

LETÍCIA ALVES PAIVA

**ESTRESSE OXIDATIVO PULMONAR EM RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS A
HIPERÓXIA**

CAMPO GRANDE

2017

LETÍCIA ALVES PAIVA

**ESTRESSE OXIDATIVO PULMONAR EM RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS A
HIPERÓXIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva.

CAMPO GRANDE

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA ALVES PAIVA

ESTRESSE OXIDATIVO PULMONAR EM RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS A HIPERÓXIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva.

Resultado_____.

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Iandara Schettert Silva
Instituição – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Paulo de Tarso Guerrero Muller
Instituição - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Juliana Loprete Cury
Instituição – Centro Universitário da Grande Dourados

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus e a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro a quem amo muito e sou imensamente grata pela minha vida. Dedico também aos meus pais Orlando e Anália, principalmente a minha mãe, um exemplo de ser humano para mim, para meus irmãos e todos que a cercam. Mãe me espelho em você, você é o ser humano mais extraordinário que eu conheço, obrigada por tudo, amo você infinitamente. Aos meus três irmãos André Luiz, Susana e Adriana e minha amada cunhada Elizandra, aos meus sobrinhos, à minha família e aos meus avós paternos Isac e Maria e avós maternos Sebastião e Francisca (*in memoriam*). Enfim dedico esta dissertação ao meu namorado Marcelo Henrique por sempre me apoiar, não sei o que faria sem você ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora pela oportunidade, por me dar força, fé e persistência ao longo dessa caminhada e pôr em nenhum momento me deixar sem auxílio.

À minha família, principalmente aos meus pais, meus irmãos, minha cunhada, meu cunhado e meus sobrinhos, muito obrigada pelas palavras e principalmente por tanto amor, vocês são tudo para mim.

Ao meu namorado que tanto me ajudou, meu amor nada disso teria sentido se você não estivesse ao meu lado. Te amo infinitamente.

Aos meus amigos, principalmente a Bárbara, Evelyn e Leonardo, obrigada pelo apoio e principalmente amizade de vocês. Vocês são luz na minha vida.

À Profa. Dra. Iandara Schettert Silva, minha orientadora, professora agradeço imensamente a oportunidade, e todo conhecimento compartilhado. Tenho uma grande admiração pela senhora. Obrigada por tudo que a senhora fez por mim. Gratidão.

Ao Prof. PhD. Albert Schiaveto de Souza por toda paciência e auxílio, professor sou grata ao senhor. Admiro o senhor desde minha época de graduação. Gratidão.

Ao Prof. Me. Pedro Carvalho Cassino e prof. Me. Anderson Fernandes da Silva e Dra. Elaine Silva de Pádua Melo, sou imensamente grata por toda ajuda, principalmente pela paciência em me ensinar. Gratidão por tudo.

Ao Prof. Dr. Petr Melnicok e ao prof. Dr., Valter Aragão do laboratório de metabolismo mineral, o meu muito obrigada pela disposição em me acolher em seu laboratório para realização das análises do meu experimento.

À Dra Priscila Pizzo pelas análises de minhas lâminas, muito obrigada pelo tempo e paciência dedicados ao meu estudo.

À dona Clecia, dona Cledina, dona Maria do Rosário e Seu Hélio, obrigada.

A Me. Lidiani Figueiredo Santana, as técnicas de laboratório Ulana e Simone e a acadêmica de medicina Mariana Vantini Soares, a minha gratidão.

Ao Dr. Caio Oliveira e a Me. Eliane Togoe, a minha gratidão pelas excelentes contribuições com meu estudo.

À toda equipe do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e da Universidade Católica Dom Bosco, muito obrigada pelo apoio e compreensão.

A todos da secretária do programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, a minha gratidão, principalmente a Aurea, o meu muito obrigada.

Enfim agradeço a todos que me ajudaram direto ou indiretamente para a realização desse estudo. Tenho pleno convicção que jamais conseguiria realizar esse estudo sem o apoio e auxílio de vocês. Muito obrigada.

“A persistência é o caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

RESUMO

PAIVA, Letícia Alves. Estresse oxidativo pulmonar em ratos diabéticos submetidos a hiperóxia. Campo Grande, 2017. [Dissertação – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O estresse oxidativo é muito estudado tanto na etiologia e fisiopatologia de doenças crônicas, como em mecanismos envolvidos em desencadeá-los. A hiperglicemia do diabetes está associada ao estresse oxidativo por meio da produção de agentes oxidantes, assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o estresse oxidativo pulmonar em ratos diabéticos submetidos a hiperóxia durante 90 minutos. Quarenta ratos Wistar machos, (8 semanas de idade) foram divididos em quatro grupos, contendo 10 animais cada, de acordo com a exposição de oxigênio: grupo controle (21% de oxigênio), grupo 50%, 75% e 100% de oxigênio (hiperóxia). Em cada um dos quatro grupos, 5 animais foram aleatoriamente submetidos a indução do diabetes por dose intraperitoneal de 55 mg/kg de estreptozotocina (STZ). Foram considerados diabéticos, os animais que desenvolveram glicemia > 250 mg/dl. Houve diferença significativa da glicemia após 72 horas da indução do diabetes em relação ao grupo experimental e controle. O malondealdeído (MDA) – marcador de estresse oxidativo, é uma das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A quantificação da concentração de MDA é considerado um parâmetro para avaliar a taxa de lipoperoxidação celular. Assim, nos grupos experimentais houve diferença significativa da concentração de MDA no tecido pulmonar e plasma ($p < 0,05$), com exceção do grupo experimental submetidos a 50% de oxigênio. Nos animais dos grupos controle também foram observadas diferenças significativas da concentração de MDA presentes no tecido pulmonar e plasma dos animais, ($p < 0,05$), com exceção dos animais do grupo controle submetido a 75% oxigênio. A concentração de MDA no tecido pulmonar em relação ao grupo de animais diabéticos e não diabéticos, mostrou diferença significativa no grupo 21 %, entretanto, nos grupos 75 e 100 % não houve diferença. Nossos achados sugerem que em animais diabéticos as altas concentrações de oxigênio (75 e 100%) parecem não atingir efeitos deletérios no que diz respeito a peroxidação lipídica do tecido pulmonar.

Palavras Chaves: Diabetes Mellitus Experimental, estreptozotocina, estresse oxidativo.

ABSTRACT

PAIVA, Letícia Alves. Pulmonary oxidative stress in diabetic rats exposed to hyperoxia. Campo Grande, 2017. [Dissertation- Graduate Program in Health and Development in the Midwest Region of the Federal University of Mato Grosso do Sul].

Oxidative stress is much studied both in the etiology and pathophysiology of chronic diseases, and in the mechanisms involved in triggering them. The hyperglycemia of diabetes is associated with oxidative stress through the production of oxidizing agents, so the purpose of this study was to evaluate the pulmonary oxidative stress in diabetic rats submitted to hyperoxia for 90 minutes. Forty male Wistar rats, (8 weeks of age) were divided into four groups, each containing 10 animals, according to their level of oxygen exposure: the control group (21% oxygen) and the 50%, 75% and 100% oxygen (hyperoxia) groups. In each of the four groups, 5 animals were randomly subjected to induction of diabetes by means of an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a dose of 55 mg/kg. Animals that developed a blood glucose level > 250 mg/dl were considered diabetic. 72 hours after induction of diabetes, there was a significant difference in blood glucose in the experimental groups relative to the control. Malondialdehyde (MDA) - a marker of oxidative stress, is one of the substances that react with thiobarbituric acid (TBA). The quantification of MDA concentration is considered a parameter to evaluate a rate of cellular lipoperoxidation. In the experimental groups there was a significant difference in the concentration of malondialdehyde (MDA) in lung tissue and blood plasma ($p < 0.05$), with the exception of the experimental group exposed to 50% oxygen. In the control groups, significant differences in the MDA concentration present in plasma and lung tissue were also observed ($p < 0.05$), with the exception of animals in the control group exposed to 75% oxygen. The MDA concentration in lung tissue with respect to the diabetic and non-diabetic groups showed a significant difference in the 21% group; however, there was no difference in the 75 and 100% groups. Our results suggest that in diabetic animals high oxygen concentrations (75 or 100%) do not appear to exert deleterious effects on lipid peroxidation in lung tissue.

Key Words: Experimental Diabetes Mellitus, streptozotocin, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Homeostase da glicose normal “Adaptado de” Fonte: (NOLAN; DAMM e PRENTKI, 2011)	22
Figura 2- Mecanismo diabetogênico de STZ. A alquilação de DNA, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), estresse oxidativo, danos ao DNA e sobrecarga de glicose levam à morte de células β , causando hiperglicemia juntamente com a diminuição da biossíntese e liberação de insulina “Adaptado de” Fonte:(GOYAL et al., 2016).	25
Figura 3- Representação gráfica da caixa de vidro e cilindro de oxigênio utilizados no experimento.	31
Figura 4- Fotomicrografia histológicas de cortes pulmonares de grupos controle. (A) grupo controle 21% apresentando escasso infiltrado inflamatório, ausência de colapso alveolar e ausência de espessamento de parede vascular (B) grupo controle 50% apresentando moderado infiltrado inflamatório, áreas de edema focal e ausência de espessamento de parede vascular (C) grupo controle 75% apresentando presença de edema e processo inflamatório (D) grupo controle 100% apresentando presença de atelectasia, presença macrófagos e processo inflamatório no grupo controle hiperóxia 100%. Coloração HE. Objetiva 10x.	38
Figura 5- Fotomicrografia histológicas de cortes pancreáticos. (A) rato não diabético, saudável, apresentando ilhota pancreática normal, não demonstrando deformidade e diminuição (B) rato diabético, apresentando diminuição e deformidade da ilhota pancreática, através da destruição das células beta. Coloração HE.Objetiva 40x.	39
Figura 6- Fotomicrografia histológicas de cortes pulmonares de grupos experimentais. (A) grupo experimental 21% apresentando edema, congestão e processo inflamatório (B) grupo experimental 50% apresentando atelectasia e processo inflamatório (C) grupo experimental 75% apresentando presença de macrófago e processo inflamatório (D) grupo experimental 100% apresentando presença de edema, presença de hemorragia, presença de atelectasia, e processo inflamatório. Coloração HE. Objetiva 40x.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características do diabetes tipo 1 e tipo 2 “Adaptado de” Fonte: (KING e BOWE, 2013)	23
Tabela 2- Resultados referentes à glicemia dos animais, de acordo com o momento e grupo experimental.....	35
Tabela 3- Resultados referentes à concentração de malondealdeído (MDA) no tecido e no plasma dos animais, de acordo com o grupo experimental e o grau de estresse oxidativo.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ATA	Atmosfera absoluta
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPG	Produção endógena de glicose
ER	Estresse reticular endoplasmático
FIO ₂	Fração inspirada de oxigênio
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon
GLUT-2	Transportador de glicose 2
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
HBO	Oxigenoterapia hiperbárica
i.p	Intraperitoneal
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
ORAC	Capacidade de absorvência do radical oxigênio
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaCO ₂	Pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RL	Radicais livres
RNC	Espécies de cloro reativas
RLO	Radicais livres de oxigênio
SBACAL	Sociedade Brasileira de Ciências em Animal de Laboratório
SOD	Superóxido dismutase

STZ	Estreptozotocina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TUNEL	Terminal Desoxinucleotidil transferase
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VMI	Ventilação Mecânica Invasiva

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	beta
dl	Decilitro
h	hora
(HNO ₂)	Ácido nitroso
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
L	Litro
min	Minuto
mg	Miligramas
mmol	Milimol
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Nm	Namômetro
(NO)	Óxido nítrico
(NO ₂ ⁻)	Nitritos
(NO ₃ ⁻)	Nitratos
(N ₂ O ₃)	Óxido nitroso
O-GlcNAc	N-acetilglicosamina
(OH)	Hidroxila
p/v	Peso/volume
(O ₂ ^{•-})	Superóxido
(ONOO ⁻) ₁₀	Peroxinitritos
Rpm	Rotações por minuto
(RO [•])	Alcoxila
(ROO [•])	Peroxila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Estresse oxidativo	17
2.2 Radicais Livres	18
2.3 Diabetes Mellitus	20
2.3.1 Fisiopatologia do diabetes	21
2.3.2 Modelo experimental de diabetes	23
2.4 Hiperóxia	25
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivo específico	29
4 MÉTODOS	30
4.1 Animais de experimentação	30
4.2 Indução do diabetes	30
4.3 Protocolo experimental de exposição a hiperóxia	31
4.4 Procedimento de análises das amostras	31
4.5 Avaliação do estresse oxidativo	32
4.6 Análise histopatológica	32
4.7 Análise estatística	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	51

1.INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, a ação da insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada com danos a longo prazo, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). O Diabetes Mellitus designa-se por ser um distúrbio crônico e complexo, de evolução lenta e diagnóstico dificultoso.

Em 2011 havia uma estimativa de 366 milhões de pessoas no mundo com diabetes. Em 2030 a estimativa é que ocorra um aumento de 50,7% do número de pessoas com diabetes no mundo, esse aumento pode decorrer devido ao crescimento populacional, o envelhecimento das populações e urbanização associado a mudança de estilo de vida. O aumento global previsto do número de pessoas com diabetes de 2011 para 2030 tem um crescimento médio anual de 2,7 % que corresponde a 1,7 vezes o crescimento anual total da população adulta mundial. No Brasil, em 2011 o número de pessoas com diabetes entre 29 e 79 anos era de 12,4 milhões de pessoas, a estimativa para 2030 é de que haja 19,6 milhões de pessoas com diabetes (WHITING *et al.*, 2011).

Estudos de Davis *et al.* (2000) e Walter *et al.* (2003) demonstraram que o DM causa anormalidades funcionais no sistema pulmonar, tais como redução no recolhimento elástico, nos volumes e na capacidade de difusão. De acordo com a revisão de Brownlee (2001), a hiperglicemia desencadeia o estresse oxidativo por meio do aumento da produção de ânion superóxido mitocondrial e do aumento da glicosilação não enzimática de proteínas, assim como por meio da ativação de vários fatores de transcrição celular, que pode afetar a função celular e provocar as alterações pulmonares citadas.

O estresse oxidativo é aceito como um fator causal das complicações crônicas e pode ser medida com base nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade da catalase (WIETZYCOSKI *et al.*, 2016).

A hiperglicemia pode ainda ativar fatores de transcrição nuclear desencadeando um aumento na expressão de mediadores inflamatórios. A

combinação desses mecanismos irá alterar a produção de oxidantes, causando o estresse celular e o consequente dano estrutural. Estudos experimentais demonstraram que a resistência venosa pulmonar se eleva duas semanas após o início do DM e que a hiperglicemia induz o estresse oxidativo no tecido pulmonar (CALLES-ESCANDON e CIPOLLA, 2001).

A exposição a altas concentrações de oxigênio produz alterações do trato respiratório em seres humanos e outros animais, que ocorrem no epitélio pulmonar, na rede arterial pulmonar, nos septos alveolares e também no espaço pleural (CRAPO, 1986).

Atualmente há poucos estudos que evidenciam o uso do oxigênio, seja em pequenas, médias ou altas concentrações em pacientes diabéticos, elucidando as possíveis alterações estruturais pulmonares. Assim, nosso estudo tem como objetivo avaliar o estresse oxidativo pulmonar em um modelo de diabetes experimental submetido a hiperóxia.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a interrupção da sinalização redox e controle e/ou danos moleculares (SIES e JONES, 2007).

Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), a oxidação da camada lipídica da membrana celular. O estresse oxidativo pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Segundo Buresh e Berg (2015), o estresse oxidativo envolve moléculas que são agentes oxidantes especialmente fortes, conhecidos coletivamente como radicais livres, e incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). O estresse oxidativo tem sido implicado na etiologia de várias doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e câncer.

A partir de 1985, o conceito de estresse oxidativo foi introduzido na pesquisa em biologia redox e medicina (SIES, 2015), e se estende até os dias atuais o interesse do estresse oxidativo principalmente na fisiopatologia de diversas doenças e nas ações de agentes antioxidantes.

2.2 Radicais Livres

Os radicais livres (RL) são entidades químicas reativas de curta duração, contendo um ou mais elétrons não emparelhados, tornando-se assim altamente reativas. Os radicais livres podem ser classificados em: espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies de cloro reativos (RCS) (ASMAT; ABAD E ISMAIL, 2016).

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativo e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (como por exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos), na desintoxicação

de drogas, e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam vasodilatação (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). O oxigênio que respiramos é metabolizado em nosso organismo, em condições fisiológicas normais, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio consumido na mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons. O restante é utilizado por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Em excesso, os RL apresentam efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas e DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Conforme Barreiros, David e David (2006), as principais espécies reativas de oxigênio distribuem-se em dois grupos: os radiculares: hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}\bullet$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as espécies reativas de nitrogênio incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-)¹⁰. Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são geradas durante o metabolismo aeróbio, e as células contêm sistemas antioxidantes de defesa para equilibrar a produção. A superprodução dessas espécies reativas, levam ao estresse oxidativo e está implicado em diversas doenças (CHEN; FAN e YANG, 2016).

Segundo Vasconcelos et al (2007), o sistema antioxidante é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e a glutational peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutational como co-fator. O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com

destaque para a glutatona (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno.

2.3 Diabetes Mellitus

O diabetes atualmente tornou-se um grande problema de saúde pública mundial. A cada ano aumenta o número de pessoas com diabetes.

Além dos 415 milhões de adultos que se estima que atualmente têm diabetes em perspectiva mundial, há 318 milhões de adultos com tolerância à glicose prejudicada, o que coloca em alto risco de desenvolver a doença no futuro. Estima-se que 193 milhões de pessoas com diabetes no mundo não são diagnosticadas e, portanto, estão em maior risco de desenvolver complicações. A estimativa é que haverão 642 milhões de pessoas com diabetes no mundo em 2040. Dados de 2015 relataram que na América central e do Sul 29,6 milhões de pessoas tem diabetes, e que em 2040 esse número subirá para 48,8 milhões de pessoas com a doença. Os números impressionam, segundo dados de 2015 um a cada onze adultos tem diabetes no mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O diabetes é classificado em quatro classes: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, intolerância à glicose e diabetes gestacional. A diabetes tipo 1 é caracterizada por deficiência da produção de insulina no corpo. Pessoas com diabetes tipo 1 requerem a administração diária de insulina para regular a quantidade de glicose no sangue. A causa do diabetes tipo 1 não é conhecida e atualmente não é evitável. Os sintomas incluem micção e sede excessiva, fome constante, perda de peso, alterações de visão e fadiga. A diabetes tipo 2 resulta do uso ineficaz da insulina no corpo. É responsável por grande parte do número de diabéticos no mundo. Os sintomas podem ser semelhantes aos do diabetes do tipo 1, mas são frequentemente menos marcados ou ausentes. Como resultado, a doença pode não ser diagnosticada por vários anos, até que as complicações surjam. Durante muitos anos o diabetes tipo 2 foi visto apenas em adultos, mas há casos em crianças. A intolerância à glicose e a glicemia de jejum alterada são condições intermediárias na transição entre níveis normais de glicose no sangue e diabetes (especialmente tipo 2), embora a transição seja inevitável. Pessoas com intolerância à glicose e glicemia de jejum alterada

possuem um maior risco de ataques cardíacos e derrames. A diabetes gestacional é uma condição temporária que ocorre na gravidez e traz risco a longo prazo de diabetes tipo 2. A condição está presente quando os valores de glicose no sangue estão acima do normal, mais ainda abaixo do diagnóstico de diabetes. As mulheres com diabetes gestacional estão em risco aumentado de algumas complicações durante a gravidez e parto, assim como seus bebês (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

2.3.1 Fisiopatologia do Diabetes

No estado de jejum de um indivíduo saudável, a concentração de glicose no sangue é determinada pelo equilíbrio entre a produção endógena de glicose (EGP), principalmente através da glicogenólise hepática e da gliconeogênese, e sua utilização por tecidos independentes da insulina, como o cérebro. O EGP previne a hipoglicemia e é suportado por uma baixa taxa de insulina/glucagon no plasma. O cérebro é dependente da glicose e, portanto, outros tecidos, como coração e músculo esquelético fornecem nutrientes sem glicose (por exemplo, ácidos graxos não esterificados da lipólise do tecido adiposo). No estado alimentado (refeição com hidratos de carbono) as concentrações de glicose do sangue aumentam devido à absorção no intestino, que estimula a secreção de insulina pelas células β das ilhotas e suprime a secreção do glucagon das células α . O EGP é suprimido (o que ajuda a reduzir a entrada de glicose total no sangue) e a captação em tecidos periféricos sensíveis à insulina, tais como o coração, o músculo esquelético e tecido adiposo, é ativada (o que aumenta a taxa de eliminação da glicose). Os processos neuro-hormonais incluem a liberação de hormônios incretina, tais como GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon), que aumenta a secreção de insulina estimulada pela glicose e a supressão de glicose da secreção de glucagon. A lipólise do tecido adiposo é suprimida e o metabolismo anabólico é promovido. As concentrações de glicose tornam-se próximas ao nível de jejum dentro de 2 h (figura 1) (NOLAN; DAMM e PRENTKI, 2011).

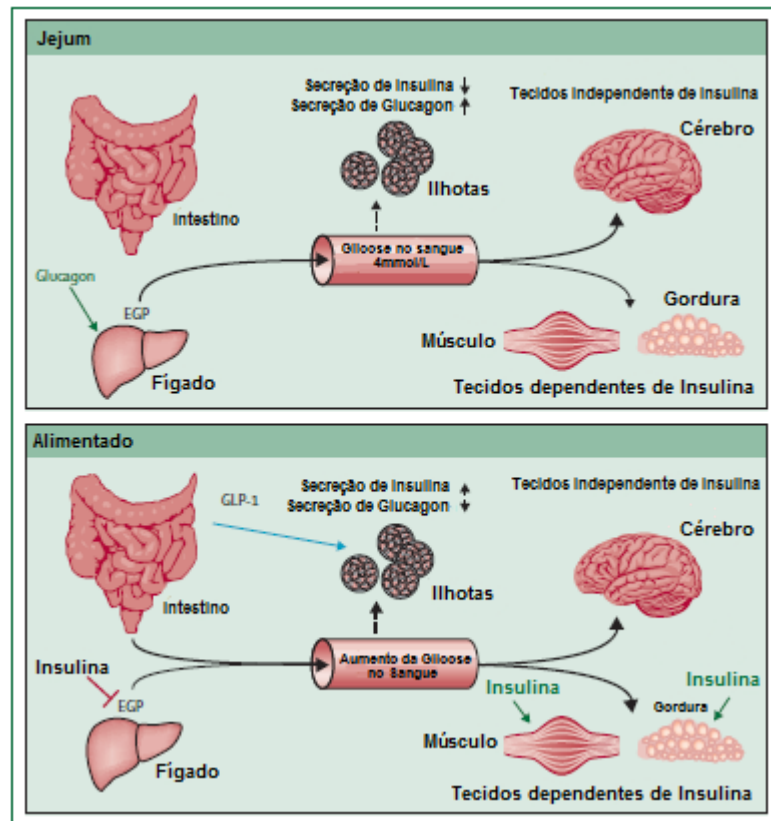


Figura1: Homeostase da glicose normal Fonte: "Adaptado de" (NOLAN; DAMM e PRENTKI, 2011)

O diabetes tipo 1 é uma condição na qual a destruição da célula pancreática geralmente leva à deficiência absoluta de insulina (DANEMAN, 2006). A infiltração de células mononucleares nos ilhéus pancreáticos (insulite) e uma redução das células β produtoras de insulina têm sido reconhecidas como características patológicas chave do pâncreas quando obtidas na necropsia de pacientes com diabetes tipo 1 (ATKINSON e EISENBARTH, 2001).

Conforme Nolan; Damm e Prentki (2011) o diabetes tipo 2 é um distúrbio metabólico da homeostasia caracterizado por hiperglicemia e metabolismo lipídico alterado causado por células β ilhotas sendo incapazes de secretar insulina adequada, em resposta a falta de exercício físico regular e alimentação inadequada, como consequência o sobrepeso ou obesidade e resistência à insulina.

Na tabela 1 podemos observar algumas características do Diabetes (tipo 1 e tipo 2).

Tabela 1. Características do diabetes tipo 1 e tipo 2.

	Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2
Patogênese	Destruição autoimune de células β pancreáticas	A resistência à insulina associada à incapacidade das células β para compensar, levando a uma deficiência relativa de insulina
Características Principais	Infiltração imune das ilhotas Auto anticorpos Massa severamente reduzida de células β	A resistência à insulina no músculo e no fígado Massa celular β e/ou função reduzida
Início	Frequentemente ocorre na infância com etiologia desconhecida	Geralmente ocorre em adultos com mais de 40 anos, mas nos últimos anos tornou-se mais comum em pacientes mais jovens Fortemente associada com obesidade e sedentarismo
Tratamento	Insulina exógena por injeção ou bomba de insulina Transplante de ilhotas ou pâncreas em um pequeno subconjunto de pacientes	Intervenções no estilo de vida Metformina Sulfonilureias Glitazones Gliptins GLP-1 miméticos de insulina

Fonte: “Adaptado de” (KING e BOWE, 2013).

2.3.2 Modelo Experimental de Diabetes

Os modelos animais de diabetes têm sido usados extensivamente na obtenção do esclarecimento sobre essa doença (CORREIA-SANTOS *et al.*, 2012).

A aloxana e a estreptozotocina (STZ) são amplamente utilizados para induzir diabetes experimental em animais. A aloxana e a estreptozotocina são citotóxicas, análogas de glicose que se acumulam preferencialmente em células β pancreáticas através do transportador de glicose GLUT2 (LENZEL, 2008).

A aloxana, um derivado de pirimidina, possui dois efeitos patológicos distintos: o primeiro mecanismo inibe a secreção de insulina induzida pela glicose através da inibição da enzima glicoquinase, que funciona como sensor de glicose da célula β . O segundo mecanismo induz a formação de ROS que resulta na necrose seletiva de células β pancreática através da diabetes insulínica. A aloxana tem sua ação no pâncreas através da rápida captação pelas células β pancreáticas, o que tem sido proposto como uma das características mais importantes dessa substância. No entanto, alguns pesquisadores demonstram resistência quanto a sua seletividade de ação (LENZEL, 2008; SZKUDELSKI, 2001).

Segundo SZKUDELSKI (2001), a estreptozotocina (STZ) é um glicosídeo nitrosuréia natural isolado do fungo *Streptomyces achromogenes*. A alquilação da estrutura do DNA celular das células β do pâncreas é considerada como principal mecanismo indutor da STZ. O acúmulo de espécies tóxicas promove a degradação do DNA assim como a ativação da poli (ADP ribose) -polimerase-1, enzima reparadora do DNA, que utiliza como substrato a forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). A elevação da atividade dessa enzima diminui a concentração de NAD⁺ intracelular, levando à inibição do ciclo do ácido tricarboxílico e diminuição do consumo de oxigênio pela mitocôndria, o que limita a produção de ATP e resulta em apoptose celular, culminando com a inibição da secreção e biossíntese de insulina. Além disso, a STZ inibe a atividade da enzima superóxido dismutase, permitindo o acúmulo de ROS, que provocam a elevação na peroxidação lipídica e diminuição na atividade de outras enzimas antioxidantes das células β . (SANTOS, 2014-dissertação).

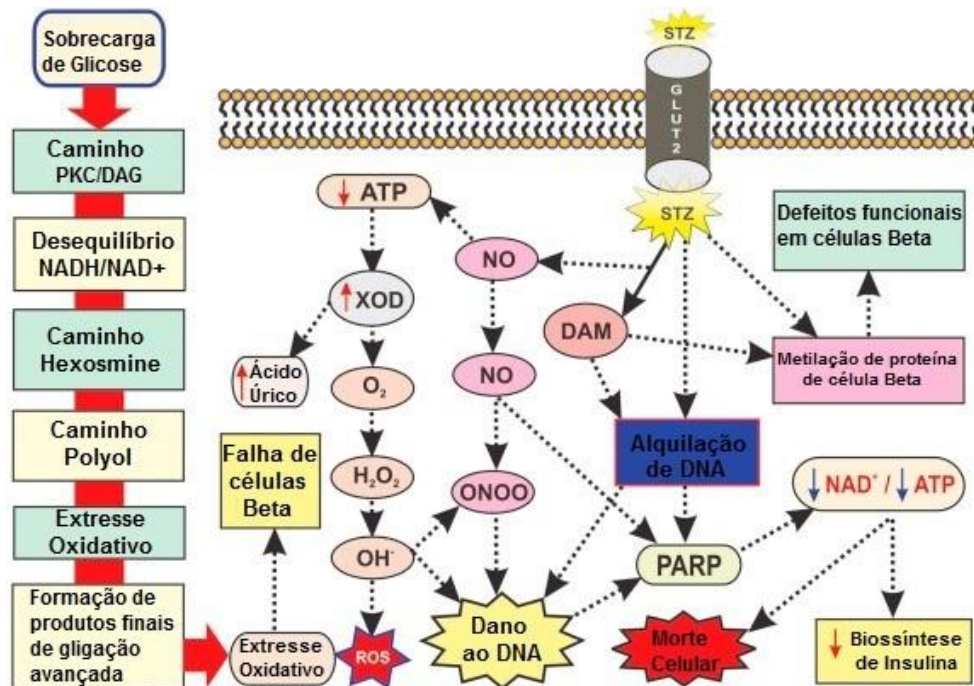


Figura 2- Mecanismo diabetogênico de STZ. A alquilação de DNA, a geração de ROS e RNS, estresse oxidativo, danos ao DNA e sobrecarga de glicose levam à morte de células β , causando hiperglicemia juntamente com a diminuição da biossíntese e liberação de insulina. “Adaptado de” Fonte: (GOYAL et al., 2016).

Destruição seletiva das células β , deficiência de insulina e hiperglicemia são características de propriedades diabetogénico da STZ. O transportador de insulina GLUT-2 localizado no plasma, medeia a entrada de STZ nas células β do pâncreas. Há resistência às ações da estreptozotocina em células produtoras de insulina que não têm expressão do transportador GLUT-2, os roedores por exemplo, possuem expressão GLUT-2 que especificamente adquire STZ nas células β pancreáticas e fortalece a ação diabetogénica da droga. Este xenobiótico (STZ) tem sido usado para induzir tanto o DM1 quanto o DM2, dependendo da concentração, dose e via de administração (GOYAL et al., 2016).

2.4 Hiperóxia

A oxigenoterapia é considerada uma importante ferramenta terapêutica, eficaz em casos de insuficiência respiratória. Essa ferramenta terapêutica, consiste em um tratamento em que a pressão parcial do oxigênio no sangue arterial é

aumentada por meio de maior concentração de oxigênio no ar inspirado (Mendes *et al.*, 2010).

O oxigênio é largamente prescrito por profissionais da unidade de terapia intensiva, salvando vidas quando administrado corretamente. Porém, quando ofertado sem avaliação, indicação e monitorização coerentes pode gerar graves consequências. Como qualquer outra profilaxia, existem claras indicações quanto ao tratamento, métodos apropriados de administração e monitoramento (VALENÇA *et al.*, 2007).

Os pulmões estão entre os órgãos mais oxigenados do corpo humano (Lu *et al.*, 2016). Ele é protegido contra o oxigênio por enzimas antioxidantes endógenos, tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase. A hiperóxia gera ROS, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que induzem a lesão pulmonar. A exposição prolongada de oxigênio a 100% no epitélio capilar e endotélio pulmonar leva a uma extensa infiltração de células inflamatórias, edema intersticial e intra alveolar. Um estudo com ratos relatou a morte por insuficiência respiratória após 66-78 h expostos continuamente a 100% de oxigênio (CLAYTON, *et al.*, 2001).

Valença e colaboradores (2007) estudaram os efeitos de curto prazo da exposição a altas concentrações de oxigênio (hiperóxia) em pulmões de ratos Wistar. Os animais expostos ao oxigênio por 90 minutos apresentaram infiltração de células inflamatórias nos alvéolos e nos septos alveolares. Glóbulos vermelhos extravasaram dos capilares para os alvéolos com evidências de congestão, hemorragia e edema de septo. Os autores concluíram que a hiperóxia por 90 minutos causa prejuízo no parênquima pulmonar, resultando em dano oxidativo e infiltrado inflamatório. Apesar de não ser possível garantir no seu estudo que a hiperóxia 100% foi alcançada, acredita que a concentração de oxigênio na câmara de exposição deveria ter atingido quase este valor. Os autores sugerem que o tempo é um fator importante e crucial no processo de lesão induzida pela hiperóxia. A observação desse modelo pode ser estendido para seres humanos, embora a introdução de doses e a duração da hiperóxia permaneça desconhecidas. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão pulmonar induzida por oxigênio são complexos. No entanto, sugere-se que, mesmo em uma fase aguda, a suplementação de oxigênio exerça efeito deletério para o pulmão.

Nesse contexto, estudos apontam que o dano epitelial pulmonar induzido pela exposição à hiperóxia esteja associado ao estresse oxidativo (HAY e BELL, 2000).

Mazulo Filho *et al.* (2012) em seu estudo sobre a correlação do estresse oxidativo causado na ventilação mecânica invasiva (VMI) em pacientes internados na UTI, verificaram um aumento do estresse oxidativo ao final da VMI, em comparação ao início da VMI, analisados a partir do aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e diminuição das dosagens séricas da superóxido dismutase (SOD) e catalase. Os autores observaram ainda a correlação estatisticamente significativa entre a FiO_2 (fração inspirada de oxigênio) e o TBARS (ácido tiobarbitúrico) antes e após à VMI, sugerindo que quanto maior for a FiO_2 maior será o estresse oxidativo.

Reis *et al.* (2013), analisou os efeitos da exposição à hiperóxia (100% de oxigênio) sobre a histoarquitetura pulmonar de camundongos neonatos e concluíram que a hiperóxia promoveu alterações na arquitetura do pulmão, aumentou áreas de atelectasia e provocou hemorragia alveolar difusa no tecido pulmonar dos animais.

Métodos de terapias hiperbáricas são usados para tratar doenças ou lesões que utilizam pressões mais elevadas do que a pressão atmosférica. Nas terapias hiperbáricas, a oxigenoterapia hiperbárica (HBO), é a administração de oxigênio puro (100%) a pressões superiores à pressão atmosférica, isto é, mais do que um ATA, por razões terapêuticas (ALBUQUERQUE e SOUZA, 2007).

O estudo de Pereira e colaboradores (2009), os autores observaram alterações histológicas compatíveis com início do processo inflamatório no tecido pulmonar e aumento da atividade celular desse tecido, que foram evidenciadas pelo aumento significativo da espessura dos septos alveolares no tecido pulmonar de ratos Wistar expostos a concentração de 100% de oxigênio durante 72 horas.

O estudo sobre os efeitos de oxigênio em pulmões de ratos demonstrou que a exposição durante 72 horas de oxigênio na concentração de 100% pode causar morte e originar lesão pulmonar difusa. Os animais expostos a concentração de 70% de oxigênio foram identificados espessamento das paredes alveolares e congestão capilar. Porém, os animais submetidos a concentração de 40% de oxigênio não

apresentaram alterações histopatológicas significativas no tecido pulmonar. (PEREIRA et al., 2014).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o estresse oxidativo pulmonar em ratos diabéticos submetidos a hiperóxia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o surgimento de lesões pulmonares em ratos diabéticos e não-diabéticos segundo as concentrações de oxigênio após o tempo de exposição de 90 minutos;
- Verificar a ocorrência de estresse oxidativo na hiperóxia pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Identificar histopatologicamente as lesões causadas no tecido pulmonar e pancreático;

4 MÉTODO

4.1 Animais de experimentação

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/PPGSD –UFMS) protocolo número 686/2015. Os princípios éticos para experimentação com animais da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) foram seguidos (CONCEA, 2015). Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, adultos, da linhagem WISTAR, com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério - UT/ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. Os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 40 a 60% de umidade relativa), com alimentação padrão e água *ad libitum*. Essas condições foram utilizadas com base para período de adaptação inicial de 7 dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 10 animais. Em cada grupo, metade dos animais tiveram diabetes induzida (grupo experimental) e a outra metade foi mantida como controle do grupo (grupo controle). Cada grupo foi exposto a diferentes concentrações de oxigênio (21,50,75 e 100%) durante 90 minutos. O estudo foi realizado no setor de Experimentação do Biotério – UT/ CCBS/ UFMS.

4.2 Indução do diabetes

Em 20 animais, foi injetado uma solução fresca de estreptozotocina por via intraperitoneal (i.p), (55mg/kg; Sigma Chemical, StLouis, MO, EUA) preparada em tampão de citrato de sódio 20 mmol/L, (pH 4,5) injetado dentro de 15 minutos da preparação, após jejum de 12 h. Foi feita a aferição da glicemia nos 40 animais, sendo realizada nos seguintes momentos: glicemia de jejum; glicemia após 8 h, após 24 h, após 48 h e após 72 h da indução do diabetes. O momento 72 h da indução do diabetes equivale ao dia da eutanásia dos animais. A glicemia foi determinada utilizando-se um ensaio enzimático colorimétrico (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostics, EUA). Os animais que às 72 horas após a aplicação de estreptozotocina desenvolveram glicemia >250 mg/dl foram inseridos no modelo de diabetes experimental (PERES *et al.*, 2014).

4.3 Protocolo experimental de indução a hiperóxia

Após a inserção do grupo induzido ao diabetes no modelo de diabetes experimental, cada um dos quatro grupos foi aleatoriamente exposto a uma determinada concentração de oxigênio. Os animais foram alocados para o protocolo experimental em caixas de vidro desenvolvido para o estudo nas dimensões de 33x40x30 cm com fechamento hermético proporcionado pela adesão tampa/caixa com adesivo de silicone e suplemento de oxigênio. O oxigênio umidificado foi administrado de forma contínua, prevenindo assim o acúmulo de dióxido de carbono e mantendo a concentração constante de oxigênio desejada em todos os grupos, no tempo determinado de 90 minutos. O controle da concentração de oxigênio dentro da caixa foi realizado através de um fluxômetro calibrado (capacidade de 15 L/min) acoplado a um cilindro de oxigênio medicinal. Após a exposição ao oxigênio os animais foram submetidos à eutanásia por injeção i.p de pentobarbital sódico. Foram coletados os pulmões, o pâncreas e amostras de sangue.

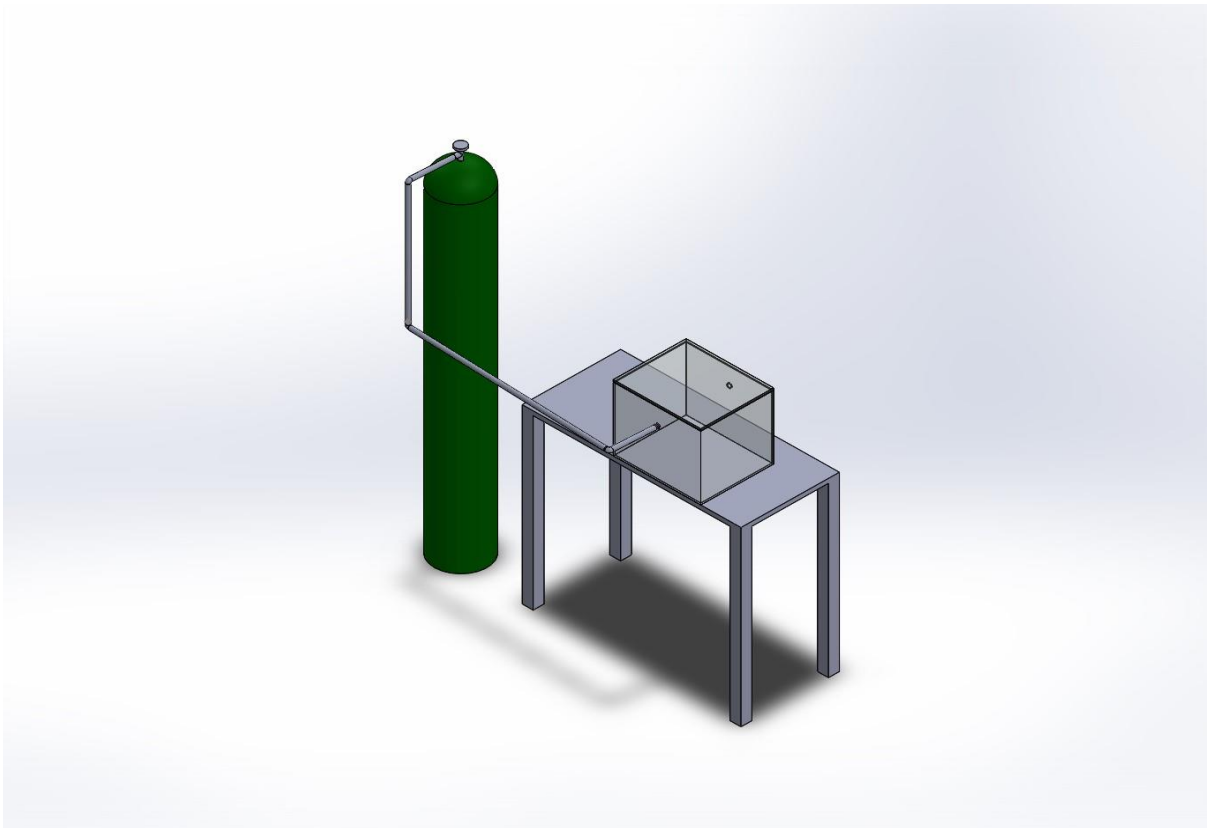


Figura 3: Representação gráfica da caixa de vidro e cilindro de oxigênio utilizados no experimento.

4.4 Procedimento de análise de amostra

Os pulmões foram dissecados para análise histopatológica e avaliação do estresse oxidativo tecidual e armazenados a -80°C. No dia da análise foram descongelados em temperatura ambiente, utilizados na proporção de 1:10 (p/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,5% (MERCK), macerados em disruptor ultrassônico e centrifugados a 3.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. Alíquotas de 500 µL de sobrenadante do macerado de pulmão e de 500 µL de plasma de cada animal estudado foi adicionado a 1.000 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8% (Sigma) e incubado por 1 h a 90°C. A solução foi resfriada por 15 min, homogeneizada com 4 mL de álcool n-butílico (MERCK), e centrifugada a 3.000 rpm por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para micro tubos de x mL e o precipitado descartado. O sobrenadante foi utilizado para realizar a leitura em espectrofotômetro da marca Thermo, modelo Multiskan GO, com comprimento de onda de 535 nm, realizado através de placa com leitura duplicada. As dosagens foram expressas em ng/mL.

As amostras de sangue foram colhidas através de punção cardíaca. O plasma foi separado por centrifugação a 3500 rpm durante 10 min e congelado a -80 °C até o momento da análise. As amostras séricas de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente e adicionada a tubos de ensaio identificados. Uma alíquota de 250 microlitros de TBA foram adicionados para cada 125 microlitros de plasma. Após a pipetagem da amostra, os tubos foram fechados com tampa de rosca e aquecido num banho de água a 94 ° C durante 1 hora. Subsequentemente, as amostras foram aclimatadas a temperatura ambiente e mantidas em descanso sobre um contador à temperatura ambiente durante 15 min, 1 ml de álcool n-butílico foi adicionado a cada tubo de ensaio. Em seguida, cada tubo foi misturado individualmente no agitador de tubos, de modo a alcançar a extração máxima de MDA para a fase orgânica. Finalmente, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm durante 10 min. A leitura do plasma foi realizada através de placa com leitura duplicada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm.

O pâncreas e o pulmão foram dissecados para análise histopatológica. Os órgãos utilizados para essa análise foram imersos por infusão lenta em uma solução tamponada de formalina a 10% preservando a arquitetura alveolar e pancreática. Foi

realizado a troca da solução tamponada de formalina a 10 % a cada 48 horas durante 3 vezes para fixação nos tecidos.

4.5 Avaliação do estresse oxidativo

A decomposição de ácidos poli-insaturados desencadeia a formação de malondealdeído (MDA), como um indicador do grau de peroxidação. A absorbância foi determinada por espectrofotometria a 535 nm (BUEGE e AUST, 1978). Para o cálculo da concentração MDA foi utilizada uma equação obtida a partir da curva padrão da absorbância gerado por concentrações conhecidas como padrão (PERCÁRIO, 2004; UCHIYAMA e MIHARA, 1978).

4.6 Análise histopatológica

Os cortes dos tecidos pulmonares e pancreáticos foram analisados por um patologista, sem o conhecimento da origem das lâminas, através da microscopia óptica de luz, microscópio Leica DM5500B, câmera de microscópio digital Leica DFC495 (8 Megapixel) e software Leica Application Suite (LAS) versão 4.0, desde a visão panorâmica até a objetiva de aumento final de 40x, em campos aleatórios e sobre dois cortes seriados e transformados em escores. Os tecidos foram embebidos em parafina cera, seccionados a 4µm e coradas com hematoxilina e eosina (H & E). Nos cortes pulmonares foram observadas as seguintes alterações: alterações na arquitetura pulmonar, apoptose celular, macrófagos intravasculares, espessamento do septo alveolar, aumento da membrana extracelular, hemorragia, edema, congestão pulmonar, perda da luz alvéolo capilar e processo inflamatório. Nos cortes do tecido pancreático foram observadas seguintes alterações: alterações na arquitetura do pâncreas, diminuição da área/tamanho das ilhotas pancreáticas, apoptose celular, macrófagos e processo inflamatório.

Foi realizado a contagem em cruzes (+) onde se utilizou o score leve (+), moderada (++) e intensa (+++), se houvesse presente algumas das alterações relacionadas tanto nos tecidos pancreático quanto no pulmonar.

4.7 Análise estatística

A comparação entre os momentos de análise, em relação à glicemia dos animais, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey. A comparação entre os animais diabéticos e aqueles não diabéticos, em relação à glicemia ou à taxa de TBARS no tecido e no plasma, foi realizada por meio do teste t-student. Já a comparação entre os graus de estresse oxidativo, também em relação à glicemia ou à taxa de TBARS no tecido e no plasma, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. A comparação entre o tecido e o plasma, em relação à taxa de TBARS, foi realizada por meio do teste t-student pareado. A comparação entre os graus de estresse oxidativo, também em relação às alterações histopatológicas pulmonares e pancreáticas, foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Os demais resultados deste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas. A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5% (ROWE, 2007).

5 RESULTADOS

Os resultados referentes à glicemia dos animais de acordo com o momento de análise e o grupo (experimental ou controle), estão apresentados na Tabela 2.

Nos grupos diabetes induzido houve diferença significativa da glicemia em relação aos momentos de análise glicêmica (Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, Grupo 21%: $p < 0,001$; Grupo 50%: $p < 0,001$; Grupo 75%: $p = 0,005$ e Grupo 100%: $p < 0,001$) sendo que, os cinco animais do grupo diabetes induzido 21 % a partir de 24 horas da administração da STZ, já apresentavam-se hiperglicêmicos, diferente dos outros três grupos experimentais, onde a maioria dos animais só apresentaram hiperglicemia (glicemia > 250 mg/dL), 72 horas após a indução do diabetes (pós teste de Tukey, $p < 0,05$). Comparando-se os grupos controle e diabetes induzido observamos diferenças significativas da glicemia no momento de análise glicêmica 72 horas após a indução do diabetes, nos oito subgrupos, (teste t-student, $p < 0,05$), onde podemos observar a diferença da glicemia entre os dois grupos (diabéticos e não diabéticos), demonstrando que os animais dos grupos experimentais já estavam inseridos em um modelo de diabetes experimental. Os animais dos grupos controle, também apresentaram diferença significativa da glicemia em relação aos momentos de análise glicêmica (Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, Grupo 21%: $p = 0,036$; Grupo 75%: $p < 0,001$ e Grupo 100%: $p < 0,001$), com exceção do Grupo 50% ($p = 0,061$), que apesar de não ser estatisticamente significativo, encontra-se próximo do valor de p ($p < 0,05$). Todavia, apesar dos animais dos grupos controle apresentarem essa estatística significativa, essas variações glicêmicas dos momentos analisados, não se elenca a inserção de um modelo de diabetes experimental, já que nesse estudo foi considerado hiperglicemia os animais que desenvolveram glicemia > 250 mg/dl, o que não ocorreu, em nenhum animal inserido no grupo controle.

Tabela 2: Resultados referentes à glicemia dos animais, de acordo com o momento e o grupo experimental.

Grupos	Momento	Diabetes		Valor de p
		Sim	Não	
21%				
	Jejum	71,80±9,50b	127,20±11,17ab	<0,001
	Após 8 horas	73,80±8,41b	109,00±12,55b	<0,001
	Após 24 horas	318,80±186,32a	120,80±7,69ab	0,045
	Após 48 horas	468,40±135,14a	129,80±11,01a	<0,001
	Na eutanásia	472,00±131,42a	125,20±10,35ab	<0,001*
Valor de p (Momentos)		<0,001*	0,036*	
50%				
	Jejum	116,00±8,77b	105,80±8,67a	0,102
	Após 8 horas	128,00±8,75b	129,00±14,61a	0,899
	Após 24 horas	182,40±90,33b	119,20±11,99a	0,160
	Após 48 horas	172,60±93,01b	115,60±8,14a	0,209
	Na eutanásia	521,40±103,77a	115,60±8,14a	<0,001*
Valor de p (Momentos)		<0,001*	0,061	
75%				
	Jejum	105,40±9,45b	99,00±6,86c	0,255
	Após 8 horas	130,60±4,39b	116,20±6,06ab	0,003
	Após 24 horas	243,40±154,3102ab	117,20±3,56ab	0,105
	Após 48 horas	233,40±159,50ab	109,00±9,85b	0,120
	Na eutanásia	362,40±133,25a	129,00±9,49a	0,005*
Valor de p (Momentos)		0,005*	<0,001*	
100%				
	Jejum	104,00±19,39b	96,00±7,84b	0,417
	Após 8 horas	119,60±24,13b	123,60±6,91a	0,731
	Após 24 horas	228,60±154,99b	115,20±5,59a	0,141
	Após 48 horas	232,20±162,10b	116,40±10,74a	0,150
	Na eutanásia	477,60±50,06a	128,00±13,15a	<0,001*
Valor de p (Momentos)		<0,001*	<0,001*	

Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão da média. Comparação entre momentos: teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, com pós-teste de Tukey. Letras diferentes na coluna representam diferenças significativas entre os momentos de análise em relação à glicemia dos animais. Comparação entre animais diabéticos e não diabéticos: teste t-student. Diferenças significativas são mostradas por *, p<0,05.

Os resultados referentes a concentração de MDA no tecido e no plasma dos animais de acordo com o grupo (experimental ou controle) e o estresse oxidativo (21, 50, 75 e 100%), estão apresentados na Tabela 3.

Nos grupos onde a diabetes foi induzida houve diferença significativa da concentração de MDA no tecido pulmonar e plasma (teste t-student pareado, Grupo

21%: $p < 0,001$; Grupo 75%: $p = 0,001$ e Grupo 100%: $p < 0,005$), com exceção do grupo de animais diabéticos submetidos a 50% de oxigênio, onde não foi observada diferença significativa, $p = 0,131$ na concentração de MDA. Nos animais dos grupos controles também foram observadas diferenças significativas da concentração do MDA presentes no tecido pulmonar e plasma dos animais, (teste t-student pareado, Grupo 21%: $p = 0,07$; Grupo 50%: $p = 0,008$ e Grupo 100%: $p = 0,003$), com exceção dos animais do grupo controle expostos a concentração de 75% oxigênio, que apesar de não ser significativo estatisticamente ($p = 0,059$), encontra-se próximo do valor de p ($p < 0,05$). A concentração de MDA no tecido pulmonar em relação ao grupo de animais diabéticos e não diabéticos, mostrou diferença significativa nos grupos 21 e 50% ($p < 0,001$ e $p = 0,043$ respectivamente), nos grupos 75 e 100 % não houve diferença em relação aos animais diabéticos e não diabéticos ($p > 0,05$). A concentração de MDA no plasma sanguíneo dos animais em relação ao grupo de animais diabéticos e não diabéticos não demonstrou nenhuma diferença em nenhum dos quatro grupos ($p > 0,05$).

Tabela 3: Resultados referentes a concentração de malondealdeído (MDA) no tecido e no plasma dos animais, de acordo com o grupo experimental e o grau de estresse oxidativo.

Estresse oxidativo	Local	Diabetes		Valor de p
		Sim	Não	
21%				
Valor de p (Momentos)	Tecido	2674,20±173,87	1773,00±312,91	<0,001
	Plasma	1256,00±113,29	1133,80±73,71	0,078
		<0,001*	0,007*	
50%				
Valor de p (Momentos)	Tecido	1578,40±135,47	1813,40±171,96	0,043
	Plasma	1307,40±362,05	1187,40±155,35	0,515
		0,131	0,008*	
75%				
Valor de p (Momentos)	Tecido	1899,20±78,81	1775,80±157,01	0,115
	Plasma	1401,20±134,87	1415,60±280,99	0,920
		0,001*	0,059	
100%				
Valor de p (Momentos)	Tecido	1892,20±164,32	1751,80±84,40	0,128
	Plasma	1108,60±305,03	1231,20±233,04	0,495
		0,005*	0,003*	

Os resultados estão apresentados em média±desvio padrão da média. Comparação entre locais: teste t-student pareado. Comparação entre animais diabéticos e não diabéticos: teste t-student. Diferenças significativas são mostradas por *, p<0,05.

As alterações pulmonares estão ilustradas nas Figuras 4, 5 e 6, de acordo com o grupo e as concentrações de oxigênio que os animais foram expostos.

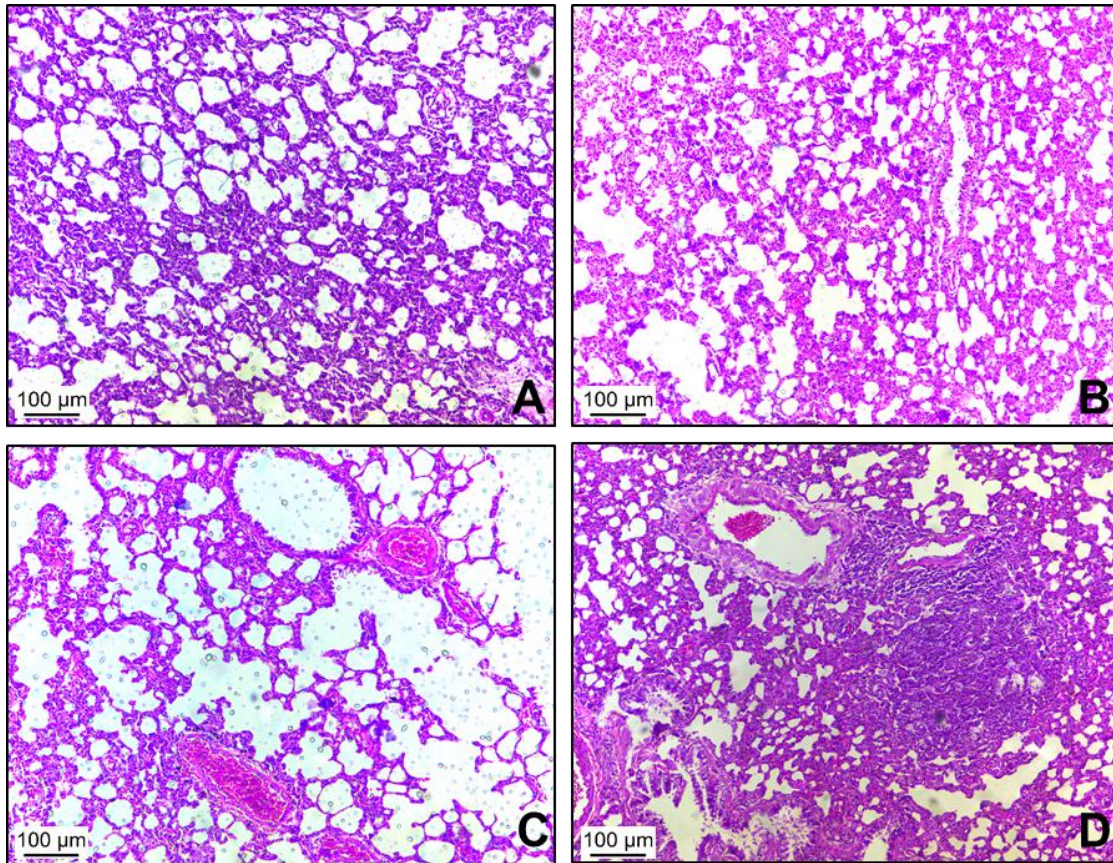


Figura 4. Fotomicrografia histológicas de cortes pulmonares de grupos controle. (A) grupo controle 21% apresentando escasso infiltrado inflamatório, ausência de colapso alveolar e ausência de espessamento de parede vascular (B) grupo controle 50% apresentando moderado infiltrado inflamatório, áreas de edema focal e ausência de espessamento de parede vascular (C) grupo controle 75% apresentando presença de edema e processo inflamatório (D) grupo controle 100% apresentando presença de atelectasia, presença de macrófagos e processo inflamatório. Coloração HE. Objetiva 10x.

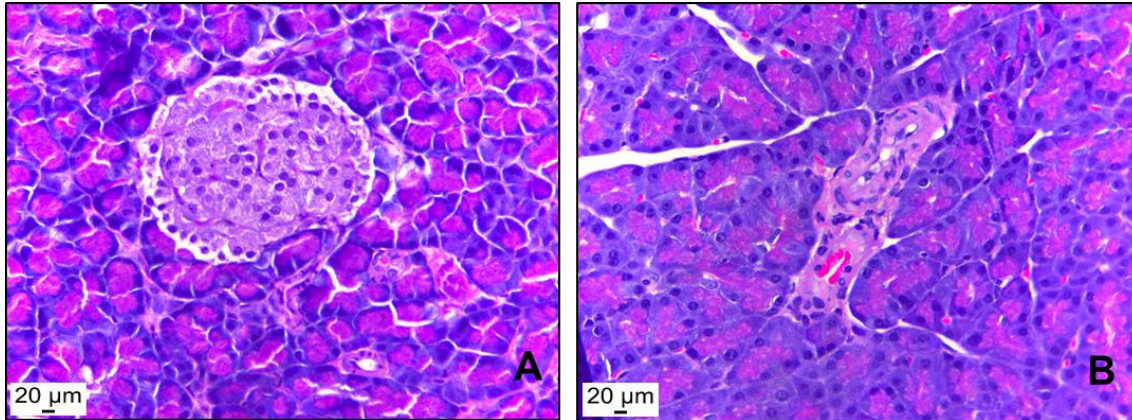


Figura 5. Fotomicrografia histológicas de cortes pancreáticos. (A) rato não diabético, saudável, apresentando ilhota pancreática normal, não demonstrando deformidade e diminuição (B) rato diabético, apresentando diminuição e deformidade da ilhota pancreática, através da destruição das células beta. Coloração HE. Objetiva 40x

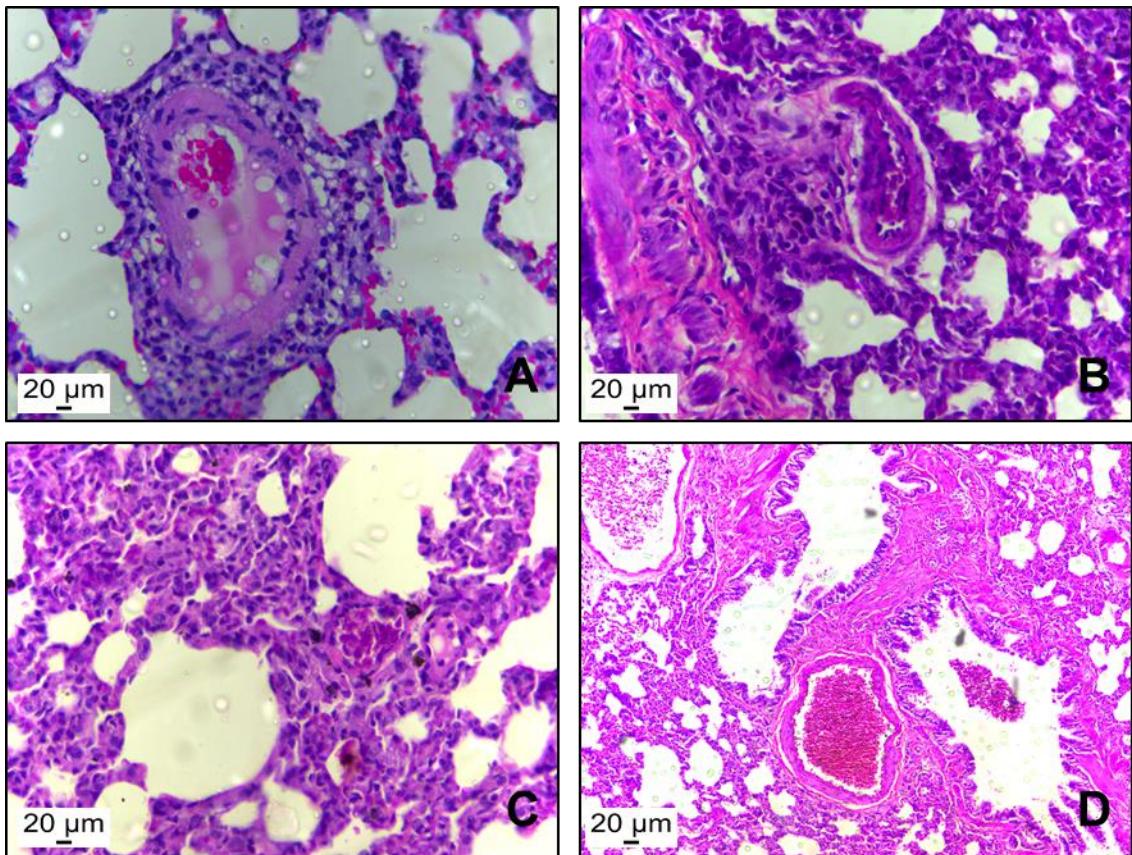


Figura 6. Fotomicrografia histológicas de cortes pulmonares de grupos experimentais. (A) grupo experimental 21% apresentando edema, congestão e processo inflamatório (B) grupo experimental 50% apresentando atelectasia e processo inflamatório (C) grupo experimental 75% apresentando presença de macrófago e processo inflamatório (D) grupo experimental 100% apresentando presença de edema, presença de hemorragia, presença de atelectasia, e processo inflamatório. Coloração HE. Objetiva 40x.

6 DISCUSSÃO

Os animais que receberam estreptozotocina, além da hiperglicemia, apresentaram polifagia, poliúria e polidipsia (dados não apresentados), o que demonstra que o modelo de diabetes experimental foi eficaz. A indução do diabetes por estreptozotocina ocorre por destruição das células β dentro de 3 dias (KARUNANAYAKE; HEARSE e MELLOWS, 1975), corroborando os dados desse trabalho. Os animais diabéticos apresentaram níveis de glicose no soro maiores em comparação aos animais não diabéticos. Outros autores também confirmaram a hiperglicemia nos animais de grupos diabéticos experimentais em relação aos animais que não receberam doses de estreptozotocina (ZHENG *et al.*, 2016).

Modelos de animais com diabetes, que apresentam o status redox similar ao humano, são úteis para análise de possíveis mecanismos que estejam envolvidos na relação diabetes e estresse oxidativo (SILVA *et al.*, 2011). Em nosso estudo obtivemos o modelo de diabetes em ratos a partir da aplicação de 55 mg/kg de estreptozotocina nos ratos. A estreptozotocina (STZ) acumula-se preferencialmente nas células β pancreáticas através do transportador de glicose GLUT2, provocando a fragmentação de ácido desoxirribonucleico (DNA), e destruindo as células β do pâncreas. Uma única dose elevada de STZ induz lesão aguda e maciça de células β , conduzindo a deficiência de insulina sem ataque autoimune como no diabetes tipo 1, ou a resistência à insulina, obesidade e inflamação como no diabetes tipo 2 (CHENG *et al.*, 2017).

O estresse oxidativo é uma consequência da presença demasiada de oxidantes em relação a antioxidantes, enquanto que os oxidantes em níveis fisiológicos, possuem um papel benéfico na produção de energia, na sinalização celular e na defesa do hospedeiro, os oxidantes em excesso podem levar a consequências patológicas e pode resultar em danos teciduais ou celulares, distúrbios e doenças (BURESH e BERG, 2015; OKAMURA e PENNATHUR, 2015).

A peroxidação lipídica em tecidos como fígado e rim está presente em animais diabéticos, induzidos pela estreptozotocina (SILVA *et al.*, 2011). Os ratos diabéticos apresentaram um aumento significativo ($p < 0,01$) no nível de peroxidação lipídica (estresse oxidativo) no pâncreas em comparação com os ratos saudáveis (SHARMA; BHARDWAJ e SINGH, 2016). Consistentemente, uma diminuição significativa do nível de atividade de SOD e aumento do teor de MDA foram

observadas no pâncreas do grupo diabético ($p < 0,01$) comparado ao grupo controle (ZHENG *et al.*, 2016). Em um estudo com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, demonstrou que o diabetes altera a expressão gênica do pulmão de ratos Wistar dentre esses, inclui-se o gene da morte celular/apoptose (VAN LUNTEREN, MOYER e SPIEGLER, 2014).

No estudo de Oyenih, Brooks e Oquntibeju (2015), os ratos diabéticos induzidos por dose única de 50 mg/kg de estreptozotocina exibiram um aumento significativo na peroxidação de lipídios hepáticos, como foi observado a partir do nível elevado de malondealdeído (MDA). Além disso, índice ORAC (capacidade de absorbância do radical oxigênio), o nível de glutathiona reduzida (GSH), a relação de redução da glutathiona oxidada (GSH: GSSG) e a atividade de catalase (CAT) foram diminuídas no fígado de ratos diabéticos. Ensaio TUNEL revelou aumento da morte celular por apoptose no fígado desses animais.

Usando TBARS como medição da peroxidação de lipídeos no tecido pulmonar, foi observado aumento significativo dele nos animais diabéticos em comparação com o grupo experimental e o grupo de animais controle (saúdáveis). Também foi observado aumento da peroxidação lipídica do tecido hepático e no sangue do grupo de animais diabéticos em relação ao grupo controle, porém nesse estudo demonstrou-se um aumento da atividade da enzima antioxidante SOD no tecido pulmonar dos animais diabéticos em comparação com animais controle (WIETZYCOSKI *et al.*, 2016). No nosso estudo também podemos observar uma diferença significativa da concentração de MDA nos materiais analisados da maioria dos grupos experimentais.

Valença e colaboradores (2007), mediram o dano induzido pelo estresse oxidativo nos pulmões de ratos Wistar pela quantificação de TBARS. Os autores observaram que o aumento da concentração de oxigênio foi dose-dependente ao longo 90' ($p < 0,001$). No estudo sobre os efeitos da hiperóxia no pulmão de ratos infantis (21 dias), foi identificado que quanto maior o tempo da exposição a hiperóxia, mais elevados era o conteúdo de malondealdeído (MDA) e as atividades de mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar dos animais em comparação aos animais do grupo controle expostos ao ar ambiente (WU *et al.*, 2010). Em um estudo com ratos machos adultos, o nível de malondealdeído e mieloperoxidase pulmonar dos ratos expostos a uma concentração de 95% de oxigênio durante 48 horas foi

maior, enquanto houve uma diminuição da glutathiona (GSH) em comparação aos animais expostos ao ar ambiente no período equivalente (HU; GUO e SUN, 2007).

No nosso estudo também identificamos uma diferença significativa da concentração de MDA no pulmão e plasma dos animais do grupo hiperóxia (100%). O aumento do nível de MDA foi identificado tanto no grupo hiperóxia induzido ao diabetes quanto no grupo hiperóxia controle. No estudo de Reis *et al.* (2016), observaram que a hiperóxia (100% de oxigênio durante 24 h) induziu a diminuição do número de macrófagos alveolares na luz alveolar, modificou a histoarquitetura pulmonar e elevou a quantidade de eritrócitos nos espaços aéreos dos camundongos do grupo experimental hiperóxia em relação aos animais do grupo controle. Na análise histopatológica pulmonar do nosso estudo, no grupo hiperóxia controle, também podemos identificar a presença de maiores alterações na arquitetura pulmonar e processo inflamatório mais intenso em relação aos demais grupos de animais controle ($p= 0,014$ e $p=0,012$ respectivamente, dados não apresentados) (figura 4).

Clayton *et al.* (2001), relataram que o processo inflamatório pulmonar pode ser induzido pelo mecanismo chave do dano tecidual através da toxicidade de oxigênio no pulmão.

A hiperglicemia crônica (glicotoxicidade) desempenha um papel central na insuficiência de células β induzindo efeitos deletérios sobre a massa e a função das células β e cria um ciclo vicioso que contribui para a perda progressiva da massa de células β funcional. Embora a ordem dos eventos não tenha sido completamente mapeada e os mecanismos exatos envolvidos na falha de células β não são conhecidos, vários mecanismos, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a ativação do estresse reticular endoplasmático (ER), regulação positiva crônica da via de sinalização hexosamina/ O-GlcNAc e indução de citocinas pró-inflamatórias em ilhotas são considerados por afetar negativamente as células- β . As células β são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo devido ao excesso de ROS no microambiente das ilhotas em resposta a concentrações elevadas de glicose e intrinsecamente baixa expressão da enzima de mecanismos de defesa antioxidantes (ALEJANDRO *et al.*, 2015). Podemos observar na análise histopatológica do nosso estudo uma diminuição do tamanho/área das ilhotas

pancreáticas nos animais diabéticos em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$, estatística não apresentada) (figura 5).

No estudo de Junior *et al.* (2015), com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina foi demonstrado que o estresse oxidativo pulmonar foi significativamente maior do que nos animais controle. Nesses animais diabéticos, foram observadas alterações na ultraestrutura pulmonar, evidenciadas pelo aumento da espessura da membrana basal e membrana alveolocapilar, juntamente com fibrose pulmonar. Na análise gasométrica, foi descrito alterações na troca gasosa nos animais diabéticos, expressas através da diminuição da PaO_2 e do aumento da $PaCO_2$, constatando assim uma diminuição na capacidade de difusão. No nosso estudo não conseguimos evidenciar todos esses dados, no que concerne as análises histopatológicas do tecido pulmonar, entretanto apesar do período breve de exposição identificamos algumas alterações pulmonares, como a presença de processo inflamatório no grupo hiperóxia e demais grupos experimentais (figura 6). A análise de tecido pulmonar de animais com diabetes induzido por estreptozotocina também mostrou aumento da espessura na membrana basal dos pulmões. Modelo experimental de diabetes em animais demonstrou que indivíduos diabéticos apresentam um déficit na expressão de proteínas, incluindo a proteína surfactante A e as proteínas surfactante hidrofóbicas B e C (CALLES-ESCANDON e CIPOLLA, 2001).

No estudo sobre a análise do efeito da ventilação com diferentes frações inspiradas de oxigênio e do alopurinol na isquemia-reperfusão pulmonar em ratos, Silva e colaboradores (2004), observaram um dado aparentemente contraditório, no grupo ventilado com oxigênio a 100% e que utilizou o antioxidante, foi identificado melhores resultados, sugerindo que o efeito deletério da alta concentração de oxigênio associada à ventilação durante a isquemia – reperfusão pulmonar deve-se basicamente ao estresse oxidativo, parecendo que, quando este é bloqueado, o oxigênio nessa concentração tem algum efeito benéfico.

No nosso estudo identificamos que os animais expostos a altas concentrações de oxigênio (75 e 100%), não apresentaram diferença significativa no estresse provocado no tecido pulmonar comparando os grupos de animais diabéticos e não diabéticos, podemos observar que as médias relacionadas a concentração de MDA no tecido pulmonar apresentavam-se bem próximas nesses

dois grupos, o que difere dos resultados dos demais estudos apresentados. Todavia, apesar dos novos resultados apresentados, poucos trabalhos na literatura estudaram o estresse oxidativo pulmonar na hiperóxia correlacionando com o diabetes.

Os animais expostos a 21% de oxigênio, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,001$) e média discrepante em relação ao grupo de animais (diabético e não diabético). O grupo diabético 21% apresentou um nível elevado de MDA no tecido pulmonar em comparação as concentrações de MDA nos demais grupos diabéticos.

Estudos na literatura afirmam que a hiperglicemia provoca alterações na produção de oxidantes podendo desencadear estresse oxidativo nas células. Nos resta compreender se altas concentrações de oxigênio mesmo com os efeitos deletérios mencionados nesse e outros estudos, se estabelece com algum efeito benéfico na presença de hiperglicemia. Estes novos resultados, nos mostram a relevância de maiores estudos que enfatizem a abordagem utilizada nesta pesquisa.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a hiperóxia provoca aumento da concentração de malondealdeído no tecido pulmonar e plasma sanguíneo e possui efeito deletério na estrutura do pulmão no tempo determinado de 90 minutos. Na histopatologia pulmonar, identificamos que as lesões no tecido ocorreram conforme a maior concentração de oxigênio nos dois grupos (diabéticos e não diabéticos). Entretanto, em animais diabéticos as altas concentrações de oxigênio parecem não atingir esses efeitos no que diz respeito a peroxidação lipídica do tecido pulmonar. Por conseguinte, ainda há poucos estudos na literatura que evidenciem o uso do oxigênio na diabetes, elucidando as alterações no tecido pulmonar, estudos futuros podem ser direcionados para que esse ou outros achados auxiliem os pacientes diabéticos perante este questionamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE E SOUZA, JG. Oxigenoterapia hiperbárica (OTHB). Perspectiva histórica, efeitos fisiológicos e aplicações clínicas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, v.14, n.4, p.219-227, out/dez. 2007.

ALEJANDRO EU, GREGG B, BLANDINO-ROSANO M, CRAS-MÉNEUR C, BERNAL-MIZRACHI E. Natural history of β -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. **Molecular Aspects of Medicine**, v.42, p.19-41, Apr.2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n.1, p. 81-90, Jan.2014.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-a concise review. **Saudi Pharmaceutical journal**, v.24, n.5, p.547-553, Sep.2016.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Journal The Lancet**, v.358, n.9277, p. 221-29, July.2001.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, Fev.2006.

BUEGE, J.A; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymol**, v.52, p.302-310, 1978.

BURESH R, BERG K. A tutorial on oxidative stress and redox signaling with application to exercise and sedentariness. **Sports Medicine**, v.1, n.3, s.3, p.1-9, Dec.2015.

BROWNLEE, M. Biochemistry and Molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n.6865, p.813-20, Dec.2001.

CALLES-ESCANDON, J; CIPOLLA, M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. **Endocrine Reviews**, v.22, n.1, p.36-52, Feb.2001.

CHEN, HC; FAN, CH; YANG, YF. Stability and application of reactive nitrogen and oxygen species induced hemoglobin modifications in dry blood spots as analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v.29, n.12, p.2157-2163, Nov.2016.

CHENG Y, SHEN J, REN W, HAO H, XIE Z, LIU J, MU Y, HAN W. Mild hyperglycemia triggered islet function recovery in streptozotocin-induced insulin-deficient diabetic rats. **Journal of Diabetes Investigation**, v.8, n.1, p.44-55, Jan. 2017.

CLAYTON, C.E.; CARRAWAY, M.S.; SULIMAN, H.B.; THALMANN, E.D.; THALMANN, K.N.; SCHMECHEL, D.E.; PIANTADOSI, C.A. Inhaled carbon monoxide and hyperoxic lung injury in rats. **American journal of physiology lung cell molecular physiology**, v.281, n.4, p.949-57, Oct.2001.

CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. **Ministério da Ciência, tecnologia e Inovação**. Dec.2015. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238271.pdf. Acesso em: 20 de nov.2015.

CORREIA-SANTOS, A.M.; SUZUKI, A; ANJOS, J.S; RÊGO, T.S; ALMEIDA, K.C.L; BOAVENTURA, G.T. Indução de diabetes tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratos Wistar. **Revista Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, n.45, v.4, p.436-44, Ago.2012.

CRAPO, JD. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. **Annual Review of Physiology**, n.48, v.1, p.721-31, March.1986

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Journal The Lancet**, v.367, n.9513, p.847-58, Mar.2006

DAVIS, T.M; KNUIMAN, M; KENDALL, P; VU, H; DAVIS, W.A. Reduced pulmonary function and its associations in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.50, n.2, p.153-9, Oct.2000.

DOS SANTOS, F.A. Adutos de DNA relacionados ao estresse oxidativo e glicação avançada em ratos diabéticos. 2014. 197f. Dissertação (Mestrado em toxicologia e análises toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

GOYAL, S.N; REDDY, N.M; PATIL, K.R; NAKHATE, K.T; OJHA, S; PATIL, C.R; AGRAWAL, Y.O. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes- A clinically relevant model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. **Chemico-Biological Interactions**, v.244, p.49-63, Dec.2015.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, JMC. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, 3ª ed, New York, 1999.

HAY, W.WJR. ; BELL, E.F. Oxygen therapy, oxygen toxicity, and the STOP-ROP trial. **Pediatrics**, v.105, n.2, p.424-5, Fev.2000.

HU X, GUO C, SUN B. Inhaled nitric oxide attenuates hyperoxic and inflammatory injury without alternation of phosphatidylcholine synthesis in rat lungs. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v.20, n.1, p.75-84, Feb.2007.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas**, v.7, 7ª ed, p.12-16 (144 páginas). Unite for diabetes [acesso 2016 out 16]. Disponível em: www.diabetesatlas.org. Acesso em: 18 de out.2016.

JUNIOR LAF; KRETZMANN NA; PORAWSKI M; DIAS AS; MARRONI NAP. Estresse oxidativo e alterações estruturais pulmonares no diabetes mellitus experimental. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.8, p.788-791, Aug.2009.

KARUNANAYAKE, E.H; HEARSE, D.J; MELLOWS, G. The metabolic fate and elimination of streptozocin. **Biochemical Society Transactions**, v.3, n.3, p.410-14, Jun.1975

KING, A.; BOWE, J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. **Biochemical Pharmacology**, v.99, p.1-10, Jan.2016.

LENZEL, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. **Magazine Diabetologia**, v.51, n.2, p.216-226, Feb.2008.

LU, W.; KANG, J.; HU, K.; TANG, S.; ZHOU, X.; YU, S.; LI, Y.; XU, L. Angiotensin – (1-7) inhibits inflammation and oxidative stress to relieve lung injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.49, n.10, p.1-9, July.2016.

MAZULO FILHO, J.B.R.; BONA, S.; ROSA, D.P.; DA SILVA, F.G.; JUNIOR, L.A.F.; DIAS, A.S.; MARRONI, N.P. Os efeitos da ventilação mecânica no estresse oxidativo. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.24, n.1, p.23-29, Março.2012.

MENDES, T.A.B.; ANDREOLI, P.B.A.; CAVALHEIRO, L.V.; TALERMAN, C.; LASELVA, C. Adequação do uso do oxigênio por meio da oximetria de pulso: um processo importante de segurança do paciente. **Einstein**, v.8, n.4, p.449-55, Oct.2010.

NOLAN, C.J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **Journal The Lancet**, n.378, v.9786, p.169-81, Jul.2011.

OKAMURA DM, PENNATHUR S. The balance of powers: Redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. **Redox Biology**, v.6, p.495-504, Dec.2015.

OYENIHI OR, BROOKS NL, OQUNTIBEJU OO. Effects of kolaviron on hepatic oxidative stree in streptozotocin induced diabetes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n.236, p.1-7, Jul.2015.

PERCÁRIO S. Dosagem do dialdeído malônico, **NewsLab**, v.6, p.46-50, 2004.

PERES, GB; JULIANO, MA; AGUIAR, JA; MICHELACCI, YM. Streptozotocin-induced diabetes mellitus affects lysosomal enzymes in rat liver. **Brazilian Journal Medical and Biological Reserach**, v.47, n.6, p.452-60, Jun.2014.

PEREIRA, A.L; FERREIRA, M.R; SANTOS, J.O; SAUAIA FILHO, E.N; PAIVA, A.E; SANTOS, R.H; SANTOS, R.A. Effects of oxygen in lungs of rats. **Acta cirúrgica brasileira**, v.29, n.12, p.771-5, Dec.2014.

PEREIRA, D.M; SILVA, I.S; SILVA, B.A.K da; AYDOS, R.D; DE CARVALHO, P.T.C; ODASHIRO, A.N; DE OLIVEIRA, L.V.F. Efeitos da Alta Concentração de Oxigênio (Hiperóxia) Efeitos da Alta Concentração de Oxigênio (Hiperóxia) por Tempo por Tempo Prolongado no Tecido Pulmonar de Ratos Wistar. **Revista Biociências, UNITAU**, v.14, n.2, Jan.2009.

REIS, R.B; NAGATO, A.C; NARDELI, C.R; MATIAS, I.C; LIMA, W.G; BEZERRA, F.S. Alterations in the pulmonary histoarchitecture of neonatal mice exposed to hyperoxia. **Jornal de pediatria**, v.89, n.3, p.300-306, May. 2013.

ROWE, Philip. Essential statistics for the pharmaceutical sciences. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltda, 2007.

SCHNEIDER, CD; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n.4, p.308-313, Jul./ago.2004.

SHARMA P, BHARDWAJ P, SINGH R. Administration of lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum ameliorated hyperglycemia, dyslipidemia, and oxidative stress in diabetic rats. **International Journal of Preventive Medicine**, v.7, n.1, p.102, Aug.2016.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v.4, p.180-183, Jan.2015.

SIES, H.; JONES, DP. Oxidative stress. Amsterdam: Elsevier; 2007.

SILVA, FM; SILVEIRA, RJ; HALLAL, ALLC; FILHO, DW; CARDOSO, JJD; ACBC-SC; LEÃO, LEV; TCBC-SP. Efeito da ventilação com diferentes frações inspiradas de oxigênio e do alopunilol na isquemia-reperfusão pulmonar em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v.31, n.5, p.291-98, Set./out.2004

SILVA M, LIMA WG, SILVA ME, PEDROSA ML. Efeitos da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.55, n.1, p.46-53, Feb.2011.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cell of the rat pancreas. **Magazine Ohysiology Research**, v.50, n.6, p.536-546, Nov/2001

UCHIYAMA M, MIHARA M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v.86, n.1, p.271-8, May.1978.

VALENÇA, SS; KLOSS, ML; BEZERRA, FS; LANZETT, M; SILVA, FL; PORTO, LC. Efeitos da hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.33, n.6, p.655-662, Nov./Dec.2007.

VAN LUNTEREN E, MOYER M, SPIEGLER S. Alterations in lung gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Endocrine Disorders**, v.14, n.5, p.1-6, Jan. 2014

VASCONCELOS, S.M.L; GOULART, M.O.F; MOURA, J.B.F; BENFATO, M.S; MANFREDINI, V; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, Fev.2007.

WALTER, RE; BEISER, A; GIVELBER, RJ; O'CONNOR, GT; GOTTLIEB, DJ. Association between glycemic state and lung function: the Framingham heart study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.167, n.6, p.911-6, Mar.2003.

WHITING, DR; GUARIGUATA, L; WEIL, C; SHAW, J.IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practive**, v.94, n.3, p.311-321, Dec.2011.

WIETZYCOSKI, CR; MARCHESINI, JCD; AL-THEMYAT, S; MEYER, FS; TRINDADDE, MRM. Melhora do estresse oxidativo após duodenojejunostomia em um modelo experimental de diabete melito tipo 2. **Arquivos Brasileiro Cirurgia Digestiva**, v.29, n.1, p. 3-7, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on diabetes.2016.88p. Disponível em: [apps.who.int /iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf). Acesso em: 30 out 2016.

WU CY, YUE F, LI M, ZHANG LP, WANG J, GUO XY. Effects of hyperoxia on inflammatory response in lung of infantile rats. **Zhonqquo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue**, v.22 , n.7, p.389-92, Jul.2010.

ZHENG S, ZHAO M, WU Y, WANG Z, REN Y. Suppression of pancreatic beta cell apoptosis by Danzhi Jiangtang capsule contributes to the attenuation of type 1 diabetes in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.16, n.31, p.1-10, Jan.2016.

ANEXOS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "Estresse oxidativo em ratos diabéticos, submetidos a oxigenoterapia em um curto período de tempo: estudos das alterações pulmonares", Protocolo nº 686/2015 sob a responsabilidade de **Iandara Schetttert Silva** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em reunião ordinária do dia 12 de agosto de 2015.

Vigência do Projeto	01/08/2015 a 13/03/2017
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Números de Animais	40
Peso/Idade	200-300g/6 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério Central/CCBS/UFMS


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 13 de agosto de 2015.

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação- PROPP
Cidade Universitária, s/n | Caixa Postal 549
Fone: 67 3345.7186 E-mail: gab.propp@ufms.br
CEP 79070-900 | Campo Grande | MS

Pulmonary oxidative stress in diabetic rats exposed to hyperoxia

L.A Paiva¹, I.S Silva¹, P.C Cassino¹, A.S Souza²

1. Laboratório de Carcinogênese e Modelo Animal de Doença, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.
2. Laboratório de Biofisiofarmacologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the pulmonary oxidative stress in diabetic rats exposed to hyperoxia for 90 minutes. Forty male Wistar rats, (8 weeks of age) were divided into four groups, each containing 10 animals, according to the oxygen concentration to which they were exposed: the control group (21% oxygen), 50%, 75% and 100% oxygen (hyperoxia) groups. In each of the four groups, 5 animals were randomly subjected to induction of diabetes by means of an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a dose of 55 mg/kg. 72 hours after induction of diabetes, there was a significant difference in blood glucose in the experimental groups relative to the control. In the experimental groups there was a significant difference in the concentration of malondialdehyde (MDA) in lung tissue and blood plasma ($p < 0.05$), with the exception of the experimental group exposed to 50% oxygen. In the control groups, significant differences in the MDA concentration present in plasma and lung tissue were also observed ($p < 0.05$), with the exception of animals in the control group exposed to 75% oxygen. The MDA concentration in lung tissue with respect to the diabetic and non-diabetic groups showed a significant difference in the 21% group; however, there was no difference in the 75 and 100% groups. Our results suggest that in diabetic animals high oxygen concentrations (75 or 100%) do not appear to exert deleterious effects on lipid peroxidation in lung tissue.

Key Words: Experimental Diabetes Mellitus, streptozotocin, oxidative stress, lung, oxygen.

Pulmonary oxidative stress in diabetic rats exposed to hyperoxia

Corresponding author

Letícia Alves Paiva

Av. Norte, 1098

Bairro: Coronel Antonino

79011-322 - Campo Grande, MS – Brasil –

Telephone: (+55- 67) 99243-7207

Email:lehalves13@hotmail.com

Introduction

Diabetes Mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action or both. Chronic hyperglycemia in diabetes is associated with long-term damage, dysfunction and failure of various organs, especially eyes, kidney, heart, nerves and blood vessels¹. Diabetes Mellitus is considered to be a complex and chronic disorder that develops gradually and is difficult to diagnose.

In 2011, there was a worldwide average of 366 million people suffering from diabetes. In 2030, it is estimated that there will be a 50.7% increase in the number of people with diabetes worldwide; this increase may be due to population growth, population aging, or urbanization associated with lifestyle change. The global increase in the number of people with diabetes projected between 2011 and 2030 translates into a mean annual growth rate of 2.7%, which corresponds to 1.7 times the total annual growth rate of the world adult population. In Brazil, in 2011, the number of people with diabetes between 29 and 79 years of age was 12.4 million; the estimate for 2030 is 19.6 million diabetics².

The studies of Davis *et al.*³ and Walter *et al.*⁴ demonstrated that DM causes functional abnormalities in the pulmonary system, such as a reduction in elastic recoil, in volumes and in diffusion capacity. As reviewed by Brownlee⁵, hyperglycemia triggers oxidative stress by increasing mitochondrial superoxide anion production and increasing the nonenzymatic glycosylation of proteins, as well as by activating various cellular transcription factors, which may affect cellular function and cause the pulmonary abnormalities mentioned.

Oxidative stress is generally believed to be a causative factor in chronic complications and may be measured on the basis of the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the activity of catalase⁶.

Hyperglycemia can even activate nuclear transcription factors, thus triggering an increase in the expression of inflammatory mediators. The combined effect of these mechanisms is to alter oxidant production, causing cellular oxidative stress and the resulting structural damage. Experimental studies showed that the pulmonary

vascular resistance is elevated two weeks after the onset of DM and that hyperglycemia induces oxidative stress in lung tissue⁷.

Exposure to high concentrations of oxygen alters the respiratory tract in human beings and other animals, with deleterious effects on the pulmonary epithelium, pulmonary arterial tree, alveolar septa and also on the pleural space⁸.

Currently, there are few studies that demonstrate the use of oxygen, whether in small, medium or high concentrations, in diabetic patients to elucidate the potential pulmonary structural alterations. Thus, the purpose of this study was to evaluate that pulmonary oxidative stress in a model of experimental diabetes with exposure to hyperoxia.

Methods

Experimental animals

This study was approved by the *Comissão de Ética no Uso de Animais* (CEUA/PPGSD –UFMS) protocol number 686/2015. The ethical principles for animal experimentation set forth by the *Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório* (SBCAL) were followed⁹. 40 adult, male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged 8-weeks old were used; they were obtained from the *Biotério - UT/ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde* (CCBS) at the *Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande*, MS. The animals were maintained under controlled conditions of lighting (12 hr day-night cycle) and temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; relative humidity, 40 to 60%), with *ad libitum* access to food and water. These baseline conditions were utilized during an initial adaptation period of 7 days. The animals were randomly divided into 4 groups of 10 animals. In each group, half of the animals had induced diabetes (group experimental) and the other half was maintained control group (group control). Each group was exposed to a different oxygen concentration (21, 50, 75 and 100%) for a 90-minute exposure period. The study was conducted in the experimentation section at *Biotério – UT/ CCBS/ UFMS*.

Induction of diabetes

In 20 animals, following a 12-hour fast, streptozotocin, dissolved in a 20 mM sodium citrate solution (pH 4.5), was injected by the intraperitoneal route (55 mg/kg i.p.; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) within 15 min of its preparation. Glucose measurements were made in 40 animals at the following times: zero time (fasting value), 8 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours following induction of diabetes. At the 72-hour time point, the animals were sacrificed. Blood glucose was determined using a colorimetric enzymatic assay (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostics, USA). The animals that at 72 hours the application of streptozotocin developing blood glucose $> 250 \text{ mg/dl}$ were inserted into the experimental diabetes model¹⁰.

Experimental protocol for hyperoxia induction

After insertion of the diabetes-induced group into the experimental diabetes model, each of the four groups was randomly exposed to a given oxygen concentration. The animals were randomly allocated to the protocol in glass chambers designed for the study with dimensions of 33x40x30 cm and airtight closure effected by a cover/box seal using a silicon adhesive in conjunction with oxygen supplementation. Humidified oxygen was administered continuously, thus preventing carbon dioxide accumulation and maintaining the desired oxygen concentration at a constant level in all groups for the chosen period of 90 minutes. Control of the oxygen concentration inside the chamber was achieved with the aid of a calibrated flow meter (capacity of 15 L/min) fed from a medical-grade oxygen cylinder. After exposure to oxygen the animals were euthanized by means of an i.p. injection of pentobarbital sodium. Lungs, pancreas and blood samples were collected.

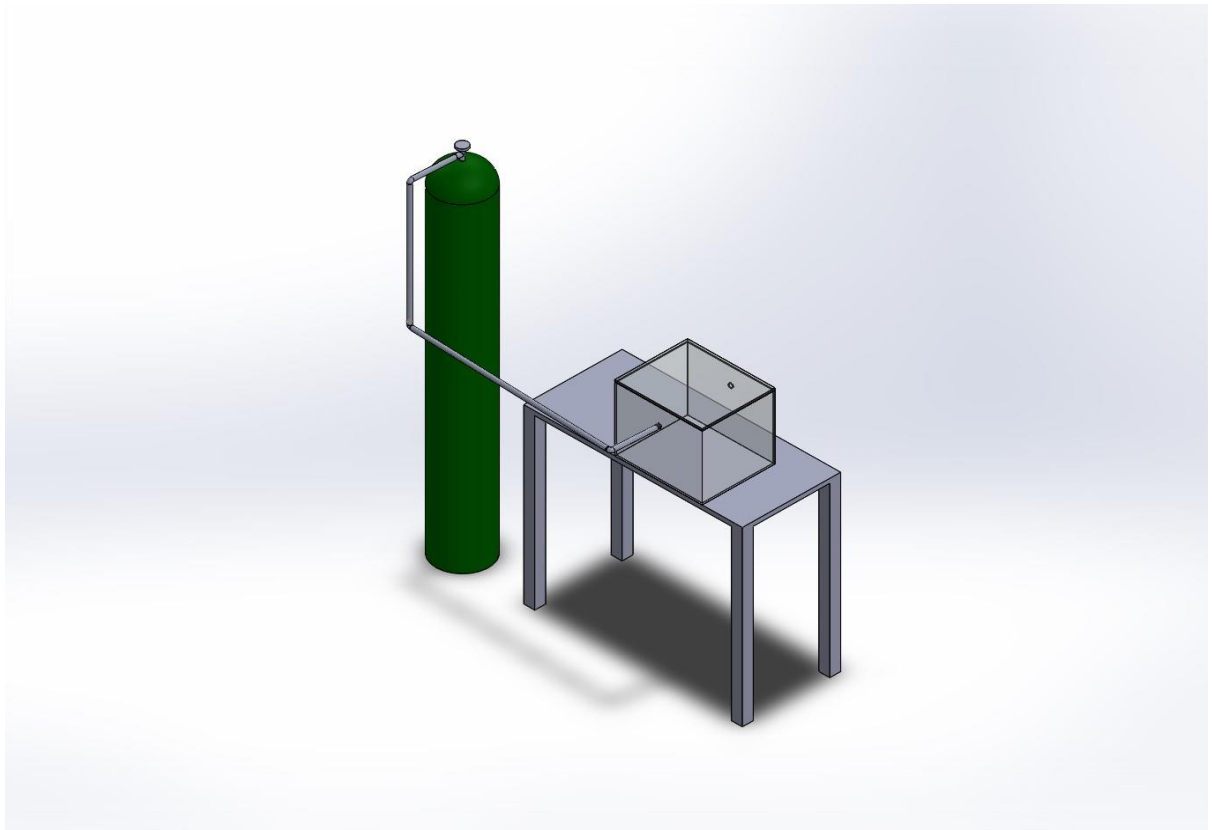


Figure 1: Graphical representation of the glass box and oxygen cylinder used in the experiment.

Sample analysis procedure

To evaluate oxidative stress in lung tissue and plasma, analytical procedures based on the TBARS method were utilized.

The pancreas and lungs used for histopathologic analysis were immersed in a slowly infused buffered solution of 10% formalin.

Evaluation of oxidative stress

Malondealdehyde (MDA) - a marker of oxidative stress, is one of the substances that react with thiobarbituric acid (TBA). The quantification of MDA concentration is considered a parameter to evaluate a rate of cellular lipoperoxidation. Thus the breakdown of polyunsaturated acids triggers the formation of malondialdehyde (MDA), which reflects the degree of peroxidation. Its absorbance at 535 nm was determined with the aid of a spectrophotometer¹¹. To calculate the MDA concentration, an equation fitted to the absorbance curve generated by known MDA concentrations was used¹²⁻¹³.

Histopathologic analysis

The pulmonary and pancreatic tissue sections were analyzed by a pathologist, who had no knowledge of the origin of the slides, via light optical microscopy, using a Leica DM5500B microscope and Leica DFC495 digital microscope camera (8 megapixel) with Leica Application Suite (LAS) software version 4, at a final magnification of 40x from the panoramic viewer to the objective, in random fields and in two serial sections and converted into scores. The tissues were embedded in paraffin, sectioned at 4 μ m and stained with hematoxylin and eosin (H & E).

Statistical analysis

Comparisons between analysis times in relation to blood glucose or TBARS rate in tissue and plasma, were performed by means of one-way, repeated measures ANOVA, followed by Tukey's post-test. Comparisons between groups were made by

means of Student's t-test. Comparisons between diabetic and non-diabetic animals, in relation to pancreatic and pulmonary histopathologic alterations, were effected by means of the Mann-Whitney test. Further, comparisons between the degree of oxidative stress in relation to pancreatic and pulmonary histopathologic changes were also performed by means of the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test. Statistical analysis was carried out using the SigmaPlot version 12.5 statistical software, with the significance level set at 0.05.

Results

The results pertaining to blood glucose in the animals as a function of the analysis time and group (experimental or control) are presented in Table 1.

In the experimental groups, there were differences in blood glucose in relation to time of blood glucose analysis (one-way repeated measures ANOVA, 21% group: $p < 0.001$; 50% Group: $p < 0.001$; 75% Group: $p = 0.005$ and 100% Group: $p < 0.001$), since the five animals in the 21% experimental group already had diabetes 24 hours after diabetes induction, unlike the other three experimental groups, in which the majority of animals only showed hyperglycemia (blood glucose > 250 mg/dl) 72 hours after induction of diabetes (Tukey's post-test, $p < 0.05$). In relation to the group of animals (diabetic or non-diabetic), significant differences were observed in blood glucose at the 72-hour time point following induction of diabetes in eight subgroups, (Student t-test, $p < 0.05$), and we were able to observe a difference in blood glucose between the two groups, demonstrating that the animals in the experimental groups could be inserted in the experimental diabetes model. The animals in the control groups also showed a significant difference in the blood glucose level in relation to time of blood glucose analysis (one-way repeated measures ANOVA, 21% Group: $p = 0.036$; 75% Group : $p < 0.001$ and 100% Group: $p < 0.001$), with the exception of the 50% Group ($p = 0.061$), which although not statistically significant, approached the value p ($p < 0.05$). However, even though the animals in the control groups showed statistical significance, these variations in blood glucose at the times analyzed did not qualify for insertion into the experimental model of diabetes, since in this study, animals that developed blood glucose > 250 mg/dl were considered hyperglycemic, which did not occur in any animal inserted into the control group.

Table 1: Results pertaining to blood glucose in the animals, as a function of time and experimental group.

Group	Time	Diabetes		P value
		Yes	No	
21%				
P value (Time)	Fasting	71.80±9.50b	127.20±11.17ab	<0.001
	After 8 hours	73.80±8.41b	109.00±12.55b	<0.001
	After 24 hours	318.80±186.32a	120.80±7.69ab	0.045
	After 48 hours	468.40±135.14a	129.80±11.01a	<0.001
	At euthanasia	472.00±131.42a	125.20±10.35ab	<0.001*
		<0.001*	0.036*	
50%				
P value (Time)	Fasting	116.00±8.77b	105.80±8.67a	0.102
	After 8 hours	128.00±8.75b	129.00±14.61a	0.899
	After 24 hours	182.40±90.33b	119.20±11.99a	0.160
	After 48 hours	172.60±93.01b	115.60±8.14a	0.209
	At euthanasia	521.40±103.77a	115.60±8.14a	<0.001*
		<0.001*	0.061	
75%				
P value (Time)	Fasting	105.40±9.45b	99.00±6.86c	0.255
	After 8 hours	130.60±4.39b	116.20±6.06ab	0.003
	After 24 hours	243.40±154.3102ab	117.20±3.56ab	0.105
	After 48 hours	233.40±159.50ab	109.00±9.85b	0.120
	At euthanasia	362.40±133.25a	129.00±9.49a	0.005*
		0.005*	<0.001*	
100%				
P value (Time)	Fasting	104.00±19.39b	96.00±7.84b	0.417
	After 8 hours	119.60±24.13b	123.60±6.91a	0.731
	After 24 hours	228.60±154.99b	115.20±5.59a	0.141
	After 48 hours	232.20±162.10b	116.40±10.74a	0.150
	At euthanasia	477.60±50.06a	128.00±13.15a	<0.001*
		<0.001*	<0.001*	

Results are presented as mean ± standard deviation of the mean. Comparisons with respect to time: One-way repeated measures ANOVA, with Tukey's post-test. The various letters in the columns represent significant differences in blood glucose in the animals at various time points. Comparisons between diabetic and non-diabetic animals: Student's t-test. Statistical differences are indicated by *, p<0.05.

Results pertaining to plasma and tissue concentrations of malondialdehyde as a function of the group (experimental or control) and level of oxidative stress (21, 50, 75 and 100%) are presented in Table 2.

In the experimental groups there was a significant difference in MDA concentration in lung tissue and plasma (paired Student's t-test, 21% Group: p=<0.001; 75%

Group: $p=0.001$ and 100% Group: $p<0.005$), with the exception of the diabetic group exposed to 50% oxygen, in which no significant difference was observed ($p=0.131$ for MDA concentration). In the animals in the control groups, significant differences in the malondialdehyde concentration in the animals' lung tissue and plasma were observed (paired Student's t-test, 21% Group: $p=0.07$; 50% Group: $p=0.008$ and 100% Group: $p=0.003$), with the exception of the control group exposed to an oxygen concentration of 75%, which although not statistically significant ($p=0.059$), approached statistical significance ($p<0.05$). The MDA concentration in lung tissue, in relation to the group of diabetic and non-diabetic animals, showed a significant difference in the 21 and 50% groups ($p<0.001$ and $p=0.043$ respectively), but in the 75 and 100% groups, there was no difference in relation to diabetic and non-diabetic animals ($p>0.05$). The MDA concentration in the animals' blood plasma in relation to the diabetic and non-diabetic groups demonstrated no difference in any of the four groups ($p>0.05$).

Table 2: Results in relation to the animals' plasma and tissue MDA concentrations, as a function of the experimental group and level of oxidative stress.

Oxidative stress	Location	Diabetes		P value
		Yes	No	
21%				
P value (Time)	Tissue	2674.20±173.87	1773.00±312.91	<0.001
	Plasma	1256.00±113.29	1133.80±73.71	0.078
		<0.001*	0.007*	
50%				
P value (Time)	Tissue	1578.40±135.47	1813.40±171.96	0.043
	Plasma	1307.40±362.05	1187.40±155.35	0.515
		0.131	0.008*	
75%				
P value (Time)	Tissue	1899.20±78.81	1775.80±157.01	0.115
	Plasma	1401.20±134.87	1415.60±280.99	0.920
		0.001*	0.059	
100%				
P value (Time)	Tissue	1892.20±164.32	1751.80±84.40	0.128
	Plasma	1108.60±305.03	1231.20±233.04	0.495
		0.005*	0.003*	

Results are presented as mean ± standard deviation of the mean. Comparisons between locations: paired Student's t-test. Comparisons between diabetic and non-diabetic animals: Student's t-test. Statistical differences are indicated by *, $p < 0.05$.

Pulmonary alterations are illustrated in Figures 2,3 and 4, according to the group and the oxygen concentrations that the animals were exposed.

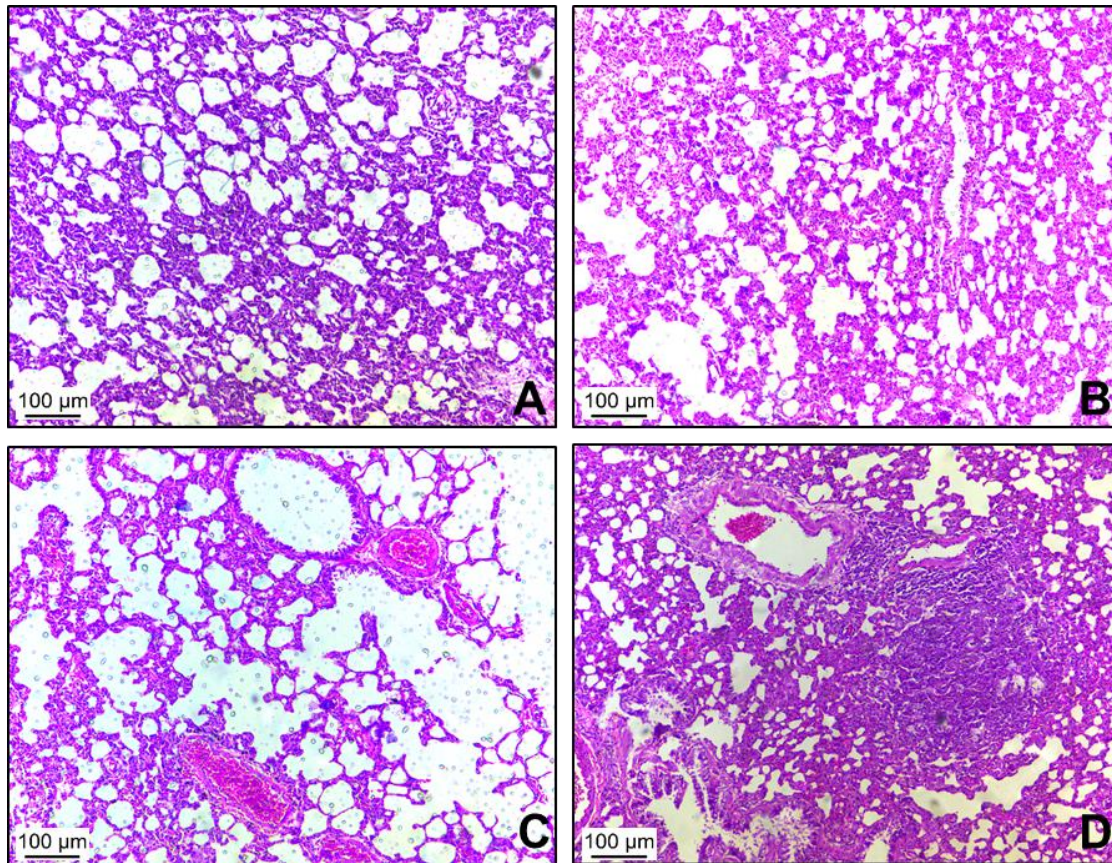


Figure 2. Histological photomicrographs of lung sections from the control groups. **(A)** 21% control group showing minimal inflammatory infiltrate, absence of collapsed alveoli and absence of vessel wall thickening **(B)** 50% control group showing moderate inflammatory infiltrate, areas of focal edema and absence of vessel wall thickening **(C)** 75% control group showing presence of edema and inflammation **(D)** 100% control group showing presence of atelectasis, macrophages and inflammation in the 100% hyperoxic control group. H&E stain. 10x objective.

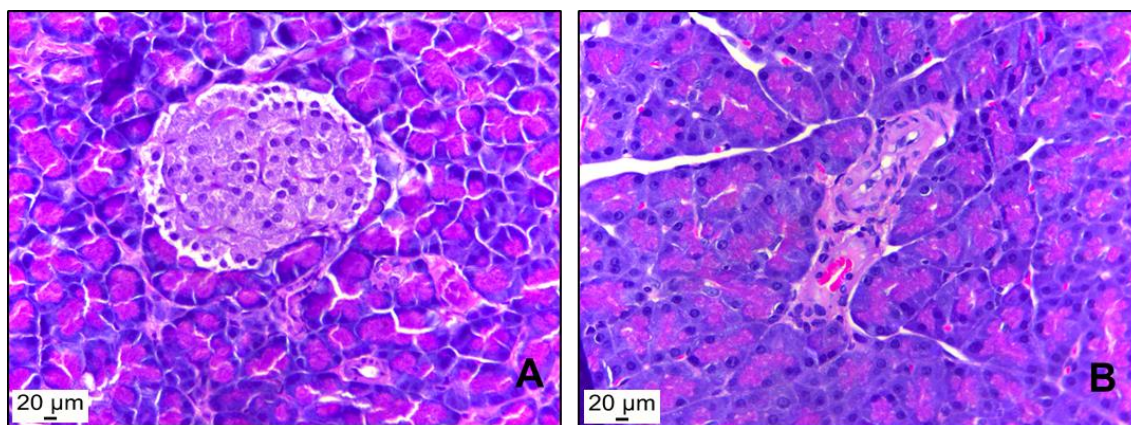


Figure 3. Histological photomicrograph of pancreatic sections. **(A)** healthy, non-diabetic rat, showing normal pancreatic islet, which demonstrates no deformation or size reduction **(B)** diabetic rat, showing size reduction and deformation of pancreatic islet, due to destruction of the beta cells. H&E stain. 40x objective.

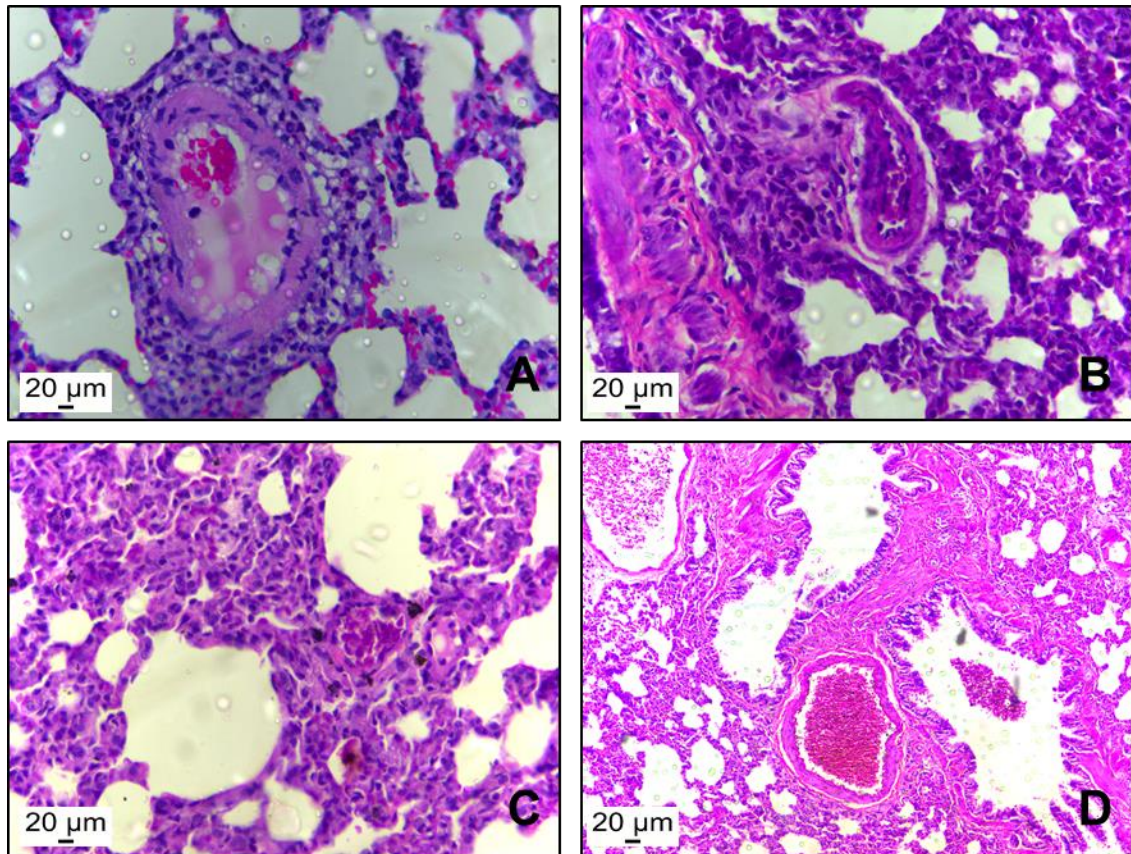


Figure 4. Histological photomicrographs of lung sections from experimental groups. (A) 21% experimental group showing edema, congestion and inflammation (B) 50% experimental group showing atelectasis and inflammation (C) 75% experimental group showing presence of macrophages and inflammation (D) 100% experimental group showing presence of edema, hemorrhage, atelectasis, and inflammation as well as tissue fibrosis. H&E stain. 40x objective.

Discussion

In the animals that received streptozotocin, polyphagia, polyuria and polydipsia were observed (data not shown) in addition to hyperglycemia, which demonstrates that the experimental diabetes model was robust. Induction of diabetes by streptozotocin destroys the beta cells within 3 days¹⁴, corroborating the data in this study. The diabetic animals showed greater serum glucose levels in comparison to non-diabetic animals. Other authors also confirmed hyperglycemia in animals in experimental diabetic groups relative to animals that were not treated with streptozotocin¹⁵.

Oxidative stress is a consequence of the presence of excess oxidants in relation to antioxidants¹⁶; whereas oxidants at physiological levels play a beneficial role in energy production, in cellular signaling, and in host defense, oxidants in excess can bring about pathological changes¹⁷ and can result in cell or tissue damage, disorders or disease. Oxidative stress involves substances that are especially strong oxidizing agents, known collectively as free radicals, including reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Various enzyme complexes generate ROS and RNS such as NADPH oxidase, myeloperoxidase, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase¹⁶. Compounds that can be modified by the action of free radicals, such as lipids, proteins and sulfhydryl groups, are also used as indirect measures of oxidative stress. Oxidative stress may be evaluated by means of the enzyme activities involved in cellular redox balance, including superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, which convert superoxide radicals into peroxides or peroxides into water and hydrogen¹⁸. Much of what is reduced by superoxide dismutase (SOD) is converted to hydrogen peroxide (H₂O₂). Hydrogen peroxide also can be reduced to water and oxygen through the reactions of the enzyme catalase and the enzyme glutathione peroxidase, which is a molecule with the capacity to dismutate ROS, becoming oxidized in the process. Glutathione (GSH) reacts with another GSH molecule, resulting in its oxidized form GSSG¹⁶.

Animal models with diabetes, which have a redox status similar to humans, are useful in the analysis of the mechanisms potentially involved in the relationship between diabetes and oxidative stress¹⁸. In our study, we obtained a model of diabetes in the rat through the application of 55 mg/kg of streptozotocin.

Streptozotocin preferentially accumulates in pancreatic beta cells via the Glut 2 glucose transporter and DNA fragments and therefore selectively destroys the pancreatic beta cells. A single high dose of STZ induces acute and massive injury of beta cells, leading to insulin deficiency in the absence of an autoimmune attack as in type 1 diabetes, or insulin resistance, obesity and inflammation as in type 2 diabetes¹⁹.

Lipid peroxidation in tissues such as liver and kidney takes place in animals with diabetes induced by streptozotocin¹⁸. The diabetic rats showed a significant increase ($p < 0.01$) in the level of lipid peroxidation (oxidative stress) in the pancreas compared to healthy rats²⁰. Consistent with this, a significant reduction in the level of SOD activity and increase in MDA content were observed in pancreas glands from the diabetic group ($p < 0.01$) compared to the control group¹⁵. In a study on rats with streptozotocin induced diabetes, it was demonstrated that diabetes alters lung gene expression in Wistar rats, including the cell death/apoptosis gene²¹.

Rats with diabetes induced by a single dose of 50 mg/kg streptozotocin exhibited a significant increase in hepatic lipid peroxidation, as was observed on the basis of the elevated MDA level. In addition, the ORAC index (oxygen radical absorbance capacity), the reduced glutathione (GSH) level, the reduced to oxidized glutathione ratio (GSH:GSSG) and catalase (CAT) activity were decreased in the diabetic rat liver. The TUNEL assay showed an increase in apoptotic cell death in the livers of these animals²². Using TBARS as a measure of lipid peroxidation in lung tissue, there was a significant increase in these diabetic animals in comparison to the experimental group and control group (healthy animals). An increase in lipid peroxidation in hepatic tissue and blood in the diabetic group above the control group was also observed, but in this study an increase in the antioxidant enzyme SOD was demonstrated in the lung tissue of diabetic animals relative to control animals⁶. In our study, we were also able to observe a significant difference in MDA concentration in the materials analyzed from most of the experimental groups.

Valença *et al.*²³ measured the damage induced by oxidative stress in the lungs of Wistar rats by the quantification of TBARS. The authors observed that the increase in oxygen concentration was dose-dependent over 90 '($p < 0.001$). In a study of the effects of hyperoxia on the lungs of immature rats (21 days old), it was identified that the longer the period of exposure to hyperoxia, the higher was the MDA content and myeloperoxidase (MPO) activity in the animals' lung tissue in comparison to the

control group of animals exposed to ambient air²⁴. In a study on adult male rats, the level of pulmonary malondialdehyde and myeloperoxidase in rats exposed to a concentration of 95% oxygen for 48 hours increased, while glutathione (GSH) levels decreased in comparison to animals exposed to ambient air for the same period of time²⁵. In our study, we also identified a significant difference in the MDA concentration in the lung and plasma of the hyperoxic (100%) animals. The increase in the level of MDA was identified in both the hyperoxia group induced to the diabetics and in the control hyperoxia group. In the study by Reis *et al.*²⁶, observed that hyperoxia (100% oxygen for 24 h) induced a decrease in the number of alveolar macrophages in the alveolar lumen, modified pulmonary histoarchitecture and raised the amount of red blood cells in the air spaces of the experimental group hyperoxia in relation to the control group. In the pulmonary histopathologic analysis of the hyperoxic control group, we were also able to identify the presence of extensive abnormalities in lung architecture and inflammation relative to the other groups of control animals ($p=0.014$ and $p=0.012$, respectively; data not shown) (figure 2).

Clayton *et al.*²⁷ have reported that the pulmonary inflammatory process can be induced by the key mechanism of tissue damage through oxygen toxicity in the lung.

Chronic hyperglycemia (glucotoxicity) plays a central role in β cell failure, inducing deleterious effects on the density and function of β cells, and creates a vicious cycle that contributes to the progressive loss of functional β cells. Although the sequence of events has not been fully mapped and the exact mechanisms involved in the loss of β cells are unknown, various mechanisms, including generation of reactive oxygen species (ROS), activation of endoplasmic reticular (ER) stress, chronic upregulation of the hexosamine/ S-GlcNAc signaling pathway and induction of pro-inflammatory cytokines in the islets are considered to negatively affect the β cells. The β cells are highly susceptible to oxidative stress due to an excess of ROS in the islet microenvironment in response to elevated concentrations of glucose and intrinsically low expression of antioxidant enzyme defense mechanisms²⁸. We were able to observe, in the course of the histopathological analysis of our study, a reduction in the size/area of the pancreatic islets in diabetic animals relative to animals in the control group. ($p<0.05$, statistics not shown) (figure 3).

In a study on rats with streptozotocin-induced diabetes, it was demonstrated that lung oxidative stress was significantly greater than in the control animals. In these

diabetic animals, lung ultrastructural abnormalities were observed, signified by the increase in thickness of the basal lamina and alveolar-capillary membrane and accompanied by pulmonary fibrosis. In the blood gas analysis, abnormalities in gas exchange were described in diabetic animals, which manifested as a reduction in PaO_2 and an increase in PaCO_2 , thus indicating a reduction in diffusion capacity²⁹. In our study, we cannot show all data concerning the histopathological analysis of lung tissue, but, despite the brief exposure period, we identified some pulmonary abnormalities, as the presence of inflammatory process in the hyperoxic and other experimental groups (figure 4). Analysis of lung tissue in animals with streptozotocin-induced diabetes also showed increased thickness of the lung basal lamina. In addition, animal models showed that diabetic individuals have a deficit in protein expression, including surfactant protein A and hydrophobic surfactant proteins B and C⁷.

In a study analyzing the effect of ventilation at different fractions of inspired oxygen and of allopurinol on lung ischemia-reperfusion in rats, apparently contradictory data were obtained: in a group that was ventilated with 100% oxygen and that used an antioxidant, better results were obtained, suggesting that the deleterious effect of high oxygen concentrations associated with ventilation during lung ischemia – reperfusion is basically due to oxidative stress, which when blocked, seemingly permits high oxygen to exert some beneficial effects³⁰.

In our study we identified that at high concentrations of oxygen (75 and 100%), there was no significant difference in stress induced in lung tissue between diabetic and non-diabetic animals; we note that the averages proved to be very close together in the two groups, which differs from the results of the other studies presented. However, despite the new results presented, few studies in the literature have studied pulmonary oxidative stress in hyperoxia correlating with diabetes. Suggesting that oxygen at these concentrations may not produce a totally deleterious effect, since as mentioned, hyperglycemia can produce oxidative stress in the lung tissue.

The animals exposed to 21% oxygen presented significant differences ($p < 0.001$) and mean difference in relation to the group of animals (diabetic and non-diabetic). The 21% diabetic group had a high level of MDA in lung tissue compared to MDA concentrations in the other diabetic groups.

Studies in the literature claim that hyperglycemia causes changes in the production of oxidants and may trigger oxidative stress in cells. It remains to be

understood whether high concentrations of oxygen, even with the deleterious effects mentioned in this and other studies, is established with some beneficial effect in the presence of hyperglycemia. These new results show us the relevance of larger studies that emphasize the approach used in this research.

In conclusion, hyperoxia elicited an increase in the concentration of malondialdehyde in lung tissue and blood plasma and exerted deleterious effects on lung structure within the chosen time period of 90 min. In pulmonary histopathology,, tissue lesions occurred according to the highest concentration of oxygen in both groups (diabetic and non-diabetic). However, in diabetic animals the high concentrations of oxygen do not seem to reach these effects with respect to lipid peroxidation of the lung tissue. Therefore, there are still few studies in the literature that demonstrate the use of oxygen in diabetes, elucidating changes in lung tissue, future studies may be directed to this or other findings to assist diabetic patients in this questioning.

Acknowledgements

We thank Dr. Elaine Silva de Pádua Melo, the technician in the *Laboratório de Carcinogênese e Modelo Animal de Doença*, the doctoral student in (Health Sciences) in the program *Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste (UFMS)*, Anderson Fernandes da Silva, and the medical student and research trainee, Mariana Vantini Soares (CNPq Scholarship) for all their support and assistance. We thank Dr. Priscila Pizzo for her assistance in the histopathological analyses. Masters student L.A Paiva has a scholarship from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES)*. This research was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq)* and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*.

Bibliography

- 1 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**. Diabetes Care 2014; 37(1): S81-90. DOI: 10.2337/dc14-S081.
- 2 WHITING, DR; GUARIGUATA, L; WEIL, C; SHAW, J. **IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030**. Diabetes Research and Clinical Practice 2011; 94:311-321. DOI:10.1016/j.diabres.2011.10.029
- 3 DAVIS, T.M; KNUIMAN, M.; KENDALL, P.; VU, H.; DAVIS, W.A. **Reduced pulmonary function and its associations in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study**. Diabetes Res Clin Pract. 2000; 50(2):153-9. PMID:10960726.
- 4 WALTER, R.E; BEISER, A; GIVELBER, R.J; O'CONNOR, G.T; GOTTLIEB, D.J. **Association between glycemic state and lung function: the Framingham heart study**. J Respir Crit Care Med. 2003; 167(6):911-6. PMID:12623860. doi:10.1164/RCCM.2203022.
- 5 BROWNLEE, M. **Biochemistry and Molecular cell biology of diabetic complications**. Nature: 2001; 414 (6865): 813-20. PMID:11742414. doi:10.1038/414813a.
- 6 WIETZYCOSKI, C.R; MARCHESINI, J.C.D; AL-THEMYAT, S; MEYER, F.S; TRINDADDE, M.R.M. **Melhora do estresse oxidativo após duodenojejunostomia em um modelo experimental de diabetes melito tipo 2**. Arq Bras Cir Dig. 2016;29(1): 3-7. doi:/10.1590/0102-6720201600S10002.
- 7 CALLES-ESCONDON, J; CIPOLLA, M. **Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective**. Endocr Rev. 2001; 22(1):36-52. PMID:11159815. doi:10.1210/edrv.22.1.0417.
- 8 CRAPO, J.D. **Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity**. Annu Rev Physiol. 1986;48(1):721-731. PMID:3518622. doi:10.1146/annurev.ph.48.030186.003445.
- 9 CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). **Para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. 2015. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238271.pdf
- 10 PERES, G.B; JULIANO, M.A; AGUIAR, J.A; MICHELACCI, Y.M. **Streptozotocin-induced diabetes mellitus affects lysosomal enzymes in rat liver**. Braz J Med Biol Res. 2014; 47(6):452-60. Epub 2014 May 9. PMID: 24820066.
- 11 BUEGE J.A; AUST S.D. **Microsomal lipid peroxidation**. Meth Enzymol 1978; 52:302-310. PMID:672633
- 12 PERCÁRIO S. **Dosagem do dialdeído malônico**. Newslab 2004; 6:46-50.
- 13 UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. **Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test**. Anal Biochem. 1978, 86(1):271-8. PMID: 655387.

- 14 KARUNANAYAKE, E.H; HEARSE, D.J; MELLOWS, G. **The metabolic fate and elimination of streptozocin.** Biochem Soc Trans 1975; 3 (3): 410-14.PMID:124280.
- 15 ZHENG, S; ZHAO, M; WU, Y; WANG, Z; REN, Y. **Suppression of pancreatic beta cell apoptosis by Danzhi Jiangtang capsule contributes to the attenuation of type 1 diabetes in rats.** BMC Complement Altern Med 2016; 16:31.DOI:10.1186/s 12906-016-0993-4. PMID: 26819084.
- 16 BURESH, R; BERG, K. **A tutorial on oxidative stress and redox signaling with application to exercise and sedentariness.** Sports Medicine 2015; 1(1):3.PMID:27747840.DOI:10.1186/s40798-014-0003-7.
- 17 OKAMURA, D.M; PENNATHUR, S. **The balance of powers: Redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury.** Redox Biol 2015; 6:495-504.DOI:10.1016/j.redox.2015.09.039.PMID:26448394. PMCID: PMC4600846.
- 18 SILVA, M; LIMA, W.G; SILVA, M.E; PEDROSA, M.L. **Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profiles and oxidative stress in hamsters.** Arq Bras Endocrinol Metabol 2011; 55(1):46-53. PMID: 21468519.
- 19 CHENG, Y; SHEN, J; REN, W; HAO, H; XIE, Z; LIU, J; MU, Y; HAN, W. **Mild hyperglycemia triggered islet function recovery in streptozotocin-induced insulin-deficient diabetic rats.** J Diabetes Investig 2016; 1-12. PMID: 27184687. DOI: 10.1111/jdi.12540.
- 20 SHARMA, P; BHARDWAJ, P; SINGH, R. **Administration of lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum ameliorated hyperglycemia, dyslipidemia, and oxidative stress in diabetic rats.** Int J Prev Med 2016; 7:102. PMID: 27625767. PMCID: PMC5007903. DOI:10.4103/2008-7802.188870.
- 21 VAN LUNTEREN, E; MOYER, M; SPIEGLER, S. **Alterations in lung gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats.** BMC Endocr Disord 2014; 14:5. PMID: 24423257. PMCID: PMC 3945062. DOI: 10.1186/1472-6823-14-5.
- 22 OYENIHI, O.R; BROOKS, N.L; OQUNTIBEJU, O.O. **Effects of kolaviron on hepatic oxidative stree in streptozotocin induced diabetes.** BMC Complement Alter Med 2015; 15:236. PMID: 26179065. DOI: 10.1186/s12906-015-0760-y.
- 23 VALENÇA, S.D.S; KLOSS, M.L; BEZERRA, F.S; LANZETTI, M; SILVA, F.L; PORTO, L.C. **Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs.** Jornal Brasileiro de Pneumologia.2007; 33(6):655-662. PMID: 18200365.
- 24 WU, C.Y; YUE, F; LI, M; ZHANG, L.P; WANG, J; GUO, X.Y. **Effects of hyperoxia on inflammatory response in lung of infantile rats.** Zhonqquo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue 2010; 22 (7):389-92. PMID: 20663297
- 25 HU, X; GUO, C; SUN, B. **Inhaled nitric oxide attenuates hyperoxic and inflammatory injury without alternation of phosphatidylcholine synthesis in rat lungs.** Pulm Pharmacol Ther 2007; 20(1):75-84. PMID: 16480908. DOI: 10.1016/j.pupt.2005.12.008.

- 26 REIS, R.B; NAGATO, A.C; NARDELI, C.R; MATIAS, I.C; LIMA, W.G; BEZERRA, F.S. **Alterations in the pulmonary histoarchitecture of neonatal mice exposed to hyperoxia.** Jornal de pediatria, v.89, n.3, p.300-306, May.2013. PMID: 23669216.
- 27 CLAYTON , C.E; CARRAWAY, M.S; SULIMAN, H.B; THALMANN, E.D; THALMANN, K.N; SCHMECHEL, D.E; PIANTADOSI, C.A. **Inhaled carbon monoxide and hyperoxic lung injury in rats.** American journal of physiology lung cell molecular physiology, v.281, n.4, p.949-57, Oct.2001.PMID: 11557599.
- 28 ALEJANDRO, E.U; GREGG, B; BLANDINO-ROSANO, M; CRAS-MÉNEUR, C; BERNAL-MIZRACHI, E. **Natural history of β -cell adaptation and failure in type 2 diabetes.** Mol Aspects Med 2015; 42: 19-41. PMID: 25542976. DOI: 10.1016/j.mam.2014.12.002.
- 29 JUNIOR, L.A.F; KRETZMANN, N.A; PORAWSKI, M; DIAS, A.S; MARRONI, N.A.P. **Estresse oxidativo e alterações estruturais pulmonares no diabetes mellitus experimental.** J.Bras. pneumol.2009; 35(8): 788-791. DOI: 10.1590/S1806-37132009000800011.
- 30 SILVA, F.M; SILVEIRA, R.J; HALLAL, A.L.L.C; FILHO, D.W; CARDOSO, J.J.D; ACBC-SC; LEÃO, L.E.V; TCBC-SP. **Efeito da ventilação com diferentes frações inspiradas de oxigênio e do alopunirol na isquemia-reperfusão pulmonar em ratos.** Rev.Col Bras.Cir.2004; v.31, n.5:291-98. DOI: 10.1590/S0100-69912004000500005.