

ALTERAÇÕES DA MORFOLOGIA DO ILHÉU DE LANGERHANS NA EVOLUÇÃO DA SÍNDROME DIABÉTICA NUM MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO 2*

RAQUEL M. SEIÇA, M. JOÃO MARTINS, PEDRO B. PESSA, ROSA M. SANTOS, LUIS M. DO ROSÁRIO, K.I.SUZUKI, MARIA I. MARTINS

Instituto de Fisiologia. Faculdade de Medicina. Universidade de Coimbra.

Serviço de Anatomia Patológica, Hospitais da Universidade de Coimbra

Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra. Coimbra. Portugal.

Department of Medicine. Tohoku Kosei-Nenkin Hospital. Sendai. Japan.

RESUMO/SUMMARY

A deficiência da secreção de insulina na diabetes tipo 2 deve-se à menor massa de células β e à disfunção destas células. A redução da massa celular na doença humana é variável, mas não superior a 50%. Não há alterações específicas da morfologia do ilhéu diabético humano; pode surgir deposição amilóide e, ocasionalmente, fibrose insular.

Com este estudo cronológico comparativo entre ratos Wistar normais (W) e ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa, fizemos a avaliação da morfologia do pâncreas endócrino; a aplicação de técnicas histológicas e imuno-histoquímicas permitiu caracterizar a estrutura insular e com o estudo morfométrico computadorizado de secções imunomarcadas para insulina foi possível avaliar as áreas insulino-positivas. Foi também feita uma avaliação clínica, igualmente de forma cronológica: peso corporal, glicémia (jejum e após glicose oral) e outros parâmetros bioquímicos do sangue. Os ratos GK foram sempre intolerantes à glicose e a hiperglicémia em jejum surgiu após as quatro semanas de vida; os ratos W foram

MORPHOLOGICAL CHANGES OF ISLET OF LANGERHANS IN AN ANIMAL MODEL OF TYPE 2 DIABETES

The impairment of insulin secretion, a major feature of type 2 diabetes, is caused by β cell mass reduction and functional failure. Pancreatic β -cell mass reduction is variable in humans, not exceeding 50%, and has been associated with amyloid deposits.

In the present study, we have chronologically compared the endocrine pancreas morphology of Wistar control rats (W) and Goto-Kakizaki (GK) rats, an animal model of non obese type 2 diabetes. We have also characterised and compared their body weight, glycaemia (fasting and after oral glucose load) as well as other biochemical parameters.

GK rats were always glucose intolerant and fasting hyperglycaemia arised at four week of age. Wistar rats had mild glucose intolerance in their first two weeks of life. GK rats had a total β -cell mass always decreased when compared to controls, but above 40%. In adult GK rats (12 weeks old) alterations in the architecture of a sub-population of

* Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e pelos Hospitais da Universidade de Coimbra.

moderadamente intolerantes à glicose nas duas primeiras semanas. A área de células insulino-positivas foi sempre menor nos pâncreas diabéticos, mas superior a 40%. Às 12 semanas e atingindo progressivamente mais ilhéus com o avançar da idade surgiram, numa subpopulação destes, lesões da normal arquitectura insular, não relacionáveis com processos inflamatórios ou imunes nem com deposição amilóide, e caracterizadas por irregularidade de contornos, perda da normal distribuição relativa das células endócrinas e aumento da matriz extracelular com deposição aumentada de material PAS positivo e fibrose. Os nossos resultados demonstram que, nos ratos GK da colónia de Coimbra, a redução da massa de células β constitui um dos factores primários da síndrome diabética. As lesões estruturais dos ilhéus, capazes de reduzir ainda mais a massa celular e de comprometer a função insular, surgem mais tarde e serão, pelo menos em parte, causadas pela hiperglicémia.

Palavras-chave: diabetes tipo 2; hiperglicémia; ilhéu de Langerhans; ratos Goto-Kakizaki.

INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus é uma síndrome complexa caracterizada por um desequilíbrio metabólico com hiperglicémia e intolerância à glicose resultantes de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina e/ou uma redução da sua acção biológica. À hiperglicémia crónica associam-se danos nos tecidos de vários órgãos com disfunção e falência dos mesmos e que constituem em si as complicações da diabetes. A diabetes tipo 2, a forma mais prevalente (\pm 85% da população diabética), resulta da coexistência de insulino-resistência periférica e hepática e da redução da capacidade secretora da célula β , por alteração funcional destas células e redução da massa celular. Na diabetes tipo 2 humana esta redução é variável mas nunca superior a 50%¹; não sendo por si só causa da hiperglicémia², pode contudo comprometer a capacidade do pâncreas endócrino de compensar a insulino-resistência e/ou a disfunção da célula β . É desconhecida a sua causa,

islets occurred which displayed signs of prominent fibrosis, with cluster of β -cells widely separated by strands of connective tissue and deposits of PAS positive material.

Our findings demonstrate that, using GK rats from the Coimbra colony, β -cell mass reduction is one of the primary features in the pathological sequence leading to diabetes. Structural lesions of the islets, that will further increase β -cell mass reduction and compromise β -cell function, will appear latter mainly due to hyperglycaemia.

Key words: type 2 diabetes; hyperglycaemia; islet of Langerhans; Goto-Kakizaki rats.

exceptuando a deposição de substância amilóide, e se surge precocemente na evolução da doença^{1,3}. A investigação em modelos animais permite-nos avaliar os diferentes mecanismos necessários à expressão da síndrome diabética; mas também não tem sido esclarecedora, no que respeita à massa de células β . É exemplo os ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo animal genético de diabetes tipo 2 não obesa produzido por reprodução endogâmica selectiva, com início numa colónia de ratos Wistar (W) com uma modesta intolerância à glicose; contrariamente aos ratos GK da colónia de Estocolmo⁴, os animais da colónia de Paris têm uma diminuição precoce da massa de células β ⁵⁻⁷. Factores ambientais e/ou genéticos (diferentes gerações de progenitores e de condições de reprodução), considerando ainda os meios técnicos utilizados, poderão justificar aquela divergência.

As alterações morfológicas mais relevantes na diabetes tipo 2 humana relacionam-se essencialmente com as

complicações sistêmicas que surgem, por norma, numa fase tardia da evolução da síndrome diabética; a hiperglicémia é um dos principais factores envolvidos no desenvolvimento daquelas complicações, fenómeno conhecido por glicotoxicidade^{8,9}. O pâncreas endócrino não tem alterações específicas; os ilhéus são qualitativamente semelhantes aos ilhéus normais ou exibem, sobretudo nos indivíduos idosos e de forma não patognomónica, uma deposição amilóide mais ou menos acentuada e, por vezes, fibrose insular^{1,10}. Em certos modelos animais hiperglicémicos foram identificadas alterações da arquitectura do ilhéu de Langerhans com irregularidade de contornos e fibrose¹¹; também nos ratos GK das colónias japonesa, francesa e sueca, com mais de oito semanas de vida, são referidos esses ilhéus, os denominados *starfish-shaped-islets*.

Neste estudo cronológico comparativo entre ratos Wistar normais (W) e ratos GK, avaliamos a massa de células β e a estrutura do ilhéu de Langerhans, e as alterações metabólicas subjacentes. Este estudo permitiu avaliar a contribuição, para a deficiente secreção de insulina, das alterações morfológicas dos ilhéus e a susceptibilidade destes ao desequilíbrio metabólico.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Os ratos GK foram obtidos da nossa colónia (colónia de Coimbra) originada em 1995 com progenitores oriundos da colónia japonesa de Sendai, oferecidos por K.I.Suzuki. Os ratos W normais foram igualmente provenientes da nossa colónia local. Os animais foram mantidos em salas adequadamente ventiladas com temperatura e humidade controladas (22-24°C e 50-60% respectivamente); foram expostos a ciclos alternados (12h) de luz e obscuridade e alimentados com dieta laboratorial (*CRF₂₀-Charles River*). Os animais iniciaram uma alimentação mista às três semanas de vida e o desmame foi processado às quatro. Em todos os estudos foram utilizados animais de ambos os sexos e em diferentes idades do seu desenvolvimento.

2. Peso corporal e glicémia

Foram determinados o peso corporal (n=6-13 ratos/sexo/idade/estirpe) e a glicémia (n=11-25 ratos/idade/estirpe) após um jejum de 16-18 horas. Foram também efectuadas provas de tolerância à glicose via oral (ratos W:n=6-18/idade, ratos GK:n=10-26/idade): administração, por sonda gástrica, de 1,75g de glicose / Kg peso corporal (em água a 25%) e determinação das glicémias aos 30, 60, 90 e 120 minutos. As concentrações da glicose no sangue total foram determinadas na veia da cauda pelo método da glicose-oxidase (*glucometer-Elite-Bayer*).

3. Outros procedimentos analíticos

Após um período de jejum de 16-18 horas foram determinadas, em 15 ratos W e 16-19 ratos GK com 12 e 32 semanas de vida, as concentrações de diversos parâmetros bioquímicos do sangue (azoto ureico, creatinina, proteínas totais e albumina, cálcio, sódio, potássio e cloro, osmolalidade, fosfato-P-inorgânico, magnésio, TGP, TGO, fosfatase alcalina, bilirrubinas total e directa, α -amilase, uratos, colesterol total e colesterol das HDL, triglicerídeos e fosfolipídeos) por analisador automático (Kits comerciais).

4. Análise morfológica do pâncreas endócrino

Foram utilizados nestes estudos três machos e três fêmeas de cada estirpe, em cada uma das idades criteriosamente seleccionadas (referidas na secção 4.1). Após excisão do pâncreas, toda a glândula foi fixada em formol-neutro tamponado a 10% e posteriormente impregnada em parafina líquida. Cada bloco de pâncreas foi seccionado no sentido do comprimento do órgão e obtidos cortes histológicos seriados de 3 μ m de espessura. Secções adjacentes foram desparafinadas para posterior investigação histoquímica e imuno-histoquímica.

4.1. Avaliação histoquímica e imuno-histoquímica

A marcação com hematoxilina-eosina¹² foi usada nos exames histopatológicos de rotina e com a técnica do Tricrómio de Masson com verde luz visualizámos o tecido conjuntivo¹³. Estes estudos foram processados em ratos com uma, duas, três e quatro semanas de vida e em ratos com 12 e 32 semanas.

Com o método do Ácido Periódico de Schiff (PAS) com diástase¹⁴ foi possível demonstrar e localizar os componentes ricos em hidratos de carbono (que não o glicogénio) e que constituem o interstício; este estudo foi processado em pâncreas com quatro semanas de vida e com 12 e 32 semanas, respectivamente antes e após o estabelecimento da hiperglicémia crónica. A técnica do Vermelho do Congo¹⁵ foi utilizada somente nos pâncreas de animais mais velhos (32ª semana), idade em que seria mais provável a deposição amilóide.

Na identificação das células α e β foi usado um método imunohistoquímico não competitivo, método da Estreptavidina-Biotina/Peroxidase¹⁶. Secções de pâncreas de ratos (nas mesmas idades referidas na marcação com hematoxilina-eosina) foram incubadas durante 30 minutos com anticorpo primário, respectivamente anticorpo de cobaia anti-insulina de porco e anticorpo de coelho anti-glucagina de porco numa diluição de 1:50 em tampão TBS/Tris salino (137 mM NaCl; 5mMTris; 0,44% HCl 1M v/v; pH 7.6). Os anticorpos secundários, cuja incubação decorreu igualmente à temperatura ambiente durante 30

minutos, foram, respectivamente, anticorpo de cabra biotilado anti-imunoglobulinas de ratinho, coelho, cobaia e rato na diluição de 1:20 em tampão TBS/Tris salino e anticorpo de porco biotilado anti-imunoglobulinas de coelho, na diluição de 1:300. Para a visualização da imunorreacção as secções de pâncreas foram depois incubadas, 30 minutos à temperatura ambiente, com o complexo estreptavidina-peroxidase na diluição de 1:500 em tampão TBS/Tris salino. O cromogénio utilizado foi o DAB na concentração de 1mg/mL em tampão Tris/HCl (4,8% Tris 1M v/v; 3,8% HCl 1M v/v, pH 7.6), durante dez minutos; na contramarcacção foi utilizada a hematoxilina de Mayer. Antes de se proceder às imunomarcacções, das células α e β , as secções de pâncreas foram preparadas; a peroxidase endógena dos tecidos foi bloqueada com peróxido de hidrogénio a 3% durante 15 minutos e as ligações não específicas foram bloqueadas com soro normal de cabra na diluição de 1:20 em tampão TBS/Tris salino durante 20 minutos e soro normal de porco na diluição de 1:20 em tampão TBS/Tris salino durante 20 minutos, respectivamente para a imunomarcacção da insulina e da glucagina.

(O anticorpo de cabra biotilado foi fornecido pela *Biogeneux, HK268, England* e os restantes reagentes utilizados, pela *Dako-Corporation, USA*)

4.2. Estudo morfológico

Na avaliação quantitativa das áreas insulino-positivas nas secções imunomarcadas para insulina, foi utilizado um sistema computadorizado de análise de imagem baseado num microscópio ligado, via câmara de vídeo a cor, a um computador PC compacto (*CAS cell analysis system INC-Becton Dickinson, Netherland*) e o *software CAS Micrometer Program*.

As áreas ocupadas pelas células imunorreactivas foram calculadas em 20 a 40 campos por cada secção de pâncreas (área insulino-positiva/campo) correspondendo cada campo a uma área definida de tecido pancreático total, seleccionada automaticamente e mantida em todas as análises efectuadas. As áreas marcadas em cada ilhéu foram manualmente seleccionadas; em função do número de ilhéus estudados em cada secção de pâncreas, 40-100 ilhéus com heterogeneidade de dimensões, foi determinada a área média, em μm^2 , de células insulino-positivas em cada ilhéu (área insulino-positiva/ilhéu). Os ilhéus GK estruturalmente alterados foram excluídos das determinações às 12 semanas de vida não sendo possível efectuar estas avaliações às 32, dado o número de ilhéus afectados.

5. Análise estatística

Os resultados foram expressos em valores médios \pm erro padrão da média. Para a avaliação do significado

estatístico da diferença entre os valores médios de dois grupos de resultados foi utilizado o teste t de Student para amostras não emparelhadas; em todos os casos um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo (conforme referenciado nas legendas das figuras).

RESULTADOS

Os ratos GK têm em qualquer idade e em ambos os sexos um peso corporal inferior ao dos controlos (redução de 15-35% nos machos e 13-22% nas fêmeas) (figuras 1A e 1B). A glicémia em jejum dos ratos GK no primeiro mês de vida é significativamente mais alta que a dos controlos, mas inferior a 5,5 mM/L; a hiperglicémia em jejum surge depois das quatro semanas de vida e mantém-se estável com a progressão da idade (figura 1C). Os ratos GK são marcadamente intolerantes à glicose desde a primeira semana de vida, mas os ratos controlo demonstram uma intolerância moderada nas duas primeiras semanas (figura 2).

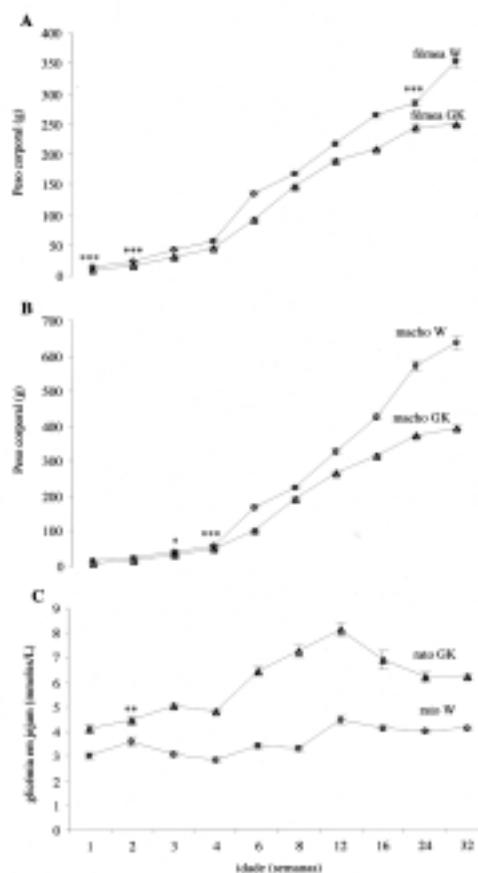


Fig.1 - Valores médios (\pm e.p.m.) do peso corporal (6-13 ratos/sexo/idade/estirpe) e da glicémia em jejum (11-25 ratos/idade/estirpe) de ratos W e de ratos GK. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; para todos os outros valores, $p < 0,0001$: ratos GK vs ratos W.

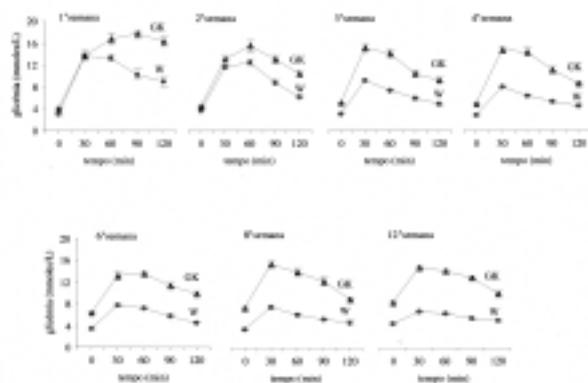


Fig. 2 - Prova de tolerância à glicose, em resposta à administração oral de 1,75g de glicose/Kg peso corporal, de ratos W e de ratos GK. Valor médio \pm e.p.m.. O número de ratos é o seguinte: 1ªsem (W n=16, GK n=26); 2ªsem (W n=18, GK n=10); 3ªsem (W n=18, GK n=10); 4ªsem (W n=16, GK n=24); 6ªsem (W n=6, GK n=18); 8ªsem (W n=16, GK n=19); 12ªsem (W n=16, GK n=12).

As concentrações da fosfatase alcalina, do ácido úrico, dos fosfolípidos e do colesterol total e HDL são significativamente mais altas nos ratos GK; contudo, não se agravam com a idade e são inferiores aos valores máximos fisiológicos referidos para rato^{17,18}.

Os ratos GK têm, desde a primeira semana de vida, uma área total de células insulino-positivas, em relação com uma menor área de células imuno-reactivas em cada ilhéu, menor que a dos controlos (figura 3), mas sempre superior a 40% da massa celular dos ratos W normais.

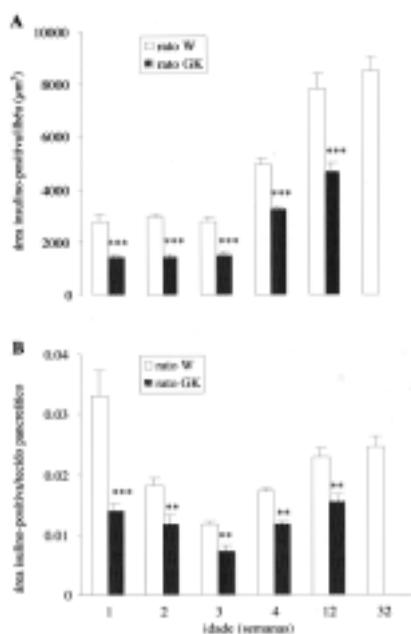


Fig. 3 - Análise quantitativa das áreas insulino-positivas nas secções imunomarcadas para insulina em diferentes idades do desenvolvimento de ratos W e de ratos GK: A) área ocupada pelas células β em cada ilhéu; B) área ocupada pelas células β em cada campo (relação das células imunorreactivas com o tecido pancreático total). Os resultados estão expressos pelo valor médio \pm e.p.m. de 6 animais/grupo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: ratos GK vs ratos W.

Confirmámos nos nossos modelos animais, durante o seu desenvolvimento até ao estado adulto, o crescimento não proporcional dos tecidos exócrino e endócrino, particularmente no primeiro mês de vida. A heterogeneidade de dimensões dos ilhéus é uma constante em qualquer idade. A presença de pequenos aglomerados de células β dispersos no tecido exócrino é notória nas primeiras três semanas de vida; surgem depois ilhéus de maiores dimensões e diminuem aqueles pequenos aglomerados. Estas características são observadas em ambas as estirpes e em ambos os sexos mas os ilhéus GK têm, em média, dimensões menores que as dos controlos nas mesmas idades.

Não observámos nos pâncreas diabéticos infiltrações polinucleares e linfocitárias sugestivas de pancreatite ou insulite. No primeiro mês de vida mantém-se preservada a estrutura microscópica dos ilhéus diabéticos. Às 12 e às 32 semanas de vida são reconhecidas, numa subpopulação de ilhéus, alterações da normal arquitectura insular não relacionáveis com deposição amilóide (figura 4A, B). Inicialmente os ilhéus apresentam um espessamento da matriz extracelular por aumento do colagénio (figura 4C, D, E) e de material PAS positivo (figura 4F, G, H); a estas

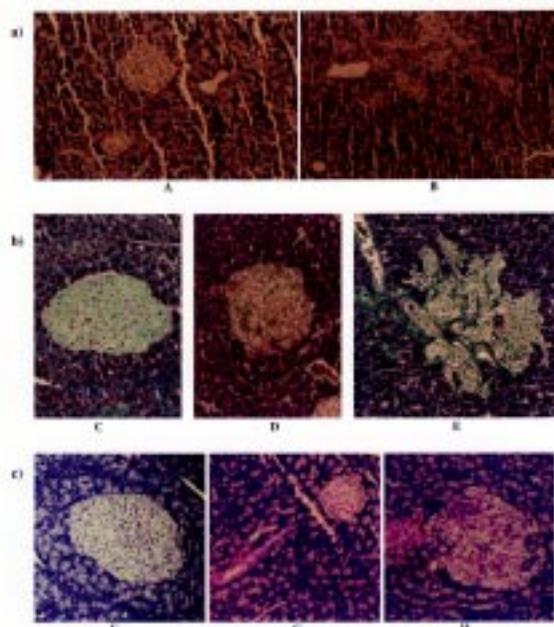


Fig. 4 - Ilhéus de Langerhans de ratos W e de ratos GK: a) ilhéus de ratos com 32 semanas de vida: A) ilhéu W; B) ilhéu GK; não há deposição de substância amilóide mesmo nos ilhéus GK estruturalmente mais alterados. Vermelho de Congo x100. b) ilhéus de ratos com 12 semanas de vida: C) ilhéu W; D) ilhéu GK com estrutura conservada; E) ilhéu GK com perda do seu contorno e aumento do colagénio na matriz extra-celular (marcação verde). Tricrómio de Masson x100. c) ilhéus de ratos com 12 semanas de vida: F) ilhéu W; G) ilhéu GK com estrutura conservada; H) ilhéu GK com perda do seu contorno e deposição aumentada de material PAS positivo na matriz extra-celular (marcação magenta). Ácido periódico de Schiff com diástase x100.

alterações progressivamente crescentes associa-se a irregularidade do contorno do ilhéu e a perda da distribuição relativa das células endócrinas com perda da localização centro-insular das células β (figura 5A, C) e da localização cortical das células α (figura 5D, E, F); estas alterações culminam com a perda da individualidade do ilhéu como micro-órgão. Num mesmo pâncreas coexistem ilhéus com diferentes graus de lesão e ilhéus estruturalmente preservados. As lesões, que inicialmente afectam de forma preferencial os ilhéus maiores, estendem-se progressivamente a mais ilhéus com o avançar da idade. Estas alterações atingem ambos os sexos com as mesmas características mas, nos machos, é maior o número de ilhéus afectados (19% nos machos e 6% nas fêmeas, com 12 semanas de vida).

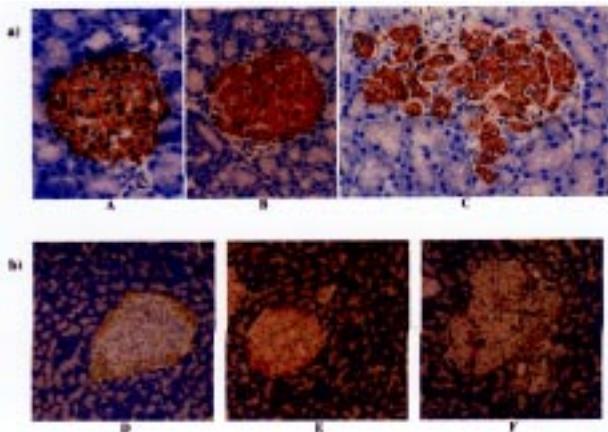


Fig. 5 - Ilhéus de Langerhans de ratos W e de ratos GK: a) ilhéus de ratos com 12 semanas de vida: A) ilhéu W; B) ilhéu GK com estrutura conservada; C) ilhéu GK com perda do seu contorno e da localização centro-insular das insulino-positivas (marcação castanha). Imunomarcagem de insulina $\times 200$. b) ilhéus de ratos com 12 semanas de vida: D) ilhéu W; E) ilhéu GK com estrutura conservada; F) ilhéu GK com perda do seu contorno e da localização cortical das células glucagina-positivas (marcação castanha). Imunomarcagem de glucagina $\times 100$.

DISCUSSÃO

Demonstrámos, neste estudo, que os ratos GK têm uma redução primária moderada da massa de célula β a que se associam mais tarde, após o estabelecimento da hiperglicémia crónica, alterações da estrutura dos ilhéus de Langerhans.

A redução da massa de células insulino-positivas, variável na diabetes humana, é factor relevante na patogenia da síndrome diabética. Nos ratos GK da nossa colónia, a redução da massa de células β (área insulino-positiva) é primária, tal como foi observado nos ratos GK da colónia de Paris⁵⁻⁷, e precede a hiperglicémia em jejum. Causas genéticas ou intra-uterinas com diminuição do compartimento proliferativo e/ou diminuição da

diferenciação e proliferação celulares estarão na base desta diminuição da massa de células β . O desequilíbrio metabólico materno, se severo, parece interferir no crescimento fetal, nomeadamente da massa pancreática^{19,20}; pelo facto de ser moderada a hiperglicémia da mãe GK sugere-se que o ambiente intra-uterino tenha um impacto menor que os factores genéticos.

A neogénese pós-natal é necessária ao estabelecimento da população celular do adulto; no rato parece dar-se nas duas primeiras semanas de vida precedendo, de forma compensatória, a apoptose transitória pós-natal (das células tipo fetal); este processo, que nos ratos W acontece na primeira semana de vida, parece ser mais tardio nos ratos GK, às duas semanas⁶. O equilíbrio entre estes dois processos compensatórios mantém-se assim nos animais diabéticos ou seja, a célula β dos ratos GK conserva, durante o desenvolvimento extra-uterino, o potencial regenerativo, embora menor que o dos controlos; a redução da massa de células β resultaria assim do compromisso da neogénese durante a vida fetal²¹ o que foi recentemente comprovado por Miralles *et al*²².

Todo o processo de regeneração envolve a replicação celular, particularmente importante no estado adulto e na fase final da gestação, e a neogénese ou seja a diferenciação e a proliferação de células indiferenciadas pluripotenciais. A neogénese relaciona-se essencialmente com o determinismo genético mas é também influenciada por factores nutritivos, como os aminoácidos, e factores locais e circulantes. É possível, nos ratos GK, a falência destes, nomeadamente dos *insulin-like growth factors* (IGFs)²², ou que possa estar em causa uma diminuição da produção de insulina durante a vida intra-uterina⁶ que, pela suas acções, na mitogénese, na utilização de nutrientes e na modulação de IGFs, induziria um menor crescimento global e também do pâncreas. Seja qual for a causa, a redução da massa celular é moderada, não sendo por si só causa da hiperglicémia².

No estado de hiperglicémia crónica (a única anomalia metabólica detectada) surgem, nos pâncreas GK, lesões insulares que, não sendo obviamente responsáveis pela redução primária da massa celular, poderão contribuir mais tarde para uma menor massa celular funcionante. Muitas vias bioquímicas, incluindo a oxidação da glicose e de produtos Amadori e a glicosilação de proteínas, estão associadas à hiperglicémia crónica e relacionadas com as complicações da diabetes, nomeadamente micro e macrovasculares. De facto a glicose pode actuar como oxidante gerando radicais livres de oxigénio (RLO) e, através da glicosilação de proteínas, ser mais uma fonte de formação de RLO e, por rearranjos progressivos, de produtos finais

irreversíveis, os AGEs (*advanced glycosilation end-products*)^{8,23,24}. O espessamento da matriz extra-celular nos ilhéus dos nossos ratos diabéticos com fibrose, não relacionável com inflamação nem agressão imunitária, e deposição aumentada de material PAS positivo traduz alterações dos componentes da matriz, em relação com a exposição prolongada à hiperglicémia. A interferência dos RLO nos ilhéus GK fibrosados corrobora esta hipótese^{25,26}. A susceptibilidade à agressão oxidativa, relacionada com as defesas anti-oxidantes endógenas, poderá constituir um dos processos pelo qual a toxicidade da glicose se evidencia em alguns indivíduos diabéticos. É possível que os ilhéus GK sejam geneticamente sensíveis ao stress oxidativo ou a glicosilação de proteínas e a produção de RLO excedam as defesas celulares do pâncreas endócrino.

O aumento de IGF₂ nos grânulos de secreção de insulina, factor responsável pelo aumento da produção de fibroblastos, poderá também contribuir para a fibrose observada^{27,28}.

A fibrose insular é esporadicamente encontrada nas fases tardias da diabetes tipo 2 humana¹⁰. Estão descritas, nos ratos GK adultos de outras colónias⁴⁻⁶ e noutros modelos animais hiperglicémicos¹¹, alterações da estrutura do ilhéu de Langerhans com irregularidade de contornos e fibrose, os denominados *starfish-shaped islets*.

Contrariamente ao verificado no homem, e apesar de aumentada a produção relativa de amilina (em relação à insulina) neste modelo animal diabético²⁹, não identificámos, tal como Hoog *et al*^{27,28} depósitos de substância amilóide, também ela factor de comprometimento da própria matriz extra-celular e da função celular³⁰.

CONCLUSÃO

Destes resultados podemos concluir que a redução da massa de células β nos ratos GK da nossa colónia associada, pelo menos em parte, a factores genéticos e/ou intra-uterinos, deve ser considerada um dos factores patogénicos primários da síndrome diabética neste modelo animal.

As alterações da estrutura dos ilhéus de Langerhans são também importantes; ao comprometerem mais ainda a massa celular insulino-produtora, podem diminuir a capacidade do pâncreas endócrino em compensar a insulino-resistência e a disfunção da célula β. As lesões insulares observadas parecem ser uma consequência da toxicidade da glicose. Assim, na sequência da possível agressão oxidativa do pâncreas endócrino, este estudo sugere a avaliação dos níveis endógenos de anti-oxidantes e dos benefícios da administração de diversas vitaminas e micronutrientes na prevenção daquelas lesões.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a João Patrício, Laboratório de Investigação Experimental dos HUC, e colaboradores, Maria de Lurdes Silva, Carlos Silva e Paulo Pereira, a manutenção dos animais e a colaboração técnica prestada nos estudos *in vivo*. A Dário Costa, Serviço de Patologia Clínica dos HUC, agradecemos a disponibilidade do Serviço que dirige para a efectivação das análises bioquímicas do sangue. Agradecemos aos técnicos do Serviço de Anatomia Patológica dos HUC, Ilda da Conceição e José M. Ruivo, a colaboração na preparação do material histológico e ao técnico do Instituto de Fisiologia da F.M.U.C., Mário Simões, o apoio prestado nos estudos *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. KLÖPPEL G, IN'T VELD PA: Morphology of the pancreas in normal and diabetic states. In: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds International Textbook of Diabetes Mellitus. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd 1997: 287-313
2. DeFRONZO RA: Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 177-269
3. CLARK A, De KONING EJP: Islet amyloid polypeptide and islet amyloid. In: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds International Textbook of Diabetes Mellitus. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd 1997: 407-416
4. GUENIFI A, ABDEL-HALIM SM, HÖÖG A, FALKMER S, ÖSTENSON CG: Preserved β-cell density in the endocrine pancreas of young, spontaneously diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Pancreas* 1995; 10: 148-153
5. MOVASSAT J, SAULNIER C, PORTHA B: β-cell mass depletion precedes the onset of hyperglycaemia in the GK rat, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: rapid publication. *Diabetes Metab* 1995; 21: 365-370
6. MOVASSAT J, SAULNIER C, SERRADAS P, PORTHA B: Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia* 1997; 40: 916-925
7. SERRADAS P, SAULNIER C, GIROIX MH, BAILBÉ D, PORTHA B: Characterization of islet architecture and β-cell function in the fetal pancreas of the GK rat, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetologia* 1994; 37 (Suppl 1): 157A 42 (abst.)
8. CERIALE A, GIUGLIANO D: Oxidative stress and diabetic complications. In: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds International Textbook of Diabetes Mellitus. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd 1997: 1453-1461
9. SIMONSON DC, ROSSETTI L, GIACCARI A, DeFRONZO: Glucose toxicity In: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds International Textbook of Diabetes Mellitus. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd 1997: 713-744
10. CRAWFORD JM, COTRAN RS: The pancreas. In: Cotran RS, Robbins SL, Kumar V, eds Robbins Pathologic Basis of Disease. EUA: W. B. Saunders Company 1994: 897-925
11. PICK A, CLARK J, KUBSTRUP C, et al: Role of apoptosis in

- failure of β -cells mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in male Zucker Diabetic Fatty Rat. *Diabetes* 1998; 47: 358-364
12. STEVENS A, WILSON I: The haematoxylin and eosin. In: Bancroft JD, Stevens A, eds *Theory and Practice of Histological Techniques*. EUA: Churchill Livingstone 1996: 99-112
 13. BRADBURY P, RAE K: Connective tissues and stains. In: Bancroft JD, Stevens A, eds *Theory and Practice of Histological Techniques*. EUA: Churchill Livingstone 1996:113-138
 14. COOK HC: Carbohydrates. In: Bancroft JD, Stevens A, eds *Theory and Practice of Histological Techniques*. EUA: Churchill Livingstone 1996: 173-211
 15. FRANCIS RJ: Amyloid. In: Bancroft JD, Stevens A, eds *Theory and Practice of Histological Techniques*. EUA: Churchill Livingstone 1996: 151-173
 16. MILLER K: Immunocytochemical techniques. In: Bancroft JD, Stevens A, eds *Theory and Practice of Histological Techniques*. EUA: Churchill Livingstone 1996: 435-470
 17. HARKNESS JE, WAGNER JE: *Biology and husbandry*. In: *The Biology and Medicine Of Rabbits and Rodents*. Philadelphia, E.U.A.: Lea & Febiger 1989: 9-54
 18. RINGLER DH, DABICH L: Hematology and clinical biochemistry. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, eds *The Laboratory Rat*. EUA: Academic Press Inc 1979: 105-121
 19. GIRLING JC, DORNHORST A: Pregnancy and diabetes mellitus. In: Pickup J, Williams G, eds *Textbook of Diabetes*. London, UK: Blackweel Science Ltd 1997: 72.1-72.34
 20. PERSSON B, HANSON U, LUNELL NO: Diabetes mellitus and pregnancy. In: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd 1997: 1135-1149
 21. MOVASSAT J, PORTHA B: Beta-cell growth in the neonatal Goto-Kakizaki rat and regeneration after treatment with streptozotocin at birth. *Diabetologia* 1999; 42: 1098-1106
 22. MIRALLES F, PORTHA B: Early development of β -cell is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50 (Suppl 1): S84-S88
 23. BROWNLEE M: Glycation of macromolecules. In: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd 1997: 745-755
 24. GIARDINO I, BROWNLEE M: The biochemical basis of microvascular disease. In: Pickup J, Williams G, eds *Textbook of Diabetes*. London, UK: Blackweel Science Ltd 1997: 42.1-42.16
 25. IHARA Y, TOYOKUNI S, UCHIDA K, et al: Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β -cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 927-932
 26. KOYAMA M, WADA R, SAKURABA H, MIZUKAMI H, YAGIHASHI S: Accelerated loss of islet β cells in sucrose-fed Goto-Kakizaki rats, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Pathol* 1998; 153: 537-545
 27. HÖÖG A, SANDBERG-NORDQVIST AC, ABDEL-HALIM S, et al: Increased amounts of a high molecular weight insulin-like growth factor II (IGF-II) peptide and IGF-II messenger ribonucleic acid in pancreatic islets of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology* 1996; 137: 2415-2423
 28. HÖÖG A, HU W, ABDEL-HALIM S, FALKMER S, QIN L, GRIMELIUS L: Ultrastructural localization of insulin-like growth factor-2 (IGF-2) to the secretory granules of insulin cells: a study in normal and diabetic (GK) rats. *Ultrastruct Pathol* 1997; 21: 457-466
 29. LECKSTROM A, ÖSTENSON C, EFENDIC S, et al: Increased storage and secretion of islet amyloid polypeptide relative to insulin in the spontaneously diabetic GK rat. *Pancreas* 1996; 13: 259-267
 30. KAHN S, ANDRIKOPOULOS S, VERCHERE C: Islet amyloid. A long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 241-253