

THALLES MAYCKON VIEIRA ARAÚJO

Descrição do método de indução de diabetes
mellitus para testes de novas drogas e
procedimentos específicos

Araçatuba- SP
2010

THALLES MAYCKON VIEIRA ARAÚJO

Descrição do método de indução de diabetes mellitus para testes de novas drogas e procedimentos específicos

**Trabalho de Conclusão de Curso
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel
em Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho".**

**Orientadora: Prof^a. Assistente
Doutora Renata Callestini Felipini**

**Araçatuba
2010**

Dedicatória

Primeiramente a Deus por ter concedido a vida e condições de estar cursando esta faculdade.

Aos meus pais Vilmônio e Gilza, e ao meu irmão Fernando por tanto carinho e constante apoio.

Agradecimentos

À Prof^a Ass. Dr^a Renata Callestini Felipini, por sua atenção, dedicação e orientação durante todo o trabalho.

Ao Marcelinho, por todo o seu apoio e dedicação durante a execução da pesquisa.

À Prof^a Ass. Dr^a Alessandra Marcondes Aranega, pela sua ajuda e apoio durante o experimento, principalmente nos momentos iniciais, onde não tínhamos conhecimento prático dos procedimentos que teriam que ser executados a fim de induzir diabetes quimicamente.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica.

Aos meus amigos e integrantes do grupo que trabalharam na pesquisa: Leonardo, Gabryela, Tales e Priscila, pelo seu apoio e dedicação que tiveram durante todo o trabalho.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de Odontologia na mesma.

A todos àqueles que muito me ensinaram e ajudaram durante esses anos de curso e neste trabalho.

***“Semeia, semeia
O que importa é semear
pouco, muito, tudo
a semente da esperança.
Semeias tuas energias
para poderes enfrentar
as lutas da vida.
Semeia tua coragem
para poderes encorajar
os outros.
Semeia teu entusiasmo,
tua fé, teu amor.
Semeias coisas
pequeninas,
insignificantes.
Semeia e confia:
cada semente há de
enriquecer um pedaço
do chão”.***

Clarissa Pinkola Estes.

Resumo

Araújo, T.M.V.. **Descrição do método de indução de diabetes mellitus para testes de novas drogas e procedimentos específicos.** Araçatuba, 2010, 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)- Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica/ Faculdade de Odontologia de Araçatuba/ Unesp.

O diabetes mellitus é uma das doenças mais comuns encontradas na população, atingindo 8% da população mundial. Com a crescente longevidade, obesidade e sedentarismo da população, a prevalência do diabetes aumenta constantemente. O termo diabetes mellitus é caracterizado por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção ou ação da insulina que possui um papel crítico na regulação da glicose no sangue. Sua deficiência provoca alterações no metabolismo dos carboidratos e secundariamente o metabolismo das proteínas e lipídios. Estas alterações podem levar ao atraso da cicatrização das feridas, ao aumento da predisposição às infecções e incidência de complicações micro e macro-vasculares. Pelo exposto, é necessário preparação e equilíbrio entre custo e benefício para procedimentos cirúrgicos nos pacientes portadores desta patologia. Assim, todo esforço a fim de pesquisar novas tecnologias que minimizem os malefícios trazidos pela doença é de grande importância. Através da indução do diabetes experimental podemos testar a ação de novos medicamentos e condução de procedimentos terapêuticos específicos para diabéticos. O presente trabalho expõe a metodologia experimental de indução de diabetes mellitus e aplicação em ratos. Consiste na utilização de ratos machos, Wistar, com 2 meses e acima de 250 gramas, alimentados com ração sólida, exceto no período de jejum que antecede a administração de Estreptozotocina. Esta droga causa a redução na síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo – NAD, levando à destruição das células beta do pâncreas e inibindo a produção de insulina. A dose única, administrada via peritoniana na proporção de 35mg para cada 1000g de peso corporal animal, é dissolvida em tampão citrato 0,01M e pH 4,5, após anestesia geral. Após três dias é feita a coleta de sangue caudal em aparelho específico para verificação de nível de glicemia e confirmação do estado diabético.

Palavras chave: Diabetes Mellitus Experimental, Estreptozotocina, Ratos.

Abstract

Araújo, T.M.V.. **Description of the method of induction of diabetes mellitus for tests of new drugs and specific proceedings.** Araçatuba, 2010, 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)- Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica/ Faculdade de Odontologia de Araçatuba/ Unesp.

Diabetes mellitus is one of the commonest diseases found in the population, reaching 8 % of the world-wide population. With the growing longevity, obesity and sedentary of the population, the predominance of diabetes increases constantly. The term diabetes mellitus is characterized for hyperglycemia, resultant force of defects in the secretion or action of the insulin that has a critical paper in the regulation of the glucose in the blood. His deficiency provokes alterations in the metabolism of the carbohydrates and secundarily the metabolism of the proteins and lipids. These alterations can lead to the delay of the scarring of the wounds, to the increase of the predisposition to the infections and incidence of complications micro and macro-vascular. For the exposed one, preparation and balance is necessary between cost and benefit for surgical proceedings in the patient bearers of this pathology. So, completely I make an effort in order to investigate new technologies that minimize the harms brought by the disease it is of great importance. Through the induction of experimental diabetes we can test the action of new medicines and driving of therapeutic proceedings special for diabetics. The present work exposes the experimental methodology of induction of diabetes mellitus and application in mice. It consists of the use of male mice, Wistar, with 2 months and above 250 grammes fed with solid ration, except of the period of fast that precedes the administration of Streptozotocina. This drug causes the reduction in the synthesis of nicotinamida adenina dinucleotide – NAD, leading to the destruction of the cells metal vein of the pancreas and inhibiting the production of insulin. The only dose, when road was administered penile in the proportion of 35mg for each 1000g of physical animal weight, citrate is dissolved in tampon 0,01M and pH 4,5, after general anesthesia. After three days the collection of blood torrent is done in appliance special for checking of level of glucose and confirmation of the diabetic state.

Keywords: Diabetes Mellitus Experimental, Streptozotocina, Rats.

Lista de Figuras

Figura 1	Ratos Wistar machos	21
-		
Figura 2	Biotério do Departamento de Patologia e Propêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP	22
-		
-		
Figura 3	Balança utilizada para a pesagem dos animais	23
-		
Figura 4	Balança de precisão utilizada para a pesagem da droga Estreptozotocina	24
-		
Figura 5	Estreptozotocina	24
-		
Figura 6	Tampão Citrato	25
-		
Figura 7	Anestésicos	26
-		
Figura 8	Tabela com peso corporal e dosagem do anestésico e miorelaxante	27
-		
Figura 9	Aplicação do anestésico por via intraperitoneal	27
-		
Figura 10	Seringa e agulha	28
-		
Figura 11	Local de introdução da agulha	28
-		
Figura 12	Introdução da agulha por via peniana	29
-		
Figura 13	Gaiola metabólica	30
-		
Figura 14	Aparelho ACCU-CHEK Performa e suas fitas reagentes	31
-		
Figura 15	Corte da ponta da cauda do rato	32
-		
Figura 16	Confirmação do estado diabetogênico	32
-		
Figura 17	Gaiola dos ratos diabéticos	33
-		

Lista de Abreviaturas

DM	=	Diabetes Mellitus
STZ	=	Estreptozotocina
OMS	=	Organização Mundial de Saúde
NAD	=	Nicotinamida adenina dinucleotideo
SUS	=	Sistema Único de Saúde
SIH	=	Sistema de Informação Hospitalar
NO	=	Óxido Nítrico
mg	=	miligrama
kg	=	quilo
g	=	grama
M	=	mol
ml	=	mililitros

Sumário

1 Introdução	11
2 Revisão de Literatura	15
3 Proposição	20
4 Materiais e Métodos	21
5 Discussão	34
6 Conclusão	39
Referências	40
Anexos	

1 Introdução

Diabetes melitus (DM) é uma doença multi-sistêmica com conseqüências bioquímicas e anatômicas. É uma doença crônica relacionada ao metabolismo de carboidrato, gordura e proteína, causada pela falta de insulina. ^{1,14}

Têm como característica a secreção deficiente ou ausente deste hormônio, ou ainda por ação deficiente de seus receptores bem como pela falta de enzimas envolvidas nesse processo da entrada de insulina na célula. ^{1,2,3} O aumento de açúcar no sangue, ou a hiperglicemia, é um efeito comum no diabetes que, com o tempo leva a sérios danos ao organismo do indivíduo, especialmente nervos e veias. ⁵

O termo diabetes foi nomeado por volta do ano 70, na Grécia Antiga, quando o médico Areteu da Capadócia descreveu a doença pela primeira vez. Posteriormente, em 1670 o médico inglês Thomas Willis provou a urina de indivíduos que apresentavam sintomas semelhantes e descobriu que era muito doce. A doença, portanto foi batizada de diabetes açucarada ou diabetes mellitus, palavra de origem latina que quer dizer mel ou adocicado. ³

Na diabetes tipo 1, ou diabetes dependente de insulina, a insulina é funcionalmente ausente devido a destruição das células beta do pâncreas. No diabetes tipo 2, também chamado de diabetes do adulto ou diabetes não dependente de insulina, o organismo não responde à sua própria insulina, sendo assim resistente à ela. A diabetes mellitus tipo 2 possui um fator hereditário maior que o tipo 1 e além disso há uma grande relação com sedentarismo e obesidade. ⁴

A diabetes mellitus tipo 1, manifesta seu início em crianças de 4 anos de idade, com o pico de incidência de início da doença aos 11 a 13 anos, coincidindo com o começo da adolescência e puberdade. Também existe uma incidência significativa em pessoas no final da terceira década de vida e começo da quarta década, quando a doença tende a se apresentar de maneira mais branda. ⁵

Em ambos os tipos de diabetes mellitus, ocorre alteração do metabolismo de todos os principais alimentos. O efeito básico da ausência de insulina ou da resistência ao hormônio, sobre o metabolismo da glicose consiste em impedir sua captação e utilização eficientes pela maioria das células do corpo.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2006 existiam cerca de 171 milhões de diabéticos, e este índice tende a aumentar com o passar dos anos. Estima-se que em 2025, o número de doentes deve chegar a 300 milhões de pessoas portadoras da doença.⁶

A diabetes mellitus ocorre em todo o mundo, sendo mais comum o tipo 2 nos países desenvolvidos. O maior aumento atualmente é esperado na Ásia e na África. O aumento do índice de diabetes em países em desenvolvimento segue a tendência de urbanização e mudanças de estilos de vida.⁶

Em 2007, estima-se que a doença tenha causado 3,8 milhões de mortes em todo o mundo – cerca de 6% do total da mortalidade mundial, quase o mesmo que a Aids e a malária combinadas. As perdas por morte ou por deficiência provocadas pela doença chegam a 25 milhões de anos de vida por ano, segundo a OMS, e a 23 milhões de anos de vida por ano, respectivamente, segundo a Federação Internacional de Diabetes. Ou seja, deixam de ser vividos ou vividos adequadamente, em função da morte ou das deficiências provocadas pelo diabetes, cerca de 48 milhões de anos de vida.^{5,6}

Infelizmente, o maior problema do diabetes é o diagnóstico tardio ou o diagnóstico mal realizado. O impacto é maior ainda, porque, embora as pessoas possam viver com a doença, a causa da morte é frequentemente registrada como doenças de coração ou falha renal.

Nos países mais pobres, pessoas com a doença e seus familiares gastam o que podem com tratamento médico. Na Índia, por exemplo, as pessoas mais pobres portadoras da doença gastam em média 25% de sua renda familiar com tratamento. Em países da América Latina e do Caribe,

as famílias pagam de seus próprios bolsos 40% a 60% dos custos com tratamentos – metade deles somente com medicamentos para manter regulados os níveis de açúcar no sangue. ⁶

O número de internações por DM registrado no Sistema de Informação Hospitalar (SIH/SUS) é elevado, tendo sido gastos mais de 39 milhões de reais com hospitalizações no SUS em 2000. Esses custos estão relacionados à alta taxa de permanência hospitalar do diabético e também à severidade das complicações que, muitas vezes, demandam procedimentos de elevada complexidade. ^{7,9}

Além dos problemas econômicos decorrentes da doença, é importante considerar sua influência negativa durante as práticas cirúrgicas, inclusive durante procedimentos odontológicos. O paciente com diabetes apresenta muitas alterações sistêmicas que diminuem a capacidade imunológica e a resposta inflamatória, aumentando a susceptibilidade às infecções, dificuldade de coagulação sanguínea, o que retarda a cicatrização das feridas e aumenta o risco de doenças periodontais. ^{8,9}

Algumas alterações bucais são visíveis na prática odontológica sendo, portanto, de extrema importância que o cirurgião dentista esteja atento a elas, atuando como um instrumento de diagnóstico e encaminhamento do paciente para o profissional da área adequado.

Embora tenham ocorrido muitos avanços terapêuticos, infelizmente o diabetes ainda é uma das principais causas de incapacitação física para o trabalho, já que torna o portador mais susceptível à cegueira, nefropatia, e com riscos de amputações de membros, aterosclerose e doença cardiovascular. ^{1,2,9}

O presente trabalho visa expor a importância de se realizarem metodologias como processos de pesquisa, a fim de conhecer melhor os mecanismos fisiopatológicos da doença e suas complicações, à procura de um tratamento capaz de contribuir com a diminuição dos danos e sintomas no organismo do portador. Para esse fim, se propõe a utilização

de substâncias químicas diabetogênicas como modelo experimental, o que contribui significativamente para a compreensão da doença.

2 Revisão de Literatura

2.1 Drogas diabetogênicas

Algumas drogas têm sido utilizadas em modelos experimentais a fim de induzir quimicamente diabetes. A utilização dessas substâncias permite estudos detalhados de eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos durante e após a indução do diabetes, além de permitir o teste de eventuais fatores de proteção contra a lesão da célula Beta, e com isso a possibilidade de descobrirem novas terapias.¹⁰

As drogas mais utilizadas para esse fim são a Estreptozotocina (STZ) e a Aloxana. A STZ é uma substância derivada do fungo *Streptomyces acromagenes*, com ação anti-tumoral, antimicrobiana e altamente diabetogênica.¹⁰

Nos tempos atuais, o uso da STZ como agente indutor de destruição de células betas pancreáticas é muito vasto, em virtude principalmente de sua persistência fisiopatológica do quadro diabético produzido dentro de uma determinada espécie.¹⁰

A administração de STZ em ratos adultos produz diabetes severo que muitas vezes necessita de administração de insulina quando os ratos precisam viver por um período maior.

A aplicação de STZ feita em meio ácido e baixa temperatura é mais eficaz, sendo justificada pelo fato desta ser um composto instável em temperaturas ambientais e em pH neutro. Possui baixa instabilidade nos líquidos e curta meia vida, estimada em apenas 5 minutos em camundongos e por esta razão, a injeção intravenosa parece ser a melhor via de administração, embora se utilize também a via intraperitoneal.¹⁰

O mecanismo pelo qual a STZ lesa a células beta ainda não está tão claro, porém existem algumas hipóteses de seu mecanismo de ação como a geração de espécies ativas de oxigênio e/ou inibição de enzimas de defesa contra espécies ativas de oxigênio e uma ação alquilante direta da droga.^{10,15}

As quebras de DNA, a geração de radicais livres, a ativação da enzima poli(ADP-ribose)polimerase, e a depleção do NAD das células betas são alguns das hipóteses quando à destruição das ilhotas pancreáticas. A literatura sugere também que alterações no metabolismo do ácido araquidônico, da produção de endotelinas e aumento do óxido nítrico parecem estar envolvidos no mecanismo de ação da droga.¹⁰

A estreptozotocina parece induzir a quebra do DNA nuclear, ativando a enzima poliadenosina-difosforibose-sintetase. Essa enzima utiliza NAD como substrato, diminuindo seu nível intracelular. Com a queda dos níveis de NAD, há uma depleção acentuada da respiração celular e como a produção de ATP por fosforilação oxidativa, se dá acoplada à cadeia respiratória, diminui o ATP intracelular. Com essa menor quantidade de energia, a biossíntese de proteínas é paralisada e há perda do balanço iônico normal das células beta. Portanto, a droga diminui o nível de utilização de NAD pela célula, diminuindo a energia disponível para a utilização e conseqüentemente a deflagração da produção de insulina.¹⁰

A administração de STZ produz flutuações trifásicas do nível de glicose sanguínea. Em ratos, a hiperglicemia inicial atinge no máximo cerca de duas horas após a injeção da droga, e é seguida de hipoglicemia acentuada com níveis glicêmicos mínimos cerca de 10 horas após a injeção. A terceira fase é representada pela hiperglicemia permanente.¹⁰

Muitas das alterações que surgem após o tratamento com a STZ são certamente decorrentes da lesão tóxica da STZ sobre as células betas, porém não estão primariamente envolvidos no mecanismo da sua toxicidade. Tendo isso como base é possível pensar que a lesão da célula beta envolve conjuntos de fatores cuja importância individual depende da dose da droga, das condições de exposição à STZ e também da susceptibilidade do organismo, determinada por variáveis como espécie e idade.^{10,11}

As doses diabetogênicas variam entre as espécies; uma mesma dose pode ser tóxica e causar um índice de mortalidade alto em uma espécie, e ser pouco diabetogênica em outra. Em cães, a sensibilidade é

máxima com uma dose de 50mg/kg de peso corporal, enquanto que com a mesma dose é mínima em camundongos. Em cobaias, a STZ possui ação diabetogênica efetiva, enquanto que a aloxana quase não produz efeito.¹⁰

Raramente são observadas recuperações espontâneas do quadro diabético em ratos, com doses de 35mg/kg de peso corporal. Entretanto, relata-se reversão do quadro diabético em ratos com doses de STZ entre 30 e 40mg/kg de peso, com retorno a condição de normoglicemia em 10 dias e da secreção de insulina em resposta a glicose em três meses.¹⁰

Os principais efeitos do diabetes quimicamente induzido por STZ abrangem um aumento progressivo da glicosúria e do volume urinário na primeira semana após a indução. Mais tarde o peso dos animais que foram induzidos tende a diminuir ou estabiliza, enquanto os animais controles da mesma idade e peso inicial apresentam um aumento ponderal progressivo. A lipemia está presente, mas a cetinúria é rara, sendo observada em ratos, apenas com doses de 100mg/kg de peso corporal.¹⁰

A droga Aloxana (2,4,5,6,-tetraoxypyrimida; 5-6-Dioxyuracila/monohidratada), derivada do ácido úrico, desempenha um efeito citotóxico preferencial nas células beta das Ilhotas de Langerhans do pâncreas.¹² Existem algumas contestações sobre o local de ação da droga na célula que podem ser a membrana celular, mitocôndrias ou o núcleo das células.

A maioria dos autores acredita que seja o núcleo da célula beta o alvo principal de ação da droga. O mecanismo de lesões envolveria a geração de espécies ativas de oxigênio no interior da célula. A aloxana, na sua auto-oxidação, origina radicais altamente reativos com ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. A possibilidade desses radicais estarem envolvidos no efeito diabetogênico de aloxana é reforçado pelo fato do etanol, metanol, n-propanol, e n-butanol, álcoois de cadeia curta e varredores desses radicais, protegerem as células beta contra a ação dessa droga.¹¹

A aloxana é uma droga mais antiga que a STZ, e tem pequena ação oncogênica, mas é menos empregada que esta, devido às dificuldades mostradas por alguns grupos de pesquisa em induzir o diabetes e manter os animais em boas condições.¹¹

No presente trabalho, a estreptozotocina foi a droga de eleição, devido às suas características como: fácil manuseio, aplicação, menores danos ao animal e efetividade comprovada pela literatura. As características da STZ permitem afirmar que este composto químico é mais indicado do que a aloxana nos estudos que requerem um quadro diabético experimental sólido e reproduzível.¹⁰

Outros mecanismos de produção de diabetes são pouco utilizados já que não exibem todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico.¹² Esses mecanismos são por meio de estresse, infecções, toxinas ou manipulações, incluindo a pancreatectomia; lesões no sistema nervoso central; uso de hormônios anti-insulínicos; exposição à hidrocortisona ou ACTH e indução por vírus.¹²

A pancreatectomia total ou parcial produz diabetes, cujos aspectos clínicos e laboratoriais se assemelham ao diabetes quimicamente induzido. Porém a utilização desses métodos tem sido restrita apenas a animais de maior porte, além de haver dificuldade por incluir um procedimento cirúrgico e com todas as suas implicações.¹²

As lesões hipotalâmicas podem causar obesidade, acompanhada de DM proporcional ao ganho de peso. Seria necessário um conhecimento aprofundado em neurofisiologia para executar procedimentos em áreas tão complexas. Os ratos que passam por esses processos tornam-se obesos, hiperglicêmicos, hipoinsulinêmicos e insulino-resistentes.^{12,13}

A utilização de hormônios com ação oposta à insulina, ainda que capazes de produzir hiperglicemia, possuem efeitos ainda incertos em animais. Exercem, principalmente no caso da epinefrina e glucagon, efeito anti-insulínico, somente se administrados em doses elevadas.¹²

A exposição da hidrocortisona ou ACTH leva a eventos bioquímicos, hormonais e fisiológicos muito variáveis, o que dificultaria na avaliação do estado diabetogênico.¹²

A utilização de modelos virais, principalmente vírus RNA, com alta especificidade, constitui um risco potencial para o experimentador e ainda não há evidências que comprovem sua efetividade.¹²

3 Proposição

O objetivo deste trabalho é:

- 1- Descrever e documentar a metodologia experimental de indução química de diabetes mellitus em ratos com a utilização da droga estreptozotocina, para que o seu detalhamento sirva como referência para futuras reproduções em pesquisas.

4 Materiais e Métodos

4.1 Seleção dos Animais

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, Wistar machos, com 2 meses de idade e peso acima de 300 gramas, procedentes do biotério do Departamento de Patologia e Propêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

A escolha desses animais foi baseada em seu fácil manuseio; ocupação de pequenos espaços e com isso a possibilidade de trabalhar simultaneamente com vários grupos experimentais; elevada resistência à infecção, facilidade de remoção dos diversos órgãos, redução de custos; e por apresentarem semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o diabetes humano (Figura 1).



FIGURA 1 - Ratos Wistar machos.

Os animais passaram por um período de adaptação de três dias e então foram enumerados e divididos em gaiolas contendo 4 animais cada. Neste período, foram alimentados com ração sólida e água *ad libitum*.

O biotério do Departamento possui temperatura controlada de 22 graus Celcius durante todo o dia, mantida através de equipamentos de ar condicionado; a iluminação é feita tanto artificialmente como à luz natural; e é realizada freqüentemente a limpeza das gaiolas (Figura 2).



FIGURA 2 - Biotério do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP.

4.2 Distribuição dos grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de 24 elementos cada, sendo um grupo diabético e um grupo controle.

GRUPO I – ratos sadios (controle)

Estes animais foram anestesiados, e submeteram-se apenas à injeção intraperitoneal de soro fisiológico,

GRUPO II – ratos diabéticos

Estes animais foram anestesiados, e submeteram-se à injeção intraperitoneal de estreptozotocina conforme o seu peso.

4.3 Indução do Diabetes Mellitus

Os animais foram privados de alimentação sólida por um período de 14 a 16 horas, prévias à administração de STZ, e foram mantidos apenas com água. Após decorrer este tempo, os animais foram separados e pesados em balança comum (Figura 3). Conhecendo os pesos dos animais, seguimos para a próxima etapa que foi a pesagem do medicamento.



FIGURA 3 - Balança utilizada para a pesagem dos animais.

A Estreptozotocina foi pesada em balança de alta precisão (Figura 4 e 5). A dose única administrada na proporção de 35 mg para cada 1000g de peso corporal foi dissolvida em tampão citrato 0,01M e pH 4,5 (Figura 6).



FIGURA 4 - Balança de Precisão, utilizada para a pesagem da droga Estreptozotocina.

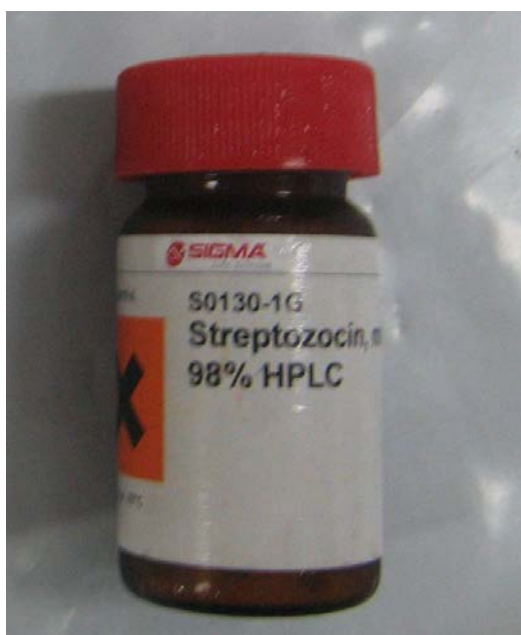


FIGURA 5 - Estreptozotocina.

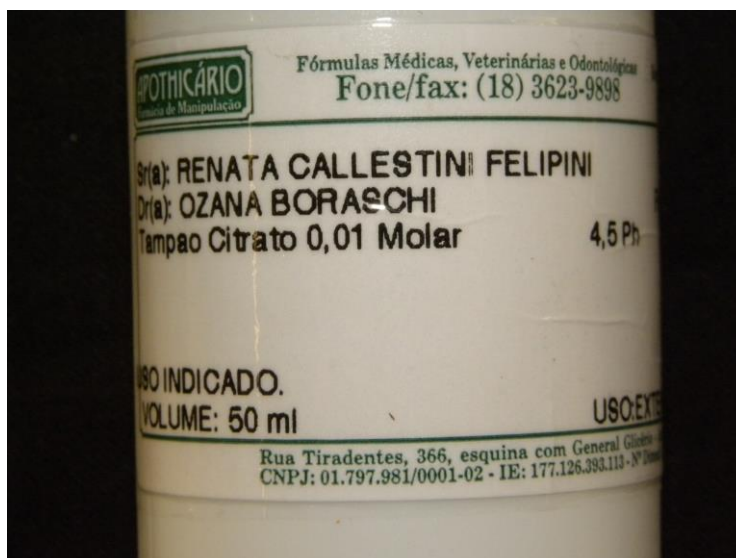


FIGURA 6 - Tampão Citrato.

Baseado no peso médio dos animais, obteve-se o valor total do peso do medicamento. Para isso, seguiu-se a seguinte regra de três:

$$0,035g \text{ (peso do medicamento para um animal)} - 1000g \\ x \text{ (peso total do medicamento)} - y \text{ (soma do peso de todos os animais)}$$

O volume total de solvente foi encontrado, multiplicando o número de ratos vezes 0,2 ml de tampão citrato. Todo o medicamento (x) e o volume total de solvente (tampão citrato) foi homogeneizado, obtendo-se a solução. A fim de não faltar solução durante a aplicação, consideramos um número de animais maior do que o real, já que observamos que somando os volumes das soluções individuais, obteve-se um número maior que a solução total, inicialmente prevista.

Para cada animal, são necessários 0,2 ml de solução para a inoculação. Para calcular a quantidade da solução individual para cada animal, utilizamos, novamente, uma regra de três:

$$P \text{ (Peso médio dos animais)} - 0,2 \text{ ml} \\ p \text{ (Peso individual do animal)} - S \text{ (volume de solução individual)}$$

Dentro dos grupos especificados, os animais foram anestesiados através da aplicação de 15 mg/Kg de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Xilazina), substância com propriedades sedativas e analgésicas além de relaxante muscular, e 38,5 mg/kg de Ketamina base a 10% (Dopaien – Agribands do Brasil Ltda), anestésico geral, via intraperitoneal (Figuras 7, 8 e 9). Os controles receberam apenas administração de tampão citrato pela mesma via.



FIGURA 7 - Anestésicos

TABELA COM PESO CORPORAL E DOSAGEM DE ANESTÉSICO E MIORRELAXANTE

Peso corporal (g)	Cetamina (ml) Dopalen Vetaset	Xilazina (ml) Coopazine Rompun	Total (ml)
100	0,050	0,050	0,100
110	0,055	0,055	0,110
120	0,060	0,060	0,120
130	0,065	0,065	0,130
140	0,070	0,070	0,140
150	0,075	0,075	0,150
160	0,080	0,080	0,160
170	0,085	0,085	0,170
180	0,090	0,090	0,180
190	0,095	0,095	0,190
200	0,100	0,100	0,200
210	0,105	0,105	0,210
220	0,110	0,110	0,220
230	0,115	0,115	0,230
240	0,120	0,120	0,240

FIGURA 8 - Tabela com peso corporal e dosagem do anestésico e miorelaxante.



FIGURA 9 - Aplicação do anestésico por via intraperitoneal.

Após a anestesia geral, os animais foram contidos em decúbito dorsal, para receber a injeção intravenosa (veia dorsal do pênis) de estreptozotocina. Com a utilização de seringa de 1 ml e agulha curta fina,

a droga foi injetada na veia dorsal, após manipular e expor a área de aplicação. A área onde é feita a aplicação, apresenta-se mais arroxeadada em comparação com o restante do tecido, o que facilita a localização da veia dorsal peniana (Figuras 10, 11 e 12).

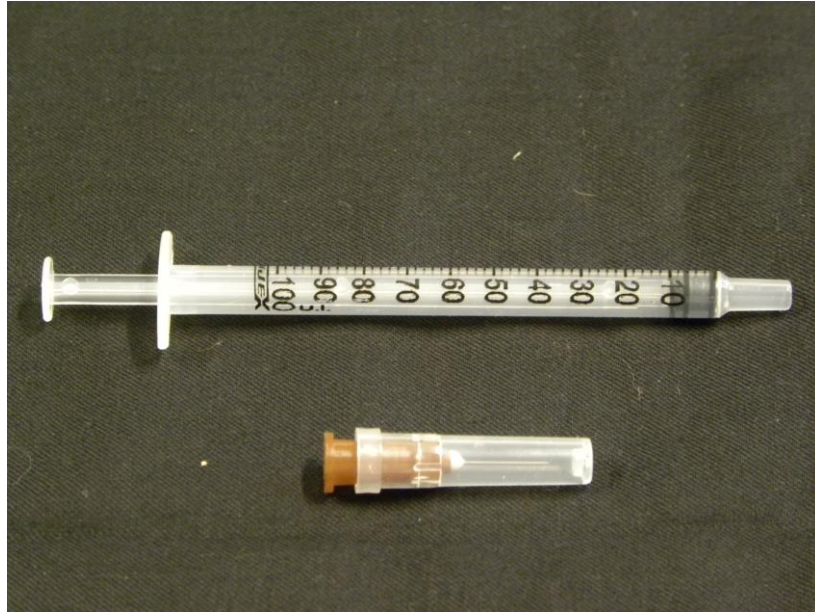


FIGURA 10 - Seringa e agulha.



FIGURA 11 - Local de introdução da agulha. Observar que o bisel da agulha está voltado para cima.



FIGURA 12 - Introdução da agulha por via peniana.

Os animais foram recolocados em suas respectivas gaiolas, e observados até o final do período de analgesia, de aproximadamente 30 a 120 minutos. Ocorrendo sucesso em todas essas etapas descritas, as gaiolas foram novamente alojadas no biotério, onde permaneceram durante todo o restante do experimento.

Existe um tipo de gaiola, a chamada gaiola metabólica que é muito utilizada em trabalhos com ratos diabéticos. Esta permite determinar o peso do animal baseado na sua perda urinária e consumo de alimento; fornecimento do volume conhecido de água, quantidade de ração consumido e quantidade de urina excretada (Figura 13).



FIGURA 13 - Gaiola Metabólica.

4.4 Confirmação do estado diabetogênico

A verificação da glicemia foi realizada 48 horas após a indução da diabetes, sendo que animais que não apresentaram valores iguais ou superiores a 300 miligramas por decilitro de sangue foram descartados.

A cada três dias foi feito o teste de glicemia em todos os animais para confirmação da permanência do diabetes e finalmente, verificação do diabetes no dia do sacrifício, para avaliar se houve qualquer processo de reversão do diabetes. As verificações foram feitas retirando sangue da veia caudal, sendo colocada uma gota sobre as fitas reagentes da marca Accu-Chek Performa, e a leitura foi feita no aparelho. Com o auxílio de uma tesoura esterilizada, é feito um corte longitudinal na ponta da cauda do animal, após o conter adequadamente, e coloca-se a gota de sangue sobre a fita reagente. Em segundos, temos o valor da taxa de glicemia no sangue, constatando-se o estado diabetogênico do animal (Figuras 14, 15 e 16).



FIGURA 14 - Aparelho ACCU-CHEK Performa e suas fitas reagentes, utilizado para verificar a taxa de glicemia no sangue dos animais.

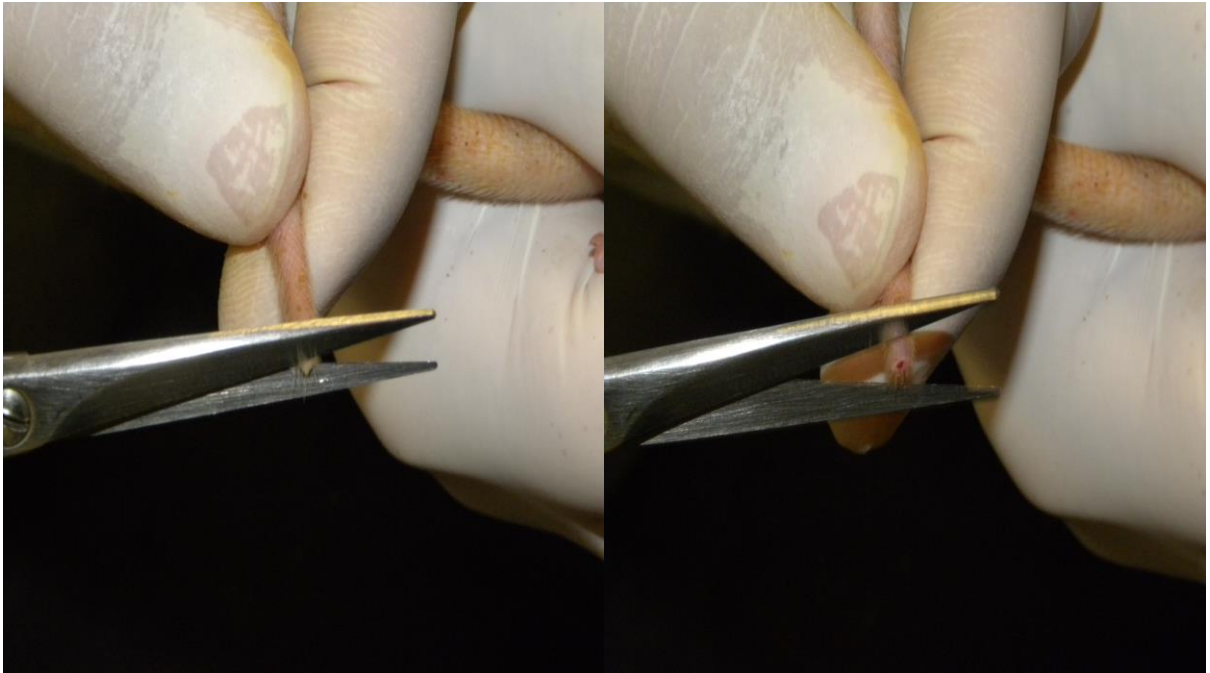


FIGURA 15 - A ponta da cauda dos animais é cortada para a retirada de sangue.

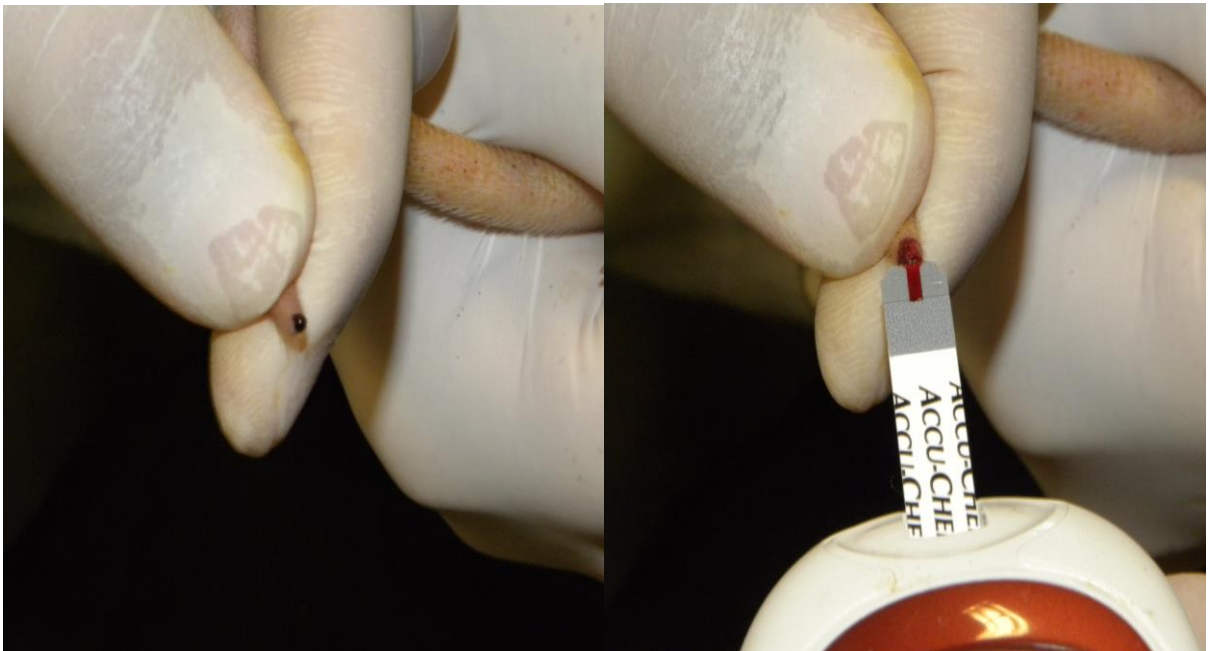


FIGURA 16 - Confirmação do estado diabetogênico com a utilização de fitas reagentes e aparelho medidor de glicemia sanguínea.

O peso dos animais também foi constantemente monitorado, através de balança comum. A balança é zerada, e o animal é contido em dentro do vasilhame, e o conjunto é então colocado sobre a balança, evidenciando o seu peso corpóreo. Estes procedimentos se repetem a cada intervalo de dois dias.

No decorrer do experimento, notou-se que os sintomas foram bem evidentes, com aumento do volume urinário e fecal, irritabilidade, polidipsia e polifagia (Figura 17).



FIGURA 17 - Gaiola dos ratos diabéticos. Observe a sujeira que se encontra a gaiola.

5 Discussão

O presente trabalho foi idealizado com o objetivo de realizar um modelo experimental, utilizando a indução química de diabetes, a fim de compreender melhor a fisiopatologia da doença. Foram muitas as alterações que ocorreram nos animais, sendo perceptíveis sintomas como poliúria, stress, polifagia etc, nos ratos.

O diabetes mellitus é uma desordem crônica que afeta o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, devido a uma deficiência relativa ou absoluta de insulina, ocorrendo como conseqüências da doença hiperglicemia em jejum, glicosúria e elevada susceptibilidade ao desenvolvimento de aterosclerose, microangiopatia, nefropatia e neuropatia.¹

O termo "diabetes" (do grego, igual a sifão) foi introduzido por Heataeus, médico romano, no primeiro século A.C., quando notou a presença de açúcar na urina. Tempos depois, em 1875, Bouchardat reconheceu que, clinicamente existiam duas formas de diabetes no homem, uma caracterizada pela obesidade e outra ocorrendo em pessoas jovens. Em 1889, Mering & Minkowsk mostraram que a pancreatectomia podia produzir diabetes no cão.^{14,6}

No ano de 1869 o cientista Langerhans descobriu as ilhotas pancreáticas, que mais tarde serviria como parâmetro para as pesquisas de insulina.^{14,15,6}

A conquista subsequente foi o isolamento da insulina, em 1921 por Banting & Best. Ainda na década de 20, foi introduzido o teste de tolerância à glicose.¹⁴ Em 1922, foi aplicada a primeira dose de insulina com finalidade terapêutica, já que o cientista Banting obteve diversos conhecimentos e descobertas sobre a terapia da doença.^{15,6}

Na década de 30, a retinopatia e nefropatia diabética foram reconhecidas como complicações específicas do diabetes.¹⁴ Entre 1950 e 1960, o interesse voltou-se para a área do tratamento e prevenção das complicações da doença.¹⁴ Nos anos 60, importantes aquisições foram

feitas ao processo de síntese de insulina e a descoberta dos efeitos metabólicos do glucagon e outros hormônios. ^{6,14}

Nos anos 70, a insulina purificada foi extraída de animais. Em 1979, o **“National Diabetes Data Group”** sugeriu critérios de classificação e diagnóstico, os quais foram subsequentemente adotados pela OMS, através do seu comitê especializado em diabetes. ¹⁴ Na década seguinte, chegou-se à conclusão que o diabetes é fator de risco isolado para enfartes e derrames. ¹⁶

Atualmente, os esforços continuam inúmeros a fim de desvendar, ainda mais, os mistérios da doença. Os cientistas buscam medicamentos mais potentes e eficazes; são realizadas cirurgias, como o transplante de pâncreas, entre outras terapêuticas, visando mudar positivamente a vida dos portadores.

A hiperglicemia é resultado da deficiência insulínica, em presença excessiva, mesmo que relativa ou absoluta de hormônio glucagon. A privação de insulina leva a desenvolver a cetose, sendo provocada por uma modificação pancreática que se apresenta através de uma ação hormonal menor em nível periférico, ou depleção da secreção de insulina. ¹

A insulina é um hormônio que propicia a utilização periférica da glicose no tecido muscular e adiposo, inibe a glicogenólise e a neoglicogênese hepática e aumenta a síntese de proteínas e lipídios. Quando ocorre uma atuação deficiente desse hormônio, há diminuição da utilização de glicose pelos tecidos insulino-dependentes e aumenta o ritmo de produção endógena, o que acarreta a elevação dos níveis sanguíneos de açúcar. ¹

O emagrecimento causado pela doença é proporcional à falha da insulina presente no organismo, e se deve ao estado catabólico em conjunto com as perdas hídricas. ^{1,6}

O DM causa inúmeros sinais e sintomas locais e sistêmicos: hiperglicemia, polidipsia, poliúria, polifagia, emagrecimento, freqüente prurido genital, às vezes cetose e repercussões no metabolismo glicídico, lipídico, protéico e hidromineral. Com o passar do tempo, podem ocorrer

lesões na circulação que levam ao comprometimento dos rins, olhos, nervos, músculos, peles, ossos, placenta, pulmões entre outros, provocando neles danos funcionais endoteliais, espessamento da membrana basal, aumento da viscosidade e adesividade plaquetária, agregação eritroplaquetária, obliteração e microtrombose.^{1,6}

Existem algumas teorias sobre a etiopatogenia da doença. A DM tipo 1 é uma disfunção catabólica, e a circulação da insulina é insuficiente, o glucagon no plasma é elevado, e as células beta pancreáticas não respondem a todos os estímulos secretórios de insulina. Os pacientes que apresentam a DM necessitam de insulina exógena para reverter os sintomas.^{5,6}

Uma segunda teoria é que a DM tipo 1 é uma doença auto-imune. O pâncreas se apresenta com infiltração linfocítica e morte das células que secretam insulina nas ilhotas de Langerhans, provocando falha na secreção de insulina. Os portadores da doença possuem células circulantes de anticorpos das ilhotas, e grande parte também apresentam anticorpos de insulina detectáveis antes de receberem terapia com insulina. A maioria dos anticorpos das células das ilhotas são mobilizadas contra a descarboxilase do ácido glutâmico dentro das células pancreáticas beta.^{5,6}

Outra teoria proposta à etiologia da DM tipo 1, é que ela é resultado de uma lesão às células beta pancreáticas por um agente ambiental infeccioso. Este ativa o sistema imunológico num indivíduo que já é suscetível a desenvolver uma resposta auto-imune contra os antígenos de células beta pancreáticas ou às moléculas nas células beta que se parecem com uma proteína viral.^{5,6}

Atualmente, a auto-imunidade é proposta e considerada o principal fator na fisiopatologia da DM tipo 1. A prevalência é mais elevada em portadores de outras doenças auto-imunes, tais como doença de Graves, tireoidite de Hashimoto e doença de Addison.⁶

A ausência de insulina induz o aumento do catabolismo protéico, já que o organismo não consegue absorver toda a glicose que entra no

organismo, causando perda de peso e atrofia muscular, bem como a ativação do hormônio lipase-sensível que leva a uma atividade lipolítica alterada causando diminuição de peso corpóreo mesmo nos animais mais obesos.

O metabolismo lipídico anormal no fígado faz com que os ácidos graxos sejam convertidos em acetilcoenzima A, ao invés de serem incorporados aos triglicerídeos. O ACoA acumula-se no fígado e é convertido em acetoacetilCoA que é transformado em ácido acetoacético causando a cetoacidose metabólica característica da doença.

A cetonemia em conjunto com a hiperglicemia já instalada, estimula **os receptores na zona "trigger" no hipotálamo causando náusea, vômito e** possível anorexia. O estado de anorexia causa desidratação baixando a taxa de filtração glomerular acumulando glicose e cetonas. A azotemia pré-renal leva à falência renal seguida de choque e morte. ¹⁰

No modelo experimental, optou-se pelo rato Wistar, considerando sua fácil obtenção, manuseio, elevada resistência à infecção e principalmente pelas características positivas apresentadas durante a instalação do diabetes. Além desses fatos, por apresentarem semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com diabetes humano.

A separação dos animais em grupos experimentais possibilitou analisar comparativamente o desenvolvimento da doença nos animais.

A deficiência de insulina determina no organismo, o aparecimento da síndrome do diabetes mellitus, um estado patológico marcado pela hiperglicemia, polidipsia, poliúria e polifagia. ⁶

As complicações metabólicas observadas no organismo com deficiência de insulina traduzem basicamente, o elevado grau de dependência dos diversos órgãos ao hormônio.

Optou-se pela utilização da Estreptozotocina, devido às suas características apresentadas serem semelhantes às encontradas em humanos, fácil utilização, destruição das células beta pancreáticas comprovada por trabalhos na literatura e rápido princípio de ação.

Foram inúmeras as tentativas de buscar na literatura trabalhos anteriores que detalhassem de forma clara, simples e completa os procedimentos executados na indução do diabetes. A maioria se apresentava de forma resumida, ou mais como um relato do que como uma exposição da técnica, e não apresentaram imagens que facilitassem a visualização dos procedimentos passo a passo. Portanto, inicialmente tínhamos um conhecimento muito limitado, e por si só não poderíamos iniciar o trabalho.

Diante dessas dificuldades, foi muito importante o contato que tivemos com a Prof^a. Ass. Dr^a. Alessandra Marcondes Aranega, o qual já tinha trabalhado com a indução de diabetes em sua Tese, em tempos passados. A sua orientação, durante a pesquisa, foi de extrema importância em todas as etapas da realização desta metodologia.

Entendemos, portanto, a suma importância da execução e documentação detalhada do método de indução de diabetes mellitus neste trabalho. Com esta descrição, podem ser realizadas novas pesquisas tendo como base esta metodologia, a fim de obter novas informações referentes à doença.

6 Conclusão

Após a reprodução, documentação e detalhamento do modelo experimental de diabetes com a administração de STZ, pudemos concluir que:

- 1- O modelo é de fácil reprodução quando efetuado com planejamento.
- 2- A droga eleita para a indução foi eficiente, demonstrado clinica e laboratorialmente, e de fácil aplicação.
- 3- A manipulação dos animais diabéticos requer um cuidado maior pela elevação do nível de estresse.
- 4- A manutenção dos animais como limpeza das gaiolas e disponibilidade de água e comida deve ser redobrada.

Referências

- 1- CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria**: estudo experimental em ratos diabéticos. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2002.
- 2- GOMES, K. R.; TOLEDO-PINTO, E. A. Estudo de diabetes mellitus em cães: Revisão de Literatura. In: Semana de Patologia Veterinária e do Simpósio de Patologia Veterinária do Centro Oeste Paulista, 2., Garça. **Anais Eletrônicos...** Garça: FAMED. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria05/anais/artigo04.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2010.
- 3- O QUE é diabetes. **Saúde é vital**. 2010. Disponível em: <http://saude.abril.com.br/especiais/diabete/conteudo_138196.shtml>. Acesso em: 6 maio 2010.
- 4- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diabetes tipo 2**. 2010. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/tipos-de-diabetes/125-diabetes-tipo-2->>. Acesso em: 6 maio 2010.
- 5- MEDCENTER.. **Diabetes Mellitus**. 2010. Disponível em: <http://www.medcenter.com/Medscape/content.aspx?LangType=1046&menu_id=49&id=10688>. Acesso em: 6 maio 2010.
- 6- DIABETES mellitus. 2010. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus#Epidemiologia>. Acesso em: 10 out.2009.

7- CARVALHO, A. R. S.; VIVIAN, K. I.; PICCOLI, M. Identificando as complicações do diabetes mellitus em freqüentadores de um centro regional de especialidades. In: Seminário Nacional Estado e Políticas Sociais no Brasil, 2., 2005, Cascavel. **Anais**...Cascavel: Unioeste, 2005.

8- SOUZA, R. R.; CASTRO, R. D.; MONTEIRO, C. H.; SILVA, S. C.; NUNES, A.B. O paciente odontológico portador de diabetes mellitus: uma revisão de literatura. **Pesqui. Bras. Odontopediatr. Clin Integr.**, v. 3, n. 2, p. 71-77, jul./dez., 2003. Disponível em: <eduep.uepb.edu.br/pboci/pdf/Artigo10v32.pdf>. Acesso em: 6 maio 2010.

9- SANTOS ROSA, R.; SCHIMIDT, M. I; DUNCAN, B. B.; SOUZA, M. F. M.; LIMA, A. K.; MOURA, L. Internações por diabetes mellitus como diagnóstico principal na Rede Pública do Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 10, n. 4, p. 465-478, dez. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v10n4/03.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2010.

10- PEDROSA FURLAN, M. M. D. A estreptozotocina como agente diabetogênico. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar.**, v. 5, n. 2, p. 197-201, maio/ago. 2001.

11- RIBEIRO, C; OLIVEIRA, C. A. M.; MELLO, M. A. R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental. **Rev. Motriz**, v. 13, n. 1, p. 72-77, jan./abr. 2007. Disponível em: <www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/motriz/article/.../744>. Acesso em: 6 maio 2010.

12- LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, A. S.; 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, Mar./Apr. 2003.

13- PIROT, P.; CARDOSO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mecanismos de destruição e morte da célula beta pancreática no diabetes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 2, Mar. 2008.

14- SOUZA, P. M. **Efeitos da betametasona sobre a glicemia de ratos normais e diabéticos aloxânicos.** 1992. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na Área de Farmacologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp, Campinas-SP, 1992.

15- CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cir. Bras.**, v.18, n. esp., p. 60-64, 2003.

16- GOMES, K. R.; TOLEDO-PINTO, E. A. Estudo de diabetes mellitus em cães: revisão de literatura. In: Semana de Patologia Veterinária e do Simpósio de Patologia Veterinária do Centro Oeste Paulista, n.2, Garça. **Anais Eletrônicos...** Garça: FAMED, 2004. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria05/anais/artigo04.pdf>>. Acesso em 16 ago. 2010.

17- CÁSSIA PINHEIRO, E. **Efeito da gentamicina sobre a severidade do diabetes, induzido por aloxana em ratos.** 1988. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia na área de Fisiologia e Biofísica) - Unicamp, Campinas-SP, 1988.

18- PRADA, F. J. A. **Efeito diabetogênico da aloxana em ratos submetidos à desnutrição protéica.** 2000. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia) - Unicamp, Campinas-SP, 2000.

19- STOPPA, G. R. **Avaliação do sistema antioxidante de ratos diabéticos submetidos à atividade física regular.** 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica) – Unicamp, Campinas-SP, 2002.

20- SPADELLA, C. T.; MERCADANTE, M. C. S. Experimental pancreas transplantation. The consequences of the portocaval shunt on the blood glucose, plasma insulin and glucagon. **Acta Cir. Bras.**, v. 12, n. 3, p. 154-158, Jul./Set. 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502003000200010>. Acesso em: 16 ago. 2010.

21- JUNIOR, E. R. S. **O efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina em ratas wistar na fase pré-gestacional e gestacional e suas conseqüências no concepto.** 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, Campinas, 2006.