

VALÉRIA MILENA DANTAS DE CASTRO

**EFEITOS DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA NO DUODENO DE RATOS COM
DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

RECIFE

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
VALÉRIA MILENA DANTAS DE CASTRO

**EFEITOS DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA NO DUODENO DE RATOS COM
DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural De Pernambuco, como requisito final para obtenção do título de doutora em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto.

Co-orientadora: Naisandra Bezerra Da Silva Farias.

RECIFE
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
VALÉRIA MILENA DANTAS DE CASTRO

**EFEITOS DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA NO DUODENO DE RATOS COM
DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

Tese de Doutorado

Aprovada em 16 de Fevereiro de 2024.

Banca examinadora

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto – Presidente
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Naisandra Bezerra da Silva Farias – Titular
Departamento de Morfologia - UFRN

Bento João da Graça Azevedo Abreu - Titular
Departamento de Morfologia - UFRN

Karina Carla de Paula Medeiros - Titular
Departamento de Morfologia - UFRN

Gilberto Santos Cerqueira - Titular
Departamento de Morfologia - UFC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C355e Castro, Valéria Milena Dantas de.
Efeitos da oxigenoterapia hiperbárica no duodeno de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina / Valéria Milena Dantas de Castro. – Recife, 2024.
93 f.: il.

Orientador(a): Joaquim Evêncio Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2024.
Inclui referências e anexo(s).

1. Oxigênio hiperbárico 2. Diabetes Mellitus 3. Mucosa duodenal
2. Morfometria 3. Inflamação 4. Estresse Oxidativo I. Evêncio Neto,
Joaquim, orient. II. Título

CDD 574

Dedico esse trabalho as mulheres da minha vida, minha mãe Lúcia, irmã Franciele e vó Olindina por tornarem esse momento possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir essa experiência de aquisição de conhecimentos e realização de um grande sonho;

A minha família por todo apoio e compreensão nos momentos de ausência, em especial meu esposo Valdeir;

A minha cunhada Lauricélia Xavier por ter sido minha rede de apoio com meu bebê para que eu pudesse ter êxito na finalização desse trabalho;

Aos amigos pela lealdade e amizade especialmente Janiele Cruz que me acompanha desde a graduação;

Ao professor Dr. Joaquim Evêncio Neto pela sua forma humanizada com que trata seus alunos, pela disponibilidade em ajudar e pelas palavras de sabedoria. Tudo isso tornou essa caminhada mais leve e agradável;

A minha co-orientadora Dra. Naisandra Bezerra Farias da Silva por todo suporte ofertado e amizade desde o mestrado;

A equipe técnica do laboratório de técnicas histológicas da UFRN (Sara e Elaine) e da UFRPE (Edna e Priscilla) pelo auxílio no processamento das amostras e microfotografias;

Ao grupo de pesquisa em Diabetes Mellitus Experimental da UFRN em especial aos professores Bento João Abreu, Karina Carla de Paula Medeiros, Flávio Santos Silva e colegas Alexandy Michel Dantas Santos, Robson Inácio Marinho e Dafiny Emannuele da Silva.

Ao programa de pós-graduação em Biociência Animal pelo acolhimento e cuidado com os discentes;

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste sonho, minha eterna gratidão.

“É justo que muito custe o que muito vale”

(Santa Teresa D'Ávila)

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica que tem como resultado a hiperglicemia persistente proveniente da falta de insulina ou de falhas na ação dela. Essa desordem geralmente é acompanhada por alterações em vias de sinalização do estado redox celular que resulta em respostas inflamatórias e posteriormente em danos a nível morfológico em tecidos e órgãos, complicações essas associadas ao diabetes. Diante desses danos que o DM causa no paciente, muitos estudos vêm testando terapias alternativas que possam reduzir essas complicações como é o caso da hiperoxigenação tecidual. A Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB) envolve a inalação de oxigênio puro e em alta pressão. No presente estudo, objetiva-se avaliar os efeitos da (OHB) nos parâmetros clínicos, morfológicos, inflamatórios e oxidativos do duodeno de ratos diabéticos. Para isso, utilizou-se 33 ratos Wistar com idade de 60 dias, pesando cerca de 220-270g. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: grupo controle composto pelos animais saudáveis (C), grupo controle tratado com oxigenoterapia hiperbárica (C+OHB), grupo diabético sem tratamento (D) e o grupo diabético tratado oxigenoterapia (D+OHB). O DM foi induzido com uma injeção intraperitoneal de streptozotocina 60mg/kg. Foi utilizado no interior da câmara de 2,5 atmosferas absolutas (ATA) num índice de 2 ATA/min sendo mantidos nessa pressão por 60 min. A câmara foi ventilada com 100% de O₂ a um fluxo de 20 L/min a fim de minimizar acúmulo de CO₂ por um período de 5 semanas. Após a eutanásia retirou-se todo o duodeno, onde se destinou 5 centímetros para análises histomorfométricas, imunohistoquímicas, estereológicas e 2 centímetros para marcação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Constatou-se que a OHB melhorou a polifagia, reverteu as alterações de volume de referência do lúmen duodenal e volume absoluto da submucosa. Também melhorou a expressão de Caspase-3, VEGF, SOD-1 E GPX. A partir dos resultados concluímos que a hiperoxigenação nesse estudo apesar de não reduzir a glicemia, teve efeitos positivos a nível tecidual reduzindo alterações morfológicas de volume bem como melhorando a expressão de proteínas envolvidas na apoptose, inflamação e estresse oxidativo.

Palavras-chave: Oxigênio hiperbárico; Diabetes Mellitus; Mucosa duodenal; Morfometria; Inflamação; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder that results in persistent hyperglycemia resulting from a lack of insulin or failures in its action. This disorder is generally accompanied by changes in cellular redox state signaling pathways that result in inflammatory responses and subsequently in morphological damage to tissues and organs, complications associated with diabetes. Given the damage that DM causes to patients, many studies have been testing alternative therapies that can reduce these complications, such as tissue hyperoxygenation. Hyperbaric Oxygen Therapy (OHB) involves inhaling pure oxygen at high pressure. In the present study, the aim is to evaluate the effects of (OHB) on the clinical, morphological, inflammatory and oxidative parameters of the duodenum of diabetic rats. For this, 33 Wistar rats aged 60 days, weighing around 220-270g, were used. The animals were distributed into four experimental groups: control group composed of healthy animals (C), control group treated with hyperbaric oxygen therapy (C+OHB), diabetic group without treatment (D) and diabetic group treated with oxygen therapy (D+OHB). DM was induced with an intraperitoneal injection of streptozotocin 60 mg/kg. It was used inside the chamber at 2.5 absolute atmospheres (ATA) at a rate of 2 ATA/min and maintained at that pressure for 60 min. The chamber was ventilated with 100% O₂ at a flow rate of 20 L/min in order to minimize CO₂ accumulation for a period of 5 weeks. After euthanasia, the entire duodenum was removed, where 5 centimeters were allocated for histomorphometric, immunohistochemical and stereological analyzes and 2 centimeters for marking reactive oxygen species (ERO). It was found that OHB improved polyphagia and reversed changes in the reference volume of the duodenal lumen and absolute volume of the submucosa. It also improved the expression of Caspase-3, VEGF, SOD-1 AND GPX. From the results we conclude that hyperoxygenation in this study, despite not reducing blood glucose, had positive effects at tissue level, reducing morphological changes in volume as well as improving the expression of proteins involved in apoptosis, inflammation and oxidative stress.

Keywords: Hyperbaric Oxygen; Diabetes Mellitus; Duodenal Mucosa; Morphometry; Inflammation; Oxidative Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1- Protocolo de administração da OHB..... | 30 |
| Figura 2- Esquema representativo da obtenção de secções histológicas do duodeno..... | 31 |
| Figura 3- Desenho esquemático da mensuração da área de absorção duodenal..... | 33 |

ARTIGO 1

| | |
|--|----|
| Figura 1. Volume de referência (Vref) segundo princípio de Cavalieri. Grupo controle (C), grupo controle tratado com oxigênio hiperbárico (C+OHB), grupo diabético (D), grupo diabético tratado com oxigênio hiperbárico (D+OHB). Secções transversais do duodeno coradas com HE com ampliação de 20x e escala de barra de 1000 µm (A). Parede Vref P = 0,0156 (B), lúmen Vref P = 0,0007 (C) e razão parede/lúmen P < 0,0036 (D). *Diferença significativa vs grupo C; # versus D..... | 59 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 2. Volume duodenal absoluto. Grupo controle (C), grupo controle tratado com oxigênio hiperbárico (C+OHB), grupo diabético (D), grupo diabético tratado com oxigênio hiperbárico (D+OHB). Mucosa (A), Submucosa (B) e camada muscular (C). P < 0,0001. *Diferença significativa vs grupo C, # vs grupo C+OHB, † diferença significativa .vs D+OHB..... | 60 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 3. Área de absorção. Grupo controle (C), grupo controle tratado com oxigênio hiperbárico (C+OHB), grupo diabético (D), grupo diabético tratado com oxigênio hiperbárico (D+OHB). Secções transversais do duodeno coradas com HE com ampliação de 40x, barra de escala de 500 µm (A). Gráfico representativo da quantificação da área de absorção (B). *Diferença significativa vs grupo C, # vs grupo C+OHB. P<0,0001. | 62 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 4. Imunohistoquímica de caspase-3 em mucosa duodenal. Cortes transversais contrastados com hematoxilina (H) mostrando imunorreatividade na coloração amarela a marrom (A). Gráfico representando a quantificação de caspase-3 no tecido. Ampliação 400x, escala de barra de 50 µm. *Diferença significativa vs grupo C, # vs grupo C+OHB, † vs grupo D. P = 0,0003. | 62 |
|--|----|

ARTIGO 2

Figura 1 Glicose e peso. Grupo controle (C), grupo controle tratado com oxigênio hiperbárico (C+OHB), grupo diabético (D), grupo diabético tratado com oxigênio hiperbárico (D+OHB). Glicemia (A), P= 0,004; Peso (B), P= 0,0001. *Diferença significativa vs grupo controle, # vs grupo C+OHB.....81

Figura 2 Efeitos da OHB nas citocinas envolvidas na inflamação. Cortes transversais contrastados com hematoxilina mostrando imunorreatividade na cor amarelo-marrom. Ampliação de 400x, escala de barra 50 µm (A). Razão de imunorreatividade DAB/H em tecido duodenal. IL-10, P= 0,0991 (B); TNF-α, P= 0,1787(C); VEGF, P = 0,0790 (D).....82

Figura 3 Efeitos da OHB nas enzimas antioxidantes. Cortes transversais contrastados com hematoxilina mostrando imunorreatividade na cor amarelo-marrom (A) com aumento de 40X, barra de escala 50µm. Razão de imunorreatividade DAB/H em tecido duodenal. SOD-1, P= 0,0051 (B); GPX, P = 0,5099 (C).....83

Figura 4 Marcador oxidativo em tecido duodenal. Cortes transversais duodenais mostram a intensidade da fluorescência emitida pela sonda DHE, que indica o nível de EROS intracelular (A). Níveis de EROS no tecido duodenal (B). Grupo controle (C), grupo controle tratado com OHB (C+OHB), grupo diabético (D) e grupo diabético tratado com OHB. N= 4 por grupo. *diferença significativa versus grupo C. P= 0,0058.....83

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Características clínicas dos ratos de acordo com o grupo experimental.....58

Tabela 2. Vv das camadas do duodeno segundo os grupos experimentais.....60

Tabela 3. Dados morfométricos do duodeno de acordo com cada grupo experimental.....61

LISTA DE ABREVIATURAS

AGS- Antígenos alvo moleculares
ATA- Atmosfera absoluta
ATP- Adenosina trifosfato
BCL-2- Proteína antiapoptose
BrdU- marcador de proliferação celular
C- Controle
C+OHB- Controle tratado com Oxigênio Hiperbárico
CAT- Catalase
CO₂- Dióxido de carbono
D- Diabético
D+OHB- Diabético tratado com Oxigênio Hiperbárico
DAB/H- razão diaminobenzidina hematoxilina
DHE- Di-hidroetídio
DM- Diabetes Mellitus
DM1- Diabetes Mellitus tipo 1
DM2- Diabetes Mellitus tipo 2
GI- Trato gastrointestinal
GLP- Peptídeo semelhante ao glucagon
GLUT1, GLUT3, GLUT4- Transportadores de glicose
GPX- Glutaciona peroxidase
HE- Hematoxilina e Heosina
HIF-1- Fator Induzível por Hipóxia
IHC- Imunohistoquímica
IL-10- Interleucina 10
IL-6- Interleucina 6
LPS- lipopolissacarídeo
NF-κB- Fator de transcrição kappa B
OCT- Tissue Teck Compound
OHB- Oxigenoterapia Hiperbárica
PBS- solução salina tamponada

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SOD- Superóxido dismutase

STZ- Streptozotocina

SURS- Amostragem Aleatória Uniforme e Sistemática

TNF- α -Fator de Necrose Tumoral alfa

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

VREF- Volume de referência

Vv- Densidade de volume

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 DIABETES MELLITUS | 18 |
| 2.2 MODELO ANIMAL DE DM1 | 20 |
| 2.3 DANOS INTESTINAIS CAUSADAS PELO DM | 20 |
| 2.4 EXTRESSE OXIDATIVO | 22 |
| 2.5 INFLAMAÇÃO | 23 |
| 2.6 APOPTOSE | 24 |
| 2.7 HIPERGLICEMIA E HIPÓXIA | 25 |
| 2.8 OXIGÊNIO HPERBÁRICO COMO TERAPIA | 26 |
| 3 OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 28 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFCOS | 28 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 ANIMAIS | 29 |
| 4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL | 29 |
| 4.3 ADMINISTRAÇÃO DA OHB | 30 |
| 4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO | 31 |
| 4.5 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA | 32 |
| 4.5.1 Volume | 32 |
| 4.5.2 Densidade de volume | 32 |
| 4.6 MORFOMETRIA | 33 |
| 4.6.1 Área de absorção | 33 |
| 4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHC) | 33 |
| 4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA | 34 |
| 4.9 ANÁLISE ESTÁTISTICA | 35 |
| 5 REFERÊNCIAS | 36 |
| ARTIGO 1 | 50 |
| ARTIGO 2 | 73 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 95 |
| ANEXO A- APROVAÇÃO CEUA | 96 |

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença, que apresenta várias desordens, envolvendo o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, sendo assim considerada uma síndrome metabólica. Sua principal característica é a hiperglicemia persistente como resultado da falta de secreção de insulina, ação da insulina ou combinação de ambos os processos (KARAMANOU et al., 2016).

Estima-se um aumento de casos de diabetes em todo o mundo para os próximos anos, onde o número de pacientes com diabetes pode aumentar em 48% de casos, chegando a 620 milhões até 2045. O Brasil é o 5º país em incidência de diabetes no mundo, com 16,8 milhões de doentes adultos (20 a 79 anos), perdendo apenas para China, Índia, Estados Unidos e Paquistão. (“Federação Internacional de Diabetes - Home”, 2019).

Dentre os subtipos de DM os que mais ocorrem são o Diabetes Mellitus Tipo II (DM2) e o Diabetes Mellitus Tipo I (DM1) respectivamente (BULLARD et al., 2016). Este, apesar de ser menos prevalente que o DM2 vem sendo cada vez mais frequente, acometendo principalmente crianças e adolescentes (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

A longo prazo é comum o desenvolvimento de várias complicações ligadas à hiperglicemia, o que prejudica a qualidade de vida do paciente (NANSEL et al., 2008). Danos como retinopatia, neuropatia periférica, problemas circulatórios, hipóxia, inflamação sistêmica, pé diabético e problemas gastrointestinais associados ao DM são sistematicamente relatados na literatura (MACHADO et al., 2017; PIPER; SAAD, 2018; SADA et al., 2016).

Muitas dessas anormalidades gastrointestinais têm sido vistas tanto em roedores quanto em pacientes humanos (PELLEGRINI et al., 2017). No intestino já foram observadas alterações de morfometria, biomecânica assim como prejuízos na função sensorial/motora (SHA et al., 2006). O modo como a hiperglicemia estimula o desenvolvimento de todas essas complicações ainda não é bem compreendido, no entanto, pesquisadores têm apontado alguns mecanismos. Fatores como hiperglicemia, hipóxia, estresse metabólico e inflamação de baixo grau têm sido mencionados com preditores para o desenvolvimento de complicações a nível

morfológico (BHOR; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2004). A mucosa intestinal é uma interface entre o meio luminal e o organismo onde está vulnerável a danos oxidativos induzidos por oxidantes luminais (CHALOVICH; EISENBERG, 2012).

No DM, a falha na captação da glicose do sangue para os tecidos ocorre a hiperfagia como mecanismo de compensação (ANDO et al., 2018). Esse aumento na ingesta alimentar leva a alterações morfofisiológicas gastrointestinais como aumento da mucosa intestinal, redução de apoptose e aumento de marcadores inflamatórios (DE CASTRO et al., 2021). O aumento de consumo de alimentos também influencia a oxigenação desse tecido tendo em vista que após uma refeição mais sangue é direcionado para essa região para promover a oxigenação desses tecidos (ZEITOUNI et al., 2016). Por sua vez, a hiperoxigenação pode influenciar mecanismos de proliferação, apoptose celular, estresse oxidativo e, conseqüentemente, a inflamação tendo em vista que o estresse oxidativo é um mediador inflamatório (MITTAL et al., 2014).

Ao mesmo tempo que ocorre maior perfusão, com o aumento de fontes de combustíveis que estimulam a respiração celular, também ocorre maior consumo de O₂ pelas mitocôndrias podendo levar a hipóxia tecidual (SADA et al., 2016). A OHB envolve a inspiração de oxigênio puro em alta pressão. Isso possibilita uma distribuição de maior quantidade desse gás pela corrente sanguínea para os tecidos. Sua utilização tem demonstrado benefícios para diversas condições patológicas como malignidades, doenças isquêmicas e pé diabético (DANESH-SANI; SHARIATI-SARABI; FEIZ, 2012; JOHNSTON et al., 2016).

A hiperóxia cria um gradiente para a difusão de oxigênio nos tecidos e dessa forma estimula a angiogênese, formação de colágeno e matriz, processos esses que seriam inibidos pela hipóxia (AL-RAWAHI, 2020; LEACH; REES; WILMSHURST, 1998). Assim, a Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB) pode ser uma alternativa efetiva para minimizar os danos teciduais advindos desse ciclo de hiperglicemia/ hipóxia causadas pelo DM1 no duodeno de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica que tem como principal característica a hiperglicemia persistente resultado da falta de secreção de insulina, ação da insulina ou combinação de ambos (KARAMANOU et al., 2016). Seu primeiro registro ocorreu no papiro egípcio durante a terceira dinastia pelo médico Hesy-Ra, onde foi identificada a poliúria como um sintoma da doença. Posteriormente há 600-400 a.c, cientistas indianos Charaka e Sushruta descreveram pacientes com grande quantidade de urina doce (EMMANUEL BHASKAR et al., 2010).

Estima-se que há uma tendência de aumento de casos de diabetes em todo o mundo para os próximos anos. Em 2017 havia cerca de 425 milhões de pessoas acometidas pela doença e em 2045 esse número pode chegar a 629 milhões, com um aumento total de 48% de casos. Especificamente no Brasil, em 2017 havia 26 milhões de casos, e que em 2045 poderia chegar a 45 milhões, o que corresponde a um aumento em 68% de novos casos da doença (“Federação Internacional de Diabetes - Home”, 2019).

No estado do Pernambuco os índices de mortalidade de pacientes hospitalizados com DM são de 42,9% dos casos, ficando atrás apenas do Rio Grande do Norte com 50,2% e Alagoas com 43,7% na região Nordeste (DATASUS, 2018). Dentre os subtipos de DM os que mais ocorrem são o Diabetes Mellitus Tipo I (DM1) e o Diabetes Mellitus Tipo II (DM2) em uma proporção de 5,8% e 90,9% respectivamente, ficando 3,3% para outros subtipos como Diabetes Mellitus Gestacional e outros tipos específicos (BULLARD et al., 2016; DE FREITAS MOREIRA et al., 2015).

O DM1 também conhecida como diabetes dependente de insulina é uma doença autoimune onde ocorre a morte das células produtoras de insulina, o que resulta em hiperglicemia. Enquanto isso o DM2 ou diabetes não dependente de insulina se caracteriza pela resistência à insulina e disfunção das células beta. A resistência à insulina resulta de uma diminuição na sensibilidade a insulina nas células dos tecidos periféricos. Inicialmente a redução da sensibilidade à insulina desencadeia a hiperfunção das células beta como mecanismo compensatório para

alcançar a normoglicemia, no entanto no longo prazo esse mecanismo não é sustentável e as células beta declinam sua atividade (BANDAY; SAMEER; NISSAR, 2020).

O DM1 ocorre principalmente em crianças e em adolescentes do sexo masculino, mas, também pode acometer adultos e idosos. É sabido que tais pacientes tornam-se dependentes da administração de insulina (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; SALES-PERES et al., 2016). Em grande parte desses pacientes a perda de células produtoras de insulina se dá via reação autoimune onde há a formação de autoanticorpos relacionados ao DM1 (KATSAROU et al., 2017).

Essa doença é de caráter heterogêneo em termos de idade de início e gravidade da resposta autoimune (ZACCARDI et al., 2016). Embora sua causa não seja totalmente compreendida, algumas possíveis causas como predisposição genética, fatores ambientais, alterações da microbiota, permeabilidade intestinal e infecção viral podem ser considerados fatores causais da doença (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; AW; FUKUDA, 2018). O DM1 pode ser classificado em dois subtipos: (DM1a e DM1b). No primeiro caso, ocorre a destruição das células beta pancreáticas, enquanto, no segundo caso, a destruição celular têm causas desconhecidas, também sendo denominado como idiopático (PASCHOU et al., 2018).

A insulina, produto das células beta-pancreáticas, é o principal agente do metabolismo da glicose. Reconhecida por células T reativas, a insulina, é um dos antígenos alvo moleculares (Ags) dessas células de defesa. Assim, ocorre a destruição autoimune das células beta, o que propicia os distúrbios metabólicos observados no DM1 (CULINA; BREZAR; MALLONE, 2013). Desse modo, o DM1 envolve eventos imunológicos, genéticos e fisiológicos que continuam sendo elucidados (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010).

Essa desordem metabólica geralmente é acompanhada do desenvolvimento de várias complicações associadas à hiperglicemia, prejudicando a qualidade de vida do paciente (NANSEL et al., 2008). Danos como retinopatia, neuropatia periférica, problemas circulatórios, hipóxia, inflamação sistêmica e problemas gastrointestinais já foram relatados na literatura (MACHADO et al., 2017; PIPER; SAAD, 2018; SADA et al., 2016)

2.2 MODELO ANIMAL DE DM1

O modelo de DM1 utilizado neste estudo foi induzido quimicamente com estreptozotocina (STZ). A STZ é um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces acromogenes* que contém uma molécula de glicose altamente reativa com função citotóxica (AKINLADE; OWOYELE; SOLADOYE, 2021). Estruturalmente é análoga a glicose e se liga a transportadores de glicose (GLUT 2) e se acumulam nas células beta pancreáticas (DARENSKAYA; KOLESNIKOVA; KOLESNIKOV, 2021) onde é absorvida seletivamente levando a citotoxicidade e autoimunidade (CLAUDIA BÜRGER; TING ZHU, 2022).

Esse modelo tem sido usado amplamente para mimetizar a condição diabética humana. A STZ pode ser usada para indução tanto do DM1 como DM2, com variações de dosagens. Geralmente para DM1 se utiliza uma dose única de estreptozotocina enquanto para DM2 se combina STZ com administração prévia de nicotinamida ou com dieta rica em gordura (AKINLADE; OWOYELE; SOLADOYE, 2021). Seus efeitos nos animais incluem deficiência de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria, todos esses sinais característicos do DM1 humano. (GRAHAM et al., 2011; FURMAN, 2015; DE CASTRO et al., 2021; SILVA et al., 2017, 2022b)

2.3 DANOS INTESTINAIS CAUSADAS PELO DM

Sabe-se que o intestino delgado é essencial para a absorção de nutrientes (ZHÃO et al., 2002). Mas além disso, o intestino delgado possui funções endócrinas com capacidade de influenciar a homeostase da glicose e a resistência à insulina (KORAKAS et al., 2020). Sua porção inicial, o duodeno, parece ser o principal centro de sinalização que colabora com os distúrbios metabólicos no DM2, por exemplo (HALUZÍK et al., 2018).

Em procedimentos bariátricos para perda de peso, o contorno do duodeno parece regular a glicemia em pacientes DM2. Isso ocorre, pois, ao contornar o intestino proximal, o trânsito intestinal é acelerado e há um aumento na liberação de hormônios intestinais como o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) (AFFINATI et al., 2019). O GLP-1 é secretado pelas células L neuroendócrinas intestinais que induz a secreção de insulina e a depuração de glicose em resposta à glicose oral.

Após a bariátrica, os níveis de GLP-1 depois das refeições são elevados, o que proporciona melhor sensibilidade à glicose nas células-beta e menor glicemia pós-prandial (KOLIAKI et al., 2017).

O DM pode afetar todo o trato gastrointestinal e aumentar o risco de desenvolvimento de uma variedade de complicações, o que inclui refluxo, dismotilidade, retenção gástrica, azia, disfagia, náuseas, inchaço, diarreia e constipação (PIPER; SAAD, 2018). Todos esses danos são englobados no termo gastroenteropatia diabética (RODRIGUES; MOTTA, 2012).

Como esperado, os sintomas gastrointestinais afetam de forma negativa a qualidade de vida do paciente diabético. Isso ocorre devido ao fato de que a estrutura e a funcionalidade desse sistema são prejudicadas no DM1. Em suma, o que se observa é que essas alterações gastrointestinais são resultado da neuropatia autônoma que está associada a neuropatia diabética (DU et al., 2018). Assim, tanto a sensibilidade quanto a motilidade do trato gastrointestinal são afetados (ZHAO et al., 2006).

Nos últimos anos a comunidade científica vem abordando a relação entre intestino delgado e o DM. Já foram identificadas diversas alterações a nível tecidual tanto em modelos experimentais quanto em pacientes. Tais alterações incluem aspectos funcionais, oxidativos, morfológicos, inflamatórios e microbiológicos (BHOR; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2004; PELLEGRINI et al., 2017; SHA et al., 2006).

A nível tecidual observamos em um estudo prévio o aumento da parede duodenal, conferido pelo aumento do comprimento das vilosidades que conferiram um aumento considerável da camada mucosa (DE CASTRO et al., 2021). Além do mais, o peso do jejuno, comprimento, espessura e área de parede aumentaram significativamente em animais diabéticos obesos (Zhão et al., 2013). O DM também alterou as propriedades viscoelásticas do intestino como relaxamento e estresse da parede intestinal e tais mudanças foram atribuídas às alterações morfológicas das camadas intestinais (ZHAO et al., 2003).

Em relação à microbiota intestinal, existe uma conexão entre disbiose intestinal e inflamação que contribuem para a desregulação da tolerância a glicose, em modelos animais com a mudança de microbiota desenvolveu-se obesidade e resistência à insulina (SANYAL, 2013). Enquanto isso no ensaio de Pellegrini et al.,

(2017) com biópsias de pacientes diabéticos, com doença celíaca e saudáveis se observou inflamação na mucosa duodenal, bem como um perfil de microbiota diferente. Nesses achados o autor afirma que são necessários mais estudos para determinar se a inflamação é a causa ou uma consequência do processo autoimune do DM1.

Alguns autores apontam que, com a disbiose intestinal, ocorre um aumento na permeabilidade da mucosa intestinal, com isso ocorre a absorção exógena de patógenos que pode provocar respostas imunes e assim induzir a autoimunidade (AW; FUKUDA, 2018; GILLESPIE, 2006). Assim, são necessários mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no diabetes e sua relação com o intestino delgado.

2.4 EXTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, o que resulta na quebra do estado redox celular. Isto está associado a numerosos danos fisiopatológicos e é um fator conhecido por exacerbar doenças crônicas como o diabetes (DEBEVEC; MILLET; PIALOUX, 2017). Em condições fisiológicas normais, o organismo libera radicais livres por meio da oxidação da glicose, os quais a defesa antioxidante é capaz de equilibrar. Quando essas moléculas são liberadas em excesso, o sistema antioxidante não consegue contrabalancear, o que resulta em estresse oxidativo (IGHODARO, 2018).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) como ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), radicais de hidroxila (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) têm sua produção aumentada com a hiperglicemia (SADI; KONAT, 2015). Algumas dessas formas danificam os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Dentre os mecanismos para prevenir o dano oxidativo, a célula contém enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), as quais atuam na sequência convertendo ERO em subprodutos menos reativos (SHIRPOOR et al., 2007).

São vários os fatores que contribuem para o aumento do estresse oxidativo, incluindo tanto mecanismos exógenos quanto endógenos (BLOCK et al., 2002). A maior parte da glicose do corpo é decomposta na via glicolítica, com o aumento da glicemia sanguínea mais glicose irá fluir para esta via que resulta em mais piruvato e

acetil-CoA, propiciando o aumento de mais NADH que é um transportador de elétrons para redução de oxigênio e produção de ATP. Com o excesso de NADH pode ocorrer uma condição denominada pseudo-hipóxia, onde o oxigênio não pode ser efetivamente consumido, que gera, então, um estresse metabólico comum no diabetes (YAN, 2014).

De forma conjunta a hiperglicemia e a hipóxia estão implicados na patogênese de complicações diabéticas. Isso ocorre pelo fato de que com o aumento exacerbado da glicose sanguínea há maior geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SADA et al., 2016). Tal processo tem ganhado destaque como possível causador de danos metabólicos e teciduais em diversos órgãos (BHOR; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2004).

A mucosa intestinal é uma interface entre o meio luminal e o organismo onde há vulnerabilidade a danos oxidativos induzidos por oxidantes luminais. A integridade da mucosa é mantida pelo estado redox celular para suportar absorção de nutrientes, fluidez de muco e microbiota diversa (CHALOVICH; EISENBERG, 2012). Diversos danos morfológicos relacionados ao DM têm sido atribuídos ao estresse oxidativo que ocorre de modo acelerado no diabetes. Assim, as vias de estresse oxidativo podem alterar propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas de modo irreversível (BHOR; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2004; SCHAAN, 2003).

2.5 INFLAMAÇÃO

Sabe-se que existe uma ligação entre hiperglicemia com o estado pro-inflamatório e a geração de ERO (CHAUDHURI; UMPIERREZ, 2012). Considerando que a inflamação é um processo fisiológico contra danos externos ou internos, ocorre um aumento na geração de ERO com o aumento da glicemia sanguínea, o que desencadeia o processo inflamatório por meio da expressão de genes pro-inflamatórios como fator nuclear kappa B (NF- κ B) e Interleucina 6 (IL-6) (MARDIAH et al., 2015).

Ambos os tipos I e II de diabetes são resultado de processos inflamatórios. No primeiro caso, ocorre uma resposta inflamatória autoimune que vai deteriorando as células beta-pancreáticas, ao passo que, no segundo caso, a inflamação resulta da

resistência à insulina. Essa inflamação tida como de baixo grau inibe a sinalização da insulina, proporcionando assim uma conexão entre inflamação, estresse oxidativo e resistência à insulina (WANG et al., 2013).

Ao estimular a produção acelerada de ERO, a hiperglicemia também estimula a expressão de fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e acúmulo de matriz extra celular (LUCCHESI et al., 2013). Tanto o estresse oxidativo como a inflamação contribuem para o desenvolvimento de complicações secundárias ao diabetes como nefropatia, neuropatia e retinopatia. (VIKRAM et al., 2014).

O estresse oxidativo pode estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias através de diversos mecanismos. Derivados de oxigênio atuam como segundos mensageiros ativando fatores de transcrição, o que leva à expressão de genes que codificam citocinas. A inflamação induzida pelo estresse oxidativo estimula ainda mais o estresse oxidativo, o que promove um ciclo vicioso (ELMARAQBY; SULLIVAN, 2012).

2.6 APOPTOSE

A apoptose é uma sequência de eventos que resulta na morte celular, um processo necessário a fim de garantir a homeostase entre proliferação celular e apoptose (OBENG, 2020). Logo, trata-se de um processo coordenado que depende de gasto de energia e envolve a ação em cascata de proteases chamadas caspases (ELMORE, 2007). A morte celular programada tem funções importantes tanto na fisiologia quanto na doença, já que disfunções nessa cascata de sinalização podem levar à remoção excessiva ou sobrevivência prolongada das células. Sendo assim, esse processo está envolvido em uma variedade de condições patológicas (SANKARI et al., 2015).

Nos mamíferos a sinalização que propicia a morte celular pode ser agrupada em duas categorias: as vias intrínseca ou mitocondrial e extrínseca ou do receptor de morte (PUTCHA et al., 2002). A via intrínseca compreende eventos intracelulares dentro da mitocôndria, para isso variáveis como fatores de crescimento, hormônios, toxinas e hipóxia levam à permeabilidade da intermembrana mitocondrial desencadeando a via. Enquanto isso a apoptose por via extrínseca ocorre pela interação mediada de ligantes e receptores de morte (OBENG, 2020).

A hiperglicemia pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que por sua vez induzem a apoptose (ZHANG et al., 2010). As mitocôndrias desempenham um papel importante na mediação da apoptose induzida pela hiperglicemia. De modo geral a hiperglicemia induz estresse oxidativo com liberação de radicais livres que alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, com isso ocorre a liberação de proteínas como citocromo C no citosol da célula levando a formação do apoptossoma, esse por sua vez recruta caspases que vão efetivar a morte celular (SMART; LI, 2007).

A caspase-3 é uma proteína efetora na sinalização da morte celular que leva a alterações e a integridade epitelial do trato intestinal depende do equilíbrio entre morte e proliferação celular (MARTINS-PERLES et al., 2019; SMART; LI, 2007). A mucosa intestinal é revestida por um epitélio mais auto-renovador dos mamíferos. Essa renovação celular envolve uma contínua proliferação de células epiteliais na base da cripta com migração em direção às vilosidades (UMAR, 2010). Nesse processo, há tanto proliferação quanto morte celular (PEÑA-VILLALOBOS et al., 2018; WEBER et al., 2009).

2.7 HIPERGLICEMIA E HIPÓXIA

A hipóxia se refere a uma insuficiência na quantidade de oxigênio que é entregue aos tecidos (GUNTON, 2020). Esta, por sua vez, pode ser induzida pela hiperglicemia sanguínea com o aumento de consumo de oxigênio pelas mitocôndrias (SADA et al., 2016). A hiperglicemia em conjunto com a hipóxia exercem funções fisiopatológicas fundamentais no desenvolvimento das complicações associadas ao diabetes (CATRINA et al., 2004).

Em situações de reduzida quantidade de oxigênio, é liberado o Fator Induzível por Hipóxia - 1 (HIF-1), um fator de transcrição (PRABHAKAR; SEMENZA, 2015). O HIF-1 é mediador da adequação a hipóxia e coopera para homeostase do estado redox celular suprimindo a produção exacerbada de ERO (SEMENZA, 2017). Em condição hiperglicêmica esse fator de transcrição é inibido e isso pode contribuir para o aumento da geração de ERO (ZHENG et al., 2022).

O HIF-1 regula a síntese de enzimas envolvidas na quebra da glicose e os receptores GLUT1 e GLUT3 que atuam na captação da glicose. Em contrapartida, a

glicose influencia a estabilidade e a ativação desse fator de transcrição (GAO et al., 2014). Esse fator de transcrição detecta a hipóxia e aciona a transcrição de outros genes envolvidos em processos como angiogênese, proliferação celular, sobrevivência e metabolismo celular para que a célula se adapte as alterações de quantidade de oxigênio (LUO et al., 2022; SCHÖDEL; RATCLIFFE, 2019).

2.8 OXIGÊNIO HPERBÁRICO COMO TERAPIA

A OHB envolve a inspiração de oxigênio puro em alta pressão para o organismo. Sua utilização tem demonstrado benefícios para diversas condições patológicas como malignidades, doenças isquêmicas e pé diabético (DANESH-SANI; SHARIATI-SARABI; FEIZ, 2012; JOHNSTON et al., 2016). A hiperóxia estimula a angiogênese, formação de colágeno e matriz, processos esses que seriam inibidos pela hipóxia (LEACH; REES; WILMSHURST, 1998).

A oxigenoterapia é indicada para complicações como embolia, isquemias traumáticas, doença descompressiva, infecções necrosantes, queimaduras, dentre outras (ZULKOWSKI, 2017). Esse tipo de intervenção confere benefícios bioquímicos e celulares como prevenção do crescimento de bactérias *Pseudomonas*, restaura a morte bacteriana mediada por neutrófilos em tecidos até então hipóxicos, além de reduzir a vasoconstrição e o dano celular (DEEPA; JAIN, 2014).

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias é elevando em condições hiperglicêmicas, isso resulta em hipóxia celular no endotélio que é considerado um tecido alvo das complicações diabéticas. Além disso, de forma conjunta a hiperglicemia não só pode causar hipóxia como também estimular a formação de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (ROSmt) (SADA et al., 2016).

A OHB é uma terapia indicada para uma gama de complicações (ANDRADE; SANTOS, 2016). No entanto seus efeitos são controversos, havendo contra-indicações para algumas doenças. Além disso supõe-se que com a hiperóxia haja um aumento de ERO, e não se sabe se essa concentração aumentada seja suportável pelo sistema antioxidante evitando o estresse oxidativo (DANESH-SANI; SHARIATI-SARABI; FEIZ, 2012).

Neste trabalho exploramos pela primeira vez os efeitos da OHB na morfologia da mucosa intestinal de organismos diabéticos, levando em conta aspectos morfológicos, inflamatórios, apoptóticos e oxidativos. Até então só há trabalhos com doenças inflamatórias intestinais com uso de OHB.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da OHB em variáveis de morfologia, inflamação, apoptose e estresse oxidativo duodenal de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar dados clínicos como glicemia, peso, polifagia e polidipsia;
- ✓ Quantificar volume de referência e densidade de volume e volume absoluto do duodeno por meio da estereologia;
- ✓ Mensurar a área de absorção da mucosa por meio da histomorfometria;
- ✓ Medir a marcação imuno-histoquímica de moléculas envolvidas na inflamação como IL-10, TNF- α e VEGF;
- ✓ Medir a marcação imuno-histoquímica de caspase-3 envolvida na apoptose;
- ✓ Avaliar o estresse oxidativo por meio de imuno-histoquímica para moléculas antioxidantes (GPX e SOD-1) e ERO por imunofluorescência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

No presente estudo foi utilizado como modelo animal o *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Centro Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, com aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais sob protocolo nº 125.054/2018. O período experimental foi realizado no biotério experimental do Departamento de Morfologia/UFRN.

A amostra utilizada nesse estudo foi composta por 33 ratos machos com idade aproximada de 60 dias, com peso entre 220-270 g. Os animais permaneceram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro durante o período de ambientação de uma semana. Foram alocados 4 animais por caixa, mantidas em condições controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais: grupo controle: composto pelos animais saudáveis (C= 8); grupo controle tratado com OHB (C+OHB=7); grupo diabético sem tratamento (D=10); e o grupo diabético tratado com OHB (D+OHB= 8).

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Com exceção dos grupos compostos por animais normoglicêmicos, os animais passaram por um processo de indução de DM1, por meio de uma injeção intraperitoneal com STZ (60 mg/kg) dissolvida em tampão citrato 0,1 M, pH 4,5. Uma semana após a indução do diabetes, a glicemia de todos os animais experimentais foi mensurada por meio de um glicosímetro portátil (ONETOUCH, Ultra®). Os animais que exibiram glicemia ≥ 250 mg/dl foram considerados diabéticos. Uma semana após a indução, iniciou-se a intervenção terapêutica com OHB que foi realizada por 60 min/dia, 5 dias por semana, durante 5 semanas. Em cada sessão os animais foram expostos a 100% de oxigênio sob uma pressão de 2,5 (ATA)/min e por um período de uma hora, após isso foi realizada a descompressão a 1 ATA/min e os animais foram retirados da câmara. Todos os grupos experimentais passaram

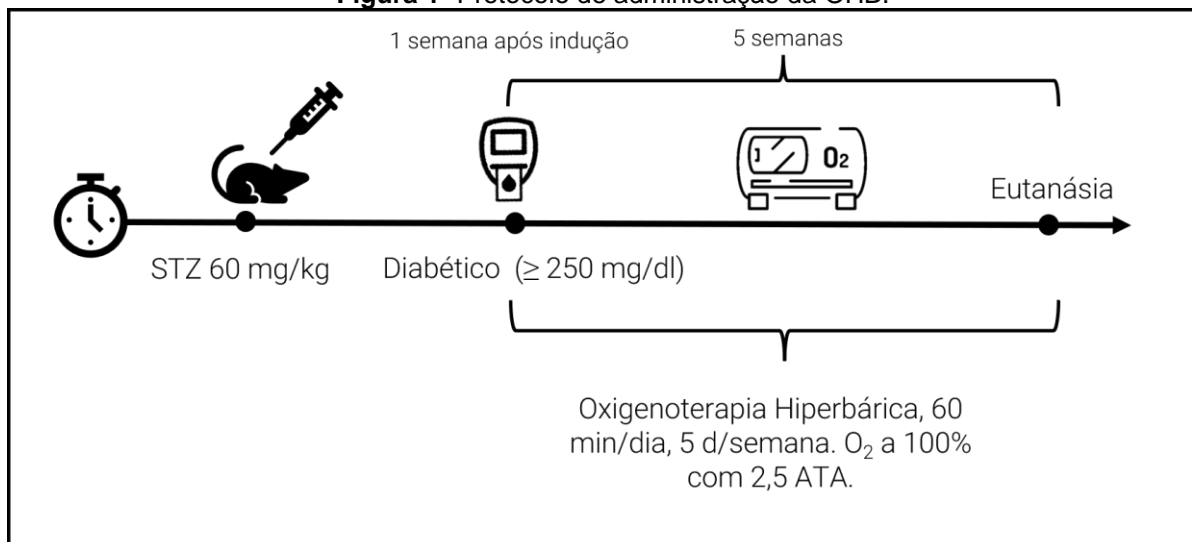
pela câmara, os grupos C e D a câmara foi ventilada com ar ambiente e não pressurizada enquanto os grupos C+OHB e D+OHB receberam o oxigênio hiperbárico. Finalizado o período experimental, os animais passaram por jejum noturno e foi realizada a eutanásia por exsanguinação cardíaca para posterior remoção das amostras de duodeno.

4.3 ADMINISTRAÇÃO DA OHB

Os animais dos grupos que foram submetidos à OHB receberam tratamento durante uma semana para adaptação à câmara, bem como nas quatro semanas posteriores. Os animais diabéticos iniciaram a adaptação na segunda semana após a indução da DM1. Em seguida, ficaram alocados em câmara hiperbárica (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda/SP) por 60 min, durante cinco dias na semana, por cinco semanas, de acordo com adaptação do protocolo (AL-WAILI et al., 2006; XU et al., 2017) (Figura 1).

Foi utilizado uma pressão no interior da câmara de 2,5 atmosferas absolutas (ATA) num índice de 1 ATA/min. A câmara foi ventilada com 100% de O₂ a um fluxo de 15 L/min a fim de minimizar acúmulo de CO₂. Ao final, a câmara foi lentamente descomprimida a um índice de 1 ATA/min.

Figura 1- Protocolo de administração da OHB.



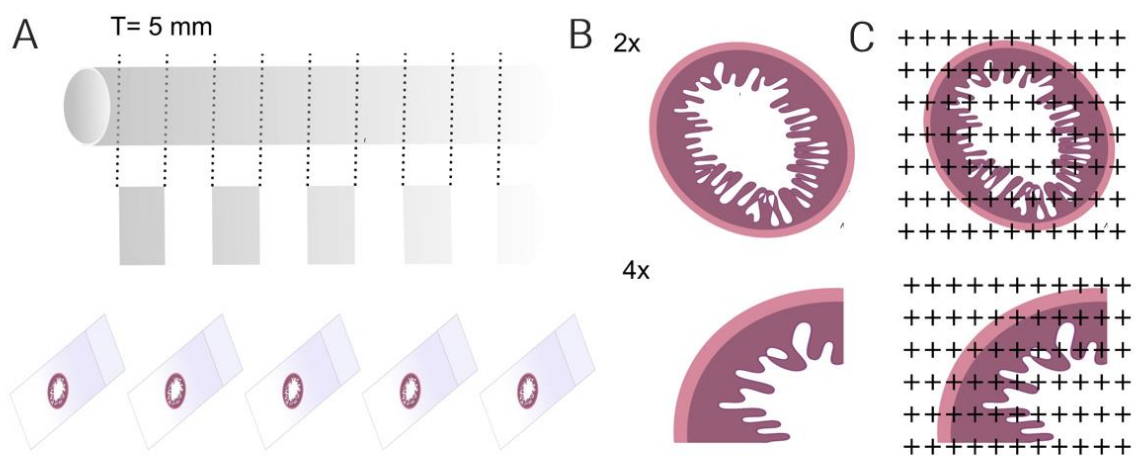
Fonte: autoria própria.

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a eutanásia dos animais foi feita uma incisão abdominal, laparotomia, para posterior coleta de amostras do duodeno. Todas as amostras coletadas, foram lavadas com soro fisiológico, e fixadas em formaldeído a 4% por 24h. Em outro momento foi realizada a secção seriada dos espécimes a 0,5 mm com aplicação de uma Amostragem Aleatória Uniforme e Sistemática (SURS) seguindo o princípio para análise estereológica (BROWN, 2017) (Figura 2A). Em seguida, o material foi alocado em cassetes e imersos em álcool 70% para seguir o processamento histológico de rotina e coloração em Hematoxilina-eosina – HE (Figura 2A).

Após a confecção das lâminas, estas foram submetidas à captura de imagens utilizando um microscópio óptico com câmera acoplada e conectados a um computador. As imagens foram capturadas com a utilização das objetivas de 2x e 4x (Figura 2B). O aumento menor foi utilizado para estimativa de volume de referência (V_{ref}) da parede, do lúmen e do volume total, segundo o princípio de Cavalieri (BROWN, 2017). Enquanto o aumento maior foi realizado para estimar a densidade de volume (V_v) das subcamadas mucosa, submucosa e musculares da parede duodenal, sendo realizadas quatro fotos por secção histológica, de acordo com o princípio de Delesse. Após a captura das imagens foi sobreposto um sistema teste quadrático para contagem de pontos que tocassem regiões de interesse (Figura 2C).

Figura 2- Esquema representativo da obtenção de secções histológicas do duodeno. Aplicação da amostragem SURS e lâminas histológicas coradas em HE (A); modo de captura das imagens (B); e aplicação de sistema testes (C).



Fonte: autoria própria.

4.5 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Com uma abordagem que fornece estimativas imparciais de parâmetros estruturais, a estereologia é uma ciência baseada em princípios geométricos e estatísticos. A partir da aplicação da análise estereológica obtém-se informações tridimensionais (3D) com base em secções bidimensionais (2D). As estimativas provenientes de tal análise se enquadram basicamente em duas categorias sendo o volume uma medida absoluta e a densidade uma medida relativa (GARCIA et al., 2007).

4.5.1 Volume

Para a estimativa de Volume Referência (Vref) de Parede e de Lúmen do duodeno, seguindo o princípio de Cavalieri, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$V_{ref} = \sum p \times (a/p) \times t \times f^{-1}_1 \times f^{-1}_2$$

Onde $\sum p$ é o somatório de pontos que tocam a região de interesse (Parede ou Lúmen), a/p é a área por ponto do sistema teste quadrático que foi sobreposto nas imagens, t é a espessura com a qual foi cortada no micrótomo em μ^2 , f^{-1}_1 é o inverso da fração que foi utilizada para amostragem do órgão na secção seriada e f^{-1}_2 é o inverso da fração aplicada na microtomia (GUNDERSEN et al., 2013). Para calcular o volume de referência total foi realizado a soma dos valores de Vref de parede e Vref de lúmen.

4.5.2 Densidade de volume

Seguindo o princípio de Delesse foi estimado a Densidade de Volume (Vv) por subcamadas. Para isto se utilizará formula a seguir:

$$Vv = \frac{\sum p \text{ subcamada}}{\sum p \text{ parede}}$$

onde $\sum p$ é o somatório de pontos que tocam a região de interesse e a subcamada neste caso pode ser mucosa, submucosa ou musculares (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Essa fração foi feita para estimar a proporção que cada camada ocupa em relação ao total que é a parede. O volume absoluto foi obtido a partir da multiplicação de Vv de cada subcamada da parede por Vref da parede duodenal.

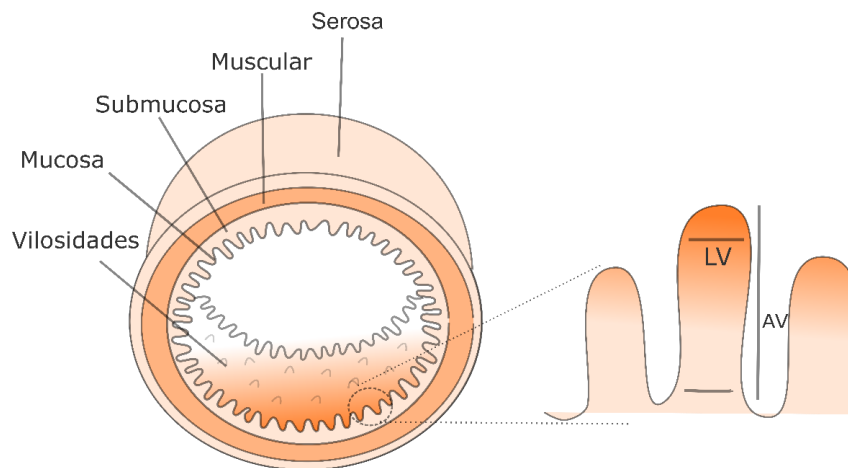
4.6 MORFOMETRIA

4.6.1 Área de absorção

Em microscópio trinocular de luz LEICA ICC50 HD® com câmera acoplada a um computador foram realizadas quatro microfotografias de cada seção histológica por animal e digitalizadas por meio do software Leica LAS EZ® (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA). A avaliação microscópica foi realizada com o auxílio do Software ImageJ®. Foram mensuradas a altura das vilosidades intestinais, as médias de largura das vilosidades e a espessura das camadas musculares. Em todos os parâmetros avaliados foram feitas 10 medidas por animal.

Com os dados de largura e altura das vilosidades foi quantificado a área de superfície de absorção empregando a seguinte fórmula adaptada por (FERREIRA et al., 2016): área de absorção= $(LV \times AV) / (LV/2)^2$ onde LV representa a largura da vilosidade enquanto AV representa a altura do da vilosidade conforme esquematizado na (Figura 3).

Figura 3- Desenho esquemático da mensuração da área de absorção duodenal.



Fonte: autoria própria.

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHC)

As amostras incluídas em parafina foram submetidas a cortes de 4 μ de espessura que foram dispostos em lâminas silanizadas. Posteriormente os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em banhos de álcool em concentrações decrescentes. Em seguida foi realizada a recuperação antigênica seguindo protocolos para imunomarcção por Estreptoavidina-Biotina (LSAB,

labeled streptavidina-biotin) utilizando os anticorpos CASPASE 3, para evidenciar apoptose celular; IL 10, TNF- α e VEGF relacionados ao processo inflamatório; e SOD-1 e GPX para estresse oxidativo, sob diluições de 1:400.

Para quantificar a expressão das proteínas das lâminas histológicas de IHC, com o auxílio de microscópio óptico e câmera acoplada Leica ICC50 HD, imagens foram digitalizadas e capturadas por computador por meio do Software Leica LAS EZ. Cinco campos foram fotografados no aumento de 40x de cada animal e analisadas por Image J[®]. A expressão das proteínas foi obtida pela razão entre as áreas de coloração DAB e H, que foram medidas após a separação do corante usando o plug-in Color Deconvolution do Image J[®] de acordo com o método já descrito por (BARTIS et al., 2016)

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para realização da marcação dos ânios superóxidos, foram utilizadas amostras de cinco animais por grupo. Após a eutanásia as amostras duodenais foram fixadas em nitrogênio líquido e mantidas sob a temperatura 20°C. As amostras foram colocadas em moldes preenchidos com Tissue Teck Compound (OCT) e congeladas para posterior corte. Os blocos de OCT foram seccionados em uma espessura de 20 μ m em um criostato (Cryostat Leica, Nussloc, Alemanha) a temperatura de -20 °C. As lâminas com as secções de duodeno foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) e em seguida incubadas com sonda fluorescente para detecção de espécies reativas de oxigênio, o di-hidroetídio (DHE), numa concentração de 10 mM. As imagens foram capturadas em um microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão).

Para análise da fluorescência de cada animal foram realizadas 4 fotos no aumento de 10x. A obtenção da intensidade média de fluorescência foi obtida de forma automatizada com o ImageJ. Para isso foram utilizadas as ferramentas (*image-adjust-colour threshold- select- analyze- histogram- RGB Red- mean*) com mesmo padrão de Hue, Saturation e Brightness para todas as imagens conforme o protocolo proposto por (SHIHAN et al., 2021).

4.9 ANÁLISE ESTÁTISTICA

A análise estatística foi performada por meio do software GraphPad Prism (versão 5.0). As variáveis foram submetidas a teste de normalidade e análise de variância (ANOVA ONE-WAY) seguido de pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando ($p \leq 0,05$).

5 REFERÊNCIAS

ADLER, A. et al. REPRINT OF: CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. **Diabetes Research and Clinical Practice**, p. 108972, jul. 2021.

AFFINATI AH, ESFANDIARI NH, ORAL EA, KRAFTSON AT. Bariatric Surgery in the Treatment of Type 2 Diabetes. **Curr Diab Rep**. v. 4. n 19. Dec. 2019.

AKINLADE, O. M.; OWOYELE, B. V.; SOLADOYE, A. O. Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents: a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy. **African Health Sciences**, v. 21, n. 2, p. 719, 1 jun. 2021.

ALBENBERG, L. et al. Correlation Between Intraluminal Oxygen Gradient and Radial Partitioning of Intestinal Microbiota in Humans and Mice. **Gastroenterology**, v. 147, n. 5, p. 1055, 1 nov. 2014.

ALI, E. M. T.; ABDALLAH, H. I.; EL-SAYED, S. M. Histomorphological, VEGF and TGF- β immunoexpression changes in the diabetic rats' ovary and the potential amelioration following treatment with metformin and insulin. **Journal of Molecular Histology**, v. 51, n. 3, p. 287–305, 1 jun. 2020.

AL-RAWAHI, A. Role of hyperbaric oxygen therapy on microvascular diabetic complications and metabolic profile among patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal Oman Medical Specialty Board**, V. 35, N.3 May. 2020.

AL-WAILI, N. S. et al. Influences of Hyperbaric Oxygen on Blood Pressure, Heart Rate and Blood Glucose Levels in Patients with Diabetes Mellitus and Hypertension. **Archives of Medical Research**, v. 37, n. 8, p. 991–997, Nov. 2006.

AL-WAILI, N. S.; BUTLER, G. J. Effects of Hyperbaric Oxygen on Inflammatory Response to Wound and Trauma: Possible Mechanism of Action. **The Scientific World Journal**, v. 6, n. 6, p. 425-441, Apr. 2006.

ANDO, A. et al. Weaning stage hyperglycemia induces glucose-insensitivity in arcuate POMC neurons and hyperphagia in type 2 diabetic GK rats. **Neuropeptides**, v. 68, p. 49–56, Feb. 2018.

ANDRADE, S. M. DE; SANTOS, I. C. R. V. Oxigenoterapia hiperbárica para tratamento de feridas. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 37, n. 2, p. 1-7, Jun. 2016.

APARECIDA FURLAN DANIEL, R. I. et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestinal ischemia reperfusion injury. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.26, n.6, p. 463-469, Dec. 2011.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69–82, Jan. 2014.

AW, W.; FUKUDA, S. Understanding the role of the gut ecosystem in diabetes mellitus. **J Diabetes Investig**, v. 9, n.1, p. 5–12, Jan. 2018.

BANDAY MZ, SAMEER AS, NISSAR S. Pathophysiology of diabetes: An overview. **Avicenna J Med**. v.13; n. 10, p. 174-188. Oct. 2020.

BARTIS, D. et al. Role of CD248 as a potential severity marker in idiopathic pulmonary fibrosis. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 51, Apr. 2016.

BAYRAK, B. B. et al. Metformin protects against diabetes–induced heart injury and dunning prostate cancer model. **Human and Experimental Toxicology**, v. 40, n.2, p. 297-209, Feb. 2020.

BERTOLETTO, P. R. et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on the rat intestinal mucosa apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury. **Microsurgery**, v. 27, n. 4, p. 224–227, May. 2007.

BHOR, V. M.; RAGHURAM, N.; SIVAKAMI, S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 89–97, jan. 2004.

BLOCK, G. et al. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 3, Aug. 2002.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1293–1300, Apr. 2010.

BOLAND, B. S.; EDELMAN, S. V.; WOLOSIN, J. D. Gastrointestinal Complications of Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 42, n. 4, p. 809–832, Dec. 2013.

BOSCO, G. et al. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates osteonecrosis in patients by modulating inflammation and oxidative stress. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1501, 1 Jan. 2018.

BOSCO, G. et al. Oxidative Stress and Inflammation, MicroRNA, and Hemoglobin Variations after Administration of Oxygen at Different Pressures and Concentrations: A Randomized Trial. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 18, Set. 2021.

BROWN, D. L. Practical Stereology Applications for the Pathologist. **Veterinary pathology**, v. 54, n. 3, p. 358–368, May. 2017.

BULLARD, K. M. et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Prevalence of Diagnosed Diabetes in Adults by Diabetes Type-United States. v. 67, n. 12, p. 359-361, Marc. 2016.

CATRINA, S. B. et al. Hyperglycemia Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α Protein Stability and Function. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3226–3232, Dec. 2004.

CHALOVICH, J. M.; EISENBERG, E. Intestinal redox biology and oxidative stress. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 7, p. 729–737, Mar. 2012.

CHAUDHURI, A.; UMPIERREZ, G. E. Oxidative stress and inflammation in hyperglycemic crises and resolution with insulin: implications for the acute and chronic complications of hyperglycemia. V. 26, n. 4, p. 257-258, Jul. 2012.

CHOUDHURY, R. Hypoxia and hyperbaric oxygen therapy: A review. **International Journal of General Medicine**, v. 20, n. 11, p. 431-442, Nov. 2018.

CLAUDIA BÜRGER, AND; TING ZHU, B. Pathogenic Mechanism of Autoimmune Diabetes Mellitus in Humans: Potential Role of Streptozotocin-Induced Selective Autoimmunity against Human Islet β -Cells. **Cells**, v. 11, n. 3, p. 492, Jan. 2022.

CULINA, S.; BREZAR, V.; MALLONE, R. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Insulin and type 1 diabetes: immune connections. **European Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 2, p. R19–R31, Feb. 2013.

DA ROSA, C. V. D. et al. Supplementation with L-glutamine and L'alanyl-L-glutamine changes biochemical parameters and jejunum morphophysiology in type 1 diabetic wistar rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–16, Dec. 2015.

DANESH-SANI, S. A.; SHARIATI-SARABI, Z.; FEIZ, M. R. Comprehensive Review of Hyperbaric Oxygen Therapy. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 23, n. 5, p. e483–e491, Set. 2012.

DARENKAYA, M. A.; KOLESNIKOVA, L. I.; KOLESNIKOV, S. I. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 171, n. 2, p. 179–189, May. 2021.

DATASUS. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

DE CASTRO, V. M. D. et al. S-methyl cysteine sulfoxide ameliorates duodenal morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. **Tissue and Cell**, v. 69, n. 101483, Dec.2021.

DE FREITAS MOREIRA, M. et al. Experimental model of type 2 diabetes induced by fat diet consumption and low dose of streptozotocin in C57BL/6J mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. S1, p. Dec. 2015.

DE WOLDE, S. D. et al. The Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Markers of Oxidative Stress and the Immune Response in Healthy Volunteers. **Frontiers in Physiology**, v. 13, N. 826163, p. 1-8, Jan. 2022.

DEBEVEC, T.; MILLET, G. P.; PIALOUX, V. Hypoxia-Induced Oxidative Stress Modulation with Physical Activity. **Frontiers in physiology**, v. 8, n. 84, Feb. 2017.

DEEPA, D.; JAIN, N. Applications of hyperbaric oxygen therapy in dentistry: A mini review. **Journal of Interdisciplinary Dentistry**, v. 4, n. 1, p. 27-32, Jun. 2014.

DROZDOWSKI, L.; THOMSON, A. B. R. Intestinal mucosal adaptation. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 12, n. 29, p. 4614-4627, 7 Ago. 2006.

DU, Y. T. et al. Gastrointestinal Symptoms in Diabetes: Prevalence, Assessment, Pathogenesis, and Management. **Diabetes Care**, v. 41, n. 3, p. 627–637, Mar. 2018.

DULAI, P. S. et al. Systematic review: The safety and efficacy of hyperbaric oxygen therapy for inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 39, n. 11, p. 1266–1275, Jun. 2014.

ELMARAQBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. Relationship between Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 49–59, Feb. 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Dec. 2007.

EMMANUEL BHASKAR, M. et al. Presenting features of diabetes mellitus. **Indian Journal of Community Medicine**, v. 35, n. 4, p. 523–525, Out. 2010.

FALEO, G. et al. Prevention of autoimmune diabetes and induction of β -cell proliferation in NOD mice by hyperbaric oxygen therapy. **Diabetes**, v. 61, n. 7, p. 1769–1778, Jul. 2012.

Federação Internacional de Diabetes - Home. Disponível em: <<https://www.idf.org/>>. Acesso em: 27 maio. 2019.

FERNANDO, Y. et al. Differences in serum markers of oxidative stress in well controlled and poorly controlled asthma in Sri Lankan children: a pilot study. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, n. 1, p. 66, Jul. 2020.

FERREIRA, P. M. F. et al. Intestinal and liver morphometry of the Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n.2, p. 911–922, Apri.2016.

GAO, W. et al. Glucose attenuates hypoxia-induced changes in endothelial cell growth by inhibiting HIF-1 α expression. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 11, n. 4, p. 270–280, May. 2014.

GARCIA, Y. et al. Stereological methods to assess tissue response for tissue-engineered scaffolds. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 175–186, Jan. 2007.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: Pathogenesis and prevention. **CMAJ**, v.175, n.2, p.165-170, Jul. 2006.

GUNDERSEN, H. J. G. et al. Stereological Principles and Sampling Procedures for Toxicologic Pathologists. Em: **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**, 2013. p. 215–286.

GUNTUN, J. E. Hypoxia-inducible factors and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 10, p. 5063-5073, 9 Oct. 2020.

GUVEN, A. et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 44, n. 3, p. 534–540, Mar. 2009.

HALUZÍK, M., KRATOCHVÍLOVÁ, H., HALUZÍKOVÁ, D., & MRÁZ, M. Gut as an emerging organ for the treatment of diabetes: focus on mechanism of action of bariatric and endoscopic interventions, **Journal of Endocrinology**. V. 237. N. 1). Jun. 2023.

HANSEN, C. F. et al. Novel insight into the distribution of L-cells in the rat intestinal tract. **American Journal of Translational Research**, v. 5, n. 3, p. 347–358, Apri. 2013.

HAO, X.; YUAN, J.; DONG, H. Salidroside prevents diabetes-induced cognitive impairment via regulating the Rho pathway. **Molecular medicine reports**, v. 19, n. 1, p. 678–684, Jan. 2019.

HVID, H. et al. Diabetic Phenotype in the Small Intestine of Zucker Diabetic Fatty Rats. **Digestion**, v. 94, n. 4, p. 199–214, Jan. 2017.

IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, n. 108, p. 656–662, Dec. 2018.

JOHNSTON, B. R. et al. The Mechanism of Hyperbaric Oxygen Therapy in the Treatment of Chronic Wounds and Diabetic Foot Ulcers. **Rhode Island medical journal (2013)**, v. 99, n. 2, p. 9–26, Feb. 2016.

Karamanou M, et al. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. **World J Diabetes**. V. 7, n. 1, p.1-7, Jan. 2016.

KATSAROU, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17016, Dez. 2017.

KOLIAKI C, LIATIS S, LE ROUX CW, KOKKINOS A. The role of bariatric surgery to treat diabetes: current challenges and perspectives. **BMC Endocr Disord**. v. 1. 2017.

KORAKAS E, KOUNTOURI A, RAPTIS A, KOKKINOS A, LAMBADIARI V. Bariatric Surgery and Type 1 Diabetes: Unanswered Questions. **Front Endocrinol (Lausanne)**. Sep. 2020.

KRISHNAN, B. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 3, p. 51-63, Jun. 2013.

LARISSA QUEIROZ DE LIRA; ROBERTO DIMENSTEIN. Vitamin a and gestational diabetes. **Rev Assoc Med Bras**. V. 56, n.3, p. 355-358. 2010.

LE GALL, M. et al. Intestinal plasticity in response to nutrition and gastrointestinal surgery. **Nutrition Reviews**, v. 77, n. 3, p. 129–143, Mar. 2019.

LEACH, R. M.; REES, P. J.; WILMSHURST, P. ABC of oxygen: Hyperbaric oxygen therapy. **BMJ**, v. 317, n. 7166, p. 1140–1143, Out. 1998.

LIU, Y. et al. Hyperbaric Oxygen Ameliorates Insulin Sensitivity by Increasing GLUT4 Expression in Skeletal Muscle and Stimulating UCP1 in Brown Adipose Tissue in T2DM Mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n 32, Jan. 2020.

LUCCHESI, A. N. et al. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n.7, p. 502-508. Jul. 2013.

LUO, Z. et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–30, Jul. 2022.

MACHADO, D. et al. Prevalência de Lesões de Cárie de Doentes com Diabetes Mellitus Tipo 1 Tratados com Múltiplas Administrações de Insulina e de Indivíduos sem Diabetes. **Acta Médica Portuguesa**, v. 30, n. 5, p. 402-408, 2017.

MARDIAH et al. Anti-inflammatory of Purple Roselle Extract in Diabetic Rats Induced by Streptozotocin. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 182–189, Jan. 2015.

MARTINS-PERLES, J. V. C. et al. QUERCETIN SUPPLEMENTATION PREVENTS CHANGES IN THE SEROTONIN AND CASPASE-3 IMMUNOREACTIVE CELLS OF THE JEJUNUM OF DIABETIC RATS. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 56, n. 4, p. 405–411, Nov. 2019.

MATSUNAMI, T. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. **Physiological research**, v. 59, n. 1, p. 97–104, Feb.2010.

MATSUNAMI, T. et al. Enhancement of glucose toxicity by hyperbaric oxygen exposure in diabetic rats. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 216, n. 2, p. 127–132, Out. 2008.

MATSUNAMI, T. et al. Enhancement of reactive oxygen species and induction of apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 4, n. 3, p. 255–266, Mar. 2011.

MATSUNAMI, T. et al. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. **Int J Clin Exp Pathol**, v.3, n.2, p. 177-188, Nov. 2009.

MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, Mar. 2014.

NANDI, J. et al. TNF- α modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 336, n. 1–2, p. 17–24, Mar. 2010.

NANSEL, T. R. et al. Quality of Life in Children with Type 1 Diabetes: A Comparison of General and Diabetes-Specific Measures, and Support for a Unitary Diabetes Quality of Life Construct. **Diabetic Medicine**, v. 25, n.11, p.1316-1223, Ago. 2008.

NNA, V. U. et al. Oxidative Stress, NF- κ B-Mediated Inflammation and Apoptosis in the Testes of Streptozotocin–Induced Diabetic Rats: Combined Protective Effects of Malaysian Propolis and Metformin. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 465–Out. 2019.

NODA, T. et al. Suppression of apoptosis is responsible for increased thickness of intestinal mucosa in streptozotocin-induced diabetic rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 50, n. 3, p. 259–264, Mar. 2001.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p. 1133–1143, 23 Out. 2020.

OLEY, M. H. et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on vascular endothelial growth factor protein and mRNA in crush injury patients: A randomized controlled trial study. **International Journal of Surgery Open**, v. 29, p. 33–39, Feb. 2021.

OZOUGWU; OBIMBA, K. C.; UNAKALAMBA. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, v. 4, n. 4, p. 46–57, 2013.

PASCHOU, S. A. et al. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. **Endocr Connect**, v.7, n.1, p.38-46, Jan. 2018.

PELLEGRINI, S. et al. Duodenal mucosa of patients with type 1 diabetes shows distinctive inflammatory profile and microbiota. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 5, p. 1468–1477, May, 2017.

PEÑA-VILLALOBOS, I. et al. Hyperbaric oxygen increases stem cell proliferation, angiogenesis and wound-healing ability of WJ-MSCs in diabetic mice. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 995, 2018.

PEREIRA, J. N. B. et al. Small intestine remodeling in male Goto–Kakizaki rats. **Physiological Reports**, v. 9, n. 3, Feb. 2021.

PIPER, M. S.; SAAD, R. J. **Diabetes Mellitus and the Colon Opinion Statement**. 2018.

PRABHAKAR, N. R.; SEMENZA, G. L. Oxygen Sensing and Homeostasis. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 30, n. 5, p. 340–348, Set. 2015.

PRABOWO, S. et al. Hyperbaric Oxygen Treatment in a Diabetic Rat Model Is Associated with a Decrease in Blood Glucose, Regression of Organ Damage and Improvement in Wound Healing. **Health**, v. 6, n. 15, p. 1950–1958, Ago. 2014.

PUTCHA, G. V. et al. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis lessons from the analysis of mutant mice. **Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 3, p. 441–453, Apr. 2002.

ROCCO, M. et al. Lipid peroxidation, circulating cytokine and endothelin 1 levels in healthy volunteers undergoing hyperbaric oxygenation. **Minerva Anestesiol**, v.67, n.5, p. 393-400, May. 2001.

RODRIGUES, M. L. C.; MOTTA, M. E. F. A. Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 1, p. 17–24, Jan. 2012.

ROULAND, M. et al. Gut mucosa alterations and loss of segmented filamentous bacteria in type 1 diabetes are associated with inflammation rather than hyperglycaemia. **Gut**, v. 71, n. 2, p. 296–308, Feb. 2022.

SADA, K. et al. Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 1 Jul. 2016.

SADI, G.; KONAT, D. Resveratrol regulates oxidative biomarkers and antioxidant enzymes in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 7, p. 1–8, 16 Jun. 2015.

SAEEDI, P. et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 157, Nov. 2019.

SALES-PERES, S. H. DE C. et al. Estilo de vida em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 4, p. 1197–1206, Abr. 2016.

SANCAK, E. B. et al. Attenuation of partial unilateral ureteral obstruction – induced renal damage with hyperbaric oxygen therapy in a rat model. **International braz. j. urol**, v. 43, n. 5, p. 946–956, Sep. 2017.

SANKARI, S. L. et al. Apoptosis in immune-mediated diseases. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 200-202, Apr. 2015.

SANYAL, D. Diabetes is predominantly an intestinal disease. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 7, p. 64-67, Oct. 2013.

SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 6, p. 654–662, dez. 2003.

SCHÖDEL, J.; RATCLIFFE, P. J. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. **Nature reviews. Nephrology**, v. 15, n. 10, p. 641–659, 1 Oct. 2019.

SELLAMUTHU, P. S. et al. Protective Nature of Mangiferin on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Tissues of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **ISRN Pharmacology**, v. 2013, p. 1–10, Sep. 2013.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. **The EMBO journal**, v. 36, n. 3, p. 252–259, Feb. 2017.

SHA, H. et al. Effect of Kaiyu Qingwei Jianji on the morphometry and residual strain distribution of small intestine in experimental diabetic rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 44, p. 7149–7154, Nov. 2006.

SHARIFI-RAD, M. et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n. 694, 2 Jul. 2020.

SHIHAN, M. H. et al. A simple method for quantitating confocal fluorescent images. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 25, n. 100916, Feb. 2021.

SHIRPOOR, A. et al. Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 32, p. 4340–4344, Aug. 2007.

SIEWIERA, J. et al. Effect of Hyperbaric Oxygenation on Blood Cytokines and Arginine Derivatives; No Evidence for Induction of Inflammation or Endothelial Injury. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 23, p. 4340–4344, Dec. 2021.

SILVA, F. S. et al. Exercise training ameliorates matrix metalloproteinases 2 and 9 messenger RNA expression and mitigates adverse left ventricular remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 29, p. 37–44, Jul. 2017.

SILVA, F. S. et al. Hyperbaric oxygen therapy mitigates left ventricular remodeling, upregulates MMP-2 and VEGF, and inhibits the induction of MMP-9, TGF- β 1, and TNF- α in streptozotocin-induced diabetic rat heart. **Life Sciences**, v. 295, N. 120393, 15 Abr. 2022.

SMART, E. J.; LI, X. A. Hyperglycemia: Cell death in a cave. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 5, p. 524–526, May. 2007.

SONG, L. et al. Ghrelin system is involved in improvements in glucose metabolism mediated by hyperbaric oxygen treatment in a streptozotocin-induced type 1 diabetes mouse model. **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 5, p. 3767, Nov. 2020.

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456-480, Abr. 2015.

ULUISIK, D.; KESKIN, E. The Effects of Coenzyme Q10 on Inflammation Markers in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1, Jun. 2017.

UMAR, S. Intestinal Stem Cells. **Current gastroenterology reports**, v. 12, n. 5, p. 340-348, Oct. 2010.

VIKRAM, A. et al. Editorial Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Complications. 2014.

WANG, L. et al. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 9, p. 2060-2064, Set. 2003.

WANG, Y. et al. Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes. **Autophagy**, v. 9, n. 3, p. 272–277, Marc. 2013.

WEBER, S. U. et al. Hyperbaric oxygen induces apoptosis via a mitochondrial mechanism. **Apoptosis**, v. 14, n. 1, p. 97–107, Jan. 2009.

WILKINSON, D. C.; CHAPMAN, I. M.; HEILBRONN, L. K. Hyperbaric oxygen but not hyperbaric air increases insulin sensitivity in men with type 2 diabetes mellitus. **Diving and Hyperbaric Medicine**, v. 50, n. 4, p. 386–390, Dec. 2020.

WILLIAM K. OVALLE E PATRICK C. NAHIRNEY. **Lower Digestive System - ClinicalKey**. Disponível em: <<https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323694643000134>>. Acesso em: 8 maio. 2022.

XU, Q. et al. Repetitive hyperbaric oxygen treatment increases insulin sensitivity in diabetes patients with acute intracerebral hemorrhage. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 13, p. 421–426, Feb. 2017.

XU, Y. et al. Effects and mechanism of stem cells from human exfoliated deciduous teeth combined with hyper-baric oxygen therapy in type 2 diabetic rats. **Clinics**, v. 75, p. 1–11, May. 2020.

YAN, L.-J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. **Journal of diabetes research**, v. 2014, n. 137919, Jun. 2014.

YANG, Z. et al. Hyperbaric oxygenation ameliorates indomethacin-induced enteropathy in rats by modulating TNF- α and IL-1 β production. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 8, p. 1426–1433, Aug. 2006.

ZACCARDI, F. et al. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgraduate Medical Journal**, v. 92, n. 1084, p. 63–69, Feb. 2016.

ZEITOUNI, N. E. et al. The impact of hypoxia on intestinal epithelial cell functions: consequences for invasion by bacterial pathogens. **Molecular and Cellular Pediatrics**, v. 3, n. 14, Dec. 2016.

ZHANG, Y. et al. Prevention of hyperglycemia-induced myocardial apoptosis by gene silencing of Toll-like receptor-4. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–8, Dec. 2010.

ZHAO J, LIAO D, YANG J, GREGERSEN H. Viscoelastic behavior of small intestine in streptozotocin-induced diabetic rats. **Dig Dis Sci**. v. 48. n 12. p. 2271-2277. Dec. 2003.

ZHAO, J. B. et al. Upper gastrointestinal sensory-motor dysfunction in diabetes mellitus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 19, p. 2846–2857, May. 2006.

ARTIGO 1

Artigo científico submetido a revista **Tissue & Cell**. Fator de Impacto 2,6 e Qualis Capes A4.

A oxigenoterapia hiperbárica previne a atrofia submucosa, preserva o espaço luminal e regula positivamente a autorrenovação dos enterócitos no duodeno de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Valéria Milena Dantas de Castro¹, Naisandra Bezerra da Silva Farias², Marcus Vinícius de Moraes³, Flávio Santos da Silva⁴, Adriana Augusto de Rezende⁵, Raimundo Fernandes de Araújo Júnior², Bento João Abreu^{2*}, Joaquim Evêncio Neto¹.

Afiliações

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

³ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

⁴ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, Brasil.

⁵ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

* Autor correspondente para: Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av Salgado Filho, Campus Universitário, 59072-970. Natal, Brasil. Telefone: +55 84 998416124. E-mail: abreubj@gmail.com

RESUMO

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) tem sido amplamente utilizada para diversas doenças, incluindo complicações associadas ao diabetes mellitus (DM). O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da OHB nas alterações morfológicas duodenais causadas pelo DM. Neste trabalho, 33 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, foram distribuídos nos seguintes grupos: controle (C, n = 8), controle + OHB (C+OHB, n = 7), diabético (D, n = 10) e diabético + OHB (D+HBO, n = 8). O DM foi induzido por injeção de estreptozotocina (60 mg/kg, i.p.). O tratamento OHB foi realizado em sessões diárias de 60 minutos com pressão de 2,5 ATA durante 5 semanas. A morfologia foi avaliada por estereologia quantificando volume de referência da parede, lúmen, volume total, densidade de volume da mucosa, submucosa e camadas musculares e respectivo volume absoluto. As análises morfométricas foram altura e comprimento das vilosidades, profundidade das criptas e área de absorção da mucosa. A apoptose celular foi avaliada por imunohistoquímica com caspase-3. O DM levou a um aumento no volume da mucosa e na área de absorção duodenal associada à redução da apoptose. O DM também causou atrofia submucosa. A OHB reverteu a redução da submucosa e preservou a renovação celular. Em resumo, o tratamento com OHB preveniu a atrofia submucosa e manteve a renovação dos enterócitos via caspase-3 na mucosa duodenal.

Palavras-chave: Oxigenoterapia Hiperbárica; Diabetes Mellitus; Intestino delgado; Morfometria.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados por níveis elevados de açúcar no sangue. Sua causa é heterogênea e pode incluir defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos. O DM leva a problemas no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Adler et al., 2021), afetando o bem-estar dos indivíduos, das famílias e da sociedade em todo o mundo. Estima-se que a prevalência global da diabetes atingirá 578 milhões até 2030 e poderá atingir 700 milhões até 2045 (Saeedi et al., 2019).

A longo prazo, o DM pode levar a complicações em diferentes sistemas orgânicos, incluindo o trato gastrointestinal. Estudos realizados com modelos animais e pacientes diabéticos demonstraram alterações na mucosa intestinal, submucosa e camadas musculares (Da Rosa et al., 2015; Pereira et al., 2021;). Por exemplo, a remodelação estrutural do intestino delgado no DM compreende proliferação celular, alongamento de vilosidades e espessamento de camadas, afetando principalmente a mucosa duodenal (Hvid et al., 2016; De Castro et al., 2021).

O intestino delgado tem capacidade própria de adaptar sua morfologia e função em resposta a estímulos internos ou externos. No DM, tais alterações podem piorar o quadro hiperglicêmico devido ao aumento da absorção de nutrientes (Drozdowski e Thomson, 2006). Existem suposições de que o intestino delgado esteja envolvido na patogênese do DM I (Pellegrini et al., 2017) e tipo II (Hvid et al., 2016).

A forma como a hiperglicemia estimula o desenvolvimento dessas alterações não é bem compreendida. Fatores como estresse oxidativo, alterações hormonais,

vasculares e lumbais têm sido mencionados como possíveis causas da remodelação do tecido intestinal (Bhor et al., 2004; Mayhew e Carson, 1989).

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) é uma ferramenta terapêutica eficaz no tratamento de diversas doenças, infecções e lesões teciduais (Peña-Villalobos et al., 2018). A OHB consiste na inalação de oxigênio 100% em uma câmara com pressão 1,5 a 3 vezes acima da pressão atmosférica normal. Sabe-se que o aumento da concentração plasmática de oxigênio ajuda a hemoglobina a atingir sua capacidade máxima de transporte de oxigênio (Choudhury, 2018).

Foi demonstrado que a OHB estimula a proliferação e impede a apoptose de células β , bem como reduz o infiltrado de células imunes das ilhotas pancreáticas (Faleo et al., 2012; Song et al., 2020). Nas lesões de isquemia/reperfusão intestinal, o efeito da OHB na mucosa depende do momento de sua aplicação. Quando administrado antes ou durante a isquemia, reduz a apoptose, enquanto na reperfusão, a OHB aumenta a apoptose das células intestinais (Zhou et al., 2012).

Estudos demonstraram implicações da OHB na morfologia intestinal em animais com doenças inflamatórias intestinais (Bertoletto et al., 2007; Dulai et al., 2014; Guven et al., 2009; Yang et al., 2006). Contudo, não existem estudos que investiguem os efeitos desta terapia na morfologia intestinal em condições hiperglicêmicas. Portanto, levantamos a hipótese de que a OHB possa promover efeitos positivos no remodelamento intestinal causado pelo DM. A partir disso, o objetivo desta pesquisa é avaliar os impactos da OHB na morfologia duodenal de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e grupos experimentais

Trinta e três ratos Wistar machos, com 60 dias de idade e pesando entre 220 e 270 g foram utilizados para este estudo. Os animais foram cedidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, com aprovação prévia do estudo pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (certificado número 125.054/2018). Os ratos foram alojados em caixas de polipropileno mantidas sob condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) com comida e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: controle não tratado (C, n=8, tratado com OHB (OHB, n=7), diabético não tratado (D, n=10) e diabético tratado com OHB (D+OHB, n) = 8). Parâmetros clínicos como glicemia, ingestão hídrica e alimentar foram medidos durante todo o período experimental.

2.2 Indução química do DM1

A indução do DM1 foi realizada com uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 60 mg/kg) dissolvida em tampão citrato 0,1 M, pH 4,5, a 4 °C. Uma semana após a indução do diabetes, a glicemia de jejum de todos os animais foi verificada por meio de glicosímetro digital (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, São Paulo, Brasil). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram níveis de glicemia ≥ 250 mg/dL (Silva et al., 2022).

2.3 Regime OHB e eutanásia

A intervenção com OHB foi iniciada uma semana após a indução do DM e realizada em câmara hiperbárica (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda/SP) por 60

min/dia, cinco dias/semana, durante cinco semanas, seguindo protocolo previamente descrito por (Al-Waili et al., 2006; Xu et al., 2017). Em cada sessão, quatro ratos foram colocados dentro da câmara ao mesmo tempo, e foi utilizada uma pressão absoluta de 2,5 atmosferas (ATA). A compressão e a descompressão foram realizadas a uma taxa de 1 ATA/min. Após cinco semanas de tratamento com OHB, os animais foram submetidos a jejum noturno e anestesiados com isoflurano (2–3%). Em seguida, foi coletado sangue (3–5 mL) da veia cava inferior para determinação da glicemia final. A eutanásia foi realizada por exsanguinação cardíaca.

2.4 Histologia

Os segmentos duodenais foram isolados, lavados com soro fisiológico para remoção de resíduos alimentares e fixados com paraformaldeído a 4%. Vinte e quatro horas depois, os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70% a 100%), clarificados em xileno, embebidos em parafina, seccionados em 4 µm e finalmente corados com hematoxilina e eosina (HE).

2.5 Estereologia

Os cortes duodenais com 4 µm de espessura foram obtidos pela técnica Amostragem Sistemática Aleatória Uniforme, seguindo o princípio da análise estereológica (Brown, 2017). A aquisição das imagens foi realizada utilizando um microscópio de luz binocular OLYMPUS CX21 (OLYMPUS, Center Valley, EUA) com câmera acoplada e o software LEICA LAS EZ. As lentes objetivas utilizadas foram de ampliação de 20x e 40x.

A menor ampliação foi utilizada para estimar o volume de referência (V_{ref}) da parede e do lúmen duodenal de acordo com o princípio de Cavalieri. Um sistema de

teste quadrático com uma área conhecida associada a cada ponto foi sobreposto às microfotografias para contagem de pontos que tocassem áreas de interesse (Marcos et al., 2012). A partir disso, o Vref da parede e do lúmen duodenal foi obtido através da seguinte fórmula:

$$V_{ref} = \Sigma p \times (a/p) \times t \times f^{-1}_1 \times f^{-1}_2$$

Onde Σp é a soma dos pontos que tocam a região de interesse (parede ou lúmen), a/p é a área por ponto do sistema quadrado de teste, t é a espessura da microsecção do tecido, f^{-1}_1 é o inverso da fração utilizada para amostragem do órgão no corte seriado, e f^{-1}_2 é o inverso da fração aplicada na microtomia (Gundersen et al., 2013). A maior ampliação foi utilizada para estimar a densidade de volume (V_v) da mucosa, submucosa e camadas musculares do duodeno em quatro lâminas histológicas, de acordo com o princípio de Delesse (Garcia et al., 2007), como segue:

$$V_v = \frac{\Sigma p_{layer}}{\Sigma p_{wall}}$$

O símbolo Σp representa a soma dos pontos que tocam a região de interesse (camada individual ou parede) (Mandarin-de-Lacerda, 2003). Esta fração foi utilizada para estimar a proporção que cada camada ocupa em relação ao total que é a parede. O volume absoluto de cada camada foi obtido multiplicando-se o V_v da camada pelo V_{ref} da parede duodenal.

2.6 Morfometria

Foram tiradas quatro microfotografias de cada corte histológico por animal com ampliação de 400x. A avaliação microscópica foi realizada com auxílio do software ImageJ (v.1.54d National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Foram realizadas dez medidas de altura e largura das vilosidades intestinais por animal. Após a

obtenção dessas medidas, a área superficial de absorção foi quantificada utilizando a seguinte fórmula: área de absorção = $(LV \times AV) / (LV/2)^2$, onde LV representa a largura das vilosidades e AV representa a altura das vilosidades (adaptado de Ferreira et al., 2016). Além disso, também foi medida a profundidade das criptas intestinais.

2.7 Imunohistoquímica

Com base em dados prévios sobre hiperplasia da mucosa intestinal em animais diabéticos, a técnica imuno-histoquímica foi empregada neste estudo para avaliar o processo de apoptose no duodeno entre os grupos experimentais. Amostras embebidas em parafina foram cortadas em 4 μ m e colocadas em lâminas rotuladas. As secções foram incubadas com anticorpo primário anti-caspase-3 (adquirido à Invitrogen™ (Carlsbad, CA, EUA), para demonstrar a apoptose celular numa diluição de 1:400. As fatias foram lavadas com PBS e incubadas com um anticorpo secundário conjugado com estreptavidina/HRP (Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 30 min. A imunorreatividade foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; DAKO-Agilent Technologies, Santa Clara, EUA; Cat. # GV825) e contrastada com hematoxilina (H).

Cinco campos aleatórios foram fotografados com ampliação de 400x para cada animal. Em cada imagem, a expressão da caspase-3 foi obtida pela razão entre as áreas dos corantes DAB e hematoxilina, que foram medidas após a separação utilizando o plug-in Color Deconvolution do ImageJ conforme método previamente descrito por Bartis et al., 2016.

2.8 Análise estatística

Utilizando o software GraphPad Prism, todas as variáveis medidas foram submetidas ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Foram realizados testes de hipóteses ANOVA unidirecional, seguidos de pós-testes de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de p foi $\leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Glicemia, peso corporal, consumo de água e alimentos

Características típicas do modelo experimental, como hiperglicemia, perda de peso e aumento da ingestão alimentar, foram observadas após a indução do diabetes com STZ até o final do experimento, conforme mostrado na Tabela 1. O tratamento com OHB não teve efeitos significativos na glicemia. A OHB causou perda de peso corporal e diminuição do consumo de água no grupo C+OHB versus grupo C. O aumento na ingestão alimentar causado pelo DM, entretanto, foi atenuado pela OHB.

Tabela 1. Características clínicas dos ratos segundo grupo experimental.

| | C | C+OHB | D | D+OHB |
|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| Glicose sanguínea (dL/mg) | 165.9 \pm 14.6 | 120.6 \pm 6.9 | 614.3 \pm 9.5*# | 653.6 \pm 30.0*# |
| Peso corporal (g) | 340.0 \pm 12.2 | 296.8 \pm 7.0* | 192.5 \pm 8.5** | 195.8 \pm 10.9*# |
| Consumo de água (ml) | 221.3 \pm 3.0 | 188.0 \pm 13* | 230.5 \pm 5.6# | 220 \pm 5.6 |
| Consumo de ração (g) | 22.8 \pm 0.2 | 21.9 \pm 1.1 | 47.5 \pm 1.1*# | 40.1 \pm 1.2*#† |

Dados expressos como média \pm SEM. *Diferença significativa vs grupo controle, # vs grupo C+OHB

3.2 Estereologia

Secções histológicas representativas do duodeno são mostradas na Figura 1A. O Vref da parede, lúmen e a relação Vref parede/lúmen são visualizados nas Figuras 1B, C e D, respectivamente. No geral, houve um aumento significativo no Vref da parede intestinal nos grupos C + OHB, D e D + OHB em comparação com o

grupo C. Enquanto isso, o Vref do lúmen diminuiu significativamente no grupo D em comparação com os grupos tratados com OHB (Figura 1C). Na relação Vref parede/lúmen, o tratamento com OHB reverteu significativamente a alteração causada pelo DM (Figura 1D).

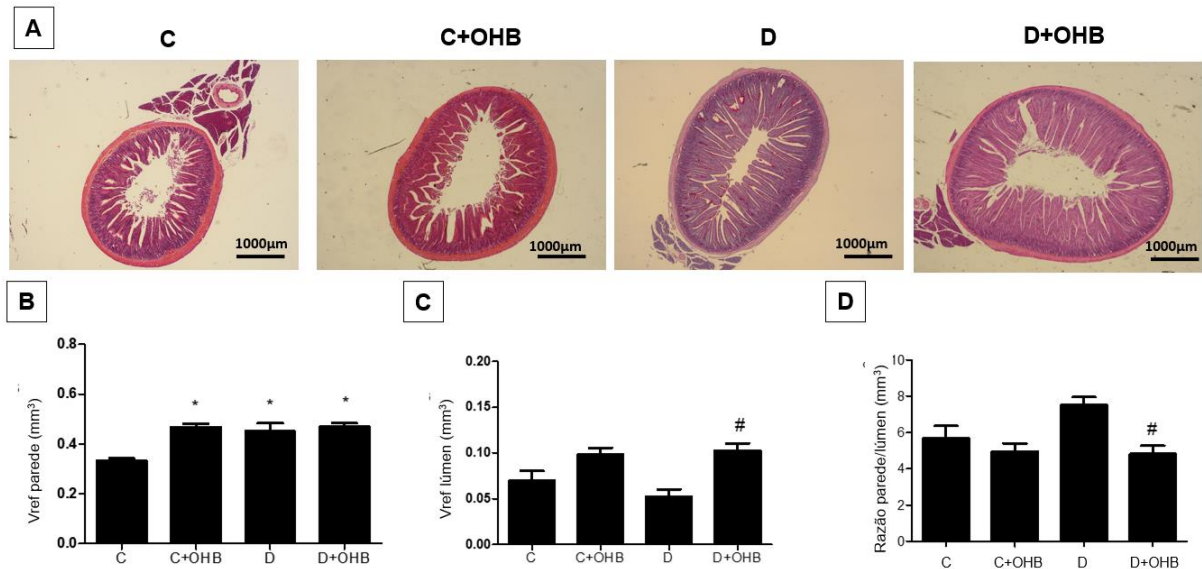


Figura 1. Volume de referência (Vref) segundo princípio de Cavalieri. Grupo controle (C), grupo controle tratado com oxigênio hiperbárico (C+OHB), grupo diabético (D), grupo diabético tratado com oxigênio hiperbárico (D+OHB). Seções transversais do duodeno coradas com HE com ampliação de 20x e escala de barra de 1000 μm (A). Parede Vref P = 0,0156 (B), lúmen Vref P = 0,0007 (C) e razão parede/lúmen P < 0,0036 (D). *Diferença significativa vs grupo C; # versus D.

Com base nos resultados do Vref da parede, foi avaliado o Vv das camadas individuais (mucosa, submucosa e muscular) (Tabela 2). A mucosa duodenal dos animais diabéticos apresentou aumento significativo da Vv em comparação aos grupos C e C+OHB. Em contrapartida, a submucosa apresentou tendência a diminuir nos grupos diabéticos, e a camada muscular foi significativamente menor (Tabela 2).

Tabela 2. Vv das camadas do duodeno segundo os grupos experimentais.

| | C | C+OHB | D | D+OHB |
|------------------|-----------|--------------|------------|--------------|
| Mucosa Vv (%) | 74.38±1.1 | 75.77±1.0 | 83.0±0.4*# | 82.29±0.8# |
| Submucosa Vv (%) | 9.24±1.1 | 7.66±0.3 | 7.0±0.2 | 6.71%±0.4 |
| Muscular Vv (%) | 16.38±0.6 | 16.57±0.8 | 10.0±0.4*# | 11.29±0.6* |
| Total (%) | 100 | 100 | 100 | 100 |

Dados expressos como média ± SEM. *Diferença significativa versus grupo controle, # versus grupo C+OHB.

A partir do Vref da parede e do Vv das camadas duodenais, foi calculado o volume absoluto de cada camada, conforme Figura 2. A mucosa apresentou aumento significativo do volume absoluto nos grupos C+OHB, D e D+OHB (Figura 2A). Houve redução significativa da submucosa no grupo D em comparação aos demais grupos C, C+OHB e D+OHB. Em relação à camada muscular, o grupo C+OHB teve aumento significativo em relação aos grupos C, D e D+OHB (Figura 2 C).

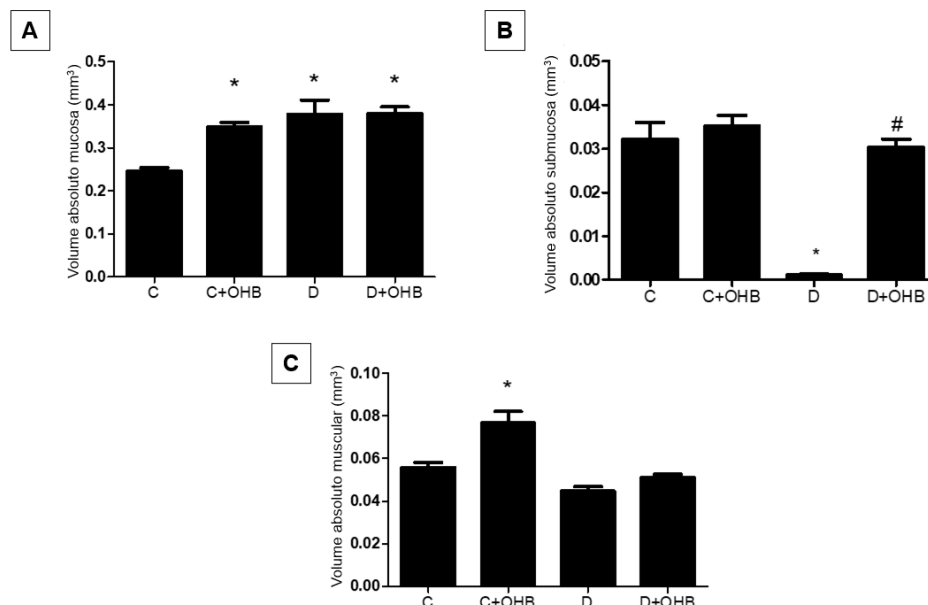


Figura 2. Volume duodenal absoluto. Grupo controle (C), grupo controle tratado com oxigênio hiperbárico (C+OHB), grupo diabético (D), grupo diabético tratado com oxigênio hiperbárico (D+OHB). Mucosa (A), Submucosa (B) e camada muscular (C). $P < 0,0001$. *Diferença significativa vs grupo C, # vs grupo D.

3.3 Morfometria

Como o aumento do volume da parede duodenal nos animais diabéticos foi devido ao aumento da mucosa, avaliamos a morfometria das criptas e vilosidades que compõem esta camada (Tabela 3). A altura das vilosidades foi significativamente maior nos grupos D e D+OHB em comparação aos grupos C e C+OHB. Por outro lado, a largura das vilosidades foi significativamente menor nos grupos C+OHB, D e D+OHB em relação ao grupo C. A profundidade das criptas apresentou tendência de aumento nos grupos D e D+OHB versus grupo C, no entanto, não foi estatisticamente significativo. O grupo tratado com D+OHB apresentou discreta atenuação das alterações na altura das vilosidades e profundidade das criptas em comparação ao grupo D (Tabela 3).

Tabela 3. Dados morfométricos do duodeno segundo cada grupo experimental.

| | C | C+OHB | D | D+OHB |
|--|------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| Altura de vilo (μm) | 264.6 \pm 11.5 | 247.9 \pm 17.2 | 375.5 \pm 13.0*# | 366.6 \pm 17.6* |
| Largura de vilo (μm) | 65.38 \pm 1.6 | 52.64 \pm 0.7* | 53.03 \pm 3.0* | 54.25 \pm 2.6* |
| Profundidade de cripta (μm) | 88.48 \pm 6.0 | 85.09 \pm 7.2 | 108.9 \pm 4.2# | 102.9 \pm 5.9 |

Dados expressos como média \pm SEM. *Diferença significativa vs grupo C, # vs grupo C+OHB.

A partir das medidas das vilosidades foi calculada a área de absorção do duodeno (Figura 3). Os grupos D e D+OHB apresentaram aumento significativo na área de absorção em comparação aos grupos C e C+OHB.

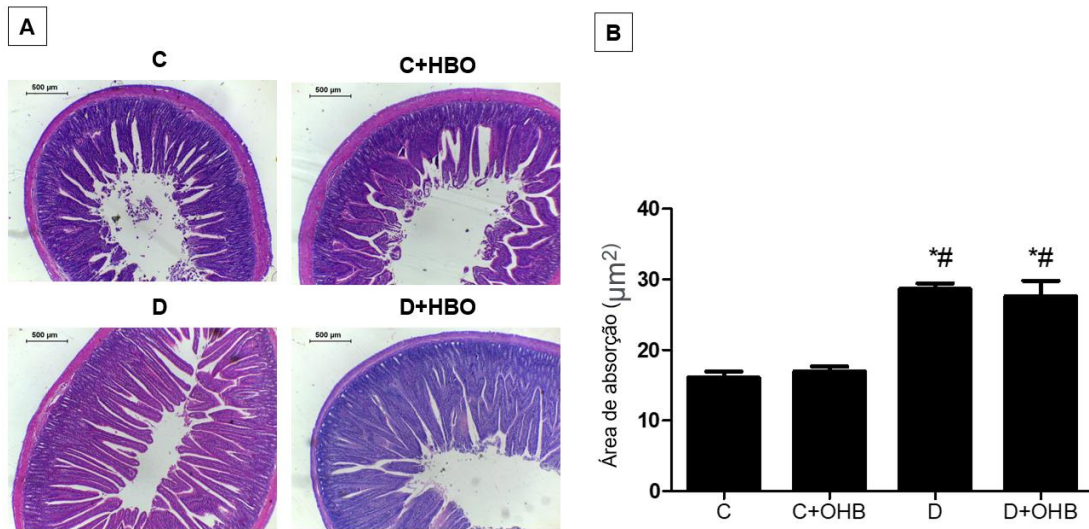


Figura 3. Área de absorção. Grupo controle (C), grupo controle tratado com oxigênio hiperbárico (C+OHB), grupo diabético (D), grupo diabético tratado com oxigênio hiperbárico (D+OHB). Secções transversais do duodeno coradas com HE com ampliação de 40x, barra de escala de 500 µm (A). Gráfico representativo da quantificação da área de absorção (B). *Diferença significativa vs grupo C, # vs grupo C+OHB. $P < 0,0001$.

3.4 Imunohistoquímica

Os resultados da imunomarcção para caspase-3, proteína envolvida na apoptose celular, são mostrados na Figura 4. Os grupos C+OHB e D+OHB foram estatisticamente semelhantes ao grupo C. O grupo D apresentou redução significativa na expressão dessa proteína em comparação aos grupos C e C+OHB.

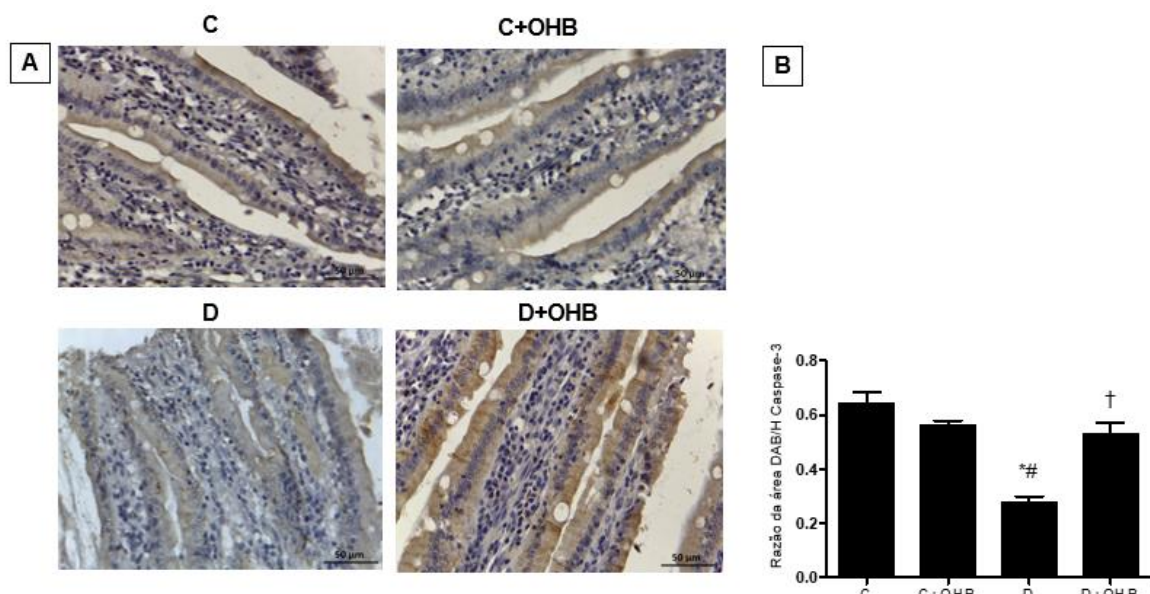


Figura 4. Imunohistoquímica de caspase-3 em mucosa duodenal. Cortes transversais contrastados com hematoxilina (H) mostrando imunorreatividade na coloração amarela a marrom (A). Gráfico representando a quantificação de caspase-3 no tecido. Ampliação 400x, escala de barra de 50 µm. *Diferença significativa vs grupo C, # vs grupo C+OHB, † vs grupo D. $P = 0,0003$.

4. DISCUSSÃO

Os efeitos da OHB no trato intestinal foram até agora descritos em relação a algumas condições inflamatórias, como doença de Crohn, colite ulcerativa (Dulai et al., 2014), enterocolite (Güven et al., 2009), jejunoileíte (Nandi et al., 2009), jejunoileíte (Nandi et al., 2009). ., 2010), isquemia (Bertoletto et al., 2007), disfunção intestinal crônica após radioterapia e microbioma intestinal (Albenberg et al., 2014). Entretanto, não foram encontrados estudos que apontem seus efeitos na morfologia intestinal no DM.

A OHB atenuou a polifagia no grupo D+OHB versus grupo D. Em contrapartida, nos demais parâmetros de peso, ingestão hídrica e níveis de glicemia, não houve efeito positivo. Esses dados estão de acordo com os resultados dos ensaios realizados por (Matsunami et al., 2009, 2011) onde a glicemia é intensificada pelo tratamento com OHB no grupo D+OHB. Da mesma forma, não houve impedimento à perda de peso, comum neste modelo em animais tratados com OHB.

Em outro estudo com ratos Sprague Dawley com DM II induzido pela combinação de dieta hiperlipídica e STZ, a exposição a 28 sessões de OHB com protocolo semelhante ao utilizado em nosso estudo não foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose. Além disso, não promoveu efeitos significativos na apoptose e proliferação celular em ilhotas pancreáticas após 6 semanas de tratamento em comparação com animais diabéticos não tratados (Xu et al., 2020).

Em contraste, camundongos com DM tipo II alimentados com alto teor de gordura e expostos à OHB por uma semana mostraram melhora na sensibilidade à insulina e redução da glicemia. Este resultado foi atribuído ao aumento da expressão

dos transportadores Glut-4 no músculo esquelético (Liu et al., 2020). Outro estudo realizado em pacientes obesos com ou sem DM tipo II expostos à OHB mostrou aumento da sensibilidade à insulina, bem como redução de marcadores inflamatórios como o TNF- α e aumento da IL-6, uma citocina antiinflamatória. Esses efeitos foram mantidos por pelo menos 30 minutos após a saída da câmara hiperbárica (Wilkinson et al., 2020).

Já era esperado que a parede duodenal apresentasse espessamento nos animais diabéticos, o que consequentemente contribuiu para um aumento significativo do volume total de referência (De Castro et al., 2021). No entanto, nossos resultados sugerem que a hiperoxigenação tecidual também causa hipertrofia da parede nos grupos C+OHB e D+OHB, mesmo com os níveis de apoptose permanecendo normais, como mostrado pela marcação com caspase-3. Em relação à luz, o grupo D apresentou restrição luminal enquanto os demais grupos tiveram esse espaço preservado. A exposição à OHB preservou o espaço luminal conforme observado no Vref e confirmado pela relação parede/lúmen.

O aumento do volume da parede intestinal proporciona maior área para absorção de nutrientes em animais diabéticos. Essa plasticidade tecidual tem sido relacionada à hiperfagia comum neste modelo experimental (Le Gall et al., 2019). O DM regula positivamente a taxa de mitose dos enterócitos na mucosa duodenal, como ocorre no jejuno e íleo de ratos diabéticos (Dorfman et al., 2015).

Por outro lado, com a camada submucosa ocorre uma diminuição do seu volume (Da rosa., et al 2015; De Castro et al., 2021). A submucosa é composta por tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos que promove nutrição e oxigenação do tecido epitelial avascular da mucosa. A remodelação que aqui ocorre prejudica a

perfusão da mucosa e da própria submucosa. O tratamento com OHB melhorou significativamente a alteração no volume submucoso absoluto.

A mucosa intestinal, ao contrário das outras camadas, sofre constante perda e regeneração celular (William K. Ovalle e Patrick C. Nahirney., 2022). Este processo envolve a proliferação contínua de células epiteliais na base da cripta com migração em direção às vilosidades (Umar, 2010). A OHB pode estimular a proliferação celular fornecendo oxigênio e pode contribuir para o aumento da morte celular através do estresse oxidativo, liberando espécies reativas de oxigênio (Peña-Villalobos et al., 2018; Weber et al., 2009). Esses achados estão de acordo com o remodelamento da mucosa duodenal encontrado no grupo C+OHB, que, mesmo com níveis normais de caspase-3, permaneceu espesso.

O Grupo D teve redução significativa na expressão da caspase-3, o que contribuiu para o aumento da mucosa. Os grupos C+OHB e D+OHB apresentaram taxas normais de apoptose, mas continuaram com mucosa espessa, mostrando que o tratamento com OHB pode estimular tanto a proliferação celular quanto a apoptose. Neste caso, a proliferação foi superior à apoptose.

Ao avaliar a mucosa duodenal, submucosa e músculo, observou-se uma reorganização na densidade de volume dessas camadas. Nos grupos diabéticos a proporção de mucosa aumentou significativamente. Essa alteração ocorreu devido ao aumento da altura das vilosidades e criptas, o que conseqüentemente contribuiu para o aumento da área de absorção nesses grupos.

A hiperoxigenação mostrou-se benéfica na preservação do volume absoluto da submucosa em animais diabéticos tratados com OHB. Enquanto na camada muscular o tratamento teve efeito significativo apenas no grupo controle tratado com OHB.

A apoptose das células epiteliais intestinais é necessária para a homeostase da mucosa deste órgão. Em estudo anterior com ratos diabéticos induzidos por STZ (NODA et al., 2001), foi evidenciado aumento da mucosa intestinal e a apoptose diminuiu uma semana após a indução do DM, mas retornou ao estado controle após três semanas. Os autores propuseram que esta redução da apoptose na fase inicial pode ser parcialmente responsável pelo aumento da altura da mucosa intestinal, mas que outros fatores de crescimento induzidos pela hiperfagia também podem estar envolvidos. Em nossos resultados, a redução da apoptose em animais diabéticos persistiu até o final do experimento, conforme também relatado em nosso estudo anterior (De Castro et al., 2021).

No pâncreas de ratos diabéticos induzidos por STZ tratados com OHB durante uma semana, não houve efeito na atividade da caspase-3 e na expressão de mRNA (Matsunami et al., 2011). No entanto, houve uma regulação negativa de Bcl-2, um fator antiapoptótico, em contraste com a regulação positiva dos níveis de mRNA do fator apoptótico Bax no grupo DM + OHB. Este estudo também observou aumento do estresse oxidativo devido à exposição à OHB, sugerindo assim que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) causada pela exposição à OHB pode promover aumento da apoptose por via alternativa, considerando que não houve efeito sobre caspase- 3 (Matsunami et al., 2011).

Em um estudo anterior, camundongos foram divididos em grupos controle e OHB para avaliar a resposta das células-tronco intestinais (Peña-Villalobos et al., 2018). Para apoptose, a Caspase-3 foi marcada e para a proliferação celular, a BrdU foi marcada. Na análise histológica foram escolhidas 36 criptas do primeiro terço do intestino de cada animal para contagem de células positivas. Neste estudo, nenhum efeito significativo foi encontrado na dinâmica da proliferação celular e apoptose. O

que foi observado foi diferença na distribuição das células marcadas com BrDU, o grupo Controle apresentou mais criptas com menos células positivas enquanto o grupo OHB apresentou menos criptas e maior número de células positivas. Esse resultado foi atribuído à possibilidade do tratamento com OHB fazer com que as células proliferassem de forma mais organizada.

5. CONCLUSÃO

O DM levou ao espessamento da parede duodenal devido à proliferação da mucosa associada ao aumento da área absorptiva e à atrofia submucosa. Embora a própria OHB também promova espessamento da parede, preveniu a atrofia submucosa causada pelo DM e preservou melhor o espaço luminal. Além disso, a remodelação duodenal induzida pela OHB envolveu hipertrofia da camada muscular em animais saudáveis. O DM pareceu atenuar a apoptose mediada por caspase-3, enquanto o duodeno diabético tratado com OHB apresentou expressão normal de caspase-3, sugerindo manutenção da renovação dos enterócitos.

Apoio financeiro

Esta pesquisa contou com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

Declaração de conflito de interesse

Nenhum.

Agradecimentos

Os autores agradecem às técnicas de laboratório Helaine Cristiane Silva e Maria Sara Maia de Queiroz do Departamento de Morfologia da UFRN pelo auxílio nos procedimentos histológicos.

REFERÊNCIAS

- Adler, A., Bennett, P., Colagiuri Chair, S., Gregg, E., Venkat Narayan, K., Inês Schmidt, M., Sobngwi, E., Tajima, N., Tandon, N., Unwin, N., Wild, S., Yudkin, J., Levitt, N., Mohan, V., Montgomery, S., Nyirenda, M.J., Tuomilehto, J., Den Boon, S., Hocking, S., 2021. Reprint of classification of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 108972. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2021.108972>.
- Albenberg, L., Esipova, T. V., Judge, C.P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., Grunberg, S., Baldassano, R.N., Lewis, J.D., Li, H., Thom, S.R., Bushman, F.D., Vinogradov, S.A., Wu, G.D., 2014. Correlation Between Intraluminal Oxygen Gradient and Radial Partitioning of Intestinal Microbiota in Humans and Mice. *Gastroenterology*. 147, 1055-1063. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.07.020>.
- Al-Waili, N.S., Butler, G.J., Beale, J., Abdullah, M.S., Finkelstein, M., Merrow, M., Rivera, R., Petrillo, R., Carrey, Z., Lee, B., Allen, M., 2006. Influences of Hyperbaric Oxygen on Blood Pressure, Heart Rate and Blood Glucose Levels in Patients with Diabetes Mellitus and Hypertension. *Arch Med Res*. 37, 991–997. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2006.05.009>.
- Bartis, D., Crowley, L.E., D'souza, V.K., Borthwick, L., Fisher, A.J., Croft, A.P., Pongrácz, J.E., Thompson, R., Langman, G., Buckley, C.D., Thickett, D.R., 2016. Role of CD248 as a potential severity marker in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*. 16, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0211-7>.
- Bertoletto, P.R., Fagundes, D.J., Simões, M.D.J., Oshima, C.T.F., Montero, E.F.D.S., Simões, R.S., Fagundes, A.T.N., 2007. Effects of hyperbaric oxygen therapy on the rat intestinal mucosa apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery* 27, 224–227. <https://doi.org/10.1002/micr.20349>.
- Bhor, V.M., Raghuram, N., Sivakami, S., 2004. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36, 89–97. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00142-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00142-0).
- Brown, D.L., 2017. Practical Stereology Applications for the Pathologist. *Vet Pathol*. 54, 358–368. <https://doi.org/10.1177/0300985817695781>
- Choudhury, R., 2018. Hypoxia and hyperbaric oxygen therapy: A review. *Int J Gen Med*. 11, 431-442. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S172460>.

- Da Rosa, C.V.D., Azevedo, S.C.S.F., Bazotte, R.B., Peralta, R.M., Buttow, N.C., Pedrosa, M.M.D., De Godoi, V.A.F., Natali, M.R.M., 2015. Supplementation with L-glutamine and lalanyl- I-glutamine changes biochemical parameters and jejunum morphophysiology in type 1 diabetic wistar rats. *PLoS One*. 10, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143005>.
- De Castro, V.M.D., de Paula Medeiros, K.C., de Lemos, L.I.C., Pedrosa, L. de F.C., Ladd, F.V.L., de Carvalho, T.G., de Araújo Júnior, R.F., Abreu, B.J., da Silva Farias, N.B., 2021. S-methyl cysteine sulfoxide ameliorates duodenal morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tissue Cell*. 69, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101483>.
- Drozdowski, L., Thomson, A.B.R., 2006. Intestinal mucosal adaptation. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 12, 4614-4727. <https://doi.org/10.3748/WJG.V12.I29.4614>.
- Dorfman T., Pollak Y., Sohotnik R., Coran AG., Bejar J., Sukhotnik I. 2015. Enhanced intestinal epithelial cell proliferation in diabetic rats correlates with β -catenin accumulation. *J Endocrinol*. 226,135-143. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0725>.
- Dulai, P.S., Gleeson, M.W., Taylor, D., Holubar, S.D., Buckey, J.C., Siegel, C.A., 2014. Systematic review: The safety and efficacy of hyperbaric oxygen therapy for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 39, 1266–1275. <https://doi.org/10.1111/APT.12753>.
- Faleo G, Fotino C, Bocca N, Molano RD, Zahr-Akrawi E, Molina J, et al. 2012. Prevention of Autoimmune Diabetes and Induction of β -Cell Proliferation in NOD Mice by Hyperbaric Oxygen Therapy. *Diabetes*. 61, 1769–1778. <https://doi.org/10.2337/db11-0516>.
- Ferreira, P.M.F., Sirlene, S.R., Oliveira, J.M., Cardoso, A.J.S., Zuanon, J.A.S., 2016. Intestinal and liver morphometry of the Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. *An Acad Bras Cienc*. 88, 911–922. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150202>.
- Garcia, Y., Breen, A., Burugapalli, K., Dockery, P., Pandit, A., 2007. Stereological methods to assess tissue response for tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials*. 28, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.037>
- Gundersen, H.J.G., Mirabile, R., Brown, D., Boyce, R.W., 2013. Stereological Principles and Sampling Procedures for Toxicologic Pathologists, in: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Elsevier. 215–286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00008-X>.
- Guven, A., Gundogdu, G., Uysal, B., Cermik, H., Kul, M., Demirbag, S., Ozturk, H., Oter, S., 2009. Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg*. 44, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2008.06.008>.
- Hvid, H., Jensen, S.R., Witgen, B.M., Fledelius, C., Damgaard, J., Pyke, C., Rasmussen, T.B., 2016. Diabetic Phenotype in the Small Intestine of Zucker Diabetic Fatty Rats. *Digestion*. 94, 199–214. <https://doi.org/10.1159/000453107>.

- Le Gall, M., Thenet, S., Aguanno, D., Jarry, A. C., Genser, L., Ribeiro-Parenti, L., Joly, F., Ledoux, S., Bado, A., & Le Beyec, J. (2019). Intestinal plasticity in response to nutrition and gastrointestinal surgery. *Nutrition Reviews*. 77, 129–143. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUY064>.
- Liu, Y., Zhang, D., Yuan, J., Song, L., Zhang, C., Lin, Q., Li, M., Sheng, Z., Ma, Z., Lv, F., Gao, G., Dong, J., 2020. Hyperbaric Oxygen Ameliorates Insulin Sensitivity by Increasing GLUT4 Expression in Skeletal Muscle and Stimulating UCP1 in Brown Adipose Tissue in T2DM Mice. *Front Endocrinol*. 11, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00032>.
- Mandarim-De-Lacerda, C. A. (2003). Stereological tools in biomedical research. 75, 469–486. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000400006>.
- Marcos, R., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., 2012. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *J. Anat*. 220, 303–317. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01475.x>.
- Matsunami, T., Sato, Y., Hasegawa, Y., Ariga, S., Kashimura, H., Sato, T., Yukawa, M., 2011. Enhancement of reactive oxygen species and induction of apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol*. 4, 255–266.
- Matsunami, T., Sato, Y., Morishima, T., Mano, Y., Yukawa, M., 2008. Enhancement of glucose toxicity by hyperbaric oxygen exposure in diabetic rats. *Tohoku J Exp Med*. 216, 127–132. <https://doi.org/10.1620/tjem.216.127>.
- Matsunami, T., Sato, Y., Sato, T., Ariga, S., Shimomura, T., Yukawa, M., 2010. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol*. 3, 177-188.
- Nandi, J., Saud, B., Zinkievich, J.M., Yang, Z.J., Levine, R.A., 2010. TNF-alpha modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis. *Mol Cell Biochem*. 336, 17–24. <https://doi.org/10.1007/S11010-009-0259-2>.
- Noda, T., Iwakiri, R., Fujimoto, K., Yoshida, T., Utsumi, H., Sakata, H., Hisatomi, A., Aw, T.Y., 2001. Suppression of apoptosis is responsible for increased thickness of intestinal mucosa in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*. 50, 259–264. <https://doi.org/10.1053/META.2001.21030>.
- Pellegrini, S., Sordi, V., Bolla, A.M., Saita, D., Ferrarese, R., Canducci, F., Clementi, M., Invernizzi, F., Mariani, A., Bonfanti, R., Barera, G., Testoni, P.A., Doglioni, C., Bosi, E., Piemonti, L., 2017. Duodenal mucosa of patients with type 1 diabetes shows distinctive inflammatory profile and microbiota. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 102, 1468–1477. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3222>.
- Peña-Villalobos, I., Casanova-Maldonado, I., Lois, P., Prieto, C., Pizarro, C., Lattus, J., Osorio, G., Palma, V., 2018. Hyperbaric oxygen increases stem cell proliferation,

angiogenesis and wound-healing ability of WJ-MSCs in diabetic mice. *Front Physiol.* 9, 1-15. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00995/BIBTEX>.

- Pereira, J. N. B., Murata, G. M., Sato, F. T., Marosti, A. R., Carvalho, C. R. de O., & Curi, R. 2021. Small intestine remodeling in male Goto–Kakizaki rats. *Physiological Reports.* 9, 1-16. <https://doi.org/10.14814/phy2.14755>.
- Rouland, M., Beaudoin, L., Rouxel, O., Bertrand, L., Cagninacci, L., Saffarian, A., Pedron, T., Gueddouri, D., Guilmeau, S., Burnol, A.F., Rachdi, L., Tazi, A., Mouriès, J., Rescigno, M., Vergnolle, N., Sansonetti, P., Christine Rogner, U., Lehuen, A., 2022. Gut mucosa alterations and loss of segmented filamentous bacteria in type 1 diabetes are associated with inflammation rather than hyperglycaemia. *Gut.* 71, 296–308. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2020-323664>.
- Sada, K., Nishikawa, T., Kukidome, D., Yoshinaga, T., Kajihara, N., Sonoda, K., Senokuchi, T., Motoshima, H., Matsumura, T., & Araki, E. 2016. Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1. *PLOS ONE.* 11, 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158619>.
- Saeedi, Pouya, Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A.A., Ogurtsova, K., Shaw, J.E., Bright, D., Williams, R., Saeedi, P., Almutairi, R., Montoya, P.A., Basit, A., Phane Besanç, S., Bommer, C., Borgnakke, W., Boyko, E., Chan, J., Divakar, H., Esteghamati, A., Forouhi, N., Franco, L., Gregg, E., Hassanein, M., Ke, C., Levitt, D., Lim, L.-L., Ogle, G.D., Owens, D., Pavkov, M., Pearson-Stuttard, J., Ramachandran, A., Rathmann, W., Riaz, M., Simmons, D., Sinclair, A., Sobngwi, E., Thomas, R., Ward, H., Wild, S., Yang, X., Yuen, L., Zhang, P., 2019. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 157. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2019.107843>.
- Silva, F.S., de Souza, K.S.C., Galdino, O.A., de Moraes, M.V., Ishikawa, U., Medeiros, M.A., Lima, J.P.M.S., de Paula Medeiros, K.C., da Silva Farias, N.B., de Araújo Júnior, R.F., de Rezende, A.A., Abreu, B.J., de Oliveira, M.F., 2022. Hyperbaric oxygen therapy mitigates left ventricular remodeling, upregulates MMP-2 and VEGF, and inhibits the induction of MMP-9, TGF- β 1, and TNF- α in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Life Sci.* 295, 1-10. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120393>.
- Song, L., YUAN, J., LIU, Y., ZHANG, D., ZHANG, C., LIN, Q., LI, M., SU, K., LI, Y., GAO, G., MA, R., & DONG, J. 2020. Ghrelin system is involved in improvements in glucose metabolism mediated by hyperbaric oxygen treatment in a streptozotocin-induced type 1 diabetes mouse model. *Molecular Medicine Reports.* 22, 3767–3776. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11481>.
- Umar, S., 2010. Intestinal Stem Cells. *Curr Gastroenterol Rep.* 12, 340-348. <https://doi.org/10.1007/S11894-010-0130-3>.

- Wang, L., Li, J., Li, Q., Zhang, J., Duan, X.L., 2003. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. *World J Gastroenterol.* 9, 2060-2064. <https://doi.org/10.3748/WJG.V9.I9.2060>.
- Weber, S. U., Koch, A., Kankeleit, J., Schewe, J. C., Siekmann, U., Stüber, F., Hoefft, A., & HoefftSchröder, S. 2009. Hyperbaric oxygen induces apoptosis via a mitochondrial mechanism. *Apoptosis.* 14, 97–107. <https://doi.org/10.1007/S10495-008-0280-Z>.
- Wilkinson, D.C., Chapman, I.M., Heilbronn, L.K., 2020. Hyperbaric oxygen but not hyperbaric air increases insulin sensitivity in men with type 2 diabetes mellitus. *Diving Hyperb Med.* 50, 386–390. <https://doi.org/10.28920/dhm50.4.386-390>.
- William K. Ovalle e Patrick C. Nahirney., n.d. Lower Digestive System - ClinicalKey [WWW Document]. URL <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323694643000134> (accessed 5.8.22).
- Xu, Q., Wei, Y.T., Fan, S.B., Wang, L., Zhou, X.P., 2017. Repetitive hyperbaric oxygen treatment increases insulin sensitivity in diabetes patients with acute intracerebral hemorrhage. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 13, 421–426. <https://doi.org/10.2147/NDT.S126288>.
- Xu, Y., Chen, J., Zhou, H., Wang, J., Song, J., Xie, J., Guo, Q., Wang, C., Huang, Q., 2020. Effects and mechanism of stem cells from human exfoliated deciduous teeth combined with hyper-baric oxygen therapy in type 2 diabetic rats. *Clinics.* 75, 1–11. <https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e1656>.
- Yang, Z., Nandi, J., Wang, J., Bosco, G., Gregory, M., Chung, C., Xie, Y., Yang, X., & Camporesi, E. M. 2006. Hyperbaric oxygenation ameliorates indomethacin-induced enteropathy in rats by modulating TNF- α and IL-1 β production. *Digestive Diseases and Sciences.* 51, 1426–1433. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9088-2>.
- Zeitouni, N. E., Chotikatum, S., Köckritz-Blickwede, M. von, & Naim, H. Y. 2016. The impact of hypoxia on intestinal epithelial cell functions: consequences for invasion by bacterial pathogens. *Molecular and Cellular Pediatrics.* 3, 2-9. <https://doi.org/10.1186/S40348-016-0041-Y>.
- Zhou, S., Sun, Y., & Wang, G. 2012. Effects of hyperbaric oxygen on intestinal mucosa apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury in rats. *World Journal of Emergency Medicine.* 3, 135-140. <https://doi.org/10.5847/WJEM.J.ISSN.1920-8642.2012.02.010>.

Artigo científico submetido a revista **Connective tissue research**. Fator de Impacto 2,9 e Qualis Capes A3.

ARTIGO 2

A oxigenoterapia hiperbárica potencializa o sistema antioxidante através de SOD-1 e GPX enquanto gera ERO na mucosa duodenal de ratos diabéticos.

Valéria Milena Dantas de Castro^a, Naisandra Bezerra da Silva Farias^{b*}, Bento João Abreu^c, Marcus Vinícius de Moraes^d, Adriana Augusto de Rezende^e, Uta Ishikawa^f, Raimundo Fernandes de Araújo Júnior^g, Karina Carla de Paula Medeiros^h, Isac Almeida Medeirosⁱ, Arthur José Pontes Oliveira de Almeida^j, Joaquim Evêncio Neto^k

Afiliações

^{a,k} Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

^{b,c,f,g,h} Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

^d Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

^e Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RS) Brasil.

^{ij} Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba - Brasil.

* Autor correspondente para: Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av Salgado Filho, Campus Universitário, 59072-970. Natal, Brasil.

E-mail: naisandra@hotmail.com

RESUMO

Complicações morfofisiológicas intestinais são comuns no Diabetes Mellitus (DM), sendo o estresse oxidativo e a inflamação preditores dessas alterações. Nosso objetivo com este estudo é avaliar os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica (OHB) sobre esses mecanismos. Para isso foram utilizados 33 ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, alocados em 4 grupos: grupo controle (C, n=8), controle + OHB (C+OHB, n=7), diabético (D, n=10) e diabético + OHB (D+OHB, n=8). O DM foi induzido com injeção de estreptozotocina (60mg/kg, i.p.). Os grupos C+OHB e D+OHB receberam tratamento 100% OHB a uma pressão de 2,5 ATM durante 5 semanas. Após o tratamento, os animais permaneceram em jejum durante a noite e a eutanásia foi realizada por exsanguinação cardíaca. Para avaliar a inflamação intestinal e o estado oxidativo, foi realizada marcação imuno-histoquímica para IL-10, TNF- α , VEGF, SOD-1, GPX e imunofluorescência intracelular de ERO. A intervenção OHB promoveu redução de IL-10, aumento de VEGF, TNF- α , SOD-1, GPX e ROS. A partir disso, concluímos que a hiperoxigenação, ao mesmo tempo que aumenta o estresse oxidativo, também potencializa o sistema antioxidante conferido pelo aumento na concentração das enzimas antioxidantes SOD-1 e GPX.

Palavras-chave: Oxigenoterapia Hiperbárica; Estreptozotocina; Duodeno; Inflamação; Estresse oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

Complicações na morfofisiologia intestinal são frequentes tanto em humanos quanto em animais diabéticos (1). Essas alterações levam ao surgimento de sinais clínicos que caracterizam a gastroenteropatia diabética, onde são comuns refluxo,

dismotilidade, retenção gástrica, azia, disfagia, náusea, distensão abdominal, diarreia e constipação (2,3). Esses sinais clínicos são acompanhados por alterações no nível tecidual, como alterações no volume da parede intestinal, alterações na biomecânica tecidual e desequilíbrios na expressão de moléculas envolvidas na inflamação, apoptose celular e estresse oxidativo (4-8).

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome metabólica crônica que envolve um distúrbio no metabolismo de açúcares, lipídios e proteínas, resultando em complicações em múltiplos sistemas do corpo (9). Esta síndrome afeta milhões de pessoas em todo o mundo e é considerada a terceira principal causa de mortalidade, atrás de malignidades e doenças vasculares, respectivamente (10). De acordo com sua etiologia, o DM pode ser classificado em quatro tipos: Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1), Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), Diabetes Mellitus Gestacional e outros tipos específicos (11). Todas as formas têm como principal característica a hiperglicemia crônica (12).

A hiperglicemia crônica está associada ao aumento do estresse oxidativo pela formação de radicais livres (13). O estresse oxidativo e a inflamação são características comuns no DM e estão implicados nas complicações de múltiplos órgãos, associadas ao DM. Tanto o estresse oxidativo quanto a inflamação são processos, em parte, ativados pelos mesmos estímulos, com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) resultantes do aumento da autooxidação da glicose (6).

A oxidação de substratos utilizando O_2 para obtenção de energia é essencial à vida. Neste processo, o O_2 é reduzido a intermediários chamados EROS. Estas moléculas pró-oxidantes levam a danos celulares quando não são contrabalançadas pelo sistema antioxidante. Carboidratos, lipídios, proteínas e DNA são os principais

alvos das alterações induzidas por ROS (14). Assim, o aumento dos níveis de glicose no sangue pode exacerbar a formação de EROS no nível mitocondrial (15).

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) aumenta a concentração de O₂ dissolvido no sangue e restaura a oxigenação dos tecidos mal perfundidos. Este tratamento envolve a administração intermitente de O₂ a 100% a uma pressão superior a 1 atmosfera absoluta (ATA) (16). Os efeitos positivos da hiperoxigenação foram demonstrados em complicações diabéticas e doenças inflamatórias intestinais (17-22).

Em relação aos processos de estresse oxidativo e inflamação, há controvérsias sobre seus efeitos, visto que à medida que o tratamento com OHB eleva os níveis de EROS, também parece potencializar a defesa antioxidante (23,24). Em condições normais, a liberação de EROS atua benéficamente, sinalizando e regulando processos como diferenciação celular, senescência e apoptose. Porém, quando produzidos em excesso, também atuam como mediadores inflamatórios (25).

O intestino delgado está naturalmente exposto ao desequilíbrio redox celular e à inflamação (26), mas isto pode ser acentuado pela hiperglicemia. Até o momento, não há estudos que tenham observado os efeitos da OHB no duodeno em diabéticos. Portanto, o objetivo deste trabalho é investigar se o tratamento com OHB pode resultar em melhorias nos aspectos inflamatórios e oxidativos deste órgão. Nossos resultados podem fornecer informações importantes que ajudarão na melhor compreensão dos efeitos da hiperoxigenação nas complicações intestinais do diabético.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e desenho experimental

Neste estudo foi utilizada como modelo animal a linhagem Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, com 60 dias de idade e peso entre 220 a 270 g. A amostra de 33 animais foi cedida pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, com aprovação prévia do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob certificado número 125.054/2018. O período experimental foi realizado no biotério experimental do Departamento de Morfologia/UFRN.

Os animais foram alojados em caixas de polipropileno sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuro) com ração e água ad libitum. Os ratos foram alocados em quatro grupos experimentais: grupo controle composto por animais saudáveis (C, n=8), grupo controle tratado com oxigenoterapia hiperbárica (C+OHB, n=7), grupo diabético não tratado (D, n=10) e grupo diabético tratado com oxigenoterapia hiperbárica (D+OHB, n=8). Dados clínicos como glicemia e peso foram medidos durante o experimento.

2.3 Indução do modelo DM1

A indução do DM1 foi realizada com dose única (60 mg/kg) de estreptozotocina dissolvida em tampão citrato 0,1 M, pH 4,5, a 4°C , via injeção intraperitoneal. Uma semana após a indução do diabetes, a glicemia de jejum de todos os animais experimentais foi verificada por meio de um glicosímetro digital

(Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, São Paulo, Brasil). Animais que apresentaram níveis de glicemia ≥ 250 mg/dl foram considerados diabéticos (27).

2.4 Tratamento OHB

A intervenção terapêutica foi iniciada uma semana após a indução do DM1 por 60 min/dia, 5 dias/semana, durante 5 semanas em câmara (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda/SP) seguindo protocolo previamente descrito (28,29). Uma pressão de 2,5 atmosferas absolutas (ATA) foi utilizada dentro da câmara a uma taxa de 1 ATA/min.

A câmara foi ventilada com 100% de O₂ a uma vazão de 15 L/min para minimizar o acúmulo de CO₂. Ao final, a câmara foi descomprimida lentamente a uma taxa de 1 ATA/min. Quatro animais foram colocados na câmara hiperbárica por vez durante cada sessão. Após 5 semanas de tratamento, os animais foram submetidos a jejum noturno e anestesiados com isoflurano (2-3%). Em seguida, foi coletado sangue (3-5 mL) da veia cava inferior para determinação dos níveis finais de glicemia e realizada a eutanásia por exsanguinação cardíaca.

2.5 Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi empregada neste estudo para avaliar parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. Amostras embebidas em parafina foram seccionadas em 4 μ de espessura e colocadas em lâminas sinalizadas. Os cortes foram incubados em estufa a 40°C por 24 horas, sendo então desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de banhos

de álcool. A recuperação antigênica foi realizada seguindo protocolos de marcação com estreptavidina-biotina (LSAB). Entre as moléculas avaliadas estavam Interleucina-10 (IL-10) com ação anti-inflamatória, Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) ambos com ação pró-inflamatória, SOD-1 e antioxidante GPX enzimas sob uma diluição de 1:400.

Para analisar e montar o painel de seção IHC, foram utilizados um microscópio óptico e uma câmera Leica ICC50 HD. O software Leica LAS EZ foi utilizado para digitalizar as lâminas. Cinco campos aleatórios foram fotografados com ampliação de 400 vezes para cada animal. A expressão de citocinas e enzimas foi obtida pela razão entre as áreas de coloração DAB e Hematoxilina, que foram medidas após a separação do corante utilizando o plugin Color Deconvolution do Image J®, conforme método descrito anteriormente (30).

2.6 Imunofluorescência

Para avaliar a formação de EROS intracelulares, foi utilizado o corante fluorescente diidroetídio (DHE). Amostras duodenais de cinco animais de cada grupo foram lavadas com solução salina e fixadas em nitrogênio líquido e mantidas à temperatura de -20°C. Os tecidos foram incluídos em moldes preenchidos com Tissue Teck Compound (OCT) e congelados para posterior seccionamento. Os blocos de OCT foram seccionados com espessura de 20 μ m utilizando um criostato (Cryostat Leica, Nussloc, Alemanha) a uma temperatura de -20°C. Os cortes do duodeno foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e depois incubados com a sonda fluorescente para espécies reativas de oxigênio, DHE, na concentração de 10 μ M por 30 minutos a 37°C em câmara úmida protegida da luz.

Em seguida, as lâminas foram lavadas antes da montagem com Meio de Montagem Fluorescente (DAKO©) com lamínulas. As imagens foram capturadas usando um microscópio de fluorescência (Eclipse Ti-E, NIKON, Japão).

Para analisar a fluorescência de cada animal, foram tiradas quatro fotos com aumento de 10x. A intensidade média de fluorescência foi obtida automaticamente usando ImageJ. As ferramentas (image-ajuste-cor limiar-selecionar-analisar-histograma-RBG Red-mean) foram utilizadas com o mesmo padrão de Matiz, Saturação e Brilho para todas as imagens de acordo com o protocolo proposto por (31).

2.7 Análise estatística

As variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Komorov-Smirnov, e aquelas com distribuição normal foram analisadas por meio do teste de hipóteses ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de p foi $\leq 0,05$. O software Graphpad Prism foi utilizado para realizar as análises.

3 RESULTADOS

3.1 Glicemia e peso

Os animais induzidos com STZ permaneceram hiperglicêmicos até o final do experimento e apresentaram redução no peso corporal conforme mostrado na

(Figura 1 A e B). O tratamento com oxigênio hiperbárico não teve efeitos preventivos sobre essas alterações.

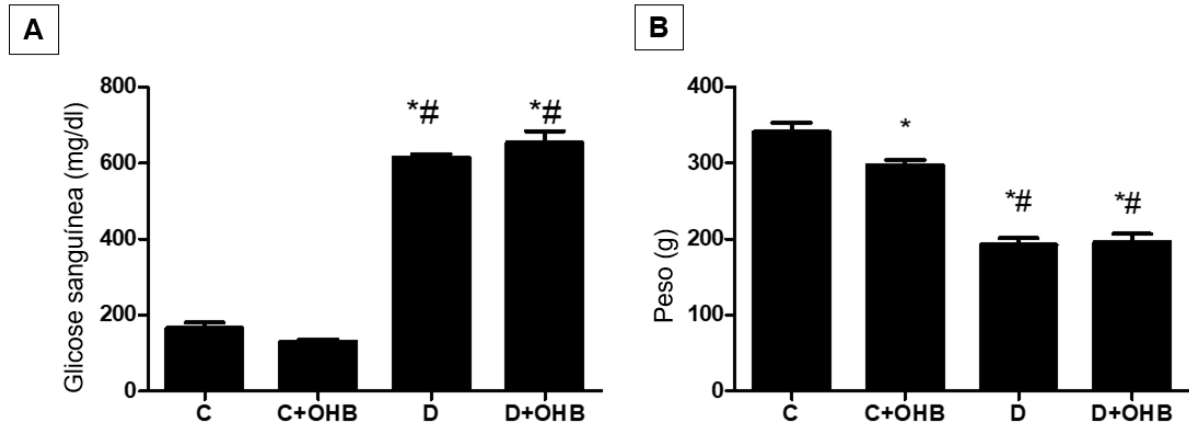


Figura 1 Glicose e peso. Grupo controle (C), grupo controle tratado com oxigênio hiperbárico (C+OHB), grupo diabético (D), grupo diabético tratado com oxigênio hiperbárico (D+OHB). Glicemia (A), $P= 0,004$; Peso (B), $P= 0,0001$. *Diferença significativa vs grupo controle, # vs grupo C+OHB.

3.1 Inflamação

A Figura 2A mostra micrografias representativas de cortes transversais duodenais com imunorreatividade revelada em amarelo-marrom e contrastação em azul devido à hematoxilina. Nas Figuras 2B, C e D observa-se a relação área DAB/H dessas marcações. Nenhuma dessas citocinas apresentou diferença significativa entre os grupos. A IL-10 apresentou menor marcação nos grupos C+OHB, D e D+OHB (Figura 2B). Enquanto isso, o TNF- α revelou aumento nos grupos tratados com OHB (Figura 2C). Em contraste, a marcação do VEGF foi reduzida nos grupos C+OHB, D e D+OHB (Figura 2D).

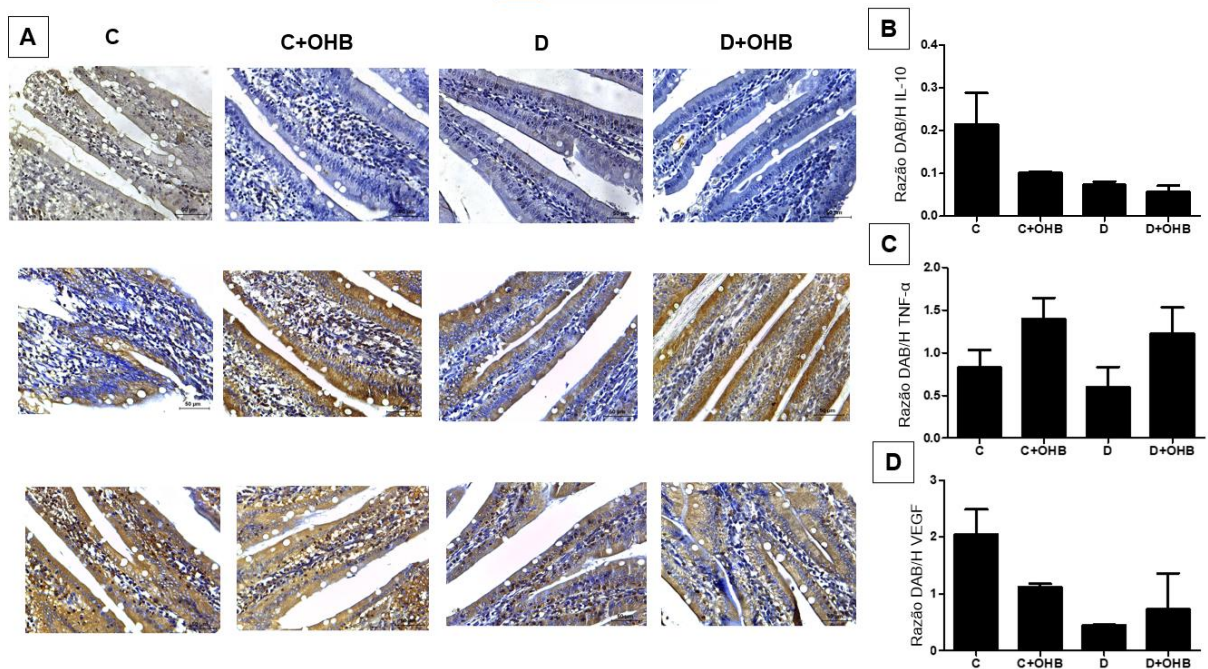


Figura 2 Efeitos da OHB nas citocinas envolvidas na inflamação. Cortes transversais contrastados com hematoxilina mostrando imunorreatividade na cor amarelo-marrom. Ampliação de 400x, escala de barra 50 μ m (A). Razão de imunorreatividade DAB/H em tecido duodenal. IL-10, $P= 0,0991$ (B); TNF- α , $P= 0,1787$ (C); VEGF, $P = 0,0790$ (D).

3.3 Efeitos antioxidantes da OHB

A Figura 3A mostra micrografias representativas de cortes transversais duodenais contrastados com hematoxilina com imunorreatividade na cor amarelo-marrom para as enzimas antioxidantes SOD-1 e GPX. As Figuras 3B e C mostram a relação DAB/H dessas enzimas.

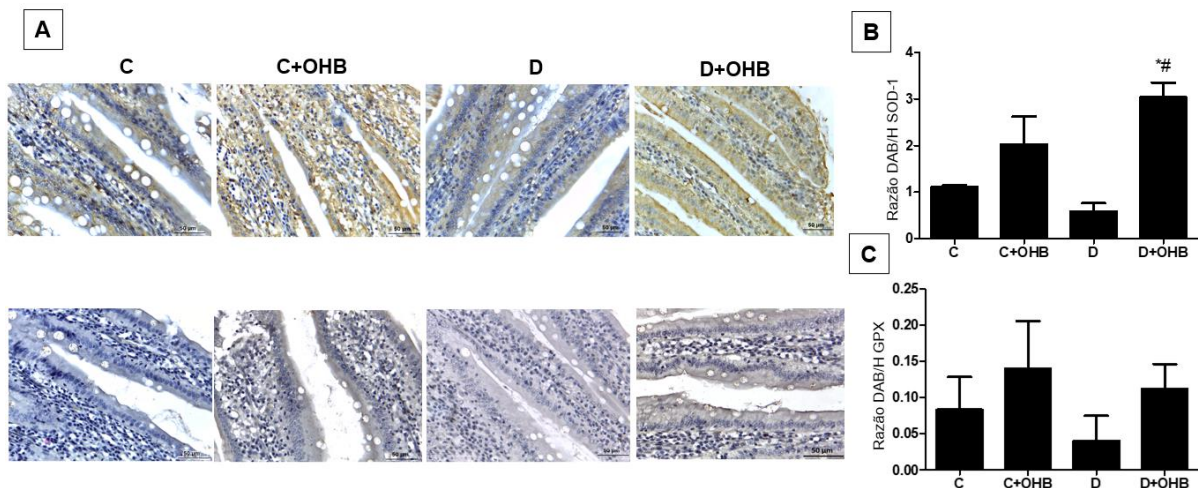


Figura 3 Efeitos da OHB nas enzimas antioxidantes. Cortes transversais contrastados com hematoxilina mostrando imunorreatividade na cor amarelo-marrom (A) com aumento de 40X, barra de escala 50 μ m. Razão de imunorreatividade DAB/H em tecido duodenal. SOD-1, P= 0,0051 (B); GPX, P = 0,5099 (C).

3.4 Efeitos da OHB nas espécies reativas de oxigênio

A Figura 4 mostra que a sonda DHE emitiu fluorescência em todas as seções transversais duodenais dos grupos experimentais. Um aumento na intensidade de fluorescência é perceptível nos grupos C+OHB, D e D+OHB, com significância observada apenas nos dois últimos em comparação ao Controle.

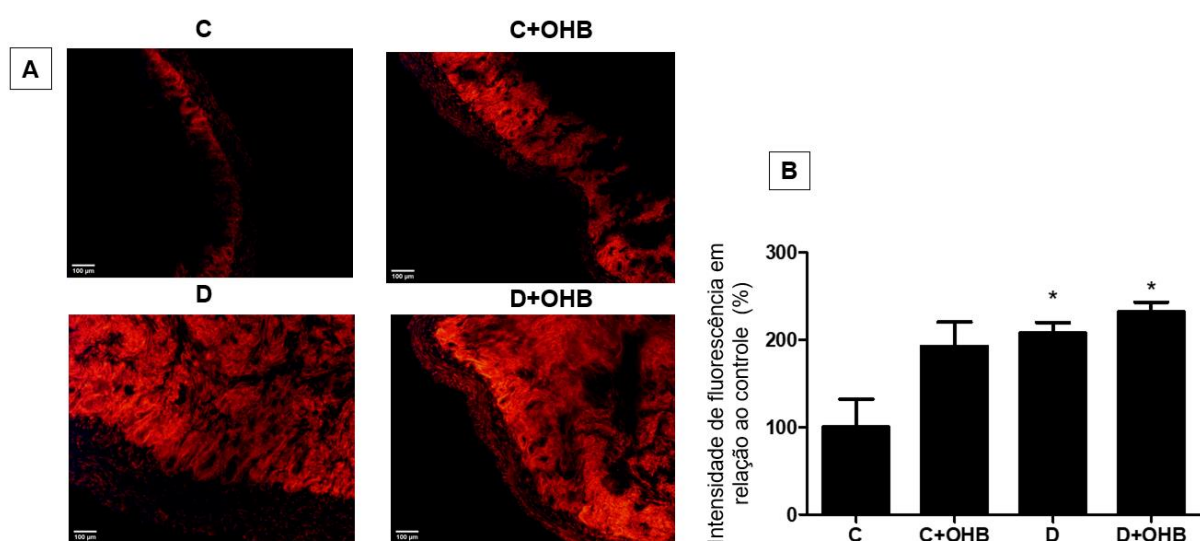


Figura 4 Marcador oxidativo em tecido duodenal. Cortes transversais duodenais mostram a intensidade da fluorescência emitida pela sonda DHE, que indica o nível de EROS intracelular (A). Níveis de EROS no tecido duodenal (B). Grupo controle (C), grupo controle tratado com OHB (C+OHB), grupo diabético (D) e grupo diabético tratado com OHB. N= 4 por grupo. *diferença significativa versus grupo C. P= 0,0058.

4 DISCUSSÃO

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar parâmetros de estresse oxidativo e inflamação no tecido duodenal de animais diabéticos submetidos à terapia com OHB. No trato gastrointestinal, a terapia OHB tem sido utilizada principalmente para tratar doenças inflamatórias como doença de Crohn, colite ulcerativa, enterocolite, isquemia, jejunoileíte e disfunção intestinal (17-21). Apesar dos benefícios demonstrados, existem controvérsias sobre seus efeitos na inflamação. Nesse processo, embora a terapia OHB gere mais espécies reativas de oxigênio, possivelmente também permite que o sistema antioxidante enfrente isso (23,24).

Em nossos resultados, o tratamento com OHB reduziu os níveis de IL-10 e aumentou TNF- α , VEGF, SOD-1 e GPX. O DM desencadeia a ativação de diversas vias de sinalização envolvidas nas complicações diabéticas, incluindo inflamação e estresse oxidativo, aos quais a mucosa intestinal é vulnerável (5,32). O DM1 é resultado de uma resposta inflamatória autoimune que destrói células produtoras de insulina (33). A hiperglicemia leva a um aumento na geração de EROs, o que desencadeia a expressão de citocinas envolvidas na inflamação (34).

A glicemia e o peso dos animais diabéticos não melhoraram com a hiperoxigenação, como visto anteriormente (35,36). Em outro estudo com modelos obesos ou com DM2 expostos ao OHB por uma semana, houve melhora na sensibilidade à insulina e redução na glicemia. Este resultado foi atribuído a um aumento na expressão dos transportadores Glut-4 no músculo esquelético (37). Essas variações nos resultados podem ser consequência de diferentes protocolos terapêuticos, bem como de mudanças nos modelos experimentais.

A coloração com IL-10, citocina anti-inflamatória, não apresentou diferenças significativas entre os grupos, porém pode-se observar redução na sua expressão nos grupos C+OHB, D e D+OHB no gráfico. No grupo D isso era esperado conforme resultados anteriores (5,38). Curiosamente, os grupos C+OHB e D+OHB também tiveram redução na IL-10. Possivelmente, OHB e DM tenham alguma ação na expressão de IL-10 e seu baixo nível possa estar relacionado ao aparecimento de inflamação em indivíduos diabéticos.

No estudo de (24) que investigou os efeitos da OHB no estresse oxidativo e na inflamação em indivíduos saudáveis, observou-se que a intervenção não teve efeito significativo nos níveis plasmáticos das citocinas TNF- α e IL-10. Neste estudo foram realizadas três sessões de OHB, cada uma com duração de 110 minutos, e também foram avaliados os níveis dessas citocinas quando estimuladas ex vivo por lipopolissacarídeo (LPS), onde foi observada discreta redução de IL-10 após a última sessão de OHB e aumento do TNF- α .

A coloração com TNF- α , citocina pró-inflamatória, não apresentou diferença significativa entre os grupos, mas foi observado ligeiro aumento nos grupos C+OHB e D+OHB, enquanto os grupos C e D foram semelhantes. Em um estudo com dois grupos de pacientes submetidos à hiperoxigenação com máscaras e câmara hiperbárica multiplace, respectivamente, inalando O₂ 100% nas pressões de 2,0 e 2,8 ATA por 10 minutos, os níveis de TNF- α foram analisados antes da pressurização, após os 10 minutos de intervenção e 30 minutos após o término do tratamento. Observou-se que houve aumento significativo dessa citocina nas duas pressões utilizadas, mas após 30 minutos os níveis retornaram aos valores basais e não diferiram do controle (39). Com base nesses resultados, os autores sugerem que outros fatores além da hiperóxia, como duração da exposição e nível de

pressão, podem ser determinantes dos resultados, como também sugerido pelos autores (28).

Em um ensaio com atletas submetidos a diferentes concentrações de O₂ e diferentes pressões, foi avaliada a geração de ERO, IL-10 e TNF- α . Esses parâmetros foram medidos antes e após as 20 sessões. No final, a OHB a pressões de 1,5 e 2,5 ATA pareceu induzir mecanismos de proteção contra EROS, embora este último possa expor o corpo a níveis mais elevados de EROS. Na mesma pressão, a IL-10 foi significativamente reduzida e o TNF- α mostrou tendência a aumentar, mas não estatisticamente significativo (23). A IL-10 inibe citocinas pró-inflamatórias e sua menor concentração pode estar relacionada a uma maior concentração de TNF- α como observado nos grupos C+OHB, D e D+OHB (40).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos fatores mais importantes no processo de angiogênese. Sua liberação pode ser decorrente de lesão tecidual ou ambiente hipóxico induzindo a formação de novos vasos (41). A terapia OHB parece aumentar a produção de EROS, que podem funcionar como moléculas sinalizadoras na produção e liberação de VEGF para promover a neovascularização (42). Em nossos resultados, houve um aumento significativo na expressão intracelular de EROs nos grupos C+OHB, D e D+OHB. No entanto, os níveis de VEGF foram reduzidos nestes mesmos grupos em comparação com o grupo C. O grupo D+OHB apresentou ligeira melhora no VEGF em comparação ao grupo D.

Em um estudo utilizando OHB para tratar isquemia intestinal lesões de reperfusão (I-R) em ratos, foi observado um aumento no VEGF tanto no grupo I-R sem OHB quanto nos grupos I-R tratados com OHB antes e depois da OHB. Os autores especulam que o aumento do VEGF causado pela OHB pode levar ao

aumento da angiogênese e vasodilatação, promovendo melhor oxigenação tecidual (43). Este resultado apoia a ideia de que a liberação de VEGF possui um padrão bifásico, sendo estimulada tanto pela hipóxia quanto pela hiperóxia, conforme mencionado por (28).

Em estudo anterior utilizando o mesmo protocolo OHB para avaliar seus efeitos no miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, foi encontrada redução significativa do VEGF no grupo D, enquanto os demais grupos permaneceram elevados neste fator de crescimento (27). Em nossos resultados, não houve diferença significativa entre os grupos, mas o grupo D também apresentou a menor expressão de VEGF, e o tratamento D+OHB melhorou a expressão em comparação ao grupo D.

As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante no desenvolvimento e nas complicações do diabetes. Enzimas antioxidantes como SOD e GPX são a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo induzido por ROS no corpo. Em ratos diabéticos induzidos por STZ, foi observada redução na atividade enzimática de SOD e GPX no fígado e nos rins (44). Aqui, avaliamos a expressão das enzimas antioxidantes SOD-1 e GPX e o nível de EROS intracelular como marcador oxidativo. O tratamento com OHB aumentou os níveis intracelulares de EROS e a expressão das enzimas antioxidantes SOD-1 e GPX. Assim, parece que embora o tratamento com OHB aumente o estado oxidativo dos tecidos, possivelmente atua no sistema antioxidante, equipando-o para equilibrar esse aumento.

Por outro lado, no estudo de T. Matsunami et al. (45) com ratos diabéticos induzidos por STZ expostos a OHB por 7 dias com sessões de 90 minutos a 2,4 ATA, observou-se que a atividade enzimática da SOD foi reduzida nos grupos

C+OHB, D e D+OHB em eritrócitos, fígado, músculo esquelético e pâncreas, enquanto a atividade enzimática do GPX aumentou nesses mesmos grupos. Em nossos resultados, o tratamento com OHB parece melhorar a imunoexpressão de SOD-1 e GPX. Essa diferença pode ser devida ao maior tempo de tratamento, que foi de 30 dias, levando em consideração o que alguns autores relataram, que o OHB pode potencializar o sistema antioxidante (23).

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção e eliminação EROS. A inflamação persistente é acompanhada pela superprodução de EROS, o que também pode contribuir para a promoção e persistência da inflamação. O estresse oxidativo pode ser uma manifestação de inflamação e também um iniciador da inflamação (46).

Finalmente, nossos principais achados foram que o tratamento com OHB aumentou o TNF- α , SOD-1 e GPX e reduziu a IL-10. Como o TNF- α e a IL-10 são citocinas envolvidas no processo de inflamação, sua amplificação ou redução pode ser benéfica ou prejudicial dependendo do momento da estimulação em relação à patologia a ser tratada. Vários fatores podem influenciar os efeitos da terapia com OHB, como tempo de tratamento, pressão e condição patológica. Assim, novos estudos são necessários para explorar mais detalhadamente as diferentes pressões e períodos de tratamento.

Apoio financeiro

Esta pesquisa contou com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da concessão de bolsa de doutorado ao primeiro autor.

Declaração de conflitos de interesse

Nenhum.

Agradecimentos

Os autores agradecem às técnicas de laboratório Helaine Cristiane Silva e Maria Sara Maia de Queiroz do Departamento de Morfologia da UFRN pelo auxílio nos procedimentos histológicos.

REFERÊNCIAS

1. Zhao, M., Liao, D., Zhao, J., 2017. Diabetes-induced mechanophysiological changes in the small intestine and colon. *World J Diabetes* 8, 249–269. <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i6.249>
2. Piper, M.S., Saad, R.J., 2018. Diabetes Mellitus and the Colon Opinion statement. *Curr Treat Options Gastroenterol* 15, 460-474. <https://doi.org/10.1007/s11938-017-0151-1>.
3. Rodrigues, M.L.C., Motta, M.E.F.A., 2012. Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. *J Pediatr (Rio J)* 88, 17–24. <https://doi.org/10.2223/jped.2153>.
4. da Rosa, C.V.D., Azevedo, S.C.S.F., Bazotte, R.B., Peralta, R.M., Buttow, N.C., Pedrosa, M.M.D., de Godoi, V.A.F., Natali, M.R.M., 2015. Supplementation with L-glutamine and lalanyl- l-glutamine changes biochemical parameters and jejunum morphophysiology in type 1 diabetic wistar rats. *PLoS One* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143005>
5. de Castro, V.M.D., de Paula Medeiros, K.C., de Lemos, L.I.C., Pedrosa, L. de F.C., Ladd, F.V.L., de Carvalho, T.G., de Araújo Júnior, R.F., Abreu, B.J., da Silva Farias, N.B., 2021. S-methyl cysteine sulfoxide ameliorates duodenal morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tissue Cell* 69, 101483. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2020.101483>

6. Nna, V.U., Bakar, A.B.A., Ahmad, A., Eleazu, C.O., Mohamed, M., 2019. Oxidative Stress, NF- κ B-Mediated Inflammation and Apoptosis in the Testes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Combined Protective Effects of Malaysian Propolis and Metformin. *Antioxidants* 8, 465. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8100465>
7. Pellegrini, S., Sordi, V., Bolla, A.M., Saita, D., Ferrarese, R., Canducci, F., Clementi, M., Invernizzi, F., Mariani, A., Bonfanti, R., Barera, G., Testoni, P.A., Doglioni, C., Bosi, E., Piemonti, L., 2017. Duodenal Mucosa of Patients With Type 1 Diabetes Shows Distinctive Inflammatory Profile and Microbiota. *J Clin Endocrinol Metab* 102, 1468–1477. <https://doi.org/10.1210/JC.2016-3222>
8. Zhao, J., Nakaguchi, T., Gregersen, H., 2009. Biomechanical and Histomorphometric Colon Remodelling in STZ-Induced Diabetic Rats. *Dig Dis Sci* 54, 1636–1642. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0540-3>
9. Hao, X., Yuan, J., Dong, H., 2019. Salidroside prevents diabetes induced cognitive impairment via regulating the Rho pathway. *Mol Med Rep* 19, 678–684. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9621>
10. Ali, E.M.T., Abdallah, H.I., El-Sayed, S.M., 2020. Histomorphological, VEGF and TGF- β immunoexpression changes in the diabetic rats' ovary and the potential amelioration following treatment with metformin and insulin. *J Mol Histol* 51, 287–305. <https://doi.org/10.1007/s10735-020-09880-x>
11. de Lira, L.Q.; Dimenstein, R., 2010. Vitamin A and gestational diabetes. *Rev Assoc Med Bras* 56, 355-359.
12. de Freitas Moreira, M., do Vale Canabrava, N., Lira, S.M., Oliveira, T.R., da Silva, J.Y.G., Holanda, M.O., Lima, C.L.S., do Nascimento Sales, J., Bezerra, A.S., da Silva, B.B., Queiroz, E.A.M., Rodrigues, P.A.S., Paim, R.T.T., de Almeida, L.M., Guedes, M.I.F., 2015. Experimental model of type 2 diabetes induced by fat diet consumption and low dose of streptozotocin in C57BL/6J mice. *Diabetol Metab Syndr* 7. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-7-s1-a160>
13. Bayrak, B.B., Koroglu, P., Karabulut Bulan, O., Yanardag, R., 2020. Metformin protects against diabetes-induced heart injury and dunning prostate cancer model. *Hum Exp Toxicol*, 40, 297-309. <https://doi.org/10.1177/0960327120947452>
14. Tangvarasittichai, S., 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 6, 456-480. <https://doi.org/10.4239/WJD.V6.I3.456>

15. Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. v., Zucca, P., Varoni, E.M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P.V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., el Rayess, Y., Beyrouthy, M. el, Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A.O., Setzer, W.N., Calina, D., Cho, W.C., Sharifi-Rad, J., 2020. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol* 11, 694. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00694/BIBTEX>
16. Sancak, E.B., Tan, Y.Z., Turkon, H., Silan, C., 2017. Attenuation of partial unilateral ureteral obstruction – induced renal damage with hyperbaric oxygen therapy in a rat model. *International braz j urol* 43, 946–956. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0565>
17. Albenberg, L., Esipova, T. v., Judge, C.P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., Grunberg, S., Baldassano, R.N., Lewis, J.D., Li, H., Thom, S.R., Bushman, F.D., Vinogradov, S.A., Wu, G.D., 2014. Correlation Between Intraluminal Oxygen Gradient and Radial Partitioning of Intestinal Microbiota in Humans and Mice. *Gastroenterology* 147, 1055. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.07.020>
18. Bertolotto, P.R., Fagundes, D.J., Simões, M.D.J., Oshima, C.T.F., Montero, E.F.D.S., Simões, R.S., Fagundes, A.T.N., 2007. Effects of hyperbaric oxygen therapy on the rat intestinal mucosa apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery* 27, 224–227. <https://doi.org/10.1002/micr.20349>
19. Dulai, P.S., Gleeson, M.W., Taylor, D., Holubar, S.D., Buckey, J.C., Siegel, C.A., 2014. Systematic review: The safety and efficacy of hyperbaric oxygen therapy for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 39, 1266–1275. <https://doi.org/10.1111/APT.12753>
20. Guven, A., Gundogdu, G., Uysal, B., Cermik, H., Kul, M., Demirbag, S., Ozturk, H., Oter, S., 2009. Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg* 44, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2008.06.008>
21. Nandi, J., Saud, B., Zinkievich, J.M., Yang, Z.J., Levine, R.A., 2010. TNF- α modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis, in: *Molecular and Cellular Biochemistry* 336,17–24. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0259-2>
22. Prabowo, S., Nataatmadja, M., Hadi, J.P., Dikman, I., Handajani, F., Tehupuring, S.E.J., Soetarso, I., Suryokusumo, M.G., Aulanni'am, A., Herawati, A., West, M., Prabowo, S., Nataatmadja, M., Hadi, J.P., Dikman, I., Handajani, F., Tehupuring,

S.E.J., Soetarso, I., Suryokusumo, M.G., Aulanni'am, A., Herawati, A., West, M., 2014. Hyperbaric Oxygen Treatment in a Diabetic Rat Model Is Associated with a Decrease in Blood Glucose, Regression of Organ Damage and Improvement in Wound Healing. *Health N Hav* 6, 1950–1958.

<https://doi.org/10.4236/HEALTH.2014.615228>

23. Bosco, G., Paganini, M., Giacom, T.A., Oppio, A., Vezzoli, A., Dellanoce, C., Moro, T., Paoli, A., Zanotti, F., Zavan, B., Balestra, C., Mrakic-Sposta, S., 2021. Oxidative Stress and Inflammation, MicroRNA, and Hemoglobin Variations after Administration of Oxygen at Different Pressures and Concentrations: A Randomized Trial. *Int J Environ Res Public Health* 18, 9755.

<https://doi.org/10.3390/IJERPH18189755>

24. de Wolde, S.D., Hulskes, R.H., de Jonge, S.W., Hollmann, M.W., van Hulst, R.A., Weenink, R.P., Kox, M., 2022. The Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Markers of Oxidative Stress and the Immune Response in Healthy Volunteers. *Front Physiol* 13, 826163. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.826163/BIBTEX>

25. Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 20, 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.5149>

26. Chalovich, J.M., Eisenberg, E., 2012. Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol* 23, 729–737.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage>

27. Silva, F.S., de Souza, K.S.C., Galdino, O.A., de Moraes, M.V., Ishikawa, U., Medeiros, M.A., Lima, J.P.M.S., de Paula Medeiros, K.C., da Silva Farias, N.B., de Araújo Júnior, R.F., de Rezende, A.A., Abreu, B.J., de Oliveira, M.F., 2022a. Hyperbaric oxygen therapy mitigates left ventricular remodeling, upregulates MMP-2 and VEGF, and inhibits the induction of MMP-9, TGF- β 1, and TNF- α in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Life Sci* 295, 120393.

<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120393>

28. Al-Waili, N.S., Butler, G.J., 2006. Effects of Hyperbaric Oxygen on Inflammatory Response to Wound and Trauma: Possible Mechanism of Action. *The Scientific World Journal* 6, 425. <https://doi.org/10.1100/TSW.2006.78>

29. Xu, Q., Wei, Y.T., Fan, S.B., Wang, L., Zhou, X.P., 2017. Repetitive hyperbaric oxygen treatment increases insulin sensitivity in diabetes patients with acute intracerebral hemorrhage. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13, 421–426.

<https://doi.org/10.2147/NDT.S126288>

30. Bartis, D., Crowley, L.E., D'souza, V.K., Borthwick, L., Fisher, A.J., Croft, A.P., Pongrácz, J.E., Thompson, R., Langman, G., Buckley, C.D., Thickett, D.R., 2016. Role of CD248 as a potential severity marker in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0211-7>
31. Shihan, M.H., Novo, S.G., le Marchand, S.J., Wang, Y., Duncan, M.K., 2021. A simple method for quantitating confocal fluorescent images. *Biochem Biophys Rep* 25, 100916. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2021.100916>
32. Bhor, V.M., Raghuram, N., Sivakami, S., 2004. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 89–97. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00142-0](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00142-0)
33. Wang, Yang, Li, Y., Yin, J., Wang, Ying, Zhu, L., Xie, G., Pan, S., 2013. Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes. *Autophagy* 9, 272–277. <https://doi.org/10.4161/auto.23628>
34. Mardiah, Zakaria, F.R., Prangdimurti, E., Damanik, R., 2015. Anti-inflammatory of Purple Roselle Extract in Diabetic Rats Induced by Streptozotocin. *Procedia Food Sci* 3, 182–189. <https://doi.org/10.1016/J.PROFOO.2015.01.020>
35. Matsunami, T., Sato, Y., Morishima, T., Mano, Y., Yukawa, M., 2008. Enhancement of glucose toxicity by hyperbaric oxygen exposure in diabetic rats. *Tohoku J Exp Med* 216, 127–132. <https://doi.org/10.1620/tjem.216.127>
36. Matsunami, Tokio, Sato, Y., Sato, T., Ariga, S., Shimomura, T., Yukawa, M., 2010. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure, *Int J Clin Exp Pathol* 3, 177-188.
37. Liu, Y., Zhang, D., Yuan, J., Song, L., Zhang, C., Lin, Q., Li, M., Sheng, Z., Ma, Z., Lv, F., Gao, G., Dong, J., 2020. Hyperbaric Oxygen Ameliorates Insulin Sensitivity by Increasing GLUT4 Expression in Skeletal Muscle and Stimulating UCP1 in Brown Adipose Tissue in T2DM Mice. *Front Endocrinol* 11, 32. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00032>
38. Uluisik, D., Keskin, E., 2017. The Effects of Coenzyme Q10 on Inflammation Markers in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Acta Sci Vet* 45, 1446. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80002>

39. Rocco, Monica, Alampi, Daniela, Spadetta, Gustavo, Rocco, M, Antonelli, M., Letizia, V., Alampi, D, Spadetta, G, Passariello, M., Conti, G., Serio, P., Gasparetto, A., 2001. Lipid peroxidation, circulating cytokine and endothelin 1 levels in healthy volunteers undergoing hyperbaric oxygenation. *Minerva Anestesiol* 67, 393-400.
40. Oliveira, C.M.B. de, Sakata, R.K., Issy, A.M., Gerola, L.R., Salomão, R., 2011. Cytokines and pain. *Rev Bras Anestesiol* 61, 260–265. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>
41. Siewiera, J., Smoleński, M., Jermakow, N., Kot, J., Brodaczevska, K., Turyn, J., Zabielska-kaczorowska, M.A., Ludwig, N., Szczepański, M.J., 2021. Effect of Hyperbaric Oxygenation on Blood Cytokines and Arginine Derivatives; No Evidence for Induction of Inflammation or Endothelial Injury. *J Clin Med* 10, 5488. <https://doi.org/10.3390/JCM10235488>
42. Oley, M.H., Oley, M.C., Noersasongko, A.D., Hatta, M., Philips, G.G., Agustine, Faruk, M., Kalangi, J.A., Rumampuk, I.M.A., Tulong, M.T., 2021. Effects of hyperbaric oxygen therapy on vascular endothelial growth factor protein and mRNA in crush injury patients: A randomized controlled trial study. *International Journal of Surgery Open* 29, 33–39. <https://doi.org/10.1016/J.IJSO.2021.01.003>
43. Aparecida Furlan Daniel, R.I., Kannen Cardoso, V.I., Góis Jr III, E., Serafim Parra, R.I., Britto Garcia, S. v, Joaquim Ribeiro da Rocha, J.V., Féres VII, O., Professor, F., 2011. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestinal ischemia reperfusion injury, *Acta Cir. Bras* 26, 463-469. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502011000600010>
44. Sellamuthu, P.S., Arulselvan, P., Kamalraj, S., Fakurazi, S., Kandasamy, M., 2013. Protective Nature of Mangiferin on Oxidative Stress and Antioxidant Status in Tissues of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *ISRN Pharmacol* 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/750109>
45. Matsunami, T, Sato, Y., Sato, T., Yukawa, M., 2010. Antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Physiol Res* 59, 97–<https://doi.org/10.33549/physiolres.931711>
46. Fernando, Y., Wickramasinghe, P., de Silva, U., Alahakoon, M., Anuradha, K.W.D.A., Handunnetti, S., 2020. Differences in serum markers of oxidative stress in well controlled and poorly controlled asthma in Sri Lankan children: a pilot study. *Allergy Asthma Clin Immunol* 16, 66. <https://doi.org/10.1186/S13223-020-00463-9>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A OHB apresentou efeitos positivos em aspectos morfológicos, apoptóticos, inflamatórios e antioxidantes no duodeno. Quanto a morfologia esse tratamento preservou o espaço luminal, bem como o volume absoluto da submucosa e a taxa de renovação dos enterócitos via Caspase-3.

O tratamento com OHB reduziu a expressão de IL-10, citocina anti-inflamatória, aumentou TNF- α , citocina pro-inflamatória e melhorou a expressão de VEGF. Por fim o tratamento aumentou os níveis de ROS intracelular e a expressão de enzimas antioxidantes SOD-1 e GPX.

A partir disso concluímos que o tratamento com OHB pode apresentar tantos resultados positivos quanto negativos no concerne a morfologia, inflamação e estresse oxidativo. O tratamento mostra que ao passo que aumenta o estado oxidativo tecidual também capacita o sistema antioxidante para lidar com isso.

ANEXO A- APROVAÇÃO CEUA


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

 Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
 Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br
**CERTIFICADO**

Natal (RN), 24 de agosto de 2018.

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito da oxigenoterapia hiperbárica em parâmetros bioquímicos, moleculares e histopatológicos causados pela nefropatia diabética em um modelo experimental de diabetes tipo 1”, protocolo 054/2018, **CERTIFICADO n.º 125.054/2018**, sob a responsabilidade de Bento João da Graça Azevedo Abreu - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

| | | | | | | |
|--------------------------|--|-------|-------------|------------|---|-------|
| Vigência do Projeto | Março 2022 | | | | | |
| RELATÓRIOS | JUNHO 2020 MARÇO 2022 | | | | | |
| Espécie | Linhagem | Idade | Peso aprox. | Quantidade | | |
| | | | | M | F | Total |
| <i>Rattus norvegicus</i> | Wistar | 60d | 220-300g | 48 | - | 48 |
| Origem | Biotério do Centro de Ciências da Saúde – UFRN | | | | | |
| Manutenção | Biotério do Depto da Morfologia – UFRN | | | | | |

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório** de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. O descumprimento desta norma poderá inviabilizar a submissão de projetos futuros.

Chistina da Silva Camillo
 Coordenadora da CEUA-UFRN