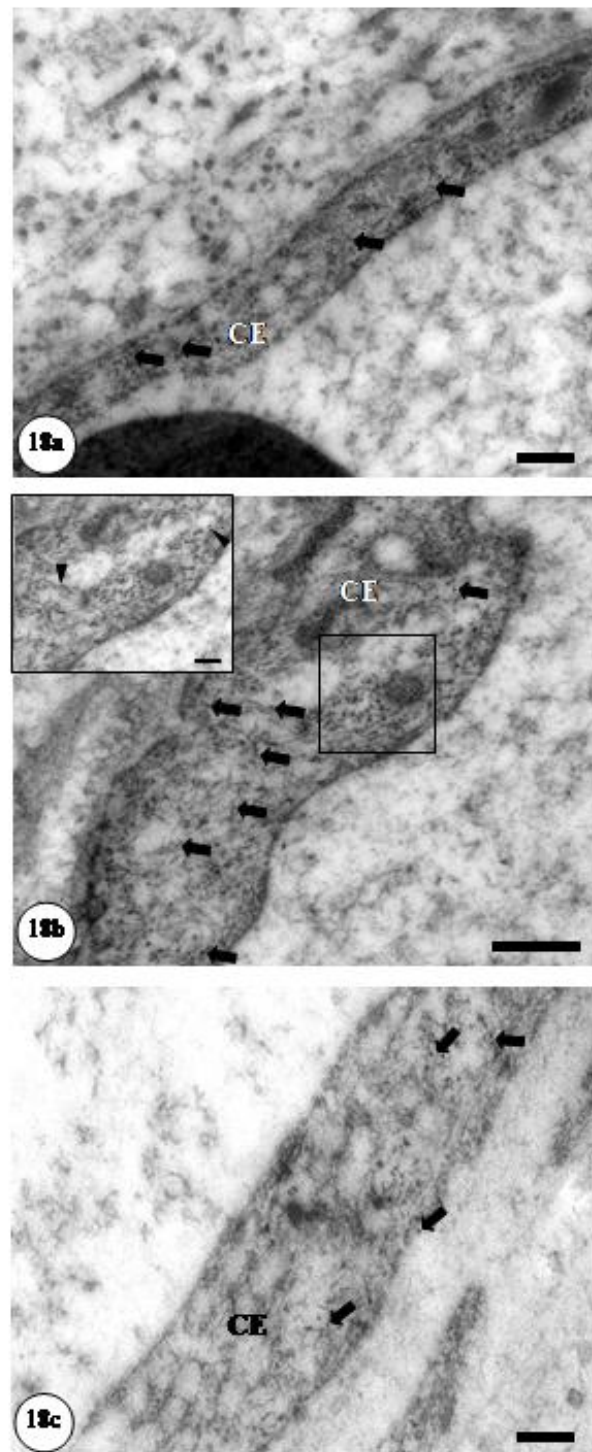
**Figura 16b.** Eletronmicrografia de célula endotelial (CE) e células musculares lisas (CML) do grupo diabético de 6 dias (DM6) imunomarcadas com anticorpo anti-talina conjugada a IgG-ouro. Na célula endotelial as partículas de ouro coloidal (8-10nm) mostram distribuição em faixa no citoplasma próximo à membrana basal (MB)(setas). Nas células musculares lisas, a talina é visualizada dispersa no citoplasma (cabeças de setas). Hemácia (H). Barra = 0,5  $\mu$ m.



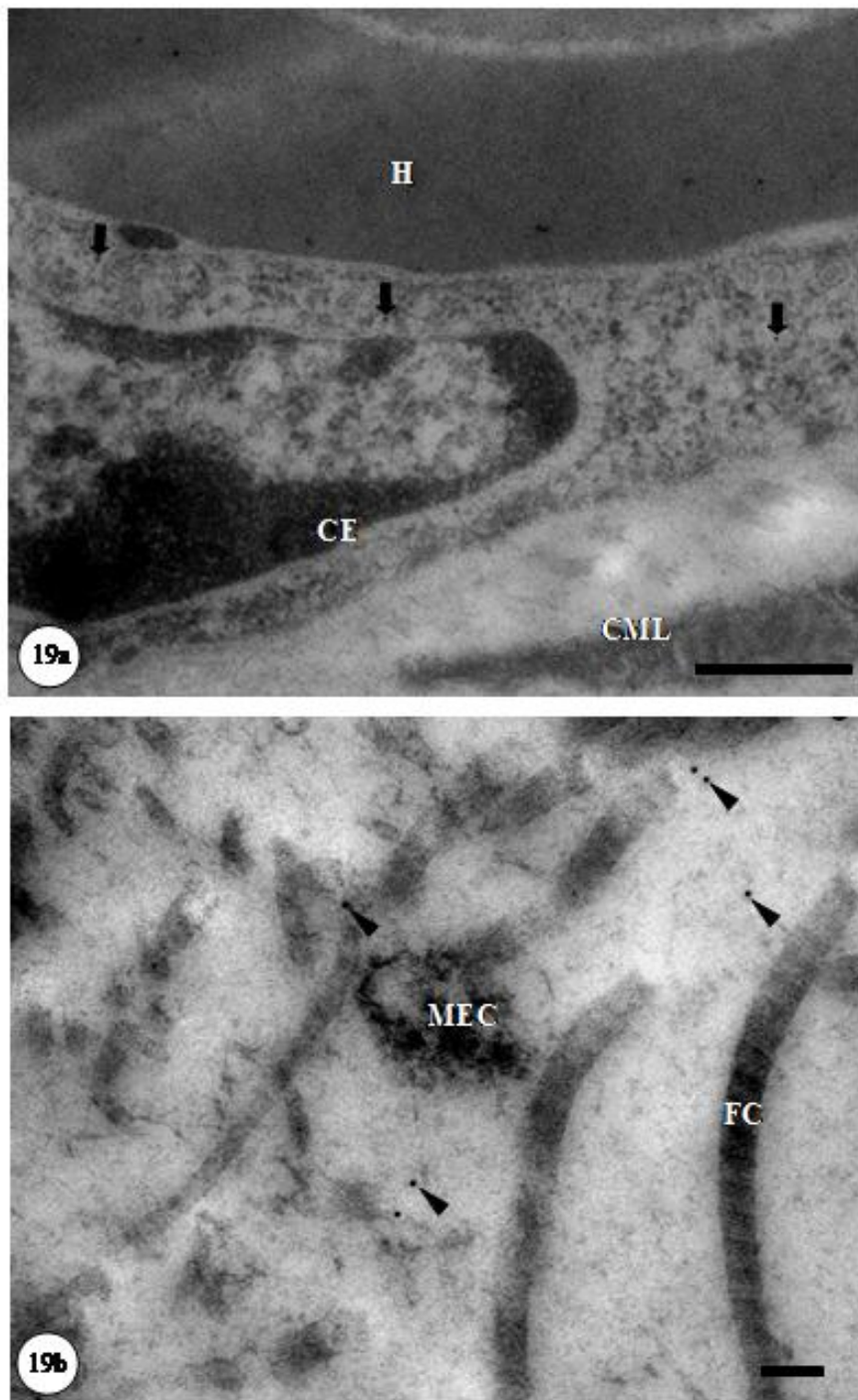
**Figura 16c.** Eletromicrografia de célula endotelial (CE) do grupo diabético de 15 dias imunomarcada com anticorpo anti-talina conjugada a IgG-ouro (8-10nm). A talina se distribui entre vesículas e prioritariamente na membrana celular, formando *clusters* (setas). Em detalhe, a formação de clusters (cabeças de setas no insert). Barra = 0,5  $\mu$ m e insert 100nm.



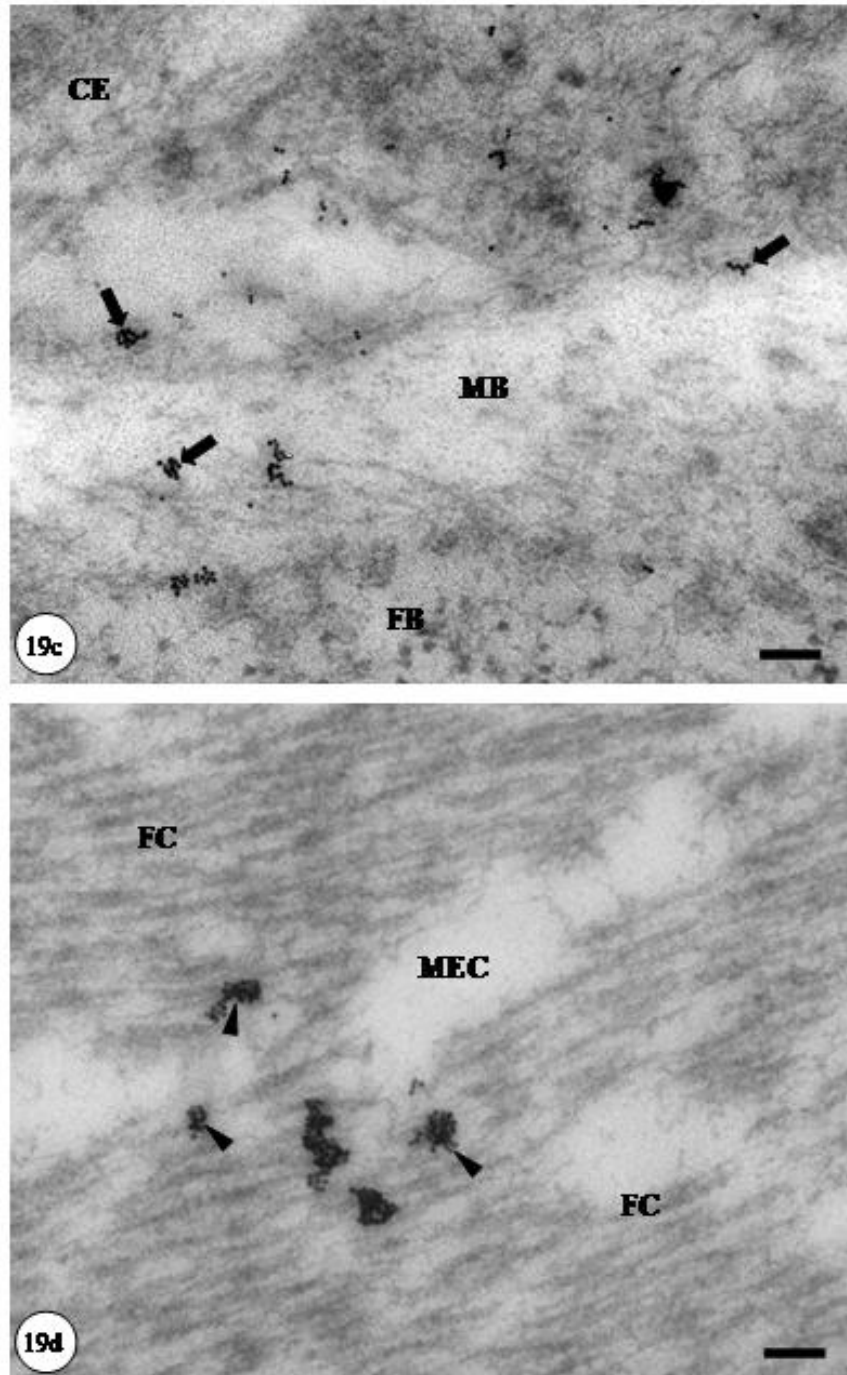
**Figura 17.** Eletromicrografias de células musculares lisas (CML) dos grupos controle (17a), diabético de 6 dias (17b) e diabético de 15 dias (17c) imunomarcadas com anticorpo anti- $\alpha$ -actina de músculo liso conjugada a IgG-ouro. Partículas de ouro coloidal (8-10nm) são visualizadas dispersas no citoplasma das células em todos os grupos sendo no grupo diabético de 6 dias em maior número (setas). Barras = 0,2 $\mu$ m.



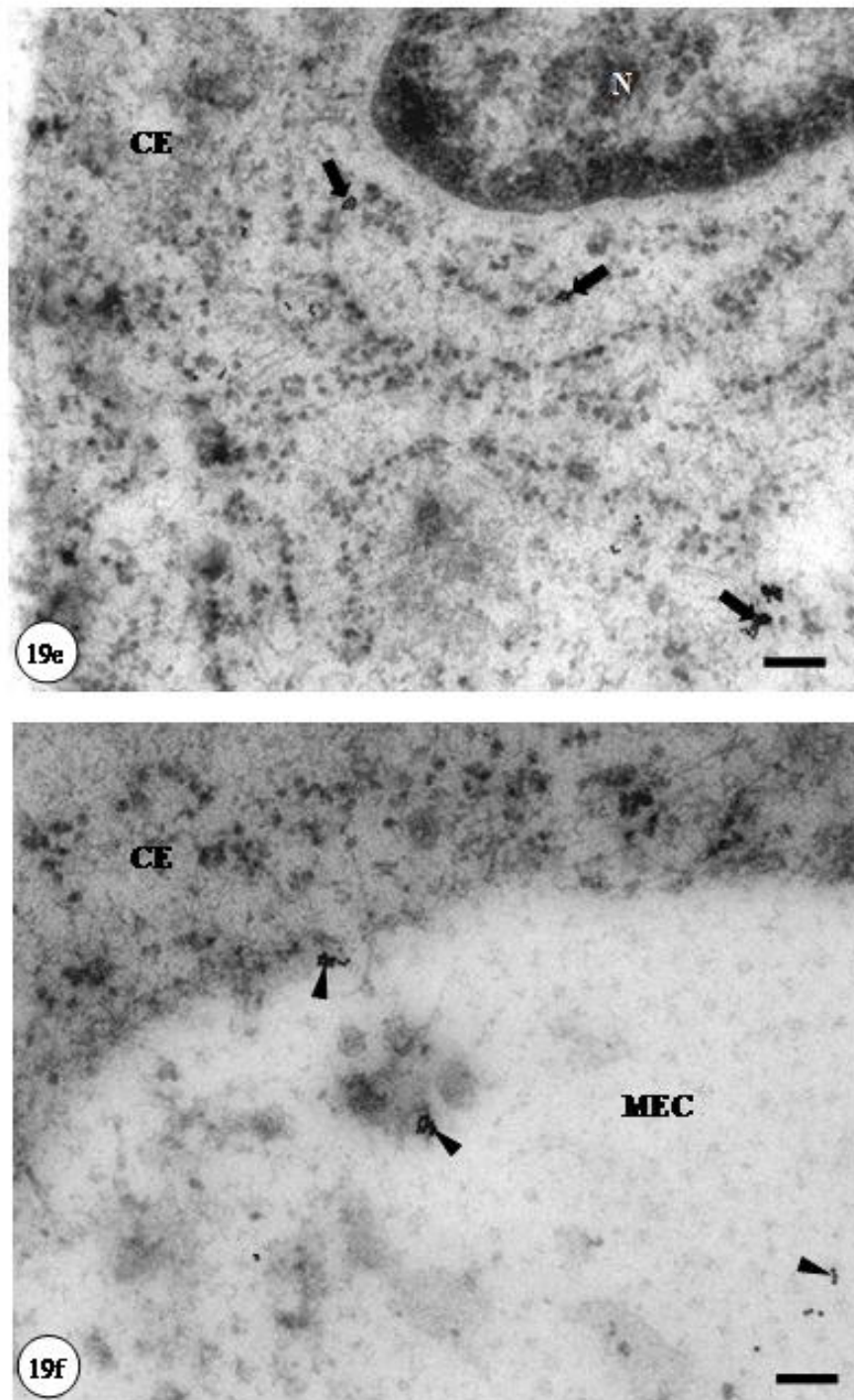
**Figura 18.** Eletromicrografias de célula endotelial (CE) dos grupos controle (18a), diabético de 6 dias (18b) e diabético de 15 dias (18c) imunomarcadas com anticorpo anti-vimentina conjugada a Proteína-ouro. Em todos os grupos, partículas de ouro coloidal (8-10nm) são visualizadas dispersas no citoplasma e próximas a membrana celular (setas), sendo estas em maior número nos grupos diabéticos de 6 e 15 dias. Insert mostrando em detalhe a marcação (cabeças de seta). Barras = (a) 0,2 $\mu$ m; (b) 0,5 $\mu$ m e insert 0,2 $\mu$ m; (c) 0,2 $\mu$ m.



**Figura 19a e b.** Eletronmicrografias de célula endotelial (CE) e da matriz extracelular (MEC) do grupo controle imunomarcadas com anticorpo anti-laminina conjugada a IgG-ouro. **19a.** Célula endotelial pouco marcada para laminina (setas). **19b.** Matriz extracelular com poucas partículas de ouro coloidal próximas a fibras colágenas (FC) (cabeças de setas). Célula muscular lisa (CML); Hemácia (H). Barras = (a) 0,5  $\mu\text{m}$  e (b) 0,2  $\mu\text{m}$ .



**Figura 19c e d.** Eletronmicrografias de célula endotelial (CE) e da matriz extracelular (MEC) do grupo diabético de 6 dias imunomarcadas com anticorpo anti-laminina conjugada a IgG-ouro. **19c.** Célula endotelial mostrando partículas de ouro coloidal em *clusters* (setas) no citoplasma. As partículas de ouro coloidal também são observadas na membrana basal (MB) e no fibroblasto (FB). **19d.** Matriz extracelular com muitas partículas de ouro coloidal dispostas em *clusters* próximas a fibras colágenas (FC) (cabeças de setas). Barras = 100nm.



**Figura 19e-f.** Eletronmicrografias de célula endotelial (CE) e da matriz extracelular (MEC) do grupo diabético de 15 dias imunomarcadas com anticorpo anti-laminina conjugada a IgG-ouro. **19e.** Célula endotelial mostrando partículas de ouro coloidal no citoplasma formando *clusters* (setas), N, núcleo. **19f.** Matriz extracelular com partículas de ouro coloidal dispostas em *clusters* e na membrana plasmática da célula endotelial (cabeças de setas). Barras = 0,2 $\mu$ m.

## **5. DISCUSSÃO**

Está bem estabelecido que a hiperglicemia exerce efeito deletério sobre o endotélio, o regulador da parede vascular <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Alterações no papel modulador desempenhado pelo endotélio e/ou células musculares lisas podem ser um fator crítico e iniciador no desenvolvimento da doença vascular diabética. Quando há descompensação dos níveis séricos de glicose, a produção de  $O^{\cdot-}$  está aumentada em artérias. O aumento da produção de  $O^{\cdot-}$  contribui para diminuir a biodisponibilidade do óxido nítrico vascular, caracterizando a disfunção endotelial. Este radical inativa o óxido nítrico por reagir com ele formando peróxido de nitrito, que resulta em uma diminuição da vasodilatação <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Desta forma, a análise da reatividade vascular pode ser usada como um dos marcadores da disfunção endotelial <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>.

Em nosso trabalho o relaxamento derivado do endotélio mostrou-se inalterado, pelo menos até o 15º dia de evolução do Diabetes Mellitus. Pieper *et al.*, 1999<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>, confirma nossos resultados mostrando que em ratos diabéticos induzidos por STZ, o relaxamento derivado do endotélio aumenta no primeiro dia após a aplicação de estreptozotocina, seguido por uma fase de reversão (1 a 2 semanas) na qual o relaxamento é normal, e então em uma fase mais tardia (8 semanas), o relaxamento torna-se comprometido. Outros trabalhos relativos ao relaxamento dependente de endotélio revelam um aspecto conflitante: alguns relatam decréscimo <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> outros, aumento <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> da reatividade vascular decorrentes da hiperglicemia. Essa discrepância se deve provavelmente a diferenças nos modelos experimentais, no tipo de vaso usado e na duração do Diabetes Mellitus <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>.

A microscopia intravital tem sido extensivamente usada em pesquisas microcirculatórias e permite medidas *in vivo* da permeabilidade vascular sob a influência de vários componentes <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Neste trabalho, o extravasamento microvascular no grupo diabético apresentou decréscimo significativo após 2 minutos da aplicação de histamina, retornando aos níveis normais aos 5 minutos. É importante ressaltar que o pico de resposta à histamina ocorre normalmente entre 3 a 5 minutos após a sua administração e se dissipa entre 10 e 20 minutos <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Pela primeira vez, nós demonstramos mudança no extravasamento microvascular no tempo de 2 minutos, mostrando que a hiperglicemia já influencia a função vascular com 6 e 15 dias de evolução da doença. Essa alteração pode estar associada a mudanças na expressão e distribuição do citoesqueleto da célula endotelial. Com relação ao extravasamento microvascular no tempo de 5 minutos, nossos resultados estão de acordo com Llorach *et al.*, (1976)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> que não observou alteração em animais diabéticos com 1 e 2 semanas de duração,

entretanto, Svënsjo *et al.*, (1999)<sup>Erro! Fonte de referênci</sup>, descreveram um aumento da permeabilidade vascular entre 6 a 8 semanas.

Nossos animais tratados com STZ apresentaram níveis de glicose sanguínea duas a três vezes maiores que no grupo controle, mantendo esses níveis durante todo o experimento, além de perda de peso de aproximadamente 20%, caracterizando um Diabetes Mellitus descompensado. Embora o modelo experimental utilizado tenha sido efetivo em promover um quadro clássico de hiperglicemia, 15 dias não foi tempo suficiente para observar alterações morfológicas e funcionais. Ainda que a glicose sanguínea não tenha sido medida em jejum, o hamster, assim como outros roedores apresenta hábitos noturnos. Desta forma, a glicemia pós-prandial avaliada no período da manhã, considerou, pelo menos, 4 horas de jejum.

Muitos trabalhos têm sido publicados sobre alterações morfológicas e funcionais nos estágios iniciais do Diabetes Mellitus, seja em modelos animais transgênicos <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>, ou naqueles submetidos a altas doses de estreptozotocina <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>, com curso de duração superior a duas semanas <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>, ou em órgãos classicamente afetados pela hiperglicemia crônica (sistema nervoso, rim, olhos) <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>.

A microangiopatia diabética está associada com o espessamento da membrana basal <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>, que em parte, pode ocorrer quando células endoteliais, musculares lisas e pericitos sintetizam quantidades aumentadas de colágeno IV <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>. No presente estudo nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos, com relação às medidas morfológicas e estereológicas: diâmetro da luz, espessamento da parede, densidade numérica ( $QA$ ) e densidade de volume ( $Vv$ ), o mesmo ocorreu com a expressão do colágeno IV.

O colágeno IV é conhecido por ser o maior componente estrutural da membrana basal, fornecendo um arcabouço para os outros constituintes <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>. A membrana basal, juntamente com as células endoteliais, forma a barreira sangue/tecido que estabiliza a parede vascular <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>. No Diabetes Mellitus, a laminina e o colágeno IV são alvos potenciais da glicação não enzimática de proteínas (AGEs), entretanto o *turnover* do colágeno parece ser mais lento em relação ao da laminina <sup>Erro! Fonte de referênci</sup>. Assim, a não alteração na expressão do colágeno IV corrobora com a inalteração do espessamento da parede. Para trabalhos semelhantes ao nosso em termos de metodologia, não houve diferenças significativas entre os resultados morfológicos e estereológicos.

Recentemente tornou-se claro que o endotélio arterial e venoso são estruturas distintas. Ambos são sensíveis a forças mecânicas derivadas da hemodinâmica do fluxo sanguíneo <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>, entretanto, respondem a essas forças por mecanismos diferentes. O estresse é sentido prioritariamente em arteríolas, pois estas têm importante influência na regulação do fluxo sanguíneo local <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Evidências clínicas e experimentais mostram que o fluxo sanguíneo está aumentado nos estágios iniciais do Diabetes Mellitus, o que significa dizer que ocorre um aumento do estresse mecânico hemodinâmico sobre a parede vascular <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. O endotélio percebe mudanças no fluxo sanguíneo através de moléculas da superfície luminal (integrinas, canais iônicos entre outras) <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>, porém, esses eventos são transmitidos simultaneamente para as superfícies apical, juncional e basal <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. A ativação destas moléculas gera uma cascata bioquímica intracelular que culmina com a formação de um segundo mensageiro ou com a ativação de mecanorreceptores integrados aos elementos do citoesqueleto <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. A resposta endotelial, um processo denominado de mecanotransdução, consiste na transmissão desse estresse mecânico para todas as estruturas que se relacionam, ou que sofrem influência dele, tais como: matriz extracelular, adesão célula – célula e célula – matriz, células musculares lisas e pericitos, além de liberação de vários fatores inflamatórios que regulam a vasomoção e a função da parede vascular <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Helmke (2005), <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> sugere que o potencial mecanismo de controle molecular dos componentes estruturais das células endoteliais seja o ambiente extracelular. Nesse contexto, as adesões focais têm papel fundamental na manutenção da força endotelial, pois medeiam a adesão da actina à matriz extracelular através de um complexo de proteínas denominadas moléculas de adesão focal que são produzidas pelas células endoteliais. <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup><sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>

A alteração de algumas proteínas de adesão focal como actina, talina, vimentina e laminina, mostraram-se alteradas em arteríolas do grupo diabético. Arteríolas imunomarcadas para talina, revelaram aumento da reatividade no grupo diabético de 6 dias, quando comparado com os grupos controle e diabético de 15 dias. A microscopia eletrônica, demonstrou que, no grupo diabético de 6 dias, partículas de ouro coloidal conjugadas à talina, se distribuíram próximo a membrana plasmática basal, indicando um fenótipo adesivos dessas células endoteliais. O acúmulo de talina é o passo inicial na formação das adesões focais <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. A talina ativa integrinas, participa do seu transporte e promove uma ligação inicial entre as integrinas e à  $\beta$ -actina <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Lee &

Gotlieb (1999)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup> revelaram que sob a condição de hiperglicemia, a talina pode sofrer alteração através da glicação não enzimática de proteína (AGEs) e da ativação da proteína quinase C (PKC). Estímulos como força mecânica ou fosforilação de determinados resíduos, poderiam expor alguns domínios da talina <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Desta forma podemos sugerir que, com 6 dias de evolução do Diabetes Mellitus, a expressão e a distribuição de talina parece estar envolvida com o aumento da adesão focal entre células endoteliais e membrana basal, bem como com o transporte secretor de integrinas.

A expressão de actina mostrou-se aumentada, em arteríolas do grupo diabético com 6 dias de evolução. Resultados similares foram obtidos por Yu *ET AL.*, (2005)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. O acúmulo de actina pode levar à hipertrofia da célula endotelial <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Entretanto, nossos resultados mostraram que a parede vascular mantém-se inalterada nos estágios iniciais do Diabetes Mellitus. Por outro lado, Loufrani & Henrion, (2008)<sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>, revelam que as AGEs promovem uma despolimerização inicial dos filamentos de actina (actina F) e subsequente decréscimo da expressão de actina G, com redução dos microfilamentos de actina, posteriormente afetando a adesão célula-célula e célula-matriz. De fato, no grupo diabético com 15 dias de evolução, a expressão de actina mostrou-se diminuída em relação ao grupo com 6 dias de doença. Ademais a imunohistoquímica ultraestrutural para este grupo revelou partículas de ouro coloidal próximas ao envoltório nuclear, a vesículas secretoras e também dispersas no citoplasma. Neste trabalho nós utilizamos um anticorpo anti-actina que reconhece ambas as formas de actina (actina G e actina F), e isto pode explicar o aumento da expressão desta proteína em 6 dias de Diabetes Mellitus e subsequente decréscimo aos 15 dias da doença.

Outra proteína do complexo de adesão focal, a laminina, apresentou aumento, em ambos os grupos diabéticos. Na microscopia eletrônica, a laminina mostrou-se distribuída em *clusters*, em ambos os grupos diabéticos. Entretanto, no grupo controle as partículas de ouro coloidal foram visualizadas dispersas no citoplasma da célula endotelial e na matriz extracelular. A laminina é o determinante primário da construção da membrana basal <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>, e dirige a formação e estabilização das mesmas <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Acredita-se que o *turnover* da laminina seja um processo dinâmico, pois são sensíveis à degradação por várias proteases (p. ex. metaloproteinases). A laminina pode ser clivada após sua secreção e seus fragmentos então apresentar novas propriedades, expondo novos sítios de ligação <sup>Erro! Fonte de referência não encontrada.</sup>. Desta forma, o aumento da expressão de laminina e sua distribuição em *clusters* nas células endoteliais e na matriz extracelular de

ambos os grupos diabéticos, pode indicar uma reorganização da interação célula-matriz sem ainda provocar uma alteração estrutural nos vasos da microcirculação.

A expressão de vimentina também se mostrou aumentada, em ambos os grupos diabéticos. Os filamentos intermediários não são estruturas que inicialmente estão relacionadas à força tensora da célula, porém, sob grandes forças mecânicas, contribuem para a estabilidade celular evitando uma deformação excessiva da célula e conseqüente ruptura dos filamentos de actina Erro! Fonte de referência não encontrada. Os filamentos intermediários também podem interagir indiretamente com os sítios de adesão focal, por sua ligação à integrina  $\alpha 6\beta 4$ , através da plectina. Esta integrina também é sítio de ligação para a laminina, indicando que os filamentos intermediários podem ser recrutados para promover uma estabilidade mecânica durante a adaptação fisiológica da rede de microfilamentos ao estresse mecânico hemodinâmico Erro! Fonte de referência não encontrada. O aumento da expressão de vimentina também está associado a uma modulação no fenótipo celular. Células que expressam quantidades aumentadas de vimentina indicam um fenótipo proliferativo Erro! Fonte de referência não encontrada.

Assim como as células endoteliais, as células musculares lisas também são importantes na manutenção da integridade estrutural e na regulação do reparo endotelial Erro! Fonte de referência não encontrada. A expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso em vênulas aumentou no grupo com 6 dias de Diabetes Mellitus. Recentemente demonstrou-se que o aumento na expressão da  $\alpha$ -actina de músculo liso resulta em aumento da força contrátil Erro! Fonte de referência não encontrada. e está associado com a estabilidade do vaso Erro! Fonte de referência não encontrada. A função primária das células musculares lisas é a manutenção da pressão e fluxo sanguíneos através de sua contração. A  $\alpha$ -SMA é necessária para células musculares e pericitos interagir com as células endoteliais e formar uma barreira sangue/tecido integrada Erro! Fonte de referência não encontrada. Desta forma, nós podemos sugerir que o aumento da expressão desta proteína está associado à nova arquitetura vascular imposta pelo fluxo sanguíneo.

## **6. CONCLUSÃO**

Concluimos que, a condição hiperglicêmica induzida experimentalmente pela administração de estreptozotocina promove em curto prazo alterações nos parâmetros associados à adesão célula-matriz. Possivelmente, pelo aumento no fluxo sanguíneo e no estresse hemodinâmico desencadeado pela hiperglicemia. No entanto, os parâmetros morfométricos e funcionais dos microvasos não são afetados nesse período inicial de evolução do Diabetes Mellitus.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1) Bundgaard M. Functional implications of structural differences between consecutive segments of microvascular endothelium. *Microcirc Endothelium Lymphatics*. 1998; 4:113-142.
- (2) Helmke BP. Molecular control of cytoskeletal mechanics by hemodynamic forces. *Physiology*. 2005; 20:43-53.
- (3) Loufrani L, Henrion D. Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Med Biol Eng Comput*. 2008; 46(5):451-460.
- (4) Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008; 111(11):5271-5281.
- (5) Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52(6):940-950.
- (6) Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54(2):s25-31.
- (7) Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol*. 2008; 45:1-16.
- (8) Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit*. 2006; 12(7):RA130-147.
- (9) Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008; 52(7):1096-1105.
- (10) Aguiar, LG, Villela NR, Bouskela E. Microcirculation in diabetes: implications for chronic complications and treatment of the disease. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007; 51(2):204-211.

- (11) Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004; 328:750-754.
- (12) American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2006; 29(1):S43-48.
- (13) Sparre T, Larsen MR, Heding PE, Karlsen AE, Jensen ON, Pociot F. Unraveling the pathogenesis of type 1 diabetes with proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005; 4:441-457.
- (14) Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ*. 2006; 175(2):165-170.
- (15) Howson JM, Walker NM, Clayton D, Todd JA; Diabetes Genetics Consortium. Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. *Diabetes Obes Metab*. 2009; Suppl 1:31-45.
- (16) Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001; 358:221-229.
- (17) Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*. 2008; 9(4):329-343.
- (18) Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998; 47(6): 859-866.
- (19) Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*. 2001; 56:1-21.
- (20) Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Lin ci (lond)* Aug;109(2):143-59, 2005.
- (21) Brownlee M. the pathobiology of diabetic complications – unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 56:1615-25.
- (22) Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006; 29(6):1420-1432.
- (23) Cagliero E, Roth T, Roy S, Lorenzi M. Characteristics and mechanisms of high-glucose-induced overexpression of basement membrane components in cultured human endothelial cells. *Diabetes*. 1991; 40(1):102-110.
- (24) Chrisholm DJ. The diabetes control and complications Trial (DCCT). A milestone in diabetes management. *Med J Aust*. 1993; 159(11-12):721-723.
- (25) Shaan BD. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do Diabetes Mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003; 47(6):654-662.

- (26) Virmani R, Burke AP, Kolodgie F. Morphological characteristics of coronary atherosclerosis in Diabetes Mellitus. *Can J Cardiol*. 2006; 22(suppl B):81B-84B.
- (27) Dandona P, Aljada A. Advances in diabetes for the millennium: diabetes and the endothelium. *MedGenMed*. 2004; 6(3Suppl):6.
- (28) Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51(2):216-226.
- (29) Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001; 50(6): 537-546.
- (30) Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005; 22(4):359-370.
- (31) Phares CK. Streptozotocin-induced diabetes in Syrian hamsters: new model of diabetes mellitus. *Experientia*. 1980; 36(6): 681-682.
- (32) Sigauco-Roussel D, Demiot C, Fromy B, Kořtka A, Lefthériotis G, Abraham P, Saumet JL. Early endothelial dysfunction severely impairs skin blood flow response to local pressure application in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2004; 53(6):1564-1569.
- (33) Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbels RM, Saliez A, Gianello P. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation*. 2006; 81(1): 36-45.
- (34) Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969; 48(11):2129-2139.
- (35) Dawson TH. Modeling of vascular networks. *J Exp Biol*. 2005; 208(pt 9):1687-1694
- (36) Halfoun VLRC, Fernandes TJ, Pires MLE, Braun E, Cardozo MGT, Bahbout GC. Estudos morfológicos e funcionais da microcirculação da pele no diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003; 47(3):271-279)
- (37) Kierzenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2008.
- (38) Bouskela E, Carvalho H. Microcirculação. In: Da luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP, editores. *Endotélio: Doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2005. p.193-202.
- (39) Ross MH, Pawlina W. *Histologia textos e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; Buenos Aires[Argentina]: Editorial Médica Panamericana, 2008.
- (40) Junqueira LC; Carneiro J. *Histologia Básica*. 11ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2008.

- (41) Perez, Andréa de Castro. Envolvimento do óxido nítrico nas respostas edematogênicas e espasmogênicas induzidas pela bradicinina e histamina. 1995. 91f. Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.
- (42) Dale HH, Laidlaw PP. The physiological action of  $\beta$ -imidazolyethylamine. *J Physiol.* 1910; 41:318-344.
- (43) Garrison JC. Histamine, bradykinin, 5HT and their antagonists. In: Goodman and Gilman, editors. *The pharmacological basis of therapeutics.* 8th. Ed. Pergamon Press; 1991. pp. 575-588.
- (44) Slaaf D, Tangelder GJ, Reneman R. Physics of the microcirculation. In: Strackee B, Slaaf D and Westerhof N, editors. *The Physics of Heart and Circulation.* Bristol: Publishing by Institute of Physics; 1993. pp.383-416.
- (45) Labrador V, Muller S, Stoltz JF. Réponse des cellules endothéliales vasculaires à l'application de contraintes mécaniques : la mécano-transduction. *Actas Bioq.* 2003; 6: 61-79.
- (46) Hakim CH, Jackson WF, Segal SS. Connexin isoform expression in smooth muscle cells and endothelial cells of hamster cheek pouch arterioles and retractor feed arteries. *Microcirculation.* 2008; 15(6):503-514.
- (47) Dillon C, Goda Y. The actin cytoskeleton: Integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci.* 2005; 28: 25-54.
- (48) Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009; 6(1):16-26.
- (49) Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia.* Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2004. pp. 277-398.
- (50) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288:373-376.
- (51) Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988; 333:664-666.
- (52) Priddy RB, Brodie AF. Facial Musculature, nerves and blood vessels of the hamster in relation to the cheek pouch. *J. Morphol.* 1948; 83:149- 180. In: Eugene RM and Miguel CC editors. *Handbook of Physiology Circulation.* Am Physiol Soc. 1984; 2 (IV):11-40.
- (53) Segal SS, Duling BR. Communication between feed arteries and microvessels in hamster striated muscle: segmental vascular responses are functionally coordinated. *Circ Res.* 1986; 59(3):283-290.

- (54) Segal SS, Duling BR. Conduction of vasomotor responses in arterioles: a role for cell-to-cell coupling ? *Am J Physiol*. 1989; 256(3 Pt 2):H838-845.
- (55) Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Investigaç o do transplante heter logo de quel ide na bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Cir Br s*. 2003;18(4):266-271.
- (56) Wiedeman MP. Patterns of the arteriovenous pathways. In: Hamilton WF. *Handbook of Physiology. Circulation*, Washington, DC: Am. Physiol. Soc. 1963; 2(II): pp. 891-933.
- (57) Svensjo E. The hamster cheek pouch as a model in microcirculation research. *Eur Respir J Suppl*. 1990; 12:595s-600s.
- (58) Ricci R, Pazos MC, Borges RE, Pacheco-Soares C. Biomodulation with low-level laser radiation induces changes in endothelial cell actin filaments and cytoskeletal organization. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 95(1):6-8.
- (59) Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia Molecular da C lula*. 3<sup>a</sup> ediç o. Porto Alegre, RS: Editora Artes M dicas Sul LTDA; 1994.
- (60) Lum H, Malik AB. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996; 74(7):787-800.
- (61) Miyoshi J, Takai Y. Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778(3):670-691.
- (62) Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*. 2000; 113(20): 3563-3571.
- (63) Critchley DR. Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochemical Society Transactions*. 2004; 32(5):831-836.
- (64) Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, Campbell ID. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*. 2007; 128:171-182.
- (65) Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75:5034-5038.
- (66) Machado GF, Figueiredo F. Revis o: filamentos intermedi rios. *Medicina Ribeir o Preto*. 1996; 29:104-113.
- (67) Kose N, Asashima T, Muta M, Iizasa H, Sai Y, Terasaki T, Nakashima E. Altered expression of basement membrane-related molecules in rat brain pericyte, endothelial, and astrocyte cell lines after transforming growth factor- $\beta$ 1 treatment. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2007; 22(4):255-266.
- (68) Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and

- function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 2005; 85(3):979-1000.
- (69) Butler LM, Khan S, Ed Rainger G, Nash GB. Effects of endothelial basement membrane on neutrophil adhesion and migration. *Cell Immunol.* 2008; 251(1):56-61.
- (70) Mokkapat S, Baranowsky A, Mirancea N, Smyth N, Breikrentz D, Nischt R. Basement membranes in skin are differently affected by lack of nidogen 1 and 2. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(9):2259-2267.
- (71) Labat-Robert J. Age-dependent remodeling of connective tissue: role of fibronectin and laminin. *Pathol Biol (Paris).* 2003; 51(10): 563-568.
- (72) Sasaki T, Fassler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol.* 2004; 164:959-963.
- (73) Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J Pathol.* 2003; 200(4):537-546.
- (74) Sannomiya P. [base de dados na Internet]. Bases Fisiológicas da Clínica Médica. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; [acesso em: 2009 jan 27]. Aula prática de Fisiopatologia da Microcirculação. Etapas da Microscopia Intravital (bochecha do hamster); [aproximadamente 57 paginas] 9 fotografias, color. Disponível em: <http://www.fm.usp.br/bases/2006/microcirculaçãopratica2006.pps>.
- (75) Sannomiya P. [base de dados na Internet]. Bases Fisiológicas da Clínica Médica. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; [acesso em: 2009 jan 27]. Aula prática de Fisiopatologia da Microcirculação. Sistema de Microscopia Intravital; [aproximadamente 57 paginas] 1 fotografia, color. Disponível em: <http://www.fm.usp.br/bases/2006/microcirculaçãopratica2006.pps>.
- (76) Duling R. The preparation and use of the hamster cheek pouch of studies of the microcirculation. *Microvascular Research.* 1973; 5:423-429.
- (77) Joyner WL, Mayhan WG, Johnson RL, Phares CK. Microvascular alterations develop in Syrian hamsters after the induction of diabetes mellitus by streptozotocin. *Diabetes.* 1981; 30:93-100.
- (78) Svensjö E, Cyrino F, Michoud E, Ruggiero D, Bouskela E, Wiernsperger N. Vascular permeability increase as induced by histamine or bradykinin is enhanced by advanced glycation endproducts (AGEs). *Journal of Diabetes and its Complications.* 1999; 13(4): 187-190.
- (79) Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a reevaluation. *Am J Clin Pathol* 1973; 59:365-373.
- (80) Bonnet F, Cao Z, Cooper ME, Cox AJ, Kelly DJ, Gilbert RE. Tranilast attenuates vascular hypertrophy, matrix accumulation and growth factor overexpression in experimental diabetes. *Diabetes Metab.* 2003; 29: 386-392.
- (81) Kranzhofer R, Schirmer J, Schomig A, von Hodenberg E, Pestel E, Metz J, Lang HJ,

- Kübler W. Suppression of neointimal thickening and smooth muscle cell proliferation after arterial injury in the rat by inhibitors of Na(+)- H<sup>+</sup> exchange. *Circ Res.* 1993; 73(2): 264-268.
- (82) Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003; 75:469-486.
- (83) Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc.* 1977; 111:219.
- (84) Mendonça LS, Fernandes-Santos C, Mandarim-de-Lacerda CA. Cardiac and aortic structural alterations due to surgically induced menopause associated with renovascular hypertension in rats. *Int J Exp Path.* 2007; 88:301-309.
- (85) Ciechanowski K, Kedzierska K, Golembiewska E, Miklaszewicz A, Domanski L, Bober J, Dutkiewicz G. The influence of oxidative stress on permeability of capillary vessels in the cheek pouch of hamsters with alloxan-induced diabetes. *Vasa.* 2004; 33(4): 211-214.
- (86) Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Endothelial dysfunction in diabetic animal models. *J Smooth Muscle Res. (Jpn. Sec).* 2004; 8: J49-J63.
- (87) Pieper SJ, Fenton AM, Kurachi Y, Shen WK. Bradykinin modulates arginine vasopressin-induced calcium influx in vascular myocytes. *Int J Cardiol.* 1999; 69(2):191-200.
- (88) Kamata K, Mori T, Shigenobu K, Kasuya Y. Endothelium-dependent vasodilator effects of platelet activating factor on rat resistance vessels. *Br J Pharmacol.* 1989; 98(4):1360-1364.
- (89) Altan VM, Karasu C, Ozüari A. The effects of type-1 and type-2 diabetes on endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 33(3):519-522.
- (90) Sotnikova R, Skalska S, Okruhlicova L, Navarova J, Kyselova Z, Zurova J, Stefek M, Hozova R, Nosalova V. Changes in the function and ultrastructure of vessels in the rat model of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes. *Gen Physiol Biophys.* 2006; 25:289-302.
- (91) Llorach MAS, Böhm GM, Leme-Garcia J. Decreased vascular reactions to permeability factors in experimental diabetes. *Br J Exp Pathol.* 1976; 57: 747-754.
- (92) Algenstaedt P, Schaefer C, Biermann T, Hamann A, Schwarzloh B, Greten H, Ruther W, Hansen- Algenstaedt N. Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia. *Diabetes.* 2003; 52(2):542-549.
- (93) Kasalová Z, Prázný M, Skrha J. Relationship between peripheral diabetic neuropathy and microvascular reactivity in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus -- neuropathy and microcirculation in diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006;

114(2):52-57.

- (94) Balakumar P, Chakkarwar VA, Singh M. Ameliorative effect of combination of benfotiamine and fenofibrate in diabetes-induced vascular endothelial dysfunction and nephropathy in the rat. *Mol Cell Biochem.* 2009; 320(1-2):149-162.
- (95) Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, Chen S. Effects of high glucose and TGF-beta 1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int.* 2002; 62(3): 901-913.
- (96) Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem.* 1989; 180(3):487-502.
- (97) Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered Cellular Interactions between Endothelial Cells and Nonenzymatically Glucosylated Laminin/Type IV Collagen. *J Biol Chem.* 1992; 267(18): 12404-12407.
- (98) Kobayashi T, Kaneda K, Kamata K. Possible involvement of IGF-1 receptor and IGF-binding protein in insulin-induced enhancement of noradrenaline response in diabetic rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2003; 140:285-294.
- (99) Harrington MA, Daub R, Song A, Stasek J, Garcia JGN. Interleukin 1 alpha mediated inhibition of myogenic terminal differentiation: increased sensitivity of Ha-ras transformed cultures. *Cell Growth and Differentiation.* 1992; 3:241-248.
- (100) Weber E, Rossi A, Solito R, Sacchi G, Agliano M, Gerli R. Focal adhesion molecules expression and fibrilin deposition by lymphatic and blood vessel endothelial cells in culture. *Microvas Research.* 2002; 64:47-55.
- (101) Lee TY, Gotlieb AL. Early stages of endothelial wound repair: conversion of quiescent to migrating endothelial cells involves tyrosine phosphorylation and actin microfilament reorganization. *Cell Tissue Res.* 1999; 297(3):435-450.
- (102) Lee SE, Kamm RD, Mofrad MR. Force-induced activation of talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction. *J Biomech.* 2007; 40:2096-2106.
- (103) Yu PK, Yu DY, Cringle SJ, Su EN. Endothelial F-actin cytoskeleton in the retinal vasculature of normal and diabetic rats. *Curr Eye Res.* 2005; 30(4):279-290.
- (104) Schopferer M, Bär H, Hochstein B, Sharma S, Mücke N, Herrmann H, Willenbacher N. Desmin and vimentin intermediate filament networks: Their viscoelastic properties investigated by mechanical rheometry. *J Mol Biol.* 2009; 388(1):133-143.
- (105) Skalli O, Bloom WS, Ropraz P, Azzarone B, Gabbiani G (1986). Cytoskeletal remodeling of rat aortic smooth muscle cells in vitro: relationships to culture conditions and analogies to in vivo situations. *J Submicrosc Cytol.* 1986; 18(3):481-493.

- (106) Tomasek JJ, Haaksma CJ, Schwartz RJ, Vuong DT, Zhang SX, Ash JD, Ma JX, Al-Ubaidi MR. Deletion of smooth muscle alpha-actin alters blood-retina barrier permeability and retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(6):2693-2700.
- (107) Chan-Ling T, Page MP, Gardiner T, Baxter L, Rosinova E, Hughes S. Desmin ensheathing ratio as an indicator of vessels stability: evidence in normal development and in retinopathy of prematurity. *Am J Pathol.* 2004; 165:1301-1313.

## **8. ANEXO**





UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

**ibrag** Instituto  
de Biologia  
Roberto  
Alcantara  
Gomes

**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº CEA/004/2009 sobre "*Estudo ultraestrutural e imunohistoquímico da matriz extracelular e do citoesqueleto dos vasos da microcirculação da mucosa oral de hamsters diabéticos*", sob a responsabilidade de **Jorge José de Carvalho**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **26/01/2009**. Este certificado expira em **26/01/2013**.

Rio de Janeiro, 26 de Janeiro de 2009.

Prof. Israel Felzenszwalb  
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb  
Diretor  
IBRAG - UERJ  
Mat. 2887-8

Profa. Patricia Cristina Lisboa  
CEA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva*  
*Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ*  
*Matricula 34765-8*

/ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br