



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

INSTITUTO BIOMÉDICO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

DISCIPLINA DE BIOQUÍMICA

ISABELLA GARCIA ROCHA

Efeitos da estreptozotocina no metabolismo de ratos Wistar

Rio de Janeiro

2016

ISABELLA GARCIA ROCHA

Efeitos da estreptozotocina no metabolismo de ratos Wistar

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina no Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Curso de Biomedicina.

Orientadora: Prof^a.Dr^a.Claudia Cardoso Netto

ISABELLA GARCIA ROCHA

Efeitos da estreptozotocina no metabolismo de ratos Wistar

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina no Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Curso de Biomedicina.

Orientadora: Prof^a.Dr^a.Claudia Cardoso Netto

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Cardoso Netto - Orientadora
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Prof. Dr. Luiz Fernando Rodrigues Júnior – Examinador
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

MSc. Laise Lourdes Pereira Tavares de Souza – Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por seu imensurável cuidado e sustento em cada dia dessa caminhada até aqui.

A todos os meus familiares, principalmente meus pais Juracy e Lindalva e meu irmão Juracy, pelo apoio em todos os momentos, incentivo e por se fazerem presentes sempre, mesmo com a distância.

Aos amigos que a UNIRIO me proporcionou.

À Priscila pela amizade e auxílio em todos os momentos.

À Juliana pelo companheirismo e amizade desde o início da graduação.

Ao Programa de extensão: Redes Colaborativas Solidárias – RECOSOL- especialmente à professora Helô e todos seus integrantes por me proporcionarem conhecimentos para além da área Biomédica e pelos laços de amizade construídos.

Aos funcionários e amigos do Hospital Gaffrée Guinle, onde pude vivenciar um pouco mais da prática de atuação em Análises Clínicas.

À Katia, Jéssica e Laise por participarem comigo desse trabalho e pelo companheirismo de sempre.

À professora Gisele por sua contribuição e atenção.

Ao professor Luiz Fernando, por todos os ensinamentos, auxílios extras e parceria em partes desse trabalho.

À orientadora Claudia por ter me proporcionado a oportunidade de participar desse projeto, por toda a ajuda e dedicação.

À banca examinadora.

À UNIRIO, por me acolher nesses anos de aprendizagem, crescimento acadêmico, além de ter me proporcionado momentos agradáveis e que certamente ficarão guardados com carinho e saudade.

Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes;
porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.

(Josué 1:9. Bíblia Sagrada)

RESUMO

Considerando que a indução do Diabetes experimental pode ser realizada com estreptozotocina (STZ), o objetivo desse trabalho consiste em descrever os efeitos de duas doses de STZ (60mg/Kg e 70mg/Kg) no metabolismo de ratos *Wistar*. Vinte e quatro *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar* foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=8 cada): Controle não diabético (C), diabético induzido com 60 mg/Kg de peso corporal de STZ (DM60) e diabético induzido com 70 mg/Kg de peso corporal de STZ (DM70). Realizou-se as análises bioquímicas glicemia, colesterol total, HDLc, triglicerídeos, insulina, proteínas totais, albumina e cálcio. Os animais dos grupos diabéticos induzidos com STZ em ambas as doses apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) de consumo alimentar em relação ao grupo controle. Os animais do grupo DM70 apresentaram diferença significativa ($p<0,001$) em relação aos demais grupos em relação ao peso corporal. O peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia entre os animais houve diferença estatística ($p<0,5$) entre o grupo controle em relação ao DM60 e DM70. No peso do fígado corrigido pelo comprimento da tíbia, houve diferença estatística ($p<0,05$) entre o grupo controle e o grupo DM70, e entre DM60 e DM70 ($p<0,05$). Quanto ao peso do rim esquerdo, corrigido pelo comprimento da tíbia, os animais não apresentaram diferença estatística entre si ($p>0,05$). A glicemia de jejum dos animais dos grupos DM60 e DM70 foi maior do que o controle, apresentando aumento significativo ($p<0,05$). A concentração de insulina diminuiu conforme o aumento da dosagem de STZ nos animais. As concentrações sanguíneas de proteínas totais e albumina foram maiores nos animais do grupo controle quando comparados aos animais dos grupos diabéticos ($p<0,05$). Não houve diferença estatística no perfil lipídico e cálcio entre os animais dos grupos experimentais ($p>0,05$). Ambas as doses de STZ causaram efeitos diabetogênicos, porém, relativamente diferentes entre si sugerindo que esse modelo pode se mostrar apropriado para diferentes tipos de Diabetes, como por exemplo tipo 1 e tipo 2, dependendo da dose utilizada.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, estreptozotocina, ratos

ABSTRACT

Considering that the induction of experimental Diabetes can be performed with streptozotocin (STZ), the objective of this study is to describe the effects of two doses of STZ (60mg / kg and 70mg / kg) on the metabolism of Wistar rats. Twenty-four Wistar rats were randomly divided into three groups (n = 8 each): Non-diabetic (C), diabetic control induced with 60 mg / kg body weight of STZ (DM60) and diabetic induced with 70 mg / Kg of STZ body weight (DM70). The biochemical analyzes were glycemia, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, insulin, total proteins, albumin and calcium. The animals of the diabetic groups induced with STZ in both doses presented a significant increase ($p < 0.05$) in food consumption in relation to the control group. The animals of the DM70 group showed a significant difference ($p < 0.001$) in relation to the other groups in relation to body weight. The weight of the heart corrected for tibia length between the animals was statistically different ($p < 0.5$) between the control group in relation to DM60 and DM70. In liver weight corrected for tibia length, there was a statistical difference ($p < 0.05$) between the control group and the DM70 group, and between DM60 and DM70 ($p < 0.05$). Regarding the weight of the left kidney, corrected for the length of the tibia, the animals presented no statistical difference between them ($p > 0.05$). The fasting glycemia of DM60 and DM70 animals was higher than control, showing a significant increase ($p < 0.05$). The insulin concentration decreased as the STZ dosage increased in the animals. The blood concentrations of total proteins and albumin were higher in the control group than in the diabetic group ($p < 0.05$). There was no statistical difference in the lipid profile and calcium among the animals of the experimental groups ($p > 0.05$). Both doses of STZ caused diabetogenic effects, however, relatively different from each other suggesting that this model may be appropriate for different types of Diabetes, such as type 1 and type 2 depending on the dose used.

Keywords: Diabetes mellitus, streptozotocin, rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Prevalência mundial de Diabetes.....	1
Figura 2 Secreção de insulina.....	5
Figura 3 Estrutura química da estreptozotocina.....	7
Figura 4 Desenho experimental do estudo.....	12
Figura 5 <i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar.....	15
Figura 6 Comparação entre os animais do grupo controle e Diabético.....	16

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 Classificação etiologia do Diabetes <i>mellitus</i>	3
---	---

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Consumo alimentar.....	15
Gráfico 2. Peso corporal.....	18
Gráfico 3. Peso do coração.....	19
Gráfico 4. Peso do coração/comprimento da tibia.....	19
Gráfico 5. Peso do fígado.....	20
Gráfico 6. Peso do fígado/comprimento da tibia.....	21
Gráfico 7. Peso do rim.....	22
Gráfico 8. Peso do rim corrigido /comprimento da tibia.....	22
Gráfico 9. Glicemia.....	23
Gráfico 10. Insulina.....	24
Gráfico 11. Proteínas totais.....	25
Gráfico 12. Albumina.....	26
Gráfico 13 Colesterol total.....	27
Gráfico14. HDL.....	27
Gráfico 15. Triglicerídeos.....	27
Gráfico 16. Cálcio sérico.....	28

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP- Trifosfato de adenosina

C - Grupo controle não diabético

CEUA - Comitê de ética em Experimentação Animal

CECAL-Centro de Criação de animais de laboratório

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DM - Diabetes mellitus

DM1 - Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 - Diabetes *mellitus* tipo 2

DM60- animais induzidos com STZ na dose de 60mg/Kg

DM70-animais induzidos com STZ na dose de 70 mg/Kg

EPM - Erro Padrão da Média

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GLUT – Transportador de glicose específico

GLUT-2 –Transportador de glicose 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

STZ – Estreptozotocina

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de Gráficos	x
Lista de abreviações e siglas.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 DIABETES MELLITUS	1
1.1.1 Definição, prevalência e complicações.....	1
1.1.2 Classificação e fisiopatologia.....	3
1.1.3 Secreção de insulina.....	5
1.1.4 Diagnóstico e Tratamento.....	6
1.2 MODELO EXPERIMENTAL PARA DIABETES MELLITUS.....	6
2 OBJETIVOS.....	8
2.1 OBJETIVO GERAL.....	8
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	8
3 METODOLOGIA.....	9
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	9
3.2 BIOSSEGURANÇA.....	9
3.3 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL.....	9
3.4 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DO SORO	11
3.5 COLETA E PESAGEM DOS ÓRGÃOS.....	11
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	12
3.6.1 Glicemia.....	12
3.6.2 Perfil lipídico.....	13

3.6.3 Insulina.....	13
3.6.4 Proteínas totais, albumina.....	14
3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4.1 ENSAIO BIOLÓGICO.....	15
4.1.1 Consumo alimentar.....	15
4.1.2 Peso corporal.....	18
4.1.3 Peso dos órgãos.....	19
4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	23
4.3.1 Glicemia.....	23
4.3.2 Insulina.....	24
4.3.3 Proteínas totais e albumina.....	25
4.3.4 Perfil lipídico.....	26
4.3.5 Cálcio.....	28
5 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXO A. APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEUA) UNIRIO.....	35
ANEXO B. Coleta de resíduos.....	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

1.1.1 Definição, prevalência e complicações

O termo “Diabetes *mellitus*” (DM) refere-se a um transtorno metabólico de etiologias heterogêneas, caracterizado por hiperglicemia e distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, resultantes de anormalidades na secreção e/ou da ação da insulina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Dentre as desordens metabólicas, o DM tem sido considerado uma das grandes epidemias mundiais deste século (HENRIQUES et al. 2013). Estima-se que 1 em cada 11 adultos no mundo tem Diabetes, o que equivale a 415 milhões de casos, sendo estimados 11,6% do total dos gastos mundialmente com atenção em saúde em 2010 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Estimated number of people with diabetes worldwide and per region in 2015 and 2040 (20-79 years)

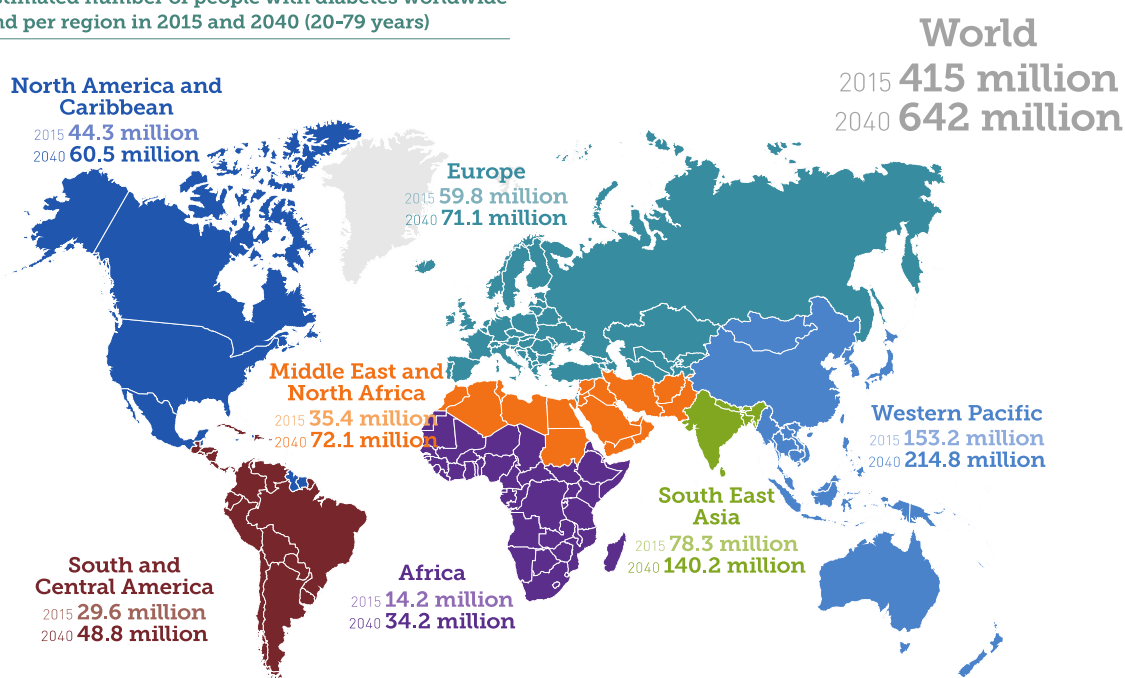


Figura 1 Prevalência mundial de Diabetes. Fonte: INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o Diabetes está entre as dez principais causas de morte no mundo.

O diabetes também é um importante preditor de mortes prematuras e está associado com o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (MALTA et al. 2014).

A hiperglicemia persistente no Diabetes *mellitus* leva a complicações microvasculares, predominando a retinopatia, nefropatia e neuropatias debilitantes, e a complicações macrovasculares, como o acidente vascular cerebral, doenças que afetam artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores (SILVA e NOGUEIRA, 2015). Os sintomas da hiperglicemia acentuada no paciente diabético incluem poliúria (aumento do volume urinário) polidipsia (aumento da ingestão hídrica), polifagia (aumento da ingestão alimentar) e significativa perda de peso (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Além disso, o Diabetes é a principal causa de internações por complicações como doença cardiovascular, diálise por insuficiência renal crônica e amputações de membros inferiores (HENRIQUES et al. 2013). Sua natureza crônica, a gravidade das complicações e os meios necessários para controlá-las tornam o DM uma doença muito onerosa não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, como custos intangíveis como dor, ansiedade, inconveniência e perda de qualidade de vida mas também para o sistema de saúde (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2015).

Entre os fatores de risco de natureza modificável, encontram-se aqueles passíveis de intervenções ou controle, como: o excesso de peso pelo Índice de Massa Corporal (IMC) - $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$, o sedentarismo, o nível de HDL-c baixo e/ou de triglicérides elevados, a hipertensão arterial e uso de medicação hiperglicemiante (VILARINHO et al. 2008).

Por outro lado, os principais fatores de risco não modificáveis são: a idade, o histórico familiar de DM, a ocorrência do diabetes gestacional prévio, a história de macrossomia fetal e a ocorrência de abortos de repetição ou mortalidade perinatal (CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES 2001; VILARINHO et al. 2008).

Com isso, o número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência de pacientes com DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2015).

Portanto torna-se imprescindível a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do DM e de suas complicações, à procura de um tratamento capaz de contribuir às alterações endócrino-metabólicas causadas pela doença e, principalmente, às lesões crônicas sobre os diferentes órgãos (LERCO et al. 2003; SILVA e NOGUEIRA, 2015).

1.1.2 Classificação e fisiopatologia

As diretrizes nacionais e internacionais recomendam a classificação do DM em quatro categorias (Quadro 1): DM tipo 1 (DM 1), DM tipo 2 (DM 2), outros tipos e Diabetes Gestacional (MARASCHI et al. 2010).

Quadro 1. Classificação etiológica do Diabetes *mellitus*

I. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 -Mediado imunologicamente - Idiopático
II. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
III. Outros tipos específicos -Defeitos genéticos da função da célula β (MODY, DNA mitocondrial) -Defeitos genéticos na ação da insulina (diabete lipoatrófico) -Doenças do pâncreas exócrino (pancreatite, hemocromatose) -Endocrinopatias (acromegalia, síndrome de Cushing) -Induzido por drogas (glicocorticóides, tiazídicos) -Infecções (citomegalovírus, Rubéola congênita) -Formas imunológicas incomuns (anticorpos contra receptor da insulina) -Outras síndromes genéticas (síndrome de Down, Turner, Prader Willi)
IV. Diabetes <i>mellitus</i> gestacional

Fonte: Adaptado de (MARASCHI et al. 2010)

O DM 1 é responsável por cerca de 5% a 10% de todos os casos de DM. A apresentação de DM1 geralmente é abrupta, com maior incidência na infância e na adolescência (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). O termo “tipo 1” indica o processo de destruição da célula beta que leva ao estágio de deficiência absoluta de insulina, quando a administração de insulina é necessária para prevenir a cetoacidose. A destruição das células beta é geralmente causada por um processo autoimune (tipo 1 autoimune ou tipo 1A) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Com isso, relaciona-se a destruição das células beta pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, devido a uma resposta auto-imune causada pelas células auto-reativas T-helper 1 (Th1). Como resultado, as células Th1 inibem a proteção natural das células beta pancreáticas, ocorrendo aumento da secreção de citocinas, interleucinas pró inflamatórias e interferon, causando inflamação e necrose de tais células (MONTI et al. 2009). O tratamento da doença quando estabelecida é baseado na aplicação de insulina exógena para manter o nível glicêmico o mais próximo do normal (SABBAG, 2000).

Por outro lado, o termo “tipo 2” é usado para designar uma deficiência relativa de insulina, isto é, há um estado de resistência à ação da insulina, associado a deficiência na sua secreção. A resistência à insulina é definida como uma resposta biológica subnormal a uma determinada concentração desse hormônio (FRAGA et al. 2012). Nesse tipo, a habilidade da célula beta em responder à glicose com liberação de insulina está prejudicada. Além disto, a sensibilidade à insulina também está reduzida (insulinorresistência) em relação aos tecidos periféricos, principalmente tecido muscular e adiposo (SABBAG, 2000). Manifesta-se, em geral, em adultos, costuma ter início insidioso e apresentar sintomas mais brandos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). É responsável por mais de 90% dos casos, não tem componente autoimune, acontece em geral após os 30 anos, em indivíduos com história familiar positiva (MARASCHI et al. 2010).

Independente da classificação, a principal característica do DM é a manutenção da glicemia em níveis acima dos valores considerados normais (FRAGA et al. 2012).

1.1.3 Secreção de insulina

A insulina é um hormônio anabólico que pode regular a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo (CARVALHEIRA et al. 2002).

O aumento da concentração de glicose sanguínea é o controlador primário da secreção de insulina (Figura 2) pelas células beta pancreáticas (GUYTON; HALL, 2011). Tais células apresentam transportadores de glicose (GLUT-2) que permitem uma taxa de influxo de glicose proporcional à concentração sérica na faixa fisiológica.

Assim, quando a glicose sanguínea aumenta, esses transportadores carregam a glicose para dentro das células beta, onde é convertida em glicose-6-fosfato pela hexocinase IV (glicocinase), sendo direcionado para a via da glicólise (FRAGA et al. 2012). Com a taxa de catabolismo da glicose mais alta, a concentração de trifosfato de adenosina (ATP) aumenta, causando o fechamento dos canais de K^+ controlados por ATP na membrana plasmática. Essa despolarização abre canais de cálcio controlados por voltagem e o aumento resultante na concentração citosólica deste mineral desencadeia a liberação de insulina por exocitose (LEHNINGER, 2011; FRAGA et al. 2012).

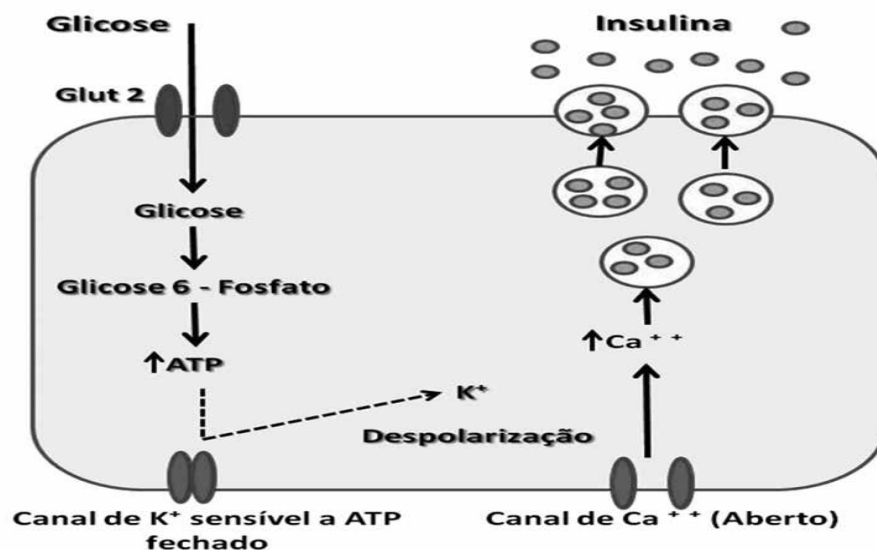


Figura 2 Secreção de insulina. Mecanismo primário de estímulo da glicose na secreção da insulina pelas células beta do pâncreas. GLUT 2 : Transportador de glicose tipo 2; ATP: Trifosfato de adenosina. Fonte: FRAGA et al. 2012.

1.1.4 Diagnóstico e tratamento

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015) atualmente são três os critérios aceitos para o diagnóstico do DM com utilização da glicemia. Os Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal, acrescidos de glicemia casual ≥ 200 mg/dL, Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL. Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia. Glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2015).

O tratamento deve estar associado a mudanças no estilo de vida, através da alteração de comportamentos como o tabagismo, inatividade física e maus hábitos alimentares, e utilizando estratégias para controle de forma rápida ou aguda, no caso do uso de fármacos (DA SILVA, 2012).

Assim, os tratamentos atuais para DM incluem a insulinoterapia, através do uso da insulina exógena, e a administração de drogas alopáticas como sulfoniluréias (glibenclamida), biguanidas (metformina) e inibidores da alfa-glicosidase (acarbose e miglitol), podendo ou não ser administradas em conjunto (VAREDA, 2013).

1.2 MODELO EXPERIMENTAL PARA DIABETES *MELLITUS*

A indução ao Diabetes experimental pode ser realizada em animais por cirurgia, infecção viral, administração de dietas e agentes químicos ou a doença se desenvolver de forma espontânea, como nos ratos diabéticos não obesos (NOD) (SABBAG, 2000). Os modelos animais de diabetes têm sido usados extensivamente na obtenção do esclarecimento sobre esta doença (KIRSTEN et al. 2010).

O método mais comumente utilizado na indução química se dá através da administração dos tóxicos aloxana ou estreptozotocina (DELFINO, 2002). Estas drogas demonstraram serem altamente seletivas, citotóxicas para a célula beta e potentes substâncias diabetogênicas (SABBAG, 2000). Os mecanismos de lesão seletiva das células pancreáticas são idênticos em ambos, sendo causados por necrose celular (LENZEN, 2008).

A estreptozotocina (STZ) é um glicosídeo nitrosuréia natural, (N-metil-N nitrosouréia) (Figura 3) isolado do fungo *Streptomyces achromogenes*, que estimula a produção de radicais livres, levando a destruição e disjunção das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas (LENZEN, 2008; NEGRI, 2005).

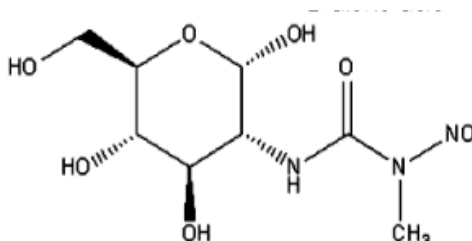


Figura 3 Estrutura química da Estreptozotocina. Fonte: adaptado de (LENZEN, 2008)

A STZ causa dano no ácido desoxirribonucléico (DNA), depletando a Nicotina Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺), que inibe a biossíntese e a secreção de insulina e, deste modo iniciam a morte das células β , através da depleção de energia (KIRSTEN et al. 2010). Uma vez que tais células são produtoras de insulina, quando utilizada em animais, determina uma severa deficiência da mesma, com quadro de hiperglicemia (VAREDA, 2013).

A dose destas drogas para indução do diabetes depende da espécie do animal e do seu peso (SZKUDELSKI, 2001; KIRSTEN et al. 2010). Estudos apontam doses eficientes de estreptozotocina para a indução de Diabetes experimental, como Rayat et al. (2000); Lerco et al. (2003); Lenzen (2008); Kirsten et al. (2010).

Segundo Lenzen (2008), os tratamentos com pequenas concentrações e em dias consecutivos ocasionam o aparecimento de lesões inflamatórias nas ilhotas pancreáticas através de reação imune mediada pelas células T. E Em doses subdiabetogênicas (40mg/kg) a STZ pode produzir insulite pancreática, com morte progressiva das células beta levando também ao diabetes mellitus (KIRSTEN et al. 2010). Segundo Lerco et al. (2003), a dose de 42mg/kg de peso corporal por via endovenosa em ratos *Wistar*, foi capaz de desenvolver alterações clínicas e laboratoriais bem definidas como elevação da ingestão hídrica e da diurese, glicose urinária, glicemia acima de 300mg/dL. Sua administração em ratos adultos produz sinais clínicos severos da doença, necessitando da administração de insulina quando os ratos precisam sobreviver por longo período (SILVA e NOGUEIRA, 2015).

Conforme Sabbag, (2000) compreendendo-se os mecanismos de ação dos agentes diabetogênicos, é possível elucidar não somente as causas do diabetes como sua prevenção. Todo o empenho científico em estabelecer modelos de estudo e novas técnicas, são desenvolvidas com o intuito de buscar caminhos para erradicar ou amenizar o problema de uma das doenças mais graves do nosso século (SILVA e NOGUEIRA, 2015).

Tendo em vista a grande diversidade de estudos realizados com dosagens variadas de STZ, o presente estudo permite a comparação de duas doses diferentes da droga, dentro da faixa diabetogênica, possibilitando avaliar seus efeitos bioquímicos e fisiopatológicos. Com isso, através dessa comparação, visa obter dados da dosagem que mais se assemelhe com os diferentes tipos da doença, e o tempo de experimento possível com os animais, descartando efeitos propiciados por uma dosagem incoerente e estabelecendo com isso, a influência da droga no efeito ocasionado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Comparar os efeitos de duas doses de STZ no metabolismo de ratos *Wistar*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar o ganho de peso e o consumo de ração dos animais.
- Comparar os efeitos de duas doses diferentes de STZ nos parâmetros bioquímicos, tais como: glicemia, perfil lipídico (colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos), insulina, proteínas totais, albumina e cálcio.
- Comparar o peso dos órgãos entre os grupos experimentais.
- Analisar o índice de hipertrofia dos órgãos dos animais

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais foram realizados segundo as normas preconizadas no “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Institute of Laboratory Animals Resources, National Academy of Science, Washington, D.C., 1996), pelos princípios éticos estabelecidos pela Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e pela legislação nacional para vivissecção animal em vigor (Lei 11.794, de 08.10.2008 e Lei 9.605, de 12.02.98).

O projeto em questão foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEUA da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO (parecer de número 001/ 2014 – ANEXO 1).

3.2 BIOSSEGURANÇA

Durante a execução do experimento, os pesquisadores envolvidos usaram luvas de procedimentos cirúrgicos e jalecos para sua proteção individual, além de máscaras e óculos de proteção, quando necessário.

Em relação aos resíduos biológicos gerados, as carcaças dos animais, bem como materiais perfuro cortantes como seringas e agulhas, foram descartados conforme procedimento padrão exigido pelo CEUA- UNIRIO. O material foi coletado por empresa de descarte especializada (2MC Transportes de resíduos, CNPJ: 07.941.147/0001-25 – Comprovante da coleta/ ANEXO 2).

3.3 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado no biotério do Instituto Biomédico da UNIRIO. Foram utilizados 24 *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos, recém-desmamados com 21 dias de idade provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Durante o experimento os animais foram mantidos em caixas plásticas de polipropileno (4 animais por caixa), em sala climatizada com temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Após um período de aclimação (3 dias), os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=8 cada): Controle não diabético (C), diabético induzido com 60 mg/Kg de peso corporal de STZ (DM60) e diabético induzido com 70 mg/Kg de peso corporal de STZ (DM70).

A indução do DM foi realizada em dois grupos por meio da administração intraperitoneal, em dose única, da droga estreptozotocina (STZ), na dosagem de 60 e 70 mg/Kg de peso do animal (*Streptozotocin – marca Sigma Life Science, USA, Lote SLBH0076V, Código: 1001651091*), dissolvida em 1 mL de tampão citrato de sódio (10 mM e pH 4,5) (LERCO et al. 2003; MACHADO et al. 2000). Após jejum alimentar de 12 horas com acesso livre à água, procedeu-se a administração da droga. Dada a similaridade entre as moléculas de glicose e STZ e a sua competição pelo transportador de glicose tipo 2 (GLUT-2), esperou-se 30 minutos após a indução para que os animais tivessem livre acesso à ração, de forma a evitar a internalização da glicose ao invés da droga diabetogênica (SZKULDESKI, 2001). O grupo controle (animais não diabéticos) foi submetido ao mesmo procedimento de indução, porém, foi administrado apenas citrato de sódio (tampão citrato).

No quinto dia após indução, foi realizada por meio da determinação da glicemia de jejum utilizando tiras reagentes *accu-chek (Contour TS, sistema para monitoramento de glicose sanguínea, Bayer HealthCare LLC, EUA, Lote: DW4DM3E52B, Validade 04/2016, Registro na ANVISA do Medidor: 80384380012; Lancetador: 80384380013; Lancetas: 8038480010; Tiras de teste: 80384380008)*.

Foram considerados diabéticos somente animais que apresentaram glicemia maior ou igual a 250 mg/dL (LERCO et al. 2003). Ao longo do período experimental, a cada 2 dias, novas avaliações da glicemia foram realizadas para acompanhamento da glicemia.

O consumo de ração foi mensurado por caixa, com a ração colocada em um recipiente de plástico sobre uma balança semianalítica, da marca Marte (modelo BL3200H), capacidade de pesagem até 3200g com resolução de 4 casas decimais, tarada, e os valores anotados para controle.

O peso corporal foi mensurado, individualmente, com os animais acomodados em um recipiente de plástico e colocados sobre a mesma, tarada, sendo os valores anotados para controle do peso. A água e a ração padrão para ratos (marca *Purina*) foram oferecidas *ad libitum*. Tanto o peso corporal quanto o consumo de ração foram monitorados duas vezes por semana

3.4 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DO SORO

Ao término do período experimental, a eutanásia dos animais foi realizada por punção cardíaca, com anestesia intraperitoneal de tiopental diluído em água destilada (50 mg/kg). Realizou-se a coleta de amostras de sangue total em tubos de polipropileno com anticoagulante EDTA. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3000 RPM por 10 min e mantido a -20°C para análises posteriores.

3.5 COLETA E PESAGEM DOS ÓRGÃOS

Ao término da retirada total de sangue do coração e seu armazenamento, foi realizada uma necropsia de todos os animais, coletando-se o fígado, coração, rins e tíbias. As tíbias esquerdas foram medidas para posterior determinação dos índices de hipertrofia cardíaca, renal e hepática. Os demais órgãos foram pesados individualmente em balança semianalítica (Marte, modelo BL3200H, capacidade: 3200g; 4 casas decimais).

Em seguida todos os órgãos foram envoltos em papel alumínio e mantidos em conservação em nitrogênio líquido até serem armazenados em biofreezer a -80°C.

O índice de hipertrofia dos órgãos estudados foi calculado pela equação (g.cm^{-1}): razão da massa do órgão pelo comprimento da tíbia (YIN et al. 1982).

O experimento teve duração total de 28 dias. O desenho experimental está descrito na Figura 4.

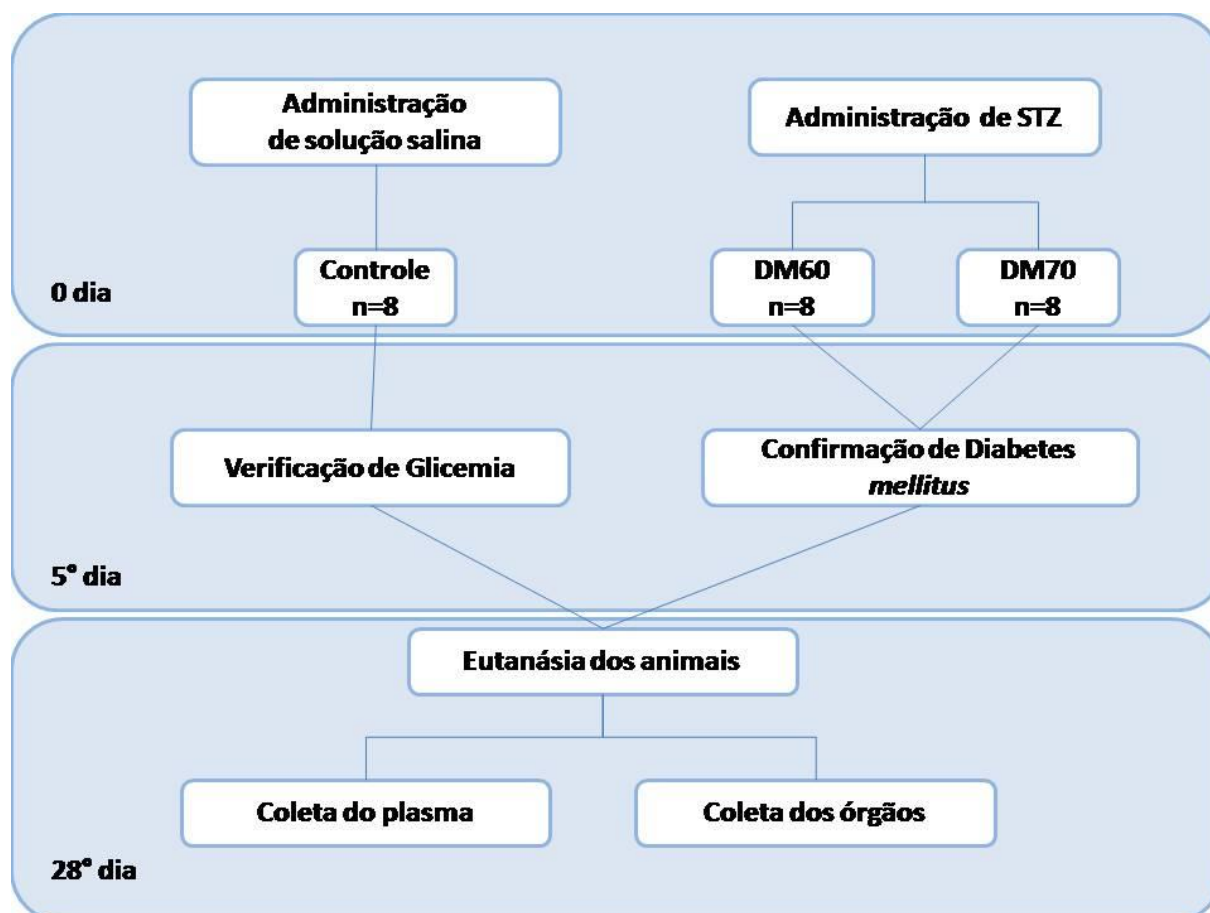


Figura 4 Desenho experimental do estudo.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Bioquímica, localizado no Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO.

3.6.1 Glicemia

Coletou-se sangue da cauda dos animais para a análise de glicemia com uso de glicosímetro portátil (sistema de monitoramento de glicose sanguínea), conforme instruções descritas no equipamento, (Contour TS, Bayer HealthCare LLC, EUA) para a confirmação do diabetes, semanalmente durante o experimento e no dia da eutanásia. Nesta dosagem, o sangue foi coletado após jejum de 12 horas.

A dosagem de glicose de jejum foi avaliada no soro dos animais, em duplicata, por método enzimático colorimétrico através de *Kits Labtest* LTDA, conforme as instruções descritas pelo fabricante (Ref.:133, Registro no Ministério da Saúde: 10009010236, Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil).

O procedimento foi realizado em sistema automático, através de equipamento analisador automático capaz de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm (Autoanalisador *ChemWell®*, Katal, Intertec, São Paulo, Brasil). A média da variação intra-ensaio da glicose no kit utilizado é de 0,98%, e inter-ensaio de 1,89%.

3.6.2 Perfil lipídico

O perfil lipídico foi avaliado em duplicata, por meio da determinação dos triglicerídeos, colesterol total e HDL no soro dos animais. As dosagens foram realizadas através de *Kits Labtest*, por método enzimático colorimétrico conforme as instruções descritas pelo fabricante (Respectivamente, Ref.: 087, Registro no Ministério da Saúde: 10009010070; Ref.: 076, Registro no Ministério da Saúde: 10009010068; Ref.: 128, Registro no Ministério da Saúde: 10009010231, Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil).

Os procedimentos foram realizados em sistema automático, através de equipamento analisador automático capaz de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm (Autoanalisador *ChemWell®*, Katal, Intertec, São Paulo, Brasil). A média da variação biológica dos kits utilizados foram as seguintes: Triglicerídeos – intra-ensaio: 1,31%, inter-ensaio: 1,81%; Colesterol Total – intra-ensaio: 1,3%, inter-ensaio: 2,23%; HDL – intra-ensaio: 0,9%, inter-ensaio: 2,36%.

3.6.3 Insulina

A análise de insulina foi realizada em duplicata no soro dos animais, por meio de *Kit* de imunensaio ligado à enzima (ELISA), conforme instruções descritas pelo fabricante. Dados do *kit*: Insulina para Ratos *Kit* ELISA - Código do produto: EZRMI-13K, Lote: 2517655, fabricante *Merck Millipore Corporation*, Darmstadt, Alemanha, distribuído no Brasil por Genese produtos diagnósticos LTDA, São Paulo. A análise foi realizada através de equipamento Autoanalisador (*ChemWell®*, Katal, Intertec, São Paulo, Brasil). As médias da variação biológica do kit utilizado foram as seguintes: intra-ensaio: 4,64%, inter-ensaio: 11,95%.

3.6.4 Proteínas totais, Albumina e Cálcio

As análises de Proteínas totais, albumina e cálcio foram realizadas em duplicata, no soro dos animais, por meio de *Kits Labtest* seguindo as instruções descritas pelo fabricante (respectivamente, Ref.: 99, Registro no Ministério da Saúde: 10009010080; Ref.: 19, Registro no Ministério da Saúde: 10009010025; Ref.: 90, Registro no Ministério da Saúde: 10009010067, *Labtest Diagnóstica S.A.*, Minas Gerais, Brasil). Os procedimentos foram realizados em sistema automático, através de equipamento analisador automático capaz de medir com exatidão a absorvância entre 490 e 520 nm. (Autoanalisador *ChemWell®*, Katal, Interteck, São Paulo, Brasil).

A variação biológica média dos kits foram as seguintes: Proteínas totais - intra-ensaio: 0,62%, inter-ensaio: 0,96%; Albumina - intra-ensaio: 1,05%, inter-ensaio: 1,65%; Cálcio – intra-ensaio: 0,77%, inter-ensaio: 1,07%.

3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram representados como média e erro padrão da média (EPM) e avaliados através de análise de variância ANOVA, sendo utilizado o teste de Newman-Keuls para o confronto das médias. O *software* utilizado foi o GraphPad 5 ® (*for Windows*), considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre as médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização do presente trabalho, utilizou-se um modelo animal preconizado por pesquisas experimentais prévias de diabetes, tendo em vista que os modelos experimentais de diabetes induzidos em ratos têm sido amplamente utilizados por pesquisadores em todo o mundo. Assim, foi utilizado o *Rattus norvegicus* (figura 5) como modelo experimental, por se tratar de espécie bem conhecida de se trabalhar e por apresentarem semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o diabetes humano. (LERCO et al. 2003)

Além disso, sua utilização permite que se trabalhe com uma grande quantidade de animais e o fato de apresentarem uniformidade genética. (KIRSTEN et al. 2010).



Figura 5 Foto dos *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, no primeiro dia de experimento.

4.1 ENSAIO BIOLÓGICO

4.1.1 Consumo alimentar

O Gráfico 1 demonstra os resultados obtidos do consumo alimentar dos animais do experimento a partir da indução do Diabetes.

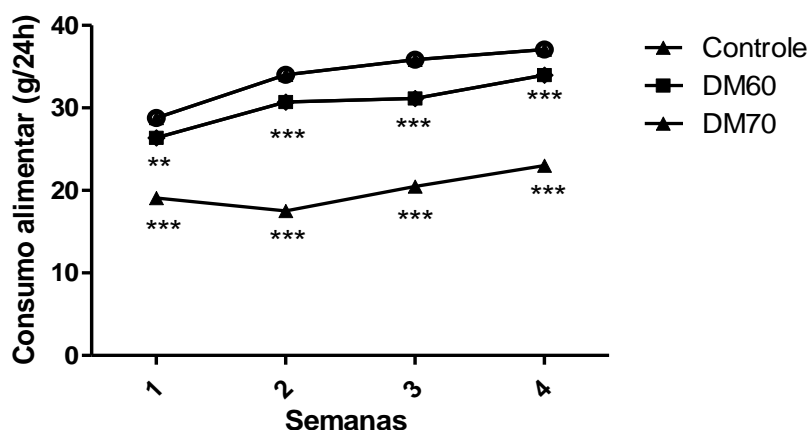


Gráfico 1. Consumo alimentar (g) dos ratos em 24h ao longo do experimento. Grupos: Controle; DM60 = animais que receberam 60mg/Kg de STZ; DM70=animais que receberam 70 mg/Kg de STZ.

Os animais dos grupos diabéticos induzidos com STZ em ambas as doses apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) de consumo alimentar (DM60 = $30,56 \pm 1,57g$; DM70 = $33,93 \pm 1,83g$) (Gráfico 1) em relação ao grupo controle (C = $20,02 \pm 1,17g$), porém, não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Neste experimento optou-se pelo uso de um método químico de supressão endócrina do pâncreas através da STZ, o qual exhibe todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico (DELFINO et al. 2002).

Segundo SALES et al. 2010, além de polidipsia e poliúria, um dos sintomas típicos de DM descompensado, consiste na polifagia. O aumento da ingestão alimentar, ou seja, polifagia, pode ser atribuída a distúrbios nos processos de regulação da fome pelo centro da saciedade, localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial, que necessita de insulina para a captação de glicose. Uma vez que a glicose é captada, o centro da fome é inibido.

Portanto, em situações como o diabetes, onde ocorre ausência de insulina, o núcleo hipotalâmico ventro-medial não capta glicose e o centro da fome, portanto, não é inibido. Esta área, uma vez não inibida, sinaliza falta de glicose e fome, estimulando assim a maior ingestão alimentar (VAREDA, 2013). O que corrobora com o estudo de Lerco et al. (2003).

Além disso, os animais diabéticos apresentaram, visivelmente (Figura 6), poliúria, polidipsia e polifagia, além de apatia, alterações na pelagem e odor forte da urina, condizentes com os sintomas encontrados em outros estudos como Gomes, (2006) e Lerco et al. (2003). Tais características foram mais intensas nos animais do grupo DM 70 quando comparados aos animais do grupo DM60.

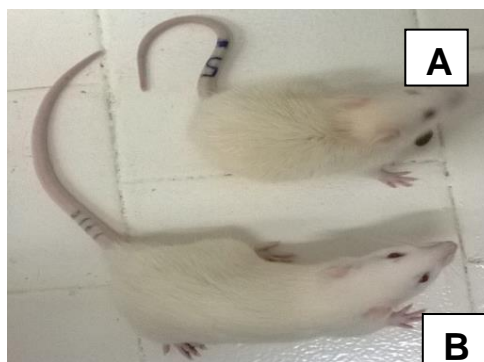


Figura 6 Comparação entre os animais do grupo controle e Diabético . Controle = animal indicado por (A) e Diabético= animal indicado por (B).

Por outro lado, os animais do grupo controle deste experimento apresentaram-se mais ativos, com aparente ganho progressivo de peso e ingestão hídrica, reflexos conservados e diurese aparente normal, dentro dos padrões de normalidade para a espécie.

A partir dos dados observados, como desenvolvimento de alterações clínicas e laboratoriais bem definidas, incluindo a elevação da ingestão hídrica e da diurese e valores glicêmicos acima de 300 mg/dL, pode-se constatar que a indução do diabetes gerou um quadro hiperglicêmico em 100% dos animais que receberam ambas as doses de STZ.

Em relação à etiologia, não se pode afirmar que a indução do diabetes no modelo experimental estudado é do tipo 1 ou do tipo 2, pois os animais não apresentaram sinais determinantes correspondentes à nenhum tipo de diabetes em específico no período de tempo analisado pelo presente estudo.

Segundo Lerco et al. (2003); Sales (2011), a polidipsia presente nos animais diabéticos deve-se à hiperosmolaridade sangüínea, em razão de altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular a fim de manter o equilíbrio osmótico. Assim, a desidratação intracelular é percebida pelos osmorreceptores cerebrais, desencadeando sede intensa.

4.1.2 PESO CORPORAL

A partir da pesagem dos animais, (Gráfico 2) realizada de forma individual, obteve-se os seguintes resultados em valores expressos em média \pm erro padrão: Início do experimento (Semana 0): C= $92,7 \pm 4,2g$; DM 60= $103,1 \pm 1,4g$; DM70= $93,8 \pm 4,4g$; enquanto que os valores no final do experimento foram: (C= $275,0 \pm 8.428$; DM60= $265,5 \pm 5,385$; DM70= $160,4 \pm 7.803$).

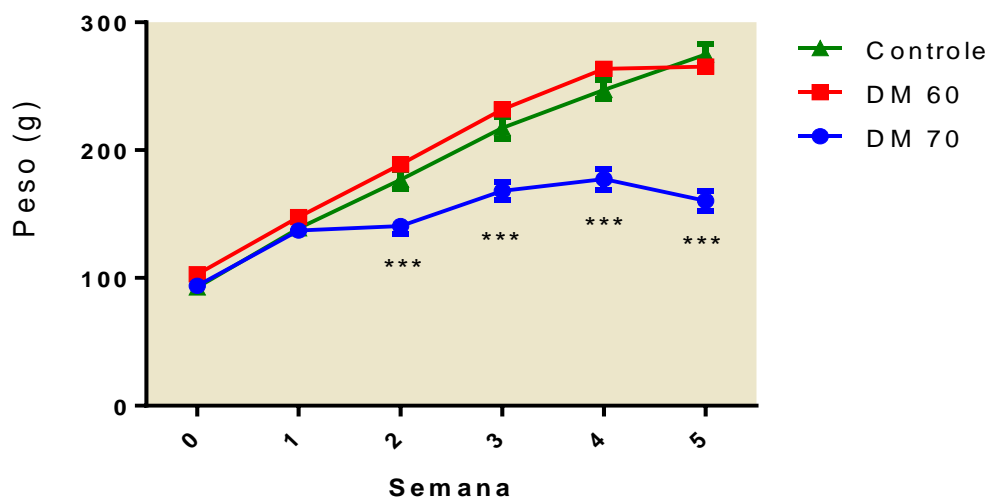


Gráfico 2. Peso corporal (g) dos ratos ao longo do experimento. Valores expressos em media \pm EPM. Grupos: Controle; DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ.

Conforme o (Gráfico 2) a partir da comparação das médias no momento inicial do experimento com o momento final (Semana 5), observou-se que após a indução com STZ, realizada entre a semana 1 e 2 do experimento, os animais do grupo DM70 apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle e ao DM60.

Segundo Sales (2011), a ausência de insulina para promover a captação de glicose pelas células dependentes de sua ação contribuiu para a manutenção de níveis elevados de glicemia e de estado de catabolismo aumentado, o que resultou na perda de peso, sendo essa perda maior nos animais que receberam a dose de 70 mg/Kg, e manutenção de polifagia. No estudo de Lerco et al. (2003), os animais apresentaram semelhanças ao longo do experimento, em relação a progressiva queda do estado geral, perda inicial de peso após a indução e ganho significativamente menor de peso em relação ao rato normal.

4.1.3. Peso dos órgãos

Em relação ao peso bruto do coração, todos os grupos experimentais apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$). A média do peso deste órgão foi maior ($p < 0,05$) no grupo controle quando comparado aos grupos diabéticos. Enquanto que entre os diabéticos, os animais do grupo DM60 apresentaram peso bruto do coração maior ($p < 0,05$) que os animais do grupo DM70 (C=0,960±0,026g; DM60=0,800±0,030g; DM70=0,687±0,026g) (Gráfico 3).

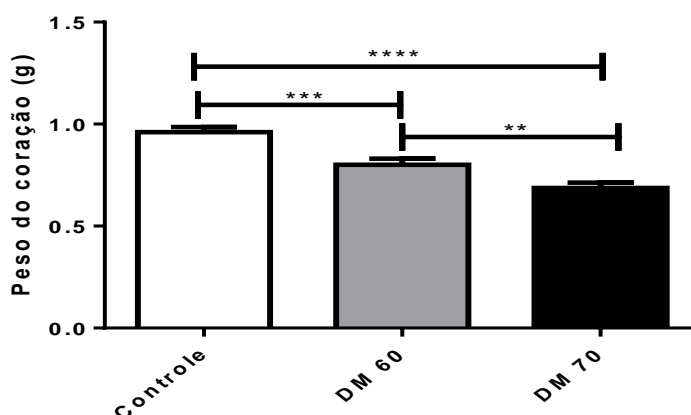


Gráfico 3. Peso do coração (g) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ. Os valores foram expressos considerando (* $p < 0,05$) (** $p < 0,01$) (***) $p < 0,001$)

O Gráfico 4 apresenta os resultados obtidos com relação entre o peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia.

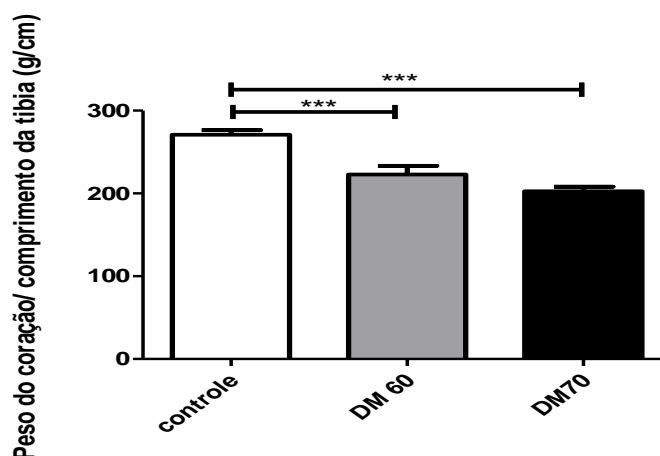


Gráfico 4. Peso do coração/comprimento da tíbia (g/cm) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ. Os valores foram expressos considerando (* $p < 0,05$) (** $p < 0,01$) (***) $p < 0,001$)

Entre os animais dos grupos experimentais, pode-se notar que houve diferença estatística ($p < 0,5$) entre o grupo controle em relação tanto ao grupo DM60 quanto ao DM70.

No peso bruto do fígado, (Gráfico 5) todos os grupos experimentais também apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

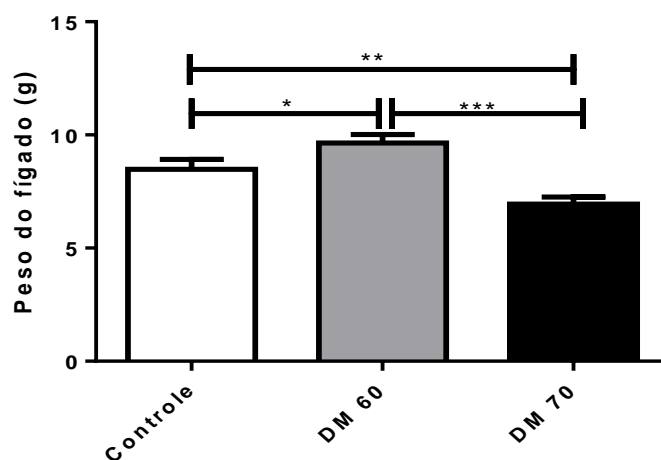


Gráfico 5. Peso do fígado. DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ. Os valores foram expressos considerando (* $p < 0,05$) (** $p < 0,01$) (** $p < 0,001$)

A média do peso deste órgão foi maior ($p < 0,05$) no grupo DM60 quando comparado tanto ao grupo controle quanto ao grupo DM70. Já o grupo DM70 apresentou a menor média comparada aos demais grupos ($p < 0,05$) (C=8,479±0,436; DM60=9,638±0,385; DM70=6,939±0,318)

Em relação ao peso do fígado corrigido pelo comprimento da tíbia (Gráfico 6) houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo DM70, e entre DM60 e DM70 ($p < 0,05$).

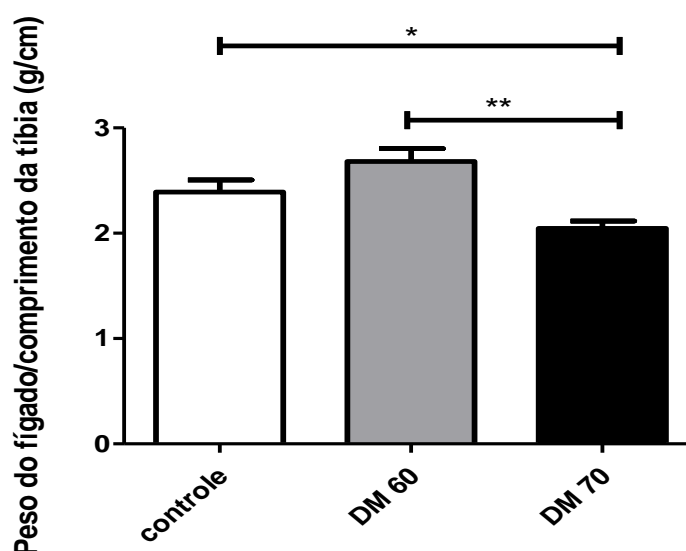


Gráfico 6. Peso do fígado/comprimento da tíbia (g/cm) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ. Os valores foram expressos considerando (* $p < 0,05$) (** $p < 0,01$) (***) $p < 0,001$)

Lucchesi et al. (2013) demonstrou em seu estudo que o DM é capaz de alterar o balanço oxidativo do fígado de ratos diabéticos, caracterizado pelo aumento significativo de Espécies Reativas de Oxigênio no tecido hepático. Dessa forma, a partir dos resultados observados pode-se sugerir que o fígado dos animais do presente estudo tenha passado por um processo inflamatório característico da doença.

Quanto ao peso bruto do rim esquerdo, os animais dos grupos experimentais não apresentaram diferença estatística entre si (C=1,153 ± 0,075; DM60=1,361 ± 0,059; DM70= 1,122 ± 0,131) ($p>0,05$) (Gráfico 7).

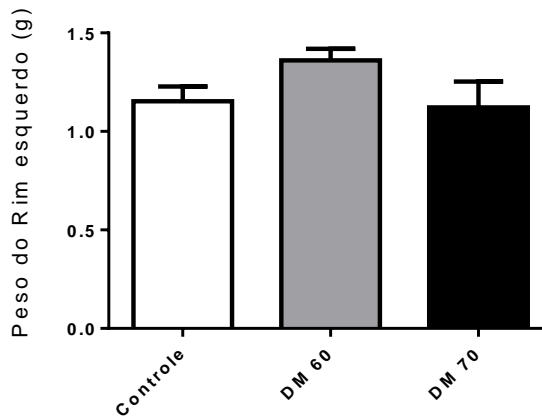


Gráfico 7. Peso do rim esquerdo (g). DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ. Os valores foram expressos considerando (* $p<0,05$) (** $p<0,01$) (***) $p<0,001$)

A comparação entre o peso do rim corrigido pelo comprimento da tíbia (Gráfico 8) demonstra que não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre todos os grupos do experimento.

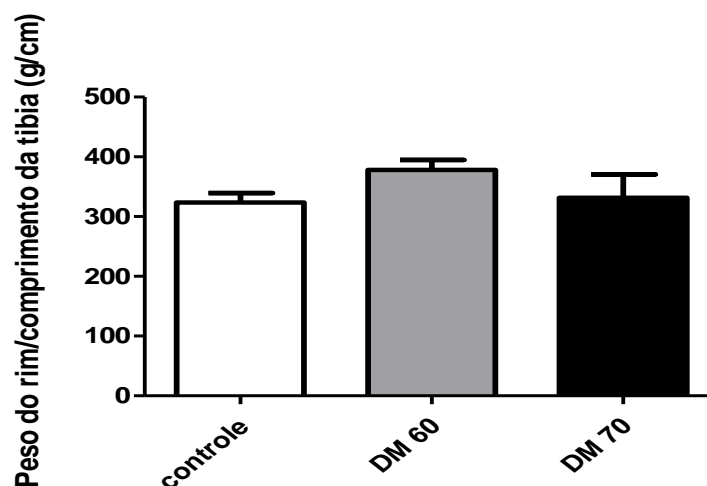


Gráfico 8. Peso do rim/comprimento da tíbia (g/cm) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ. Os valores foram expressos considerando (* $p<0,05$) (** $p<0,01$) (***) $p<0,001$)

Em relação à função renal, conforme literaturas citadas anteriormente como Lercio et al. (2003), Sales (2011), o diabetes *mellitus* é capaz de causar modificações renais, como albumina urinária, poliúria e hipertrofia renal que pode ser explicada devido à hiperfiltração glomerular e tubular proveniente da hiperglicemia. A poliúria instala-se quando a quantidade de glicose filtrada pelos rins ultrapassa a capacidade de reabsorção das células tubulares e a glicose aparece na urina, e pelo efeito osmótico da glicose presente no fluido tubular ocorre diurese osmótica (SALES, 2011). Apesar de tais modificações observadas nesses estudos, em relação à hipertrofia renal do presente estudo, esta não se mostrou condizente com tais achados anteriores. Vale ressaltar que ainda assim, houve menor concentração de albumina nos animais diabéticos bem como poliúria.

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.3.1 Glicemia

A glicemia de jejum (Gráfico 9) dos animais dos grupos DM60 e DM70 foi maior do que o controle, apresentando aumento significativo ($p < 0,05$) das concentrações séricas de glicose (C= $113,35 \pm 6,71$; DM60= $410,78 \pm 42,24$; DM70= $517,74 \pm 68,94$).

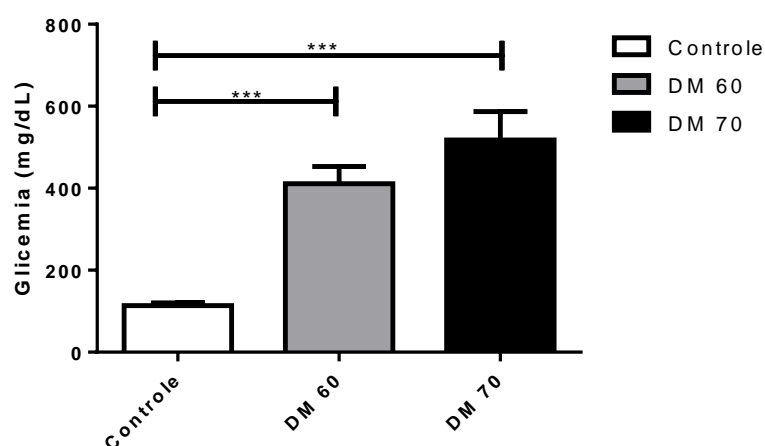


Gráfico 9. Glicemia (mg/dL). DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ. Os valores foram expressos considerando (* $p < 0,05$) (** $p < 0,01$) (***) $p < 0,001$)

Em relação à glicemia, o aumento do valor dos grupos de animais que receberam a Estreptozotocina tanto na dose de 60 mg/kg quanto na de 70 mg/kg foi semelhante a estudos como Silva et al. (2004); Nogueira-Junior et al. (2005) mostrando que as duas doses administradas, de fato, causam efeitos diabtogênicos. A hiperglicemia nos ratos diabéticos relaciona-se à destruição irreversível das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas pela droga e, que afeta a produção de insulina, resultando em hipoinsulinemia (HAMDEN et al. 2009).

Segundo Schnedl et al. (1994), o efeito citotóxico preferencial as células beta deve-se a similaridade entre a molécula de STZ e a molécula de glicose, o que faz com que a STZ seja internalizada via GLUT-2 presentes em hepatócitos, células epiteliais intestinais e renais, e astrócitos de alguns núcleos cerebrais.

4.3.2 Insulina

A concentração de insulina diminuiu conforme o aumento da dosagem de STZ nos animais. Quando comparado o grupo controle aos animais que receberam ambas as doses de STZ obteve-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). E em relação aos animais que receberam às doses diferentes, estes também apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,01$) (C=0,81 ± 0,15; DM60=0,35 ± 0,04; DM70=0,21 ± 0,02) (Gráfico 10).

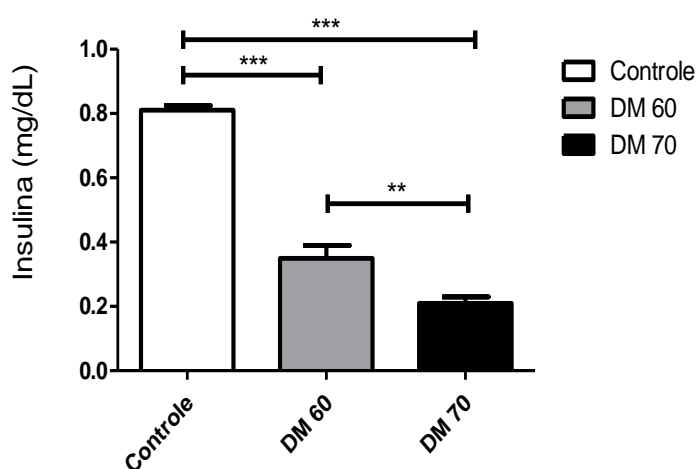


Gráfico 10. Insulina (mg/dL). DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ. Os valores foram expressos considerando (* $p < 0,05$) (** $p < 0,01$) (***) $p < 0,001$)

A falta de ação insulínica acarreta interrupção da síntese e aumento do catabolismo protéico, com esgotamento desses estoques e liberação de grandes quantidades de aminoácidos no plasma, utilizados para a produção de energia ou como substrato para a gliconeogênese (VOLPATO et al. 2006).

4.3.3 Proteínas totais e albumina

As concentrações sanguíneas de proteínas totais e albumina foram maiores nos animais do grupo controle quando comparados aos animais dos grupos diabéticos ($p < 0,05$). Além disso, essa diferença foi maior entre o grupo controle e o grupo DM70 ($p < 0,001$) comparando-se com o grupo DM60 ($p < 0,01$), para ambos os resultados (Gráficos 11 e 12).

Proteínas totais: C=5,46±0,17; DM60=4,85±0,09; DM70=4,71±0,09mg/dL;

Albumina:(C=3,19±0,08; DM60=2,84±0,03; DM70=2,84±0,06 mg/dL.

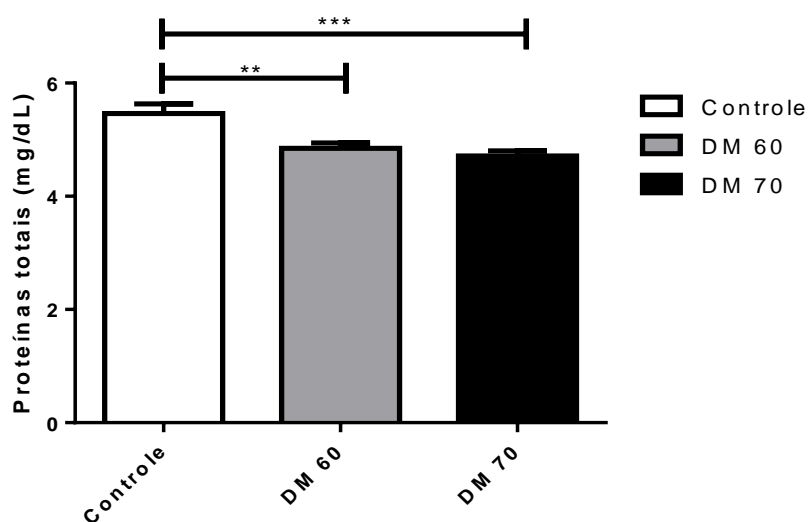


Gráfico 11. Proteínas totais (mg/dL) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ.

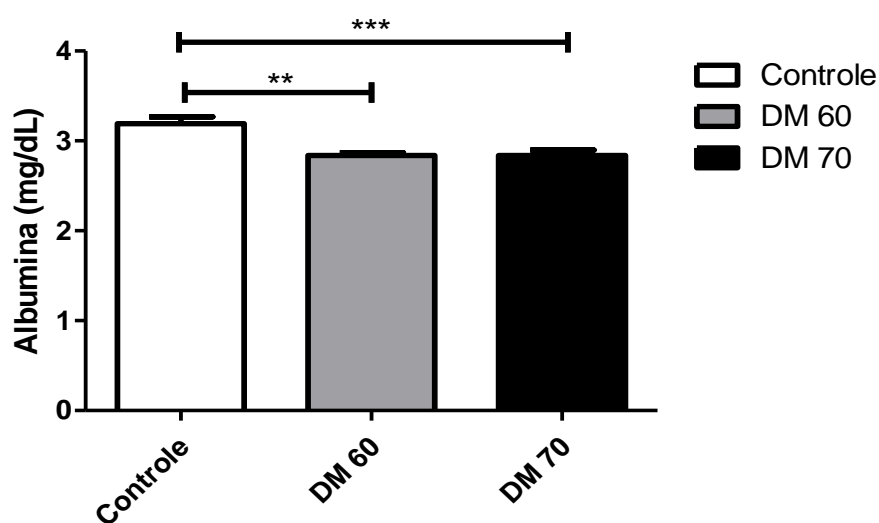


Gráfico 12. Albumina (mg/dL) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ.

Em relação a menor concentração de albumina nos animais diabéticos, poderia estar associada às glicações não enzimáticas causadas pelo estado de hiperglicemia do diabetes *mellitus*, diminuindo assim a concentração de albumina livre e aumentando a concentração de frutossamina (AHMED, 2005) e, possivelmente, a um processo inflamatório, visto que a albumina é um reagente de fase aguda negativa (NOGUEIRA JUNIOR et al. 2005).

4.3.4 Perfil lipídico (Colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos)

Não houve diferença estatística no perfil lipídico entre os animais dos grupos experimentais ($p > 0,05$) (Gráficos 13,14,15).

Colesterol total: C= $34,50 \pm 2,29$; DM60= $36,88 \pm 2,90$; DM70= $42,50 \pm 2,93$ mg/dL.

HDL-colesterol: C= $18,85 \pm 3,11$; DM60= $11,11 \pm 1,52$; DM70= $19,01 \pm 2,97$ mg/dL.

Triglicerídeos: C= $90,73 \pm 18,67$; DM60= $107,51 \pm 12,74$; DM70= $93,39 \pm 18,65$ mg/dL.

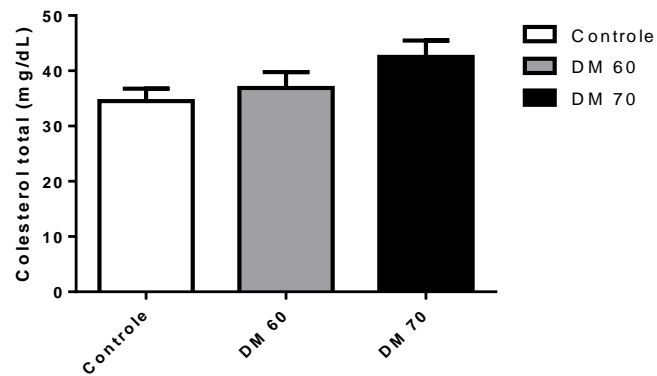


Gráfico 13. Colesterol total(mg/dL) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ.

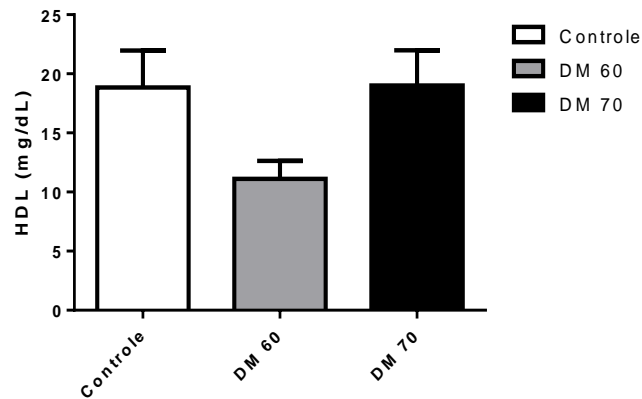


Gráfico 14. HDL (mg/dL) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ.

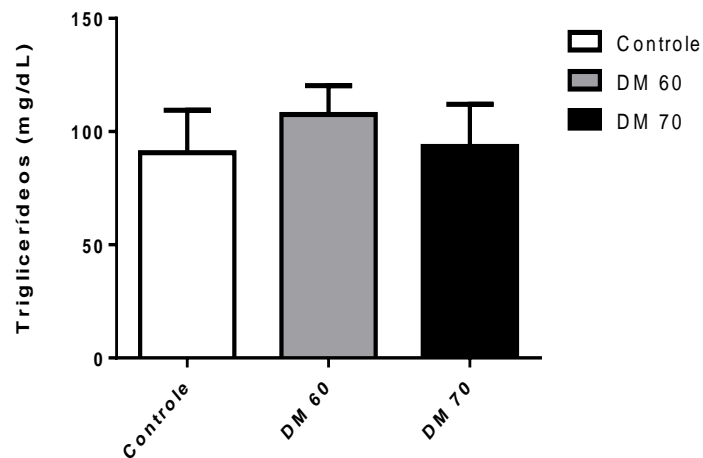


Gráfico 15. Triglicerídeos (mg/dL) DM60: animais induzidos com 60mg/Kg de STZ; DM70: animais induzidos com 70 mg/Kg de STZ.

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015), o perfil lipídico normalmente apresentado em portadores de diabetes consiste em hipertrigliceridemia e redução do HDL-c. Segundo Sales (2011), no DM induzido por STZ, o aumento dos níveis séricos de glicose é acompanhado pela elevação do colesterol e triglicerídeos plasmáticos. Contudo, os resultados observados no presente estudo relacionados ao perfil lipídico dos animais corroboram com o estudo de LERCO (2003), o qual os animais diabéticos não apresentaram alterações do perfil lipídico.

Portanto em se tratando de estudos posteriores utilizando-se desse modelo experimental, pode-se sugerir que este não seja o modelo mais apropriado para análise do perfil lipídico.

4.3.5 Cálcio

O cálcio intracelular é essencial para mediar a resposta insulínica nos tecidos muscular e adiposo; desse modo, alterações na concentração deste mineral nesses tecidos podem contribuir para elevar a resistência periférica à ação da insulina, via redução da transdução de sinal e redução na atividade do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) (SCHUCH et al. 2009).

Contudo, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais na concentração sanguínea de cálcio (Gráfico 16) (C= $13,15 \pm 0,86$; DM60= $13,46 \pm 0,57$; DM70= $14,14 \pm 1,17$ mg/dL).

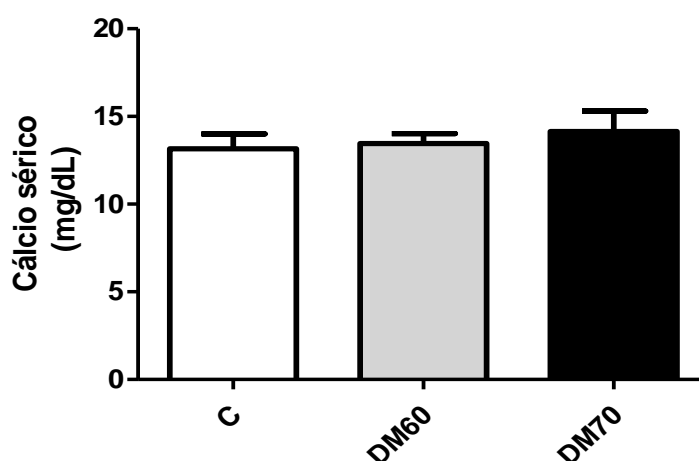


Gráfico 16. Cálcio sérico (mg/dL) C= Controle; DM60=animais que receberam 60mg/Kg de STZ; DM70=animais que receberam 70mg/Kg de STZ.

5 CONCLUSÃO

Ambas as doses de STZ causaram efeitos diabetogênicos, porém, relativamente diferentes entre si sugerindo que esse modelo pode se mostrar apropriado para diferentes tipos de Diabetes, como por exemplo, tipo 1 e tipo 2 dependendo da dose utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N. Advanced glycationendproducts-role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v.67, n.1, p.03-21, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.34, n.1, p.S62-S69, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, **Cadernos de Atenção Básica**. – Brasília: Ministério da Saúde, p.19 2013.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; MARIO J. A. SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol 46 nº 4, p.419-425 Agosto 2002

DA SILVA, L. A. **Efeito da ingestão aguda de cafeína na resposta glicêmica e insulínica em ratos diabéticos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com Universidade Estadual de Ponta Grossa, Guarapuava.

DELFINO V. D. A.; FIGUEIREDO, J. F.; MATSUO, T.; MARIA EMÍLIA FAVERO, M. E.; MATNI, A. M.; MOCELIN, A. J.; Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. **J Bras Nefrol**, v.24, n.1, p.31-36, 2002.

FRAGA, P. L.; MARTINI-SANTOS, B. J.; SEVERINO, B. N. S.; OLIVEIRA, M. R. S.; FRANÇA, G. R. A interface entre o Diabetes Mellitus tipo II e a hipertensão arterial sistêmica: aspectos bioquímicos. **Cadernos UniFOA**. Ed.20. Dez. 2012

GOMES, D. A. S. **Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos. Análise bioquímica, macroscópica, radiográfica e dos níveis de mieloperoxidase**. 2006. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Ed. Elsevier. 2006.

HAMDEN, K.; CARREAU, S.; JAMOSSI, K.; MILADI, S.; LAJMI, S.; ALOULOU, D.; AYADI, F.; ELFEKI, A. $1\alpha,25$ Dihydroxyvitamin D3: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, v.55, n.3, p.215-222, 2009.

HENRIQUES, G. S.; HELM, C. V.; SIMEONE, M. L. F. Comparação da glicemia de ratos feitos diabéticos por estreptozotocina e de ratos normais a partir da ingestão de dietas experimentais ricas em fibra alimentar de diferentes fontes. **Rev. Med. Res.**, Curitiba, v.15, n.4, p. 258-271, out./dez. 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes, 7ed. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2015. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>. Acessado em: 29 de Novembro de 2016.

KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina (Ribeirão Preto)**;43(1): p.3-10, 2010.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes **Diabetologia**, v. 51, p. 216–226, 2008

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras**, v.18, n.2, p.132-142, 2003.

LUCCHESI, A. N.; DE FREITAS, N. T.; CASSETTARI, L. L.; MARQUES, S. F. G.; SPADELLA, C. T. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 7, p. 502–508, 2013.

MALTA, D. C.; DE MOURA, L.; DO PRADO, R. R.; ESCALANTE, J. C.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Epidemiol Serv Saúde**, v.23, n.4, p.599-608, 2014.

MARASCHIN, J. F.; MURUSSI, N.; WITTER, V.; SILVEIRO, S. P. Classificação do Diabete Melito. Atualização Clínica. **Arq Bras Cardiol**; 95(2) : e40-e47, 2010

MONTI, P.; HENINGER, A.K.; BONIFACIO, E. Differentiation, expansion, and homeostasis of autoreactive T cells in type 1 diabetes mellitus. **Current Diabetes Reports**. v.9, p.113–8, 2009.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev Bras Cienc Farm**, v.41, n.2, p.121-142, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOGUEIRA JUNIOR, F. C.; COELHO, D. A.; ALMEIDA, M. M. C.; SILVA, T. C. P.; FERREIRA, E. C. S.; MACEDO, U. B. O.; NETO, F. P. F.; NETO, J. B.; ALMEIDA, M. G.; REZENDE, A. A. Efeito do tamoxifeno no perfil lipídico de ratos diabéticos por estreptozotocina. **Acta Cir Bras**, v.20, Suppl.1, p.69-75, 2005.

RAYAT, G.R.; SINGH, B.; KORBUTT, G.S.; RAJOTTE, R.V. Single injection of insulin delays the recurrence of diabetes in syngeneic islet-transplanted diabetic NOD mice. **Transplantation**. vol.70, nº6, Set. 27, p. 976-985, 2000

SABBAG, A. R. N. **Ação da Nicotinamida e da Estreptozotocina no processo estímulo secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2000

SALES, A. L. C. C.; TEIXEIRA, J. M. R.; SOARES, L. F. M.; DAMASCENO, D. C. F.; ALMEIDA, I. P.; NUNES, P. H. M. MARTINS, M. C. C. Dieta enriquecida em fibras e ácidos graxos poliinsaturados:efeitos no controle glicêmico e perfil lipídico de ratos diabéticos. **Ars Veterinaria**, v.26, n.3, p.138-146, 2010.

SCHNEDL, W. J.; FERBER, S.; JOHNSON, J. H.; NEWGARD, C. B. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. **Diabetes**, v.43, n.11, p.1326-1333, 1994.

SCHUCH, N. J.; GARCIA, V. C.; MARTINI, L. A. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 53, n. 5, p. 625-633, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso Brasileiro sobre Diabetes. São Paulo (SP); p.50, 2001.

SILVA, V.D.; NOGUEIRA, R.M.B. *Diabetes mellitus* experimental induzido com aloxana em ratos *Wistar Aloxana* e *Diabetes mellitus* experimental **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** 36(1):9-15, 2015

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES; [org. DE OLIVEIRA, J. E. P.; Sérgio VENCIO, S.]. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: **A.C. Farmacêutica**, 2015.

SZKULDESKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research.** v. 50, p. 536-546, 2001.

VAREDA, P.M.P. **Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de *Myrcia bella* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.

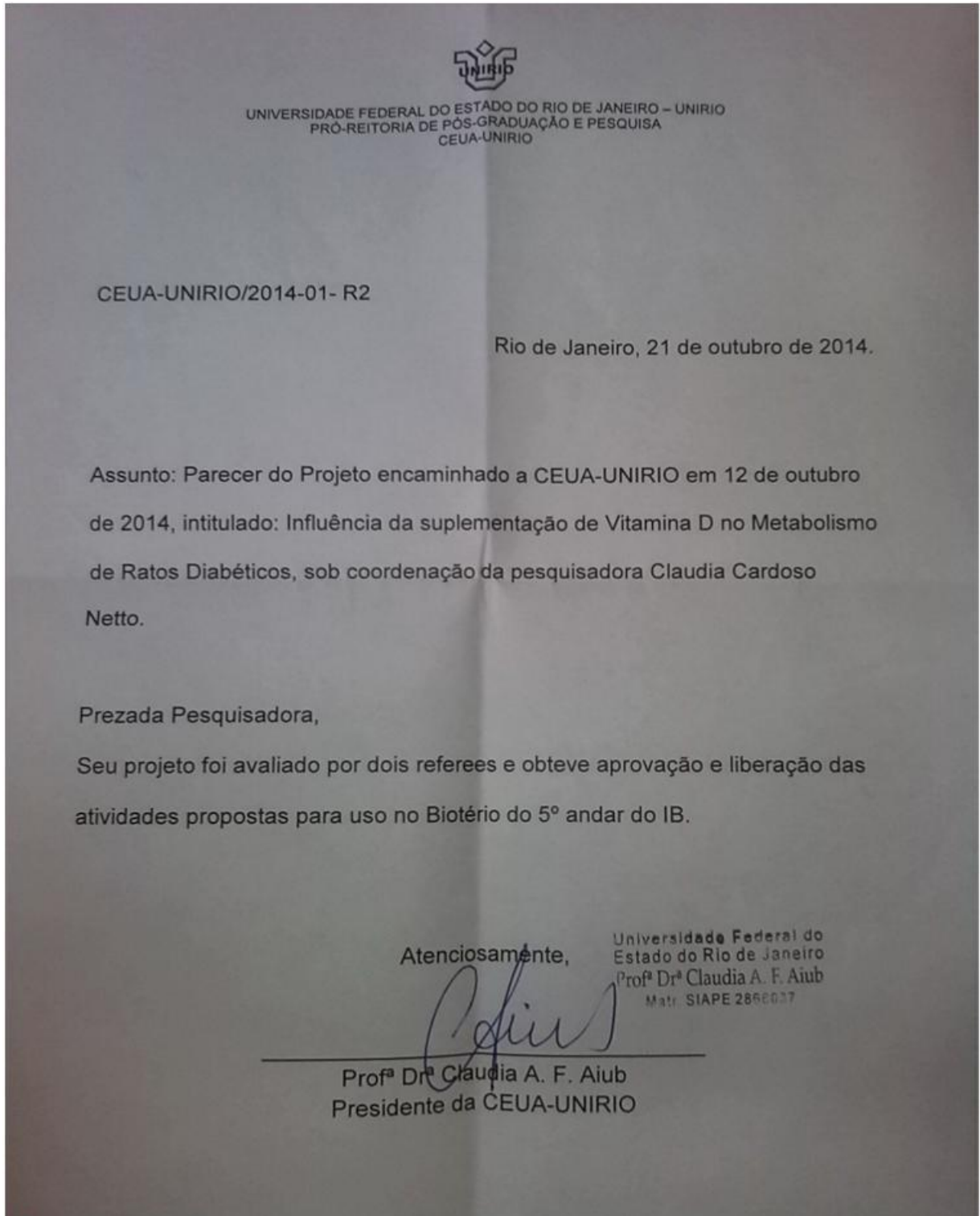
VILARINHO R.M.F., LISBOA M.T.L., THIRÉ P.K., FRANÇA P.V. Fatores de risco de natureza modificável para *diabetes mellitus*. Esc Anna Nery **Rev Enferm.** set; 12 (3): 452-56, 2008.

VOLPATO, G.T.; DAMASCENO, D.C.; CAMPOS, K.E.; ROCHA, R.; RUDGE, M.V.C.; CALDERON, I.M.P. Evaluation of the effect of physical exercise in the metabolism of pregnant diabetic rats. **Rev Bras Med Esporte**, v.12, n.5, p.205-209, 2006.

YIN, F. C.; SPURGEON,H.A.; RAKUSAN,K.; WEISFELDT, M.L.; LAKATTA,E.G. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **The American Journal of Physiology**, v. 243, n. 6, p. H941–7, dez. 1982

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEUA) DA UNIRIO



ANEXO B – COLETA DE RESÍDUOS

 PREFEITURA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO SECRETARIA MUNICIPAL DE FAZENDA NOTA FISCAL DE SERVIÇOS ELETRÔNICA - NFS-e - NOTA CARIOCA - <small>20150528u07941147000125i07941147000125</small>	Número da Nota 00009826				
	Data e Hora de Emissão 28/05/2015 19:17:38				
Código de Verificação UDTN-JRJL					
PRESTADOR DE SERVIÇOS					
	CPF/CNPJ: 07.941.147/0001-25 Inscrição Municipal: 0.379.821-6 Inscrição Estadual: --- Nome/Razão Social: 2MC TRANSPORTES RODOVIARIOS LTDA Nome Fantasia: 2MC Transportes de RESÍDUOS Tel.: 7839-6345 2426-6374 Endereço: RUA EDGARD WERNECK 588, CASA 073 - FREGUESIA(JACAREPAGUA) - CEP: 22763-197 Município: RIO DE JANEIRO UF: RJ E-mail: doismc@ig.com.br				
TOMADOR DE SERVIÇOS					
CPF/CNPJ: 079.575.387-03 Inscrição Municipal: ---- Inscrição Estadual: ---- Nome/Razão Social: CLAUDIA CARDOSO NETTO Endereço: RUA FREI CANECA 94, 4 andar - CENTRO - CEP: 20211-040 Tel.: ---- Município: RIO DE JANEIRO UF: RJ E-mail: ----					
DISCRIMINAÇÃO DOS SERVIÇOS					
COLETA, TRANSPORTE E DESTINAÇÃO FINAL DE RESÍDUO BIOLÓGICO GRUPO A GRUPO A4 (CARCAÇAS DE RATO) GRUPO E (PÉRFURO CORTANTE) SERVIÇO REALIZADO NA DEPENDÊNCIA DA UNIPIO - DEPTO DE BIOQUÍMICA VENCIMENTO 05/06/2015					
VALOR DA NOTA = R\$ 400,00					
Serviço Prestado 07.09.02 - coleta de resíduos lixo, rejeitos ou outros resíduos quaisquer					
Deduções (R\$) 0,00	Desconto Incond. (R\$) 0,00	Base de Cálculo (R\$) -----	Alíquota (%) -----	Valor do ISS (R\$) -----	Crédito Gerado (R\$) 0,80
OUTRAS INFORMAÇÕES					
- Esta NFS-e foi emitida com respaldo na Lei nº 5.098 de 15/10/2009 e no Decreto nº 32.250 de 11/05/2010 - PROCON-RJ: Rua da Ajuda, 5 subsolo; www.procon.rj.gov.br - ISS devido deve ser recolhido por meio de Documento de Arrecadação do Simples Nacional (DAS). - Documento emitido por ME ou EPP optante pelo SIMPLES NACIONAL, inclusive pelo MEI, não gera direito a crédito fiscal de IPI.					