

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WAGNER HERBERT SOBOTKA

**USO DE ESTREPTOZOTOCINA E DIETA ENRIQUECIDA EM
SACAROSE NA INDUÇÃO DE OBESIDADE, RESISTÊNCIA
PERIFÉRICA À INSULINA E INTOLERÂNCIA À GLICOSE EM RATOS**

CURITIBA

2012

WAGNER HERBERT SOBOTKA

**USO DE ESTREPTOZOTOCINA E DIETA ENRIQUECIDA EM
SACAROSE NA INDUÇÃO DE OBESIDADE, RESISTÊNCIA
PERIFÉRICA À INSULINA E INTOLERÂNCIA À GLICOSE EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

CURITIBA

2012

Sobottka, Wagner Herbert

Uso de estreptozotocina e dieta enriquecida em sacarose na indução de obesidade, resistência periférica à insulina e intolerância à glicose em ratos / Wagner Herbert Sobottka. - Curitiba, 2012.

72 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas.

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

1.Estreptozotocina. 2.Obesidade. 3.Indução de diabetes.
4.Diabetes Mellitus experimental. I.Título.

NLM WK 810



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 387ª dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **WAGNER HEBERT SOBOTTKA** com o Título USO DE ESTREPTOZOTOCINA E DIETA ENRIQUECIDA EM SACAROSE NA INDUÇÃO DE OBESIDADE, RESISTÊNCIA PERIFÉRICA À INSULINA E INTOLERÂNCIA À GLICOSE EM RATOS Linha de Pesquisa Cicatrização e Medidas de Resistência dos Tecidos Área de Concentração: Nutrição e Cicatrização em Cirurgia, tendo como orientador Professor Doutor Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas.

Às sete horas e trinta minutos do dia vinte e oito de dezembro de dois mil e doze, no auditório da CAD sala 701 - 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores Cristiano Coletto Druszcz, Flavio Heuta Ivano e Flávio Daniel Saavedra Tomasich sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias, Vice-coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da dissertação como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua dissertação no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a argüição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a argüição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de argüição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata por mim Regina Aparecida Sass Marques Secretária desta Pós-Graduação, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora de Avaliação.


Cristiano Coletto Druszcz


Flávio Daniel Saavedra Tomasich


Flavio Heuta Ivano



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno **WAGNER HEBERT SOBOTTKA**

Título da Dissertação: USO DE ESTREPTOZOTOCINA E DIETA ENRIQUECIDA EM SACAROSE NA INDUÇÃO DE OBESIDADE, RESISTÊNCIA PERIFÉRICA À INSULINA E INTOLERÂNCIA À GLICOSE EM RATOS.

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
Crhistiano Coletto Druszcz	A	10,0
Flavio Heuta Ivano	A	10,0
Flávio Daniel Saavedra Tomasich	A	10,0

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Conceito Final: A Equivalência: 10,0

Curitiba, 28 de dezembro de 2012.

MEMBROS	ASSINATURA
Crhistiano Coletto Druszcz	
Flavio Heuta Ivano	
Flávio Daniel Saavedra Tomasich	

À minha esposa Juliana
Aos meus pais Daniel e Esther
Aos meus irmãos Jonatan e Mathias
Aos meus avós Herbert e Nelsa

AGRADECIMENTOS

Ao PROF. DR. ALEXANDRE COUTINHO TEIXEIRA DE FREITAS, pelo apoio a este projeto, desde seu início. Por acreditar em mim e por orientar minha vida acadêmica e meus quatro anos de residência em Cirurgia do Aparelho Digestivo, e, principalmente pela paciência.

Ao PROF. DR. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, pela valorosa ajuda e dedicação em minha formação acadêmica durante estes longos anos.

Ao PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, pela grande dedicação dispendida na coordenação do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Aos amigos e cirurgiões DR. JOÃO CAETANO MARCHESINI, DR GIORGIO ALFREDO PEDROSO BARETTA, DR GLAUCO AFONSO MORGENTERN, DR JOÃO HENRIQUE FELÍCIO LIMA, DR GUSTAVO RODRIGUES ALVES CASTRO, DR. JOSÉ ALFREDO SADOWSKI e DRA SILVANIA KLUG PIMENTEL pela valorosa contribuição e apoio.

“As convicções são inimigas mais perigosas da verdade do que as mentiras.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Há um crescente número de indivíduos com obesidade e sobrepeso, o que vem incrementando o número de pacientes resistentes à insulina e portadores de diabetes mellitus tipo II (DM2). O DM2 é uma doença multifatorial com graves complicações e com tratamento clínico distante de resultados satisfatórios. Estudos em cirurgia bariátrica e metabólica na tentativa de tratar o DM2 trazem a necessidade de modelos animais para comprovação de novas técnicas cirúrgicas. Este estudo visa desenvolver um modelo experimental por meio da ação da estreptozotocina e da dieta enriquecida com sacarose na indução de obesidade, resistência periférica à insulina e intolerância à glicose em ratos. Utilizamos quatro grupos com 12 ratos Wistar. Os grupos controle receberam dieta padrão por oito e 16 semanas (GC8 e GC16) enquanto os grupos experimentais receberam uma dose de estreptozotocina intraperitoneal e dieta enriquecida com sacarose à 30% durante esses períodos (GE8 e GE16). Foi aferida a progressão do peso a cada duas semanas. No final do estudo foi realizada aferição de glicemia de jejum, colesterol total, triglicérides e teste oral de tolerância à glicose. Foi também realizado pesagem do fígado, do pâncreas, da gordura retroperitoneal e do epidídimo. Os dados foram analisados estatisticamente com o teste “t” de Student, Mann-Whitney e ANOVA para medidas repetidas e considerados significativos com valor de $p < 0,05$. Foram encontrados resultados significativos no peso do GE16, no peso do epidídimo e gordura retroperitoneal no GE8 e GE16, no peso do fígado no GE16. Na análise bioquímica houve diferença no valor de colesterol total no GE16 e na glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose nos grupos de oito e 16 semanas. A estreptozotocina associada a dieta enriquecida com sacarose teve efeito positivo na indução de obesidade, obesidade visceral, hipercolesterolemia, intolerância à glicose e diabetes tipo II em ratos.

Palavras chave: Estreptozotocina. Indução de diabetes. Obesidade. Diabetes mellitus experimental

ABSTRACT

The number of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM, Type 2) and impaired glucose tolerance patients are increasing along with the growing prevalence of obesity. NIDDM is associated with many factors and has serious long term complications; its management has been far from ideal in the most part of patients. Bariatric and metabolic surgery as treatment options have been studied, but experimental research has required better animal models. This study aim is to develop an experimental model of obesity, insulin resistance and impaired glucose tolerance induced by streptozotocin (STZ) and sucrose enriched diet in rats. Four groups of 12 Wistar rats were created. Two control groups received the standard diet for 8 and 16 weeks (CG8 and CG16) and to the other two groups a intraperitoneal dose of STZ was administered along with oral 30% sucrose enriched diet over 8 and 16 weeks (EG 8 and EG16). Every 2 weeks the body weight gain was checked. At the end of the study the blood levels of glucose, cholesterol and triglycerides and oral glucose tolerance test (OGTT) were checked. Liver, pancreas, retroperitoneal fat and epididymis were weighted. The data were expressed as mean \pm SEM (standard error of mean). Statistical differences between groups were analyzed using one-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by student-t test and Mann Whitney test. The difference was considered statistically significant at p value <0.05. Significant differences were found in the EG16 body weight, epididymis weight and retroperitoneal fat weight in the EG8 and EG16 and liver weight in the EG16. There were significant differences in the cholesterol level in the EG16, glucose level and OGTT in the EG8 and EG16. Streptozotocin with sucrose enriched diet had induced obesity, visceral obesity, hypercholesterolemia, impaired glucose tolerance and NIDDM in rats.

Keys words: Streptozotocin. Diabetes induction. Obesity. Diabetes Mellitus, Experimental

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGL -	Ácidos Graxos Livres
ASBS -	<i>American Society for Bariatric Surgery</i>
CEP/SD –	Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde
CNS –	Conselho Nacional de Saúde
DM1 -	Diabetes Tipo 1
DM2 -	Diabetes Tipo 2
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DP –	Desvio Padrão
GC16 -	Grupo Controle 16 semanas
GC8 -	Grupo Controle oito semanas
GE16 -	Grupo Experimental 16 semanas
GE8 -	Grupo Experimental oito semanas
GLP – 1 -	<i>Glucagon-like-peptide 1</i>
GLUT -	Proteína Transportadora de Glicose
HDL -	Lipoproteínas de Alta Densidade
HE -	Hematoxilina-eosina
HOMA-IR -	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
IL-6 -	Interleucina – 6
IMC -	Índice de Massa Corpórea
INMETRO –	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Kg/m ² -	Kilograma por Metro Quadrado
L/min -	Litros por Minuto
LDL -	Lipoproteínas de Baixa Densidade
M –	Valores Médios
Mg/dL -	Miligramas por Decilitro
Mg/kg -	Miligrama por Kilograma
NAD -	Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo
NCEP -	<i>National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III</i>
NHLBI -	<i>National Heart, Lung, Blood Institute</i>
NIH -	<i>National Institutes of Health</i>
OMS -	Organização Mundial da Saúde

pMol/L -	Pico mol por Litro
REH -	Ratos Espontaneamente Hipertensivos
SM -	Síndrome Metabólica
STZ -	Estreptozotocina
TNF-alfa -	Fator de Necrose Tumoral alfa
TOTG -	Teste Oral de Tolerância à Glicose
UFPR -	Universidade Federal do Paraná
VLDL -	Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 OBESIDADE.....	14
2.2 DIABETES.....	15
2.3 SÍNDROME METABÓLICA.....	17
2.4 ESTREPTOZOTOCINA.....	19
2.5 MODELOS ANIMAIS DE DIABETES E SÍNDROME METABÓLICA.....	20
2.5.1 Modelos genéticos.....	21
2.5.2 Modelos por indução nutricional.....	22
2.5.3 Modelos por redução de células beta-pancreáticas e modelos mistos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODO	29
3.1 COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA.....	29
3.2 ANIMAIS.....	29
3.3 AMBIENTE E ALIMENTAÇÃO.....	29
3.4 GRUPOS.....	30
3.5 MATERIAIS E PRODUTOS UTILIZADOS.....	30
3.6 PESAGEM DOS ANIMAIS.....	31
3.7 MANIPULAÇÃO E ANESTESIA.....	31
3.8 DIETA ENRIQUECIDA COM SACAROSE.....	32
3.9 ESTREPTOZOTOCINA.....	32
3.10 GLICEMIA DE JEJUM, TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E BIOQUÍMICA.....	33

3.11 MORTE DOS ANIMAIS.....	34
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS.....	36
4.1 PESOS DOS ANIMAIS.....	36
4.2 PESOS DO FÍGADO, PÂNCREAS, GORDURA RETROPERITONEAL E EPIDÍDIMO.....	38
4.3 GLICEMIA DE JEJUM.....	43
4.4 COLESTEROL TOTAL E TRIGLICERÍDEOS.....	44
4.5 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	47
5 DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICES.....	63
ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Há um crescente número de indivíduos com obesidade e sobrepeso, o que vem incrementando o número de pacientes resistentes à insulina e portadores de diabetes mellitus tipo 2 (não insulino dependente). Fatores ambientais e principalmente mudanças no estilo de vida como sedentarismo e aumento do consumo de energia são apontados como as principais causas. Fatores importantes envolvidos na patogênese do diabetes mellitus tipo 2 são a resistência periférica à insulina e a hiperinsulinemia. Quando estão associadas à dislipidemia, à obesidade e à hipertensão arterial sistêmica formam a síndrome metabólica, acarretando aumento no risco de doenças cardiovasculares (NAIR, 2007).

Em 1997 a Organização Mundial da Saúde estimou 143 milhões de pessoas diagnosticadas com diabetes em todo o mundo. A previsão para 2025 é de 300 milhões, com incremento principalmente em países desenvolvidos, devido ao aumento da idade, da obesidade e do sedentarismo (OMS, 1998). No Brasil, de acordo com estimativas do Ministério da Saúde, havia aproximadamente cinco milhões de pacientes com diagnóstico de diabetes em 1996, 90% deles com diabetes tipo 2 (BRASIL. MS, 1996). O diabetes é um capítulo de extrema importância na saúde pública, pois sua incidência e prevalência estão alcançando dimensões epidêmicas. É relacionado a várias complicações, que atingem diretamente a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes diabéticos (BROWNLEE, 2001).

A cirurgia bariátrica é o tratamento de escolha para pacientes com obesidade mórbida, isto é, pacientes com índice de massa corpórea acima de 40 kg/m². Em pacientes obesos com comorbidades associadas, a indicação cirúrgica ocorre com índices de massa corpórea a partir de 35 kg/m². Entre eles estão os pacientes diabéticos que não apresentam controle metabólico adequado. Essas técnicas cirúrgicas têm demonstrado controle adequado dos níveis glicêmicos nesses pacientes. Técnicas restritivas, disabsortivas e mistas já foram descritas. Na atualidade os melhores resultados em relação à perda de peso encontram-se nas cirurgias mistas como as técnicas de Fobi e Capella, Scopinaro, Hess e Marscaux (FOBI; CAPELLA R.F.; CAPELLA, J.F.,1991; HESS; MARSCAUX, 1998; SCOPINARO, 1979).

A cirurgia bariátrica proporcionou o controle do diabetes entre 83 e 98% dos casos dependendo da técnica mista utilizada. Um grande interesse da comunidade científica surgiu em relação ao mecanismo desse controle (BUCHWALD, 2004). Atualmente, o estudo das incretinas, fatores secretados pelo trato gastrointestinal em resposta a ingestão oral de carboidratos e lipídeos, capazes de estimular a secreção de insulina, apresenta grande evidência na literatura. Os efeitos de procedimentos cirúrgicos associando a exclusão duodenal e contato precoce dos nutrientes com o intestino delgado distal sobre as incretinas têm sido relatado em vários estudos (GUIDONE, 2006; MASON, 1999; STRADER, 2005; CREUTZFELD, 1979). Atualmente a incretina mais estudada é o GLP – 1 (*glucagon-like-peptide 1*), produzido pelas células L do íleo terminal, cuja secreção é diretamente relacionada à presença de nutrientes nessas células. Possui ações insulínótropicas e antiapoptóticas para células beta-pancreáticas (LIM, 2006).

Considerando os resultados positivos da cirurgia bariátrica no controle dos níveis glicêmicos, várias novas propostas cirúrgicas têm sido idealizadas e sugeridas para tornar possível restringir o efeito sobre a perda de peso e permanecer com o efeito sobre o controle metabólico. Dessa forma busca-se dados científicos para a recomendação dessas técnicas cirúrgicas para pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com índices de massa corpórea inferiores à 35 kg/m^2 , o que hoje é conhecido na literatura como cirurgia metabólica. Nesse sentido há a necessidade de desenvolvimento de modelos experimentais para a comprovação do efeito das novas técnicas chamadas de cirurgia metabólica para que possam ser depois testadas em humanos.

A resistência à insulina é definida pela captação reduzida de glicose pelas células, principalmente miócitos e adipócitos, em concentrações fisiológicas de insulina, podendo ter causa genética ou adquirida. É necessária então uma maior produção de insulina pelas células beta-pancreáticas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais. Dessa forma os níveis séricos de insulina encontram-se elevados, caracterizando a hiperinsulinemia. Não há alteração das funções da insulina. A perda da capacidade pancreática de produzir insulina em grandes quantidades frente a estados de hiperglicemia caracteriza o estado de intolerância à glicose, que num quadro mais prolongado e intenso evoluirá para o diabetes (MACHADO; SCHANN; SERAPHIN, 2006).

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo experimental por meio da ação da estreptozotocina e da dieta enriquecida com sacarose durante oito a 16 semanas na indução de obesidade, resistência periférica à insulina e intolerância à glicose em ratos não geneticamente suscetíveis à obesidade.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de se atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estipulados:

- Determinar a progressão do peso dos animais;
- Determinar o aumento de peso das vísceras abdominais;
- Determinar níveis de glicemia de jejum, testes de tolerância à glicose, níveis séricos de colesterol e triglicerídeos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OBESIDADE

A obesidade tem etiologia multifatorial e se tornou um problema de saúde pública devido ao aumento da sua prevalência e consequente repercussão das suas comorbidades na saúde da população. Até mesmo níveis menores trazem efeitos nocivos à saúde com redução da expectativa de vida (FIELD; COAKLEY; MUST, 2001). Pode ser classificada de acordo com o índice de massa corpórea em obesidade leve, moderada, grave (mórbida) e superobesidade, como demonstrado na figura 1 (PI-SUNYER, 2000; US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 1998).

Classificações da Obesidade				
IMC (Kg/m²)	Classificação NHLBI 1998	NIH	ASBS	Risco NHLBI 1998
25 a 30	Sobrepeso	Sobrepeso	Sobrepeso (> 27) Obesidade Suave (27 a 30)	Risco Aumentado
> 30	Obeso	Obeso Classe I	Obesidade Moderada	Risco Moderado
> 35	Obeso	Obeso Classe II	Obesidade Severa	Risco Alto
> 40	Obeso Mórbido	Obeso Classe III	Obesidade Mórbida	Risco Muito Alto
> 50	Super Obeso	Obeso Classe IV	Super Obesidade	Risco Extremamente Alto*

ASBS = American Society for Bariatric Surgery
 NHLBI = National Heart, Lung, Blood Institute
 NIH = National Institutes of Health

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DA OBESIDADE
 FONTE: US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (1998)

Existem vários modelos animais para o estudo da obesidade. Pode ser induzida em animais por meio de modificações genéticas, neuroendócrinas e dietéticas. O estudo desses modelos vem demonstrando que o sistema nervoso central regula o gasto energético e a ingestão de alimentos, tendo também relação com glândulas suprarrenais, sistema nervoso autônomo e hábitos alimentares. A grande similaridade entre genoma humano e de roedores faz com que esse seja o modelo animal mais utilizado. Proporcionalmente pode se comparar e aferir alterações de peso corporal em ratos em 10 dias, o que levaria um ano se fosse

aferido em seres humanos. Dentre os modelos de indução de obesidade em animais destacam-se a Lesão do Núcleo Hipotalâmico Ventromedial que pode ser realizada com lesão elétrica direta ou injeção de monoglutamato de sódio; ooforectomias; modelos utilizando dietas hipercalóricas e modelos genéticos (VON DIEMEN, TRINDADE, E.N.; TRINDADE, M.R.M, 2006).

2.2 DIABETES

O diabetes consiste em uma doença única, porém contendo um grupo heterogêneo de distúrbios. O que há de comum a todos eles é a hiperglicemia. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2007). Hoje o diabetes é classificado quanto à etiologia. Segundo a Organização Mundial da Saúde e a Associação Americana de Diabetes, o diabetes é dividido em quatro classes: diabetes tipo 1 (autoimune ou idiopático), diabetes tipo 2, outros tipos específicos de diabetes (FIGURA 2) e diabetes gestacional.

O diabetes tipo 1 é o resultado da destruição das células beta-pancreáticas com tendência a cetoacidose. Pode ser mediada por autoimunidade, porém há casos sem associação com processos autoimunes que são conhecidos como forma idiopática. O diabetes tipo 1 compreende 5% a 10% dos casos de diabetes.

O surgimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ocorre por um período de tempo variável, que passa por estágios intermediários como glicemia de jejum alterada e tolerância a glicose diminuída. Nesses estágios é observada a combinação de resistência periférica à insulina e disfunção de células beta-pancreáticas, além de fatores genéticos, ambientais e obesidade. Esse tipo compreende 85% a 90% dos casos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007). A resistência à ação da insulina pode ser estimada através do cálculo do *Homeostasis Model Assessment* (HOMA-IR), que consiste no valor da insulina em jejum multiplicada pela glicose plasmática. Esse valor é dividido pelo fator 22,5.
$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina em jejum (pmol/L)} \times \text{glicose plasmática em jejum (mmol/L)}] / 22,5.$$
 Métodos mais complexos e dinâmicos como o clampe euglicêmico e o teste intravenoso de tolerância à glicose também podem ser utilizados (BORAI *et al.*, 2011).

Outros tipos específicos de DM
Defeitos genéticos na função das células beta
<p>MODY 1 (defeitos no gene HNF-4 alfa)</p> <p>MODY 2 (defeitos no gene da glicoquinase)</p> <p>MODY 3 (defeitos no gene HNF-1 alfa)</p> <p>MODY 4 (defeitos no gene IPF-1)</p> <p>MODY 5 (defeitos no gene HNF-1 beta)</p> <p>MODY 6 (defeitos no gene Neuro D1)</p> <p>DM mitocondrial</p> <p>Outros</p>
Defeitos genéticos na ação da insulina
<p>Resistência à insulina tipo A</p> <p>Leprechaunismo</p> <p>Síndrome de Rabson-Mendenhall</p> <p>DM lipoatrófico</p>
Doenças do pâncreas exócrino
<p>Pancreatite</p> <p>Pancreatectomia ou trauma</p> <p>Neoplasia</p> <p>Fibrose cística</p> <p>Pancreatopatia fibrocalculosa</p>
Endocrinopatias
<p>Acromegalia</p> <p>Síndrome de Cushing</p> <p>Glucagonoma</p> <p>Feocromocitoma</p> <p>Somatostinoma</p> <p>Aldosteronoma</p>
Induzido por medicamentos ou agentes químicos
<p>Determinadas toxinas</p> <p>Pentamidina</p> <p>Ácido nicotínico</p> <p>Glicocorticóides</p> <p>Hormônio tireoideano</p> <p>Diazóxido</p> <p>Agonistas betadrenérgicos</p> <p>Tiazídicos</p> <p>Interferon alfa</p> <p>Outros</p>
Infecções
<p>Rubéola congênita</p> <p>Citomegalovírus</p>

FIGURA 2 - OUTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES
 FONTE: SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2006)

2.3 SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica (SM) consiste em uma situação clínica que agrupa fatores de risco cardiovascular. Fazem parte desta síndrome a obesidade, a dislipidemia e a hipertensão arterial. Manifestações de disfunção endotelial causam aumento do risco de eventos cardiovasculares e diabetes tipo 2. A resistência a ação da insulina é um fator causal chave. Em 1999 a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a síndrome metabólica baseada em dados clínicos e laboratoriais facilmente aferidos. Fazem parte dos critérios a glicemia de jejum, resistência periférica à insulina, pressão arterial, perfil lipídico (triglicerídeos e colesterol HDL), índice de massa corpórea, microalbuminúria e circunferência de quadril e cintura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Em 2001, o *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III* (NCEP, 2001) propôs uma série de critérios semelhantes, porém mais simples de serem avaliados, os quais incluem: glicemia de jejum, pressão arterial, cintura, triglicerídeos e colesterol HDL. São os critérios mais frequentemente utilizados. Tem sido sugerido que cada população tenha esta definição validada de acordo com as suas características étnicas locais.

Um estudo avaliou 753 pacientes com diabetes tipo 2, com critérios de glicemia de jejum maior que 126 mg/dl, ausência de episódios prévios de cetoacidose diabética, idade do diagnóstico maior que 30 anos e ausência de necessidade de uso de insulina por cinco anos a partir do diagnóstico (PICON *et al.*, 2006). Todos os pacientes foram classificados quanto à presença de síndrome metabólica utilizando a classificação da OMS e da NCEP. Foram classificados como pacientes com síndrome metabólica 89% e 87%, respectivamente.

Uma interação entre resistência a insulina, inflamação e obesidade é a hipótese fisiopatológica que mais amplamente unifica os diversos itens da síndrome metabólica. A resistência à insulina correlaciona-se com o grau de obesidade, especialmente a abdominal, e é forte fator preditivo para o desenvolvimento de diabetes, assim como o é a presença de processo inflamatório difuso e a obesidade. A insulina, além de seus clássicos efeitos na homeostase glicêmica, também apresenta atividades anti-inflamatórias, de forma que um estado de resistência à insulina não apenas reduz a utilização de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis, mas também estimula a sinalização pró-inflamatória (DANDONA *et al.*, 2005).

A resistência à insulina tem como mais importante contribuinte o excesso de ácidos graxos livres (AGL) circulantes, os quais se originam do tecido adiposo e das lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Em acordo com as ações antilipolíticas e de estímulo à lipase lipoprotéica da insulina, a resistência a este hormônio é determinante de lipólise e aumento de AGL. No fígado, os AGL aumentam a produção de glicose, triglicerídeos e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), associando-se redução do colesterol contido na lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento da densidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). No músculo, os ácidos graxos livres reduzem a sensibilidade à insulina, inibindo a captação de glicose insulino-mediada. Dados epidemiológicos demonstrando papel preditivo dos AGL no desenvolvimento do diabetes suportam os dados fisiopatológicos descritos (PANKOW *et al.*, 2004). Aumento da glicose circulante e liberação de ácidos graxos livres aumentam a secreção de insulina do pâncreas, resultando em hiperinsulinemia, a qual pode levar à retenção de sódio e aumento da atividade simpática, contribuintes da hipertensão.

Tanto o tecido adiposo como outras células secretam excessivamente interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e outras citocinas, além de haver redução da adiponectina, citocina com propriedades anti-inflamatórias. Essas alterações resultam em maior resistência à insulina e lipólise, aumentando ácidos graxos livres e produção hepática de glicose, além da produção de fibrinogênio pelo fígado, resultando em estado pró-trombótico. A síndrome metabólica abrange uma grande variedade de alterações fisiopatológicas, todas de repercussões sistêmicas, acometendo os mais distintos territórios do organismo, nos quais alterações nos transportadores de glicose presentes são observadas em maior ou menor grau.

Os transportadores de glicose, denominados GLUTs, são um conjunto de 14 moléculas de membrana que localizados em vários órgãos e tecidos que permitem a difusão facilitada de glicose através da membrana celular (FIGURA 3). Apresentam propriedades distintas no metabolismo da glicose e homeostase glicêmica. O efeito da síndrome metabólica nos GLUTs foi estudado em vários órgãos. No músculo cardíaco ocorre diminuição do GLUT 4, com diminuição do metabolismo celular. Já no músculo esquelético e tecido adiposo a diminuição do GLUT 4 está associada a aumento da glicemia e diminuição da sensibilidade à insulina. Na célula beta-

pancreática há diminuição de GLUT 2 com diminuição da secreção de insulina (SHEPPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004).

Proteínas Transportadoras de Glicose (GLUTs)

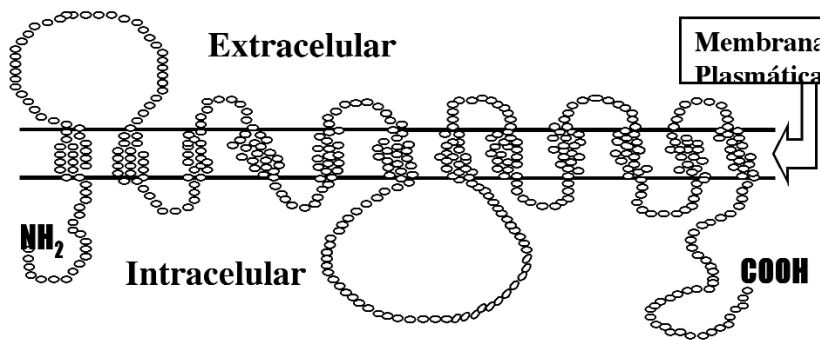


FIGURA 3 - ESTRUTURA BIDIMENSIONAL DAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE GLICOSE (GLUTs)

FONTE: MACHADO, SCHANN, B.D.; SERAPHIN (2006)

2.4 ESTREPTOZOTOCINA

Os modelos experimentais para o estudo do diabetes contribuem para o esclarecimento sobre a doença, suas causas e consequências. A indução química do diabetes em animais experimentais ocorre após a destruição química seletiva das células beta-pancreáticas. Uma das substâncias diabetogênicas mais usadas é a estreptozotocina (STZ). A dose dessa droga para indução do diabetes depende da espécie do animal e do seu peso (SZKUDELSKI, 2001). A STZ é uma nitrosamina, inicialmente isolada do *Streptomyces achromogenes*. É uma molécula de glicose com uma cadeia lateral altamente reativa, que inicia a ação citotóxica (ISLAS-ANDRADE *et al.*, 2000). A molécula de glicose direciona a estreptozotocina para as células beta-pancreáticas, onde ela se liga ao transportador de membrana GLUT-2. Schnedl e colaboradores demonstraram que a toxicidade da estreptozotocina nas células beta-pancreáticas é devida à similaridade da molécula da STZ com a da glicose, permitindo que seja internalizada via transportadores GLUT-2 (SCHNEDL *et al.*, 1994; VERSPOHL, 2002).

A ação celular da estreptozotocina pode ser avaliada com necrose de células beta à microscopia eletrônica em duas a quatro horas da sua injeção. Análise com microscopia óptica evidencia insulinite e necrose de células beta após 24 horas. Ocorre alquilação de bases de DNA em vários níveis, as quais, quando reparadas, causam alterações no metabolismo das células beta-pancreáticas, acarretando depleção de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD) (ASPLUND *et al.*, 1984). Evidências apontam para o envolvimento do óxido nítrico na lesão da célula beta-pancreática durante o diabetes induzido por estreptozotocina (HALUZIK; NEDVIDKOVA, 2000).

2.5 MODELOS ANIMAIS DE DIABETES E SÍNDROME METABÓLICA

A compreensão do diabetes mellitus progrediu com o uso de modelos animais da doença. O entendimento de múltiplos aspectos da patologia, como a genética, bioquímica, fisiologia, complicações e estabelecimento de novas propostas terapêuticas foram impulsionados através de estudos em animais. O uso destes modelos possibilita a análise de fatores genéticos multifatoriais com observação de múltiplas gerações em um curto período de tempo. Análises de alterações bioquímicas, anatômicas e genéticas muitas vezes inacessíveis em seres humanos podem ser realizadas. Os modelos são muitos, divididos em modelos semelhantes ao diabetes não insulino dependente e em modelos semelhantes ao diabetes insulino dependente (DM1) (KARASIK; HATTORI, 1994).

Os modelos em diabetes normalmente são divididos quanto ao modo de surgimento da doença: surgimento espontâneo por cruzamentos isogênicos (genético), induzido por dieta ou por drogas. O modelo experimental animal considerado ideal por muitos autores para estudo dos efeitos da cirurgia metabólica em animais diabéticos é o rato Goto-Kakizaki (RUBINO; MARESCAUX, 2004; INABNET, 2009). Estes animais possuem um DM2 de surgimento espontâneo por meio de cruzamentos isogênicos e o padrão glicêmico é considerado bastante semelhante ao padrão do humano com diabetes tipo 2 (MISTRY; OMANA; KINI, 2009).

2.5.1 Modelos genéticos

Modelos genéticos são amplamente utilizados no estudo e tratamento do diabetes. O camundongo db/db, apresenta mutação em um único gene no cromossomo 4, que é autossômico recessivo com penetrância completa. Heterozigotos para esse gene apresentam obesidade com hiperglicemia grave e diabetes. Esses animais tornam-se hiperinsulinêmicos já com 14 dias, obesos nos primeiros dois meses de vida e hiperglicêmicos com resistência periférica a insulina com três meses. A partir daí apresentam redução gradativa da função das células beta pancreáticas, com perda de massa celular, degeneração e necrose. Aparece a perda de peso, cetoacidose e óbito entre cinco e nove meses (KAKU; PRIVINCE; PERMUTT, 1989).

Já o modelo genético do camundongo ob/ob apresenta um quadro de diabetes mais ameno em relação ao anterior. A mutação ob aparece no cromossomo seis e é autossômica recessiva. Os primeiros estágios são semelhantes ao db/db, com obesidade e hiperinsulinemia com graus variados de hiperglicemia, porém sem progredir para falência das células beta. Histologicamente há hipertrofia das ilhotas pancreáticas e hiperplasia das células beta. O animal apresenta hiperfagia e hiperplasia e hipertrofia dos tecidos adiposos (KARASIK; HATTORI, 1994).

Em 1965 foi descrito pela primeira vez o rato obeso fa/fa (*Zucher rat*). A obesidade é adquirida por uma mutação autossômica recessiva, que quando em homozigose desenvolve ratos com hiperfagia e obesidade extrema. O rato apresenta resistência insulínica, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e dislipidemia ao longo do ganho de peso. Células pancreáticas do tipo beta não são deterioradas e permanecem produzindo insulina, apresentando hiperplasia e hipertrofia (PENICAUD *et al.*, 1987).

A maioria dos modelos de roedores que desenvolvem diabetes tipo II espontaneamente são obesos. O rato BHE é uma exceção. Desenvolvido a partir de 1942 por cruzamentos de três linhagens de ratos em um centro de pesquisa norte-americano (*National Institutes of Health Animal Resources Center*). São ratos não obesos, que desenvolvem tolerância anormal à glicose a partir de 300 dias de vida, associados à dislipidemia com elevação de triglicerídeos, de colesterol e de esteatose hepática. São úteis no estudo de diabetes moderado em não obesos, porém não são comercializados (BERDANIER, 1991).

2.5.2 Modelos por indução nutricional

Há um número bastante grande de pesquisas utilizando estímulo por dieta para indução de obesidade, diabetes e alterações relacionadas na literatura. O rato da areia (*Psammomys obesus*) em seu habitat natural, áreas desérticas da África, apresenta dieta pobre em calorias, apresentando-se euglicêmico e normoinsulinêmico. Quando em cativeiro submetido a dietas hipercalóricas *ad libitum*, se torna obeso e desenvolve quadro o qual se apresenta com forma moderada a severa de hiperglicemia. A hiperinsulinemia torna-se evidente e quadro de hiperglicemia com gliconeogênese duas vezes o valor em relação a controles são demonstrados no tecido hepático. Na análise com microscopia óptica não apresentam modificações em relação a ratos normais. Apenas em fases mais avançadas de diabetes, que ocorrem em 10% dos casos, aparece degranulação das células beta. Esse modelo mimetiza grupos humanos como os índios Pima na América do Norte e os aborígenes australianos que quando submetidos a uma dieta ocidental apresentam altos índices de obesidade, resistência insulínica e intolerância à glicose (RICE; ROBERTSON, 1980).

O uso de dieta enriquecida por sacarose foi estudado por Kawasaki *et al.* (2005). Foram utilizados ratos Wistar, que em condições normais não desenvolvem diabetes e obesidade. Dezesesseis ratos machos receberam dieta normal acrescentada de solução de sacarose a 30% (300g/L) enquanto o grupo controle recebeu dieta e água normais. Foi aferido o peso entre três e 42 semanas de vida. Foram extraídos dados de glicemia de jejum, insulinemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose e teste intravenoso de tolerância à glicose. Foram obtidos resultados significantes em relação à diferença de peso médio ao final das 42 semanas (799g no grupo de estudo versus 636g no grupo controle). A glicemia de jejum demonstrou diferença significativa após 28 e 36 semanas do estudo. Já a insulinemia foi maior no grupo de estudo a partir de 12 semanas, mesmo sem diferença significativa de peso ou de glicemia de jejum nesse momento. Intolerância à glicose também foi comprovada nos testes com administração oral e endovenosa de glicose.

Em estudo sobre os efeitos da dieta hiperlipídica palatável em ratos por quinze semanas, Duarte *et al.* (2006) demonstraram efeitos sobre o ganho de peso, porém sem alterar os níveis de glicemia de jejum e de insulinemia em relação ao

grupo controle. Foram utilizados 32 ratos Wistar machos em cada grupo. Enquanto o grupo controle recebeu ração padrão, o grupo de estudo recebeu ração hipercalórica e hiperlipídica. Foram medidos os níveis de glicemia de jejum, de insulina de jejum, o peso da gordura retroperitoneal, o peso do epidídimo, do fígado, do músculo gastrocnêmio e do pâncreas. Foi realizada incubação das ilhotas de Langerhans para posterior aferição da insulina secretada *in vitro*. O pâncreas foi avaliado em microscopia óptica corado com Hematoxilina-Eosina (HE). Foi avaliado o conteúdo de glicogênio muscular e hepático por método calorimétrico. A dieta hipercalórica promoveu obesidade no grupo de estudo, aumentando significativamente o peso da gordura retroperitoneal e do epidídimo, comprovando aumento da gordura visceral. Não houve aumento significativo dos níveis de glicemia de jejum, da insulina de jejum, do peso de fígado e do gastrocnêmio, bem como o conteúdo de glicogênio nesse mesmo músculo, o gastrocnêmio. O conteúdo de glicogênio do fígado aumentou. Não foi encontrado aumento de secreção de insulina *in vitro* após estimulação com doses maiores ou menores que a fisiológica de glicose.

Outro estudo (SORIA; D'ALESSANDRO; LOMBARDO, 2001) demonstrou diferença entre ratos Wistar alimentados com dieta padrão em comparação com alimentados com um preparado rico em sacarose. Foram utilizados animais entre 180 e 200 g e divididos em grupos controle e experimental que recebiam dieta durante três ou 15 semanas. No grupo alimentado por três semanas observou-se significância nos níveis de insulinemia e trigliceridemia. No grupo alimentado por 15 semanas houve aumento significativo em relação à glicemia, à insulinemia, à trigliceridemia, ao peso, ao peso do epidídimo e, ao tamanho dos adipócitos no epidídimo. Dessa maneira, resistência periférica a insulina foi demonstrada já com três semanas de dieta rica em sacarose e obesidade, dislipidemia e intolerância a glicose surgiram com maior tempo do experimento.

Modelos de síndrome metabólica também têm sido estudados com indução por meio de dietas hipercalóricas palatáveis, conhecidas como dieta de cafeteria. Naderali, Fatani e Williams (2004) dividiram ratos Wistar em três grupos. Um deles recebeu ração padrão por 15 semanas, um recebeu dieta de cafeteria, que consistia em 33% de ração padrão, 33% de leite condensado, 7% de sacarina e 27% de água, por 15 semanas e outro recebeu dieta hipercalórica por oito semanas e após, ração padrão até o sacrifício em 15 semanas. Demonstraram aumento significativo em relação ao peso, maior porcentagem de gordura corporal aparente na

bioimpedância, aumento do peso do epidídimo e da gordura retroperitoneal, com melhora dos parâmetros após reintrodução da ração padrão, porém sem alcançar os níveis do grupo controle. Embora os níveis de glicemia de jejum não sofressem alteração, houve aumento dos níveis de insulina de jejum, de leptina e do teste HOMA (demonstrando resistência à insulina) com retorno a níveis próximos aos controles no grupo que reintroduziu a dieta padrão na metade do estudo. Anormalidades endoteliais também foram encontradas com reversão completa após modificação da dieta (NADERALI; FATANI; WILLIAMS, 2004). Modelos animais com apenas obesidade visceral são muito úteis em estudos metabólicos em várias áreas. Da Silva *et al.* (2004) mantiveram ratos Sprague-Dawley com dieta hiperlipídica (40% de lipídios) por 12 meses em comparação com grupo de dieta padrão para estudar efeitos da endotelina na pressão arterial. Utilizaram para determinação de obesidade visceral o peso da gordura retroperitoneal, peso da gordura do epidídimo e da gordura perirrenal. Não houve diferença em peso total no final do estudo em relação ao grupo controle, porém um acréscimo de 80% de gordura visceral. Não houve significância nos valores de glicemia de jejum e insulinemia. Os ratos com dieta hiperlipídica ficaram hipertensos.

2.5.3 Modelos por redução de células beta-pancreáticas e modelos mistos

A hiperglicemia no diabetes tipo 2 é o resultado da resistência periférica à insulina em relação a capacidade de secreção da insulina pelas células beta. Nos modelos anteriores a obesidade e a resistência insulínica assumiam o papel principal na gênese do diabetes. A redução química ou cirúrgica de células pancreáticas tem sido investigada no desenvolvimento de modelos animais. Pancreatectomia parcial a 90% em ratos causa hiperglicemia e hipoinsulinemia sem modificação no peso corporal, em comparação com grupos controles (LEAHY; BONNER-WEIR; WEIR 1988).

Como já foi apresentada, a estreptozotocina é tóxica para as células beta-pancreáticas. Pode causar diabetes permanente e grave quando administrada em ratos adultos. Esse modelo de redução de células beta está normalmente associado à DM tipo 1. Bonner-Weir *et al.* (1981) utilizaram um modelo de ratos Sprague-Dawley com injeção intraperitoneal de 90 mg/kg de estreptozotocina em ratos

neonatos com dois dias de vida, utilizando grupo controle. Foi observado um pico hiperglicêmico no quarto dia de vida no grupo de estudo. A partir de 10 dias de estudo observou-se recuperação parcial de células beta e normoglicemia. Após seis semanas, surgiu novamente quadro de hiperglicemia que persistiu durante o estudo até 13 semanas. Dessa forma foi demonstrado capacidade de regeneração de células beta-pancreáticas após a agressão pela estreptozotocina, porém sem sustentação à medida que houve crescimento do animal, com baixa produção de insulina, resultando num quadro de diabetes.

Modelos semelhantes ao diabetes tipo 1 também podem ser induzidos através da estreptozotocina. Utilizando múltiplas injeções intraperitoneais ou intravenosas de STZ na dose de 40 mg/kg em camundongos machos CD1 (cinco injeções diárias), Like e Rossini (1976) demonstraram hiperglicemia já na quarta injeção. Análise anatomopatológica das ilhotas pancreáticas demonstrou grande número de linfócitos e moderado número de macrófagos, com distorção da arquitetura da ilhota e necrose de células beta. Houve diminuição gradativa da insulinite em 12, 16 e 25 dias do experimento. As ilhotas pancreáticas remanescentes apresentaram-se diminuídas e compostas quase que exclusivamente de células pancreáticas alfa e delta.

Há um modelo de ratos espontaneamente hipertensivos (REH) que apresentam resistência à insulina e hiperinsulinemia. Esses animais mimetizam defeitos descritos em pacientes com hipertensão e intolerância parcial à glicose. O rato espontaneamente hipertenso (REH) é o modelo experimental de hipertensão arterial que mais se assemelha ao desenvolvimento da hipertensão humana, incluindo a presença dos distúrbios do metabolismo da glicose comumente observados em hipertensos essenciais. Nesse modelo, assim como na hipertensão essencial humana, o aumento da pressão arterial se dá de forma progressiva, e a hipertensão arterial se associa a outros fatores de risco, como a hipertrofia ventricular esquerda, a resistência à insulina, a hipertrigliceridemia e a intolerância à glicose (CESARETTI; KOLMANN, 2006). Cabe destacar que os animais REH não desenvolvem obesidade, pelo menos no que se refere a aumento ponderal. Entretanto, esses animais apresentam aumento da adiposidade visceral, como o aumento da gordura peri-epididimal. Portanto, embora não apresente aumento de peso, o REH se constitui em um modelo de obesidade visceral que mais se associa à resistência à insulina. Estudos atuais têm atribuído a resistência à insulina destes

animais a uma mutação localizada no cromossomo quatro com diminuição da expressão de um gene que determina o transporte de ácidos graxos, o gene CD36 (GOUVEIA; KETTELHUT; FOSS 2000). Foi criado um experimento a partir de REH (REAVEN; HO, 1991). Grupos de REH e de ratos Wistar-Kyoto (sem intolerância à insulina) com nove semanas foram submetidos à injeção de 35 mg/kg de estreptozotocina. Foram separados em grupos que receberam dieta padrão ou dieta rica em frutose (66% de frutose) por 10 dias. Os dados extraídos antes e depois do experimento e depois comparados foram o peso, a glicemia de jejum, os níveis de insulina e de triglicerídeos. Os resultados demonstraram níveis maiores de glicemia e trigliceridemia nos REH. Não houve diferença nos níveis de insulina nos grupos. A glicemia e trigliceridemia foram maiores nos ratos que receberam tanto estreptozotocina como dieta rica em frutose. O estudo conseguiu demonstrar que a diminuição da secreção de insulina (ação tóxica da estreptozotocina) e o aumento da resistência periférica de insulina (dieta rica em frutose) causam efeitos mais acentuados em ratos espontaneamente hipertensos se comparado com Wistar-Kyoto. Ao final obtém-se um modelo de hipertensão arterial, alterações no metabolismo da glicose e dos lipídeos, mimetizando a síndrome metabólica.

A resistência das células à insulina é fator importante para que se potencialize a ação da estreptozotocina em baixas doses em modelos animais. Ao associar dieta isocalórica e hiperlipídica em comparação à dieta normal em ratos Wistar machos que receberam injeção intraperitoneal de 30 ou 45 mg/kg de estreptozotocina, Pascoe e Storlien (1990) demonstraram essa afirmativa. O grupo animal que recebeu 45 mg/kg de STZ e dieta hiperlipídica apresentou alteração significativa nos níveis de glicemia de jejum em relação aos demais grupos. Grupos que receberam dieta hiperlipídica com 30 mg/kg de STZ apresentaram testes positivos apenas após estímulo com solução endovenosa de glicose hipertônica administrada em cânula instalada em veia jugular externa do animal. Dessa maneira infere-se que a disfunção de células beta causada pela STZ com menor capacidade de secreção de insulina associada à sensibilidade periférica à insulina alterada pela dieta hiperlipídica resulta em um modelo experimental útil para o estudo do DM tipo 2.

Células betas normais tem a capacidade de aumentar os níveis de insulina em quantidade suficiente para compensar a resistência periférica aumentada em decorrência de dieta hiperlipídica. Ao comparar a resposta metabólica de dieta hiperlipídica em ratos Wistar machos e Goto-Kakisaki por 12 semanas, um estudo

demonstrou hiperinsulinemia em ratos não diabéticos (Wistar) em resposta ao teste oral de tolerância à glicose. Essa resposta também foi observada no Goto-Kakisaki, porém com elevações nos níveis do TOTG. O metabolismo da glicose em ratos diabéticos após dieta hiperlipídica é deteriorado por secreção insuficiente de insulina causada por defeitos genéticos e pela lipotoxicidade relacionada aos níveis elevados de ácidos graxos livres (SHANG *et al.*, 2002).

Srinivasan *et al.* (2004) desenvolveram um modelo experimental de DM2 em ratos com o objetivo de demonstrar os eventos que determinam a história natural da doença, da resistência insulínica à disfunção das células beta, além de contemplar as alterações metabólicas do DM2 humano. O objetivo também foi buscar um método barato, de fácil execução, reproduzível e útil para utilização de novas terapêuticas para a doença. Cinquenta e quatro ratos Sprague-Dawley foram alimentados com dieta hiperlipídica (58% lipídeos, 25% proteínas e 17% carboidratos) por duas semanas. Foi utilizado grupo controle com 36 ratos que receberam dieta padrão. Após duas semanas foi realizada injeção de baixa dose de STZ intraperitoneal (35 mg/kg). Aferidos o peso, a glicemia, o colesterol total, os triglicerídeos, a insulina e o teste endovenoso de tolerância à glicose. Ratos com glicemia maior que 300 mg/dl foram considerados diabéticos e encaminhados para estudos terapêuticos. Após a dieta de duas semanas o grupo de estudo apresentou maior peso, alterações nas medidas bioquímicas e resistência à insulina. Uma semana após injeção de estreptozotocina, o grupo controle apresentou níveis significativamente menores de glicemia que o grupo que possuía resistência periférica à insulina (média de 137 mg/dl *versus* 418 mg/dl). Houve aumento nos níveis de colesterol e de triglicerídeos e diminuição nos níveis de insulina no grupo da dieta hipercalórica com estreptozotocina. O peso nesse grupo diminuiu significativamente após a injeção de estreptozotocina, porém sem diminuir até o peso do grupo controle. Os animais desenvolveram hiperfagia, poliúria e polidipsia. Foram feitas comparações com injeção de 25 mg/kg ou 45/55 mg/kg de STZ. O grupo com dose menor não alcançou níveis significativos de glicemia em relação ao grupo que recebeu apenas dieta hipercalórica. O grupo com dose maior desenvolveu quadro mais grave de diabetes, com perda rápida de peso. Os ratos diabéticos receberam tratamento com hipoglicemiantes orais, a glipizida que é uma droga insulínica e a pioglitazona que é um agente sensibilizador de insulina. Foi demonstrada a eficácia na redução dos níveis de glicemia, colesterol e triglicerídeos

nos ratos tratados em comparação com placebo. Dessa forma foi validado o modelo para experimentos invasivos. Modelo semelhante foi utilizado por Gilbert, Fu e Liu (2011) que testaram várias doses e números de aplicações de STZ associado à dieta hipercalórica rica em lipídeos em camundongos C57BL com seis meses de idade. O grupo que foi induzido com dieta hiperlipídica e três injeções de STZ a 40 mg/kg em dias consecutivos apresentou características metabólicas de DM2 com resistência periférica à insulina e redução de células beta-pancreáticas.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA

O projeto de pesquisa do presente estudo foi realizado de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Lei Federal 6638, submetido, analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CEP/SD), em 04 de março de 2009, sob o registro CEP/SD: AN.018.001.09.02 (ANEXO 1).

3.2 ANIMAIS

Neste estudo experimental foram utilizados 48 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia mammalia*), machos, aclimatizados a partir de 21 dias de vida, provenientes do biotério de criação do Instituto Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.3 AMBIENTE E ALIMENTAÇÃO

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, o qual conta com ambiente apropriado para manipulação dos animais e execução dos procedimentos cirúrgicos. Durante todo o período de estudo os animais permaneceram em ambiente com controle de temperatura ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), ruído e luminosidade (ciclos claro-escuro de 12 horas – *Cronomat*[®], Mallory do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As condições de higiene foram mantidas com troca diária das forrações de cepilho que acumulavam dejetos. Esses animais foram agrupados em número de quatro, em gaiolas coletivas de aproximadamente 0,022 m³ (41,4 cm x 34,4 cm x 16 cm). As gaiolas, em número total de 12, foram identificadas e acomodadas sobre estantes horizontais.

Durante todo o período de aclimação, que foi de 14 dias, e de estudo, os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum*, padrão *Nuvilab CR1*[®], produzido pela empresa Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil (ANEXO 2).

3.4 GRUPOS

Após o período de aclimação, com 35 dias de vida, os animais foram pesados e marcados com tinta (D0). Todos foram submetidos à dosagem de glicose com glucômetro portátil e fitas reagentes, do modelo Accu-Chek®, laboratório Roche, após jejum de 12 horas (apenas oferta de água) e divididos de forma aleatória em quatro grupos de acordo com o tipo de dieta, uso de estreptozotocina e tempo do experimento.

- **Grupo GC8 (grupo controle - oito semanas):** constituído por 12 animais que receberam água e dieta padrão Nuvilab CR1®, por oito semanas.
- **Grupo GE8 (grupo de estudo - oito semanas):** constituído por 12 animais que foram submetidos à administração de estreptozotocina 35 mg/kg, intraperitoneal no 1º dia do estudo e receberam dieta padrão e solução de sacarose à 30% por oito semanas.
- **Grupo GC16 (grupo controle – 16 semanas):** constituído por 12 animais que receberam água e dieta padrão Nuvilab CR1, por 16 semanas.
- **Grupo GE16 (grupo de estudo – 16 semanas):** constituído por 12 animais que foram submetidos à administração de estreptozotocina 35 mg/kg, intraperitoneal no 1º dia do estudo e receberam dieta padrão e solução de sacarose à 30% por 16 semanas.

3.5 MATERIAIS E PRODUTOS UTILIZADOS

A droga utilizada no grupo de estudo, Estreptozotocina, é produzida pela indústria farmacêutica Sigma Aldrich e foi adquirida comercialmente do laboratório em questão.

No grupo de estudo foi utilizada dieta enriquecida com sacarose. A sacarose foi adquirida comercialmente para diluição diária de solução a 30%. Para o teste oral de tolerância à glicose foi utilizada glicose hipertônica (50%), frascos de 10 ml (Baxter).

Luvax de látex foram utilizadas para simples manipulação diária dos animais (anestesia, documentação fotográfica e gavagem). Para anestesia foi utilizado isoflurano inalatório e, para o sacrifício, éter etílico em campânula de vidro.

O procedimento de gavagem (teste oral de tolerância à glicose) foi feito com a utilização de sonda plástica desenhada e desenvolvida para esse fim, de acordo com o tipo e tamanho médio dos animais. Mede 11,5 cm de extensão e apresenta ponta esférica atraumática de 1,4 mm. As soluções foram dosadas em seringas de três mililitros, de acordo com o peso dos animais.

Para realização do procedimento cirúrgico (dissecção e remoção de vísceras abdominais após morte dos animais) foi utilizado material estéril descartável ou esterilizado em autoclave.

3.6 PESAGEM DOS ANIMAIS

A pesagem dos animais foi feita em balança modelo *AM 500 Marte*[®], regulada nos padrões do Inmetro. Os animais foram pesados no primeiro dia de estudo (D0) e a cada duas semanas. O peso inicial foi usado para o cálculo da dosagem de estreptozotocina utilizada no grupo de estudo. O peso final foi utilizado para o cálculo da dosagem de glicose hipertônica utilizada no teste oral de tolerância à glicose. Os dados foram registrados em planilha do programa *Microsoft Office Excel*[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). A unidade utilizada foi o grama (g).

3.7 MANIPULAÇÃO E ANESTESIA

Inicialmente para realização de dosagem de glicemia de jejum, bem como quando sedados para pesagem, coleta de sangue para exames laboratoriais e teste oral de tolerância à glicose os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano. Individualmente, os ratos foram colocados em um sistema fechado para o ato anestésico.

Os animais foram apreendidos pela cauda, a fim de evitar trauma. Em seguida foram submetidos à anestesia inalatória com vaporizador de isoflurano (*Isoforine*[®] - laboratório Cristália) na concentração de 1,5 a 3% e fluxo de oxigênio variando de 0,5 a 3 L/min. Individualmente, cada rato foi colocado em campânula fechada através da qual o plano anestésico foi monitorado pelos movimentos voluntários e respiratórios do animal, sendo o mesmo retirado da campânula assim que apresentasse parada dos movimentos voluntários, preservando ainda os movimentos ventilatórios para o procedimento de pesagem, coleta de sangue,

dosagem de glicemia e gavagem para o teste oral de tolerância a glicose. Os ratos ainda anestesiados foram contidos com a mão esquerda do pesquisador, pela região dorsal do animal. Imobilização adequada e atraumática foram conseguidas apoiando-se o segundo e terceiro dedos do pesquisador entre a cabeça e os membros anteriores do rato, e o primeiro e quarto dedos entre os membros posteriores e tronco anterior.

3.8 DIETA ENRIQUECIDA COM SACAROSE

Os animais do grupo de estudo receberam solução com sacarose 30% em substituição à água durante todo o período de estudo. Os frascos contendo a solução foram trocados diariamente e mantidos em solução com hipoclorito à 10% para higiene.

3.9 ESTREPTOZOTOCINA

Os animais do grupo de estudo foram submetidos à aplicação de estreptozotocina pela via intraperitoneal na dose de 35 mg/kg no primeiro dia de estudo. A estreptozotocina foi diluída em dois mililitros de solução salina isotônica para a sua aplicação.



FIGURA 4 - FRASCO DE ESTREPTOZOTOCINA UTILIZADA NO ESTUDO

3.10 GLICEMIA DE JEJUM, TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E BIOQUÍMICA

Ao fim do experimento em cada grupo (oito ou 16 semanas) todos os animais foram pesados, foi realizada nova dosagem de glicemia de jejum utilizando glucômetro portátil e fitas reagentes e realizado teste oral de tolerância à glicose. Após jejum de 12 horas, sob sedação, todos os animais foram submetidos à sondagem orogástrica com sonda plástica maleável. Conforme técnica descrita, o rato foi contido com a mão esquerda do pesquisador, enquanto na mão direita a sonda acoplada a uma seringa de três mililitros contendo a dose apropriada de solução foi introduzida até o ponto correspondente à distância entre a boca e o apêndice xifóide do animal. Foi infundida então solução de glicose a 50%, na dose de 1 g/kg. Após lenta infusão da solução e retirada da sonda, a fim de diminuir o risco de regurgitação, o rato foi mantido com a porção cefálica mais elevada que a caudal até completa recuperação anestésica. Foi coletada uma gota de sangue da ponta da cauda após 30 e 120 minutos para nova dosagem de glicose com o glucômetro. A unidade utilizada é miligrama por decilitro (mg/dl).

Após a morte, foi coletado também 1,5 mililitro de sangue de cada animal, para a dosagem de triglicerídeos (mg/dl) e de colesterol total (mg/dl), com acondicionamento em frascos próprios e enviado para laboratório específico para processamento.



FIGURA 5 - PUNÇÃO SUBXIFÓIDEA PARA COLETA DE SANGUE DOS ANIMAIS

3.11 MORTE DOS ANIMAIS

No último dia de estudo, após a coleta dos demais dados, os animais foram mortos com dose letal de éter etílico inalado em sistema fechado de campânula de vidro. O rato foi posicionado em decúbito dorsal, realizou-se laparotomia mediana após tricotomia, com retirada do fígado, do pâncreas, do epidídimo e da gordura retroperitoneal. Todas as estruturas foram pesadas e o fígado e pâncreas foram colocados em frascos adequados com formalina 10% para a análise anatomopatológica posterior.

A documentação fotográfica foi realizada com câmera digital *Sony*[®] modelo *Cyber-shot DSC-T10* (Sony, Tokyo, Japão), com resolução de 7.2 megapixels.

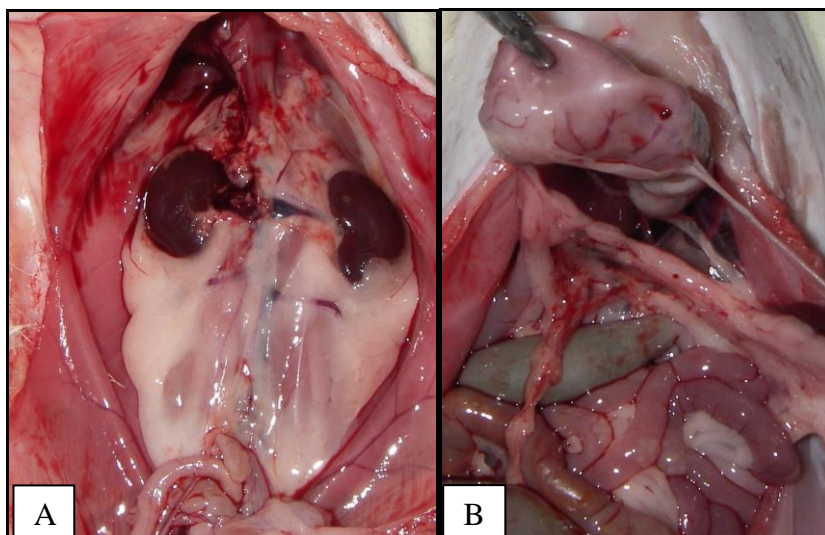


FIGURA 6 - RETIRADA DOS ÓRGÃOS ESTUDADOS: (A) GORDURA RETROPERITONEAL; (B) EXPOSIÇÃO DO PÂNCREAS

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram tabulados em planilha do programa *Microsoft Office Excel*[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) (APÊNDICES 1-8), obtendo-se os valores médios (M) e desvio padrão (DP) para cada variável nos diferentes tempos estudados.

Procedeu-se ao tratamento estatístico julgado adequado conforme a natureza dos dados analisados nos grupos controle e estudo, nos períodos oito semanas e 16 semanas para as variáveis: pesos corporais (g) iniciais, pesos corporais a cada duas

semanas, pesos corporais finais; pesos do fígado (g); pesos do pâncreas (g); pesos da gordura retroperitoneal (g); pesos do epidídimo (g); valores de triglicerídeos (mg/dl); valores de colesterol total (mg/dl); valores de glicemias de jejum inicial (mg/dl); valores de glicemias de jejum final (mg/dl); valores do teste oral de tolerância à glicose (mg/dl). Observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico. Na análise não paramétrica foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para as comparações: colesterol total (oito semanas), peso da gordura retroperitoneal (oito semanas) e peso do epidídimo (oito semanas). Nos demais resultados utilizou-se a análise paramétrica com o teste “*t*” de *Student*. Para a análise das medidas de peso corporal e do teste oral de tolerância à glicose foi utilizado o teste ANOVA para medidas repetidas. Para todos os testes estatísticos o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 PESO DOS ANIMAIS

O peso dos animais avaliados durante o período de oito semanas está representado na tabela 1.

TABELA 1 - DADOS DESCRITIVOS DOS PESOS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE (GC8) E EXPERIMENTAL (GE8) DE OITO SEMANAS

Grupo	peso (g)	média	dp
GC8	SEM 0	119,727	6,669
	SEM 2	190,182	5,427
	SEM 4	254,909	7,011
	SEM 6	286,636	8,105
	SEM 8	304,000	10,205
GE8	SEM 0	133,083	6,385
	SEM 2	215,500	5,196
	SEM 4	278,500	6,712
	SEM 6	309,917	7,760
	SEM 8	336,750	9,771

Nota: GC8 – grupo controle oito semanas – GE8 – grupo experimental oito semanas - dp – desvio padrão

Foi observada diferença em relação ao peso no decorrer das semanas $p < 0,001$ no mesmo grupo, mas não observamos diferença significativa no peso entre os grupos controle e grupo experimental com $p = 0,370$ (GRÁFICO 1).

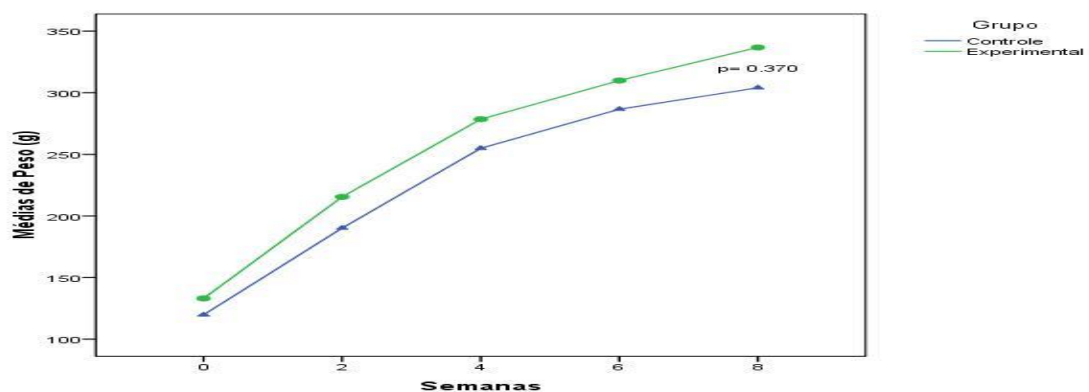


GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO DO PESO ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL NO GRUPO COM OITO SEMANAS DO ESTUDO

O peso dos animais avaliados no período de 16 semanas está demonstrado na Tabela 2.

TABELA 2 - DADOS DESCRITIVOS DOS PESOS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE (GC16) E EXPERIMENTAL (GE16) DE 16 SEMANAS

Grupo	peso (g)	média	dp
GC16	SEM 0	115,667	3,692
	SEM 2	180,750	7,394
	SEM 4	240,583	6,474
	SEM 6	239,667	6,822
	SEM 8	270,917	5,931
	SEM 10	270,750	6,948
	SEM 12	282,750	6,817
	SEM 14	301,583	8,131
	SEM 16	289,167	5,141
	GE16	SEM 0	128,917
SEM 2		210,167	7,394
SEM 4		239,583	6,474
SEM 6		274,333	6,822
SEM 8		308,583	5,931
SEM 10		296,250	6,948
SEM 12		317,000	6,817
SEM 14		315,667	8,131
SEM 16		368,333	5,141

Nota: GC8 – grupo controle oito semanas – GE8 – grupo experimental oito semanas - dp – desvio padrão

Nesse grupo houve diferença estatística na comparação do peso no decorrer das semanas ($p < 0,001$). Houve diferença significativa também na comparação do peso entre os grupos com média de peso ao final das 16 semanas de $368,33 \text{ g} \pm 5,141$ no grupo experimental e de $289,16 \text{ g} \pm 5,14$ no grupo controle com $p < 0,001$ (GRÁFICO 2).

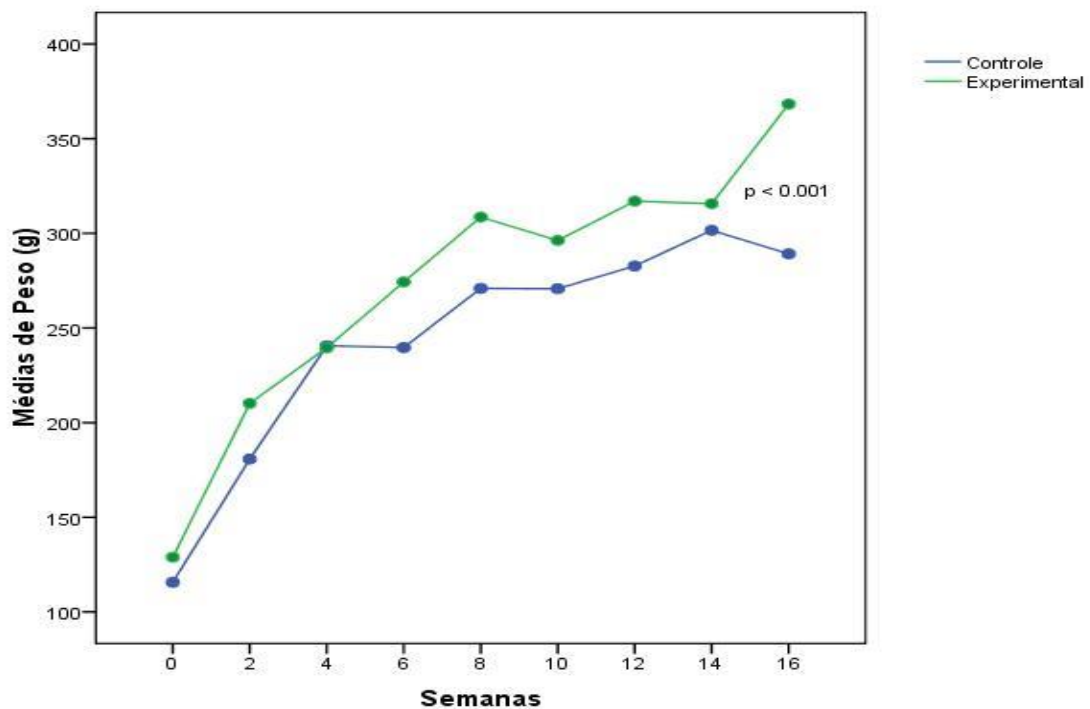


GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO ENTRE O PESO NO BRAÇO DE ESTUDO DE 16 SEMANAS DE DURAÇÃO, ENTRE GRUPO CONTROLE E GRUPO EXPERIMENTAL

4.2 PESO DE FÍGADO, PÂNCREAS, GORDURA RETROPERITONEAL E EPIDÍDIMO

Não houve diferença no peso do fígado entre os grupos de estudo de oito semanas. O grupo controle apresentou média de peso de $11,87 \text{ g} \pm 2,52$ e o grupo experimental média de $12,93 \text{ g} \pm 1,536$, com $p=0,228$ (GRÁFICO 3).

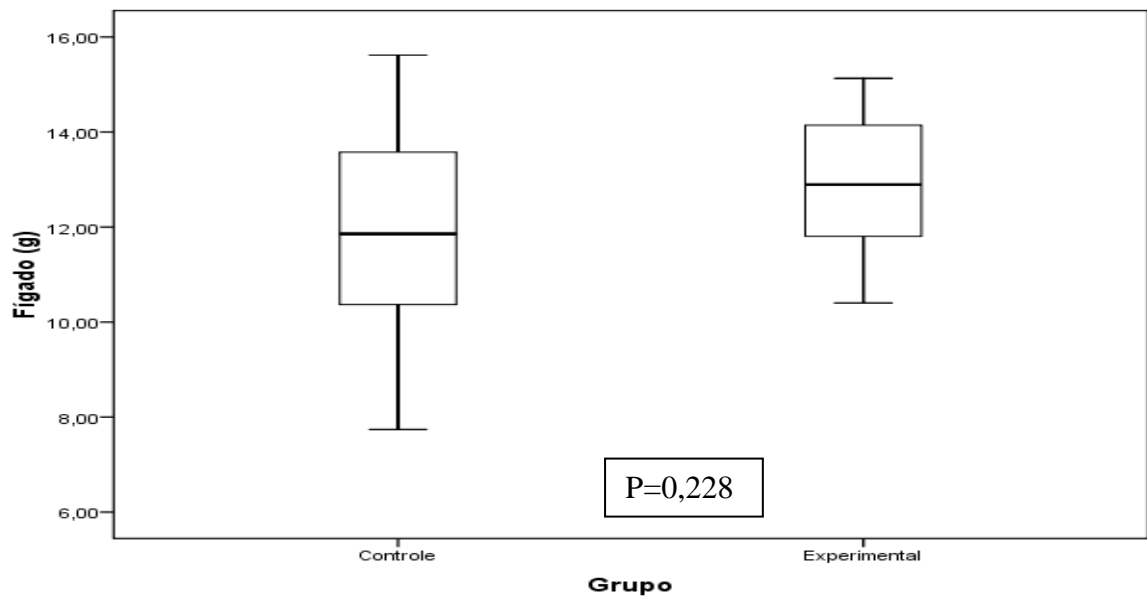


GRÁFICO 3 - COMPARAÇÃO ENTRE PESO DO FÍGADO DOS GRUPOS GC8 E GE8 (g)

Já no grupo de 16 semanas houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,001$ conforme gráfico 4, com média de $9,81 \text{ g} \pm 1,75$ no grupo controle e de $12,54 \text{ g} \pm 1,31$ no grupo experimental.

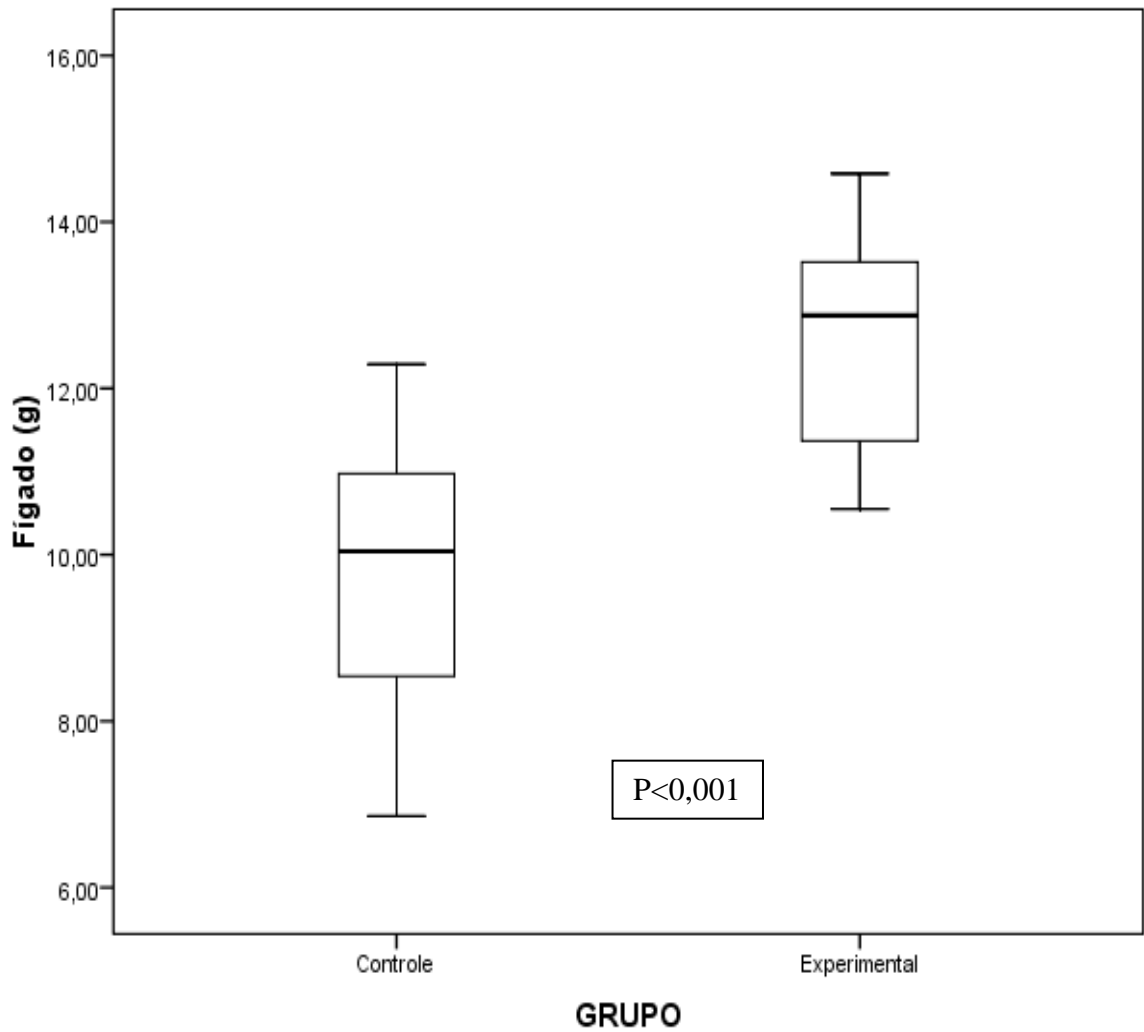


GRÁFICO 4 - COMPARAÇÃO ENTRE PESO DO FÍGADO NOS GRUPOS GC16 E GE16 (g)

O peso do pâncreas não apresentou diferença estatística tanto no estudo de oito semanas com $p=0,200$ como no de 16 semanas com $p=0,168$. Já o peso da gordura retroperitoneal apresentou diferença tanto em oito como em 16 semanas. Com oito semanas a média do GC8 foi de $3,15 \text{ g} \pm 1,3$ enquanto no GE8 foi encontrada a média de $8,70 \text{ g} \pm 2,13$ com $p<0,001$ conforme representado no gráfico 5.

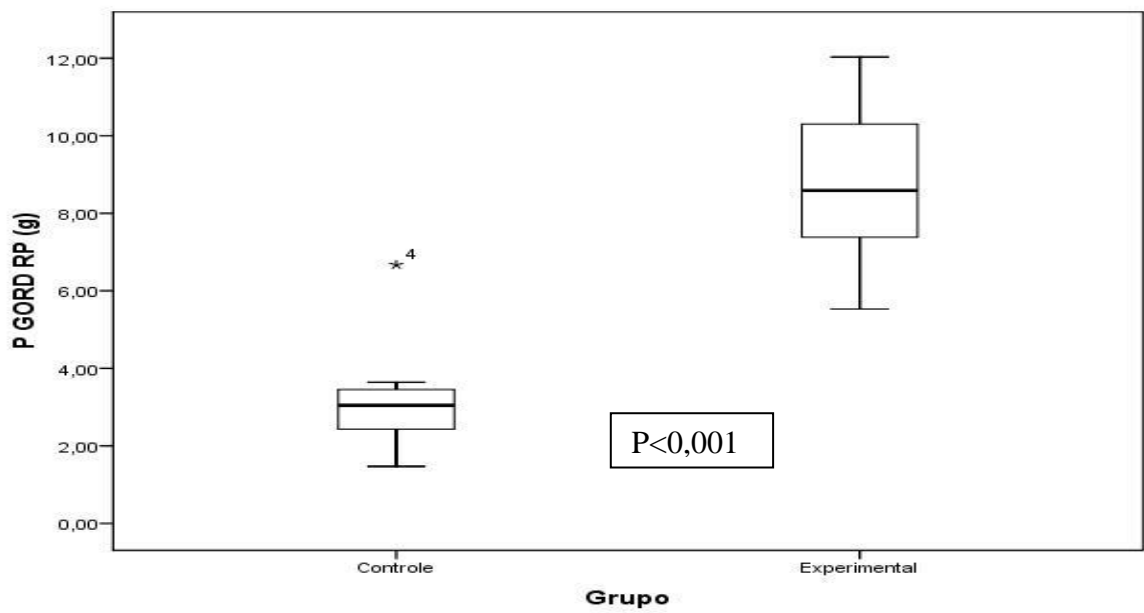


GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO ENTRE PESO DA GORDURA RETROPERITONEAL NOS GRUPOS GC8 E GE8 (g)

Resultado semelhante foi encontrado no grupo de 16 semanas com aumento da diferença entre o GC16 e o GE16 e $p < 0,001$ (GRÁFICO 6). A média do GC16 foi de $2,17 \text{ g} \pm 1,134$ e a média do GE16 foi de $11,06 \text{ g} \pm 2,446$.

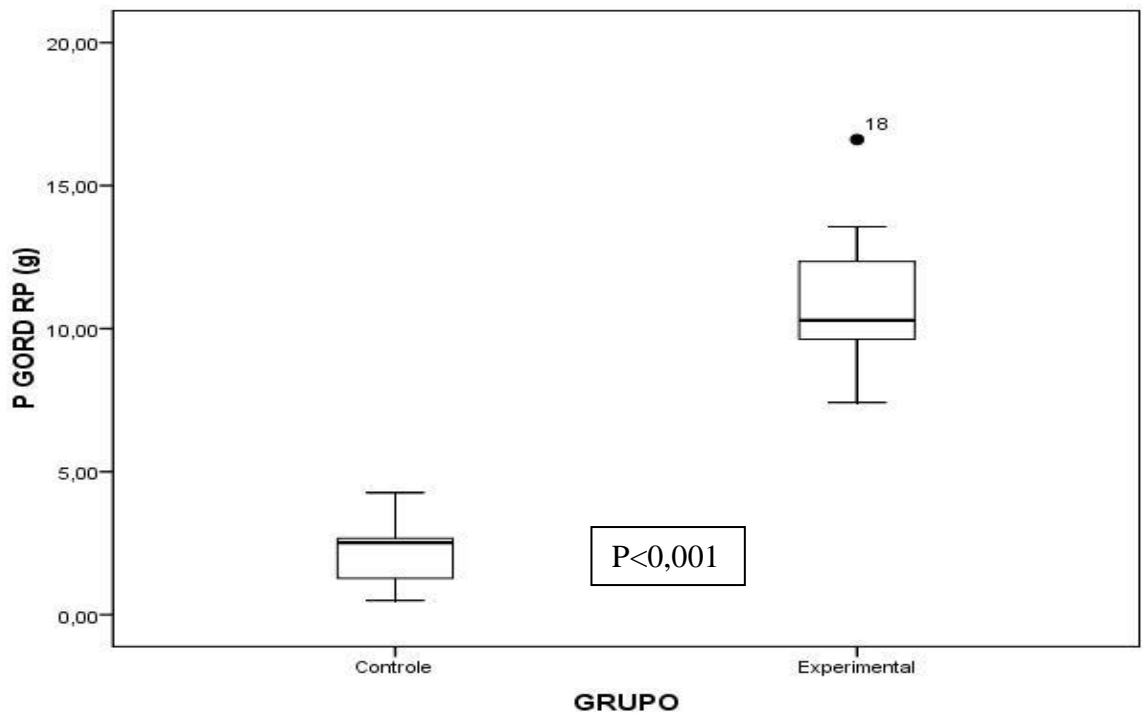


GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO ENTRE PESO DE GORDURA RETROPERITONEAL NOS GC16 E GE16 (g)

O peso do epidídimo no estudo de oito semanas apresentou diferença estatística com médias de $1,34 \text{ g} \pm 0,896$ no grupo controle e de $1,77 \text{ g} \pm 0,678$ no grupo experimental, com $p=0,032$, representado pelo gráfico 7.

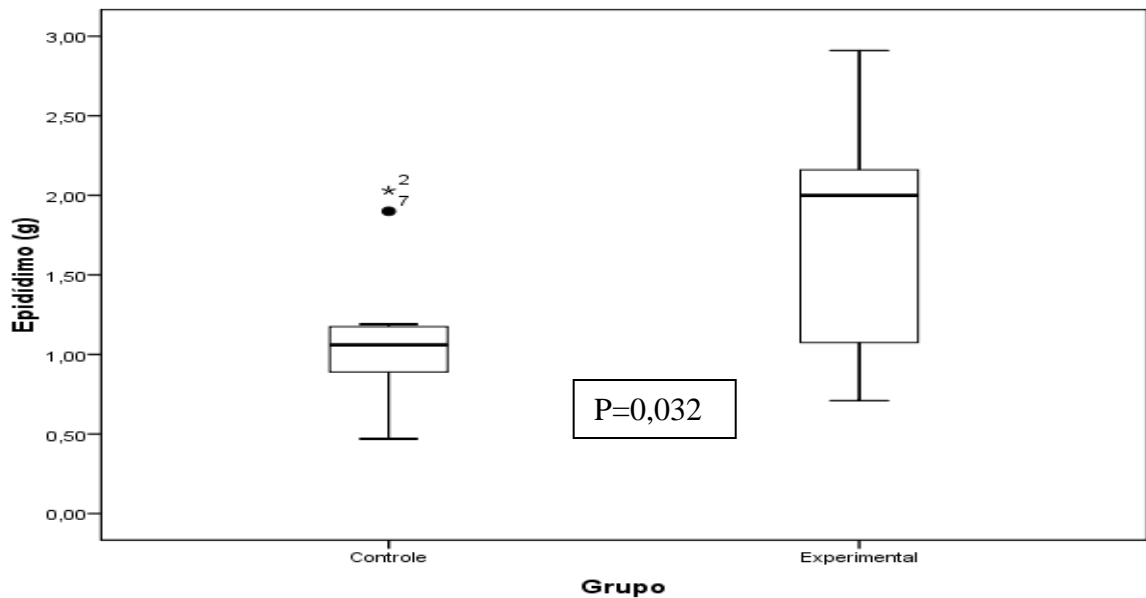


GRÁFICO 7 - COMPARAÇÃO DO PESO DO EPIDÍDIMO ENTRE GC8 E GE8

Da mesma forma, no grupo de 16 semanas houve diferença no peso do epidídimo, com médias de $0,79 \text{ g} \pm 0,177$ no GC16 e de $1,19 \text{ g} \pm 0,418$ no GE16, conforme gráfico 8, com $p=0,008$.

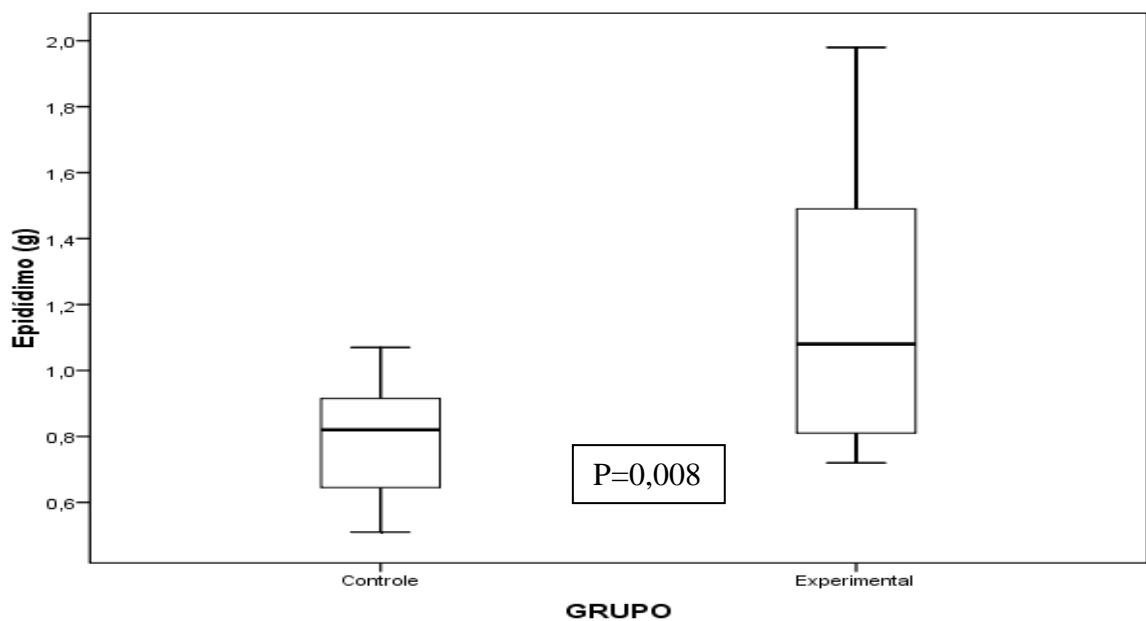


GRÁFICO 8 - COMPARAÇÃO DO PESO DO EPIDÍDIMO ENTRE GC16 E GE16

4.3 GLICEMIA DE JEJUM

A glicemia de jejum aferida no primeiro dia de estudo foi semelhante entre os grupos de oito e 16 semanas. Nos grupos GC8 e GE8 houve diferença estatística na glicemia de jejum ao final das oito semanas com $p=0,0018$. A média no grupo controle foi de $90,58 \text{ mg/dl} \pm 9,82$ enquanto o grupo experimental apresentou média de $108,50 \text{ mg/dl} \pm 14,43$ (GRÁFICO 9).

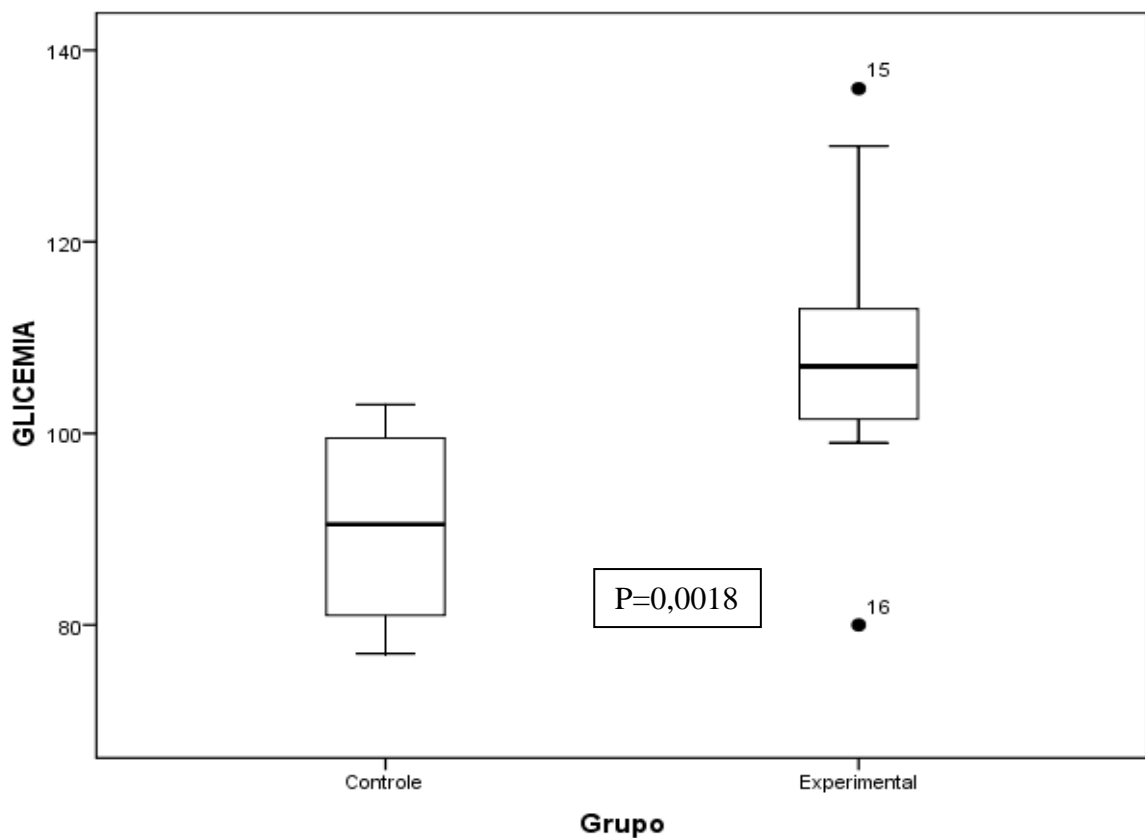


GRÁFICO 9 - COMPARAÇÃO DA GLICEMIA DE JEJUM ENTRE GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL NO ESTUDO DE 8 SEMANAS (mg/dl)

Ao se comparar a glicemia de jejum nos grupos controle e experimental com 16 semanas também foi encontrado diferença estatística com $p<0,001$. O GC16 obteve média de $83,5 \text{ mg/dl} \pm 6,8$ enquanto o GE16 apresentou média de $114,25 \text{ mg/dl} \pm 11,00$ (GRÁFICO 10).

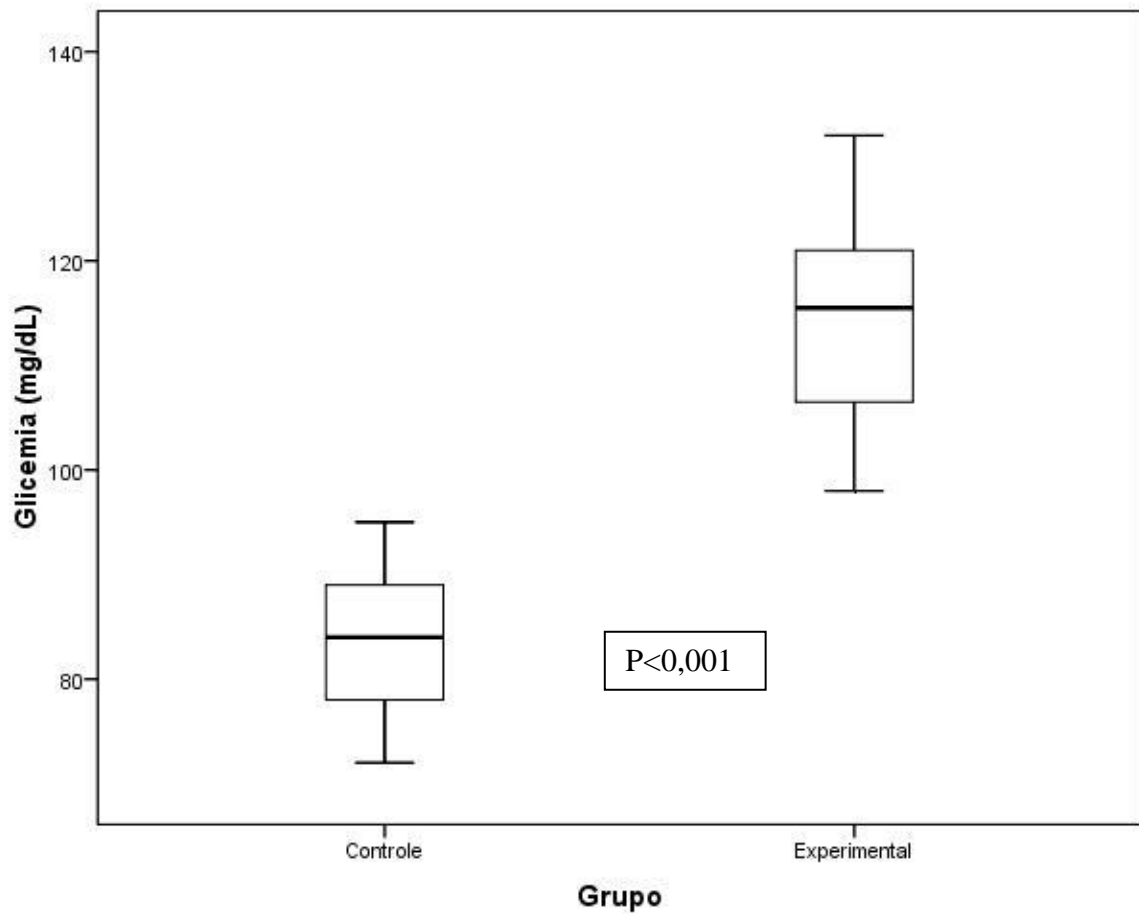


GRÁFICO 10 - COMPARAÇÃO DA GLICEMIA DE JEJUM ENTRE GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL NO ESTUDO DE 16 SEMANAS (mg/dl)

4.4 COLESTEROL TOTAL E TRIGLICERÍDEOS

Os valores de colesterol total não apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e experimental de oito semanas. O GC8 apresentou média de 55,17 mg/dl \pm 10,861 enquanto o GE8 apresentou média de 59,25 mg/dl \pm 7,111, com $p=0,143$ (GRÁFICO 11).

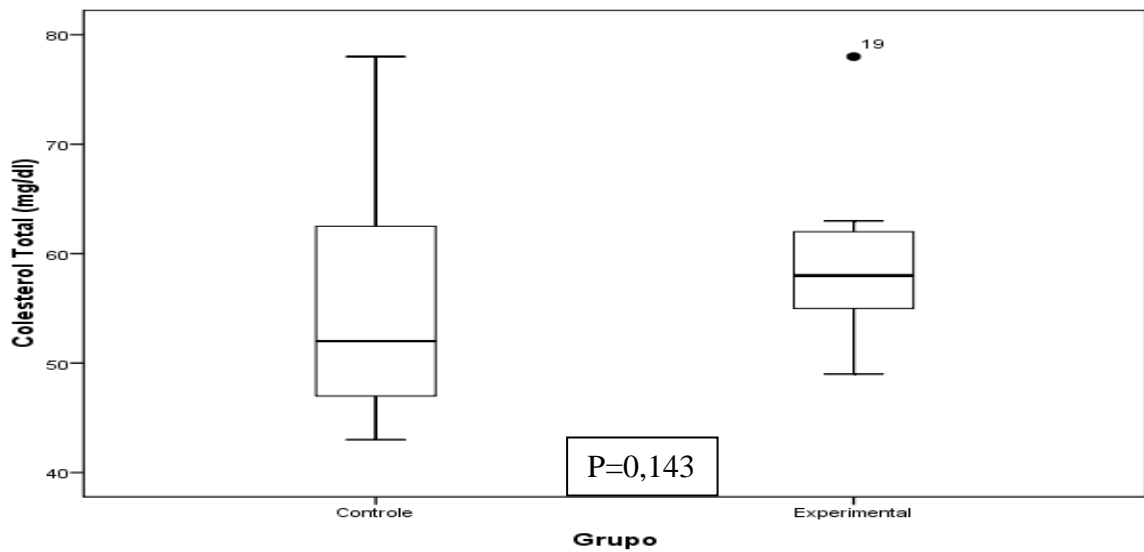


GRÁFICO 11 - COMPARAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL ENTRE GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL DE OITO SEMANAS (mg/dl)

No estudo de 16 semanas houve diferença significativa nos valores de colesterol total com $p < 0,001$. A média do grupo controle foi de $48,83 \text{ mg/dl} \pm 6,337$ e do grupo experimental foi de $67 \text{ mg/dl} \pm 11,282$ conforme gráfico 12.

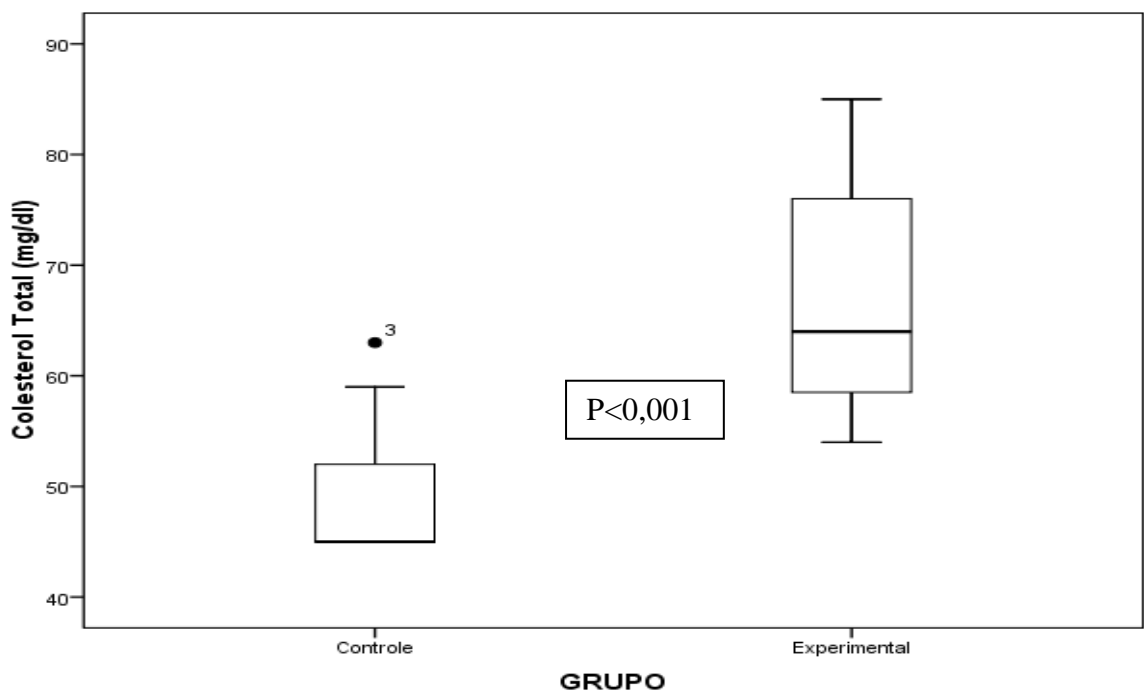


GRÁFICO 12 - COMPARAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL ENTRE GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL DE 16 SEMANAS (mg/dl)

Os valores de triglicerídeos não apresentaram diferença significativa no estudo de oito semanas e nem no estudo de 16 semanas. No primeiro as médias foram de 65,08 mg/dl \pm 7,204 no GC8 e de 69 mg/dl \pm 12,445 no GE8, com valor de $p=0,336$ (GRÁFICO 13).

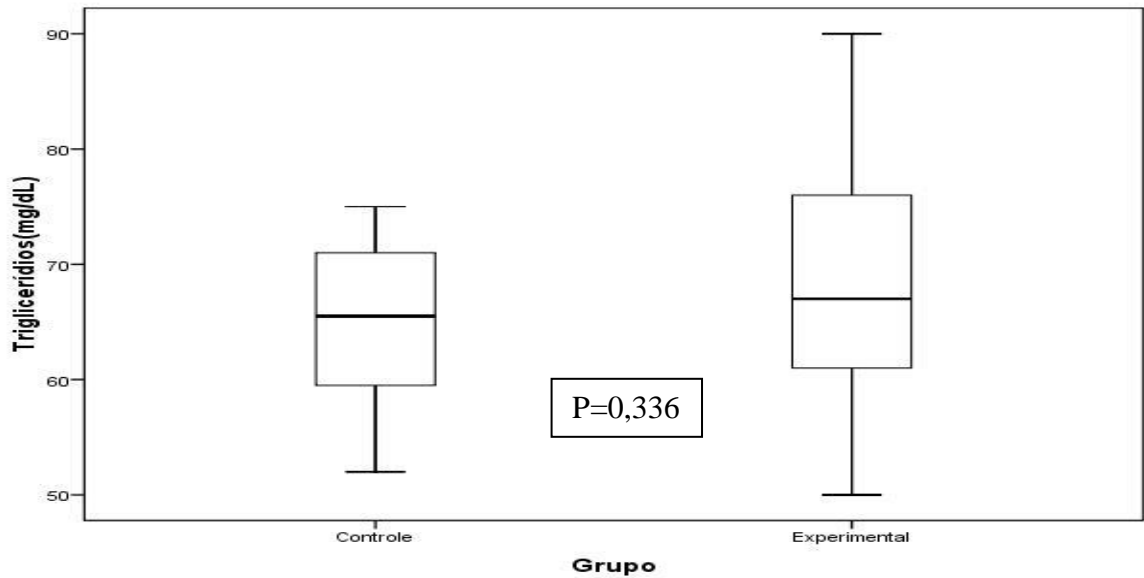


GRÁFICO 13 - COMPARAÇÃO DO VALOR DE TRIGLICERÍDEOS ENTRE GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL DE 8 SEMANAS (mg/dl)

Já no grupo de 16 semanas as médias dos valores de triglicerídeos foram de 79,83 mg/dl \pm 10,886 para o GC16 e de 88,42 mg/dl \pm 14,52 para o GE16, com valor de $p=0,116$ (GRÁFICO 14).

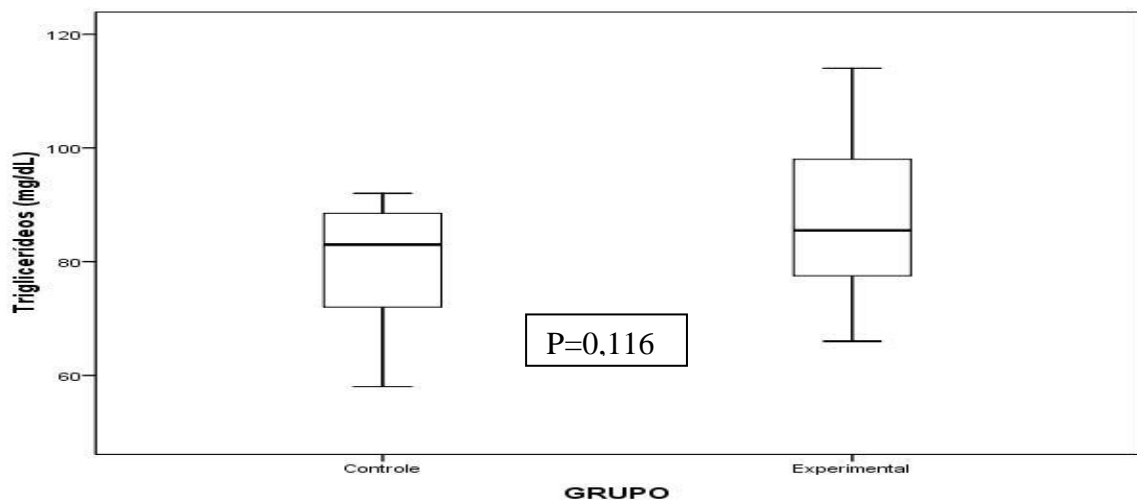


GRÁFICO 14 - COMPARAÇÃO DO VALOR DE TRIGLICERÍDEOS ENTRE GRUPO CONTROLE E EXPERIMENTAL DE 16 SEMANAS (mg/dl)

6.5 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

No teste oral de tolerância à glicose, a glicemia foi aferida nos tempos zero, 30 e 120 minutos em todos os grupos. Na análise estatística dos animais de oito semanas observou-se diferença estatística nos resultados da glicemia em todos os tempos, quando comparados no mesmo grupo. Houve também diferença significativa quando comparados os resultados entre os grupos controle e experimental com $p=0,001$ (TABELA 3, GRÁFICO 15).

TABELA 3- DADOS DESCRITIVOS DO TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (8 SEMANAS)

	totg	IC95%			
		média	dp	Menor medida	Maior medida
Controle	0 min	91,818	3,693	84,138	99,498
	30 min	131,727	3,344	124,774	138,681
	120 min	93,545	3,792	85,660	101,431
Experimental	0 min	108,500	3,536	101,147	115,853
	30 min	145,250	3,201	138,593	151,907
	120 min	105,417	3,631	97,866	112,967

Nota: totg – teste oral de tolerância à glicose (medido em mg/dl) – dp – desvio padrão – IC95% - intervalo de confiança de 95% - min – minutos

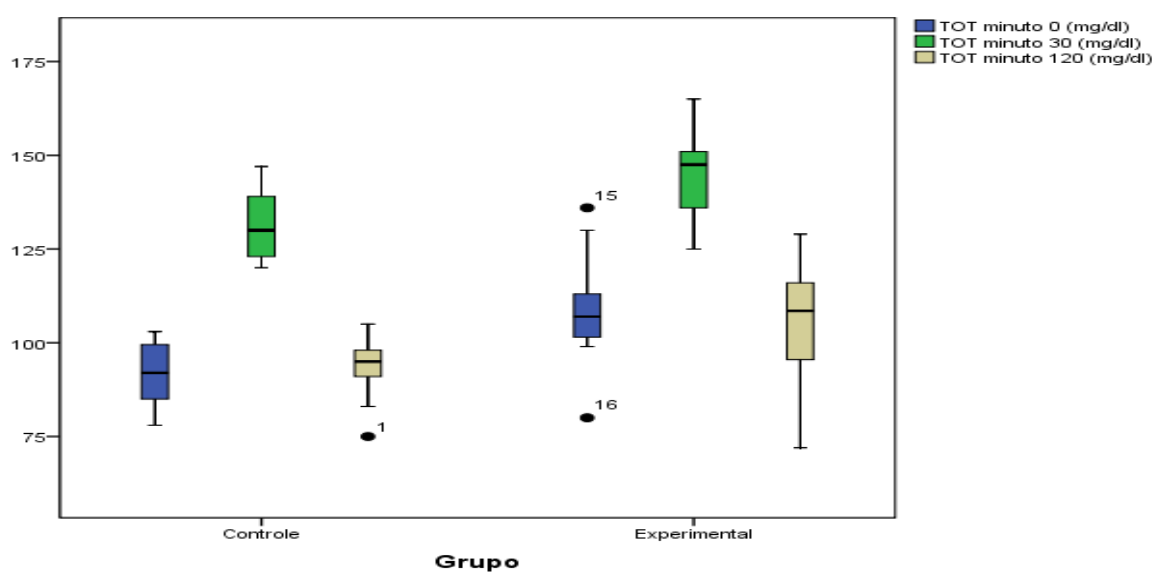


GRÁFICO 15 - TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE NOS GRUPOS DE OITO SEMANAS

No estudo de 16 semanas observou-se comportamento semelhante no teste oral de tolerância à glicose em relação ao de oito semanas. Os dados descritivos estão demonstrados na tabela 4. Houve diferença entre os grupos controle e experimental em todos os tempos com $p < 0,001$ (TABELA 4, GRÁFICO 16).

TABELA 4 - DADOS DESCRITIVOS DO TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (16 SEMANAS)

	totg	IC95%			
		média	dp	Menor medida	Maior medida
Controle	0 min	83,500	2,648	78,008	88,992
	30 min	132,167	5,433	120,899	143,435
	120 min	85,000	2,298	80,235	89,765
Experimental	0 min	114,250	2,648	108,758	119,742
	30 min	173,833	5,433	162,565	185,101
	120 min	114,167	2,298	109,402	118,932

Nota: totg – teste oral de tolerância à glicose (medido em mg/dl) – dp – desvio padrão – IC95% - intervalo de confiança de 95% - min – minutos

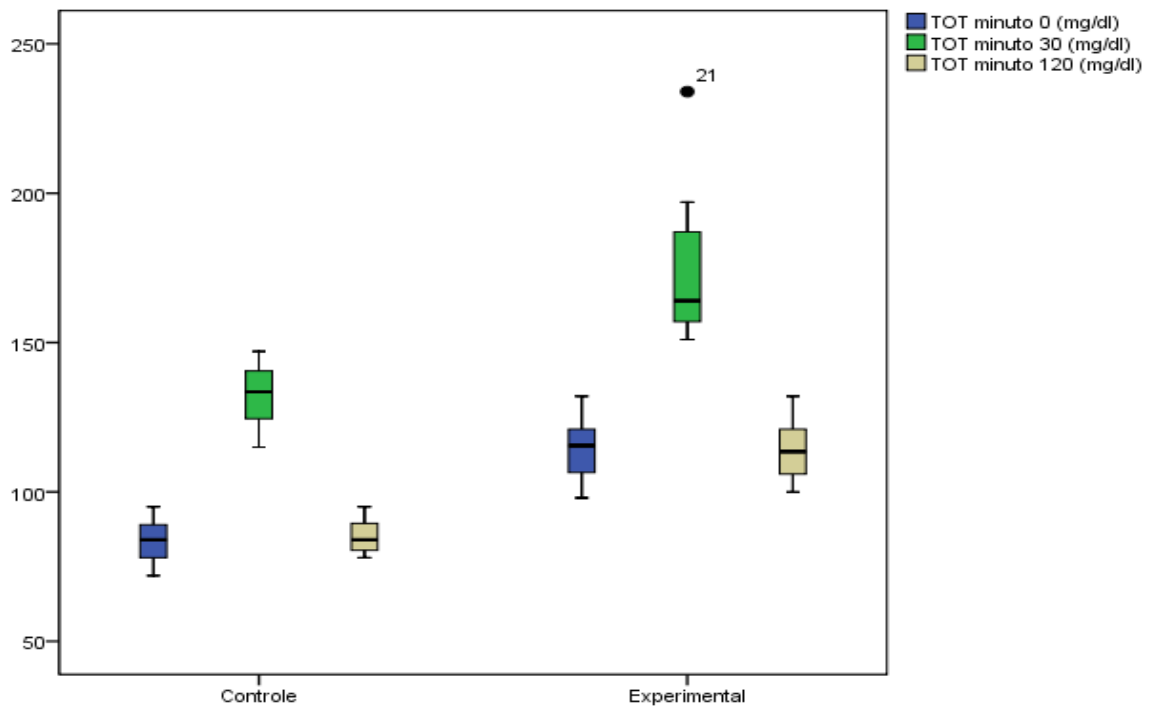


GRÁFICO 16 - TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE NOS GRUPOS DE 16 SEMANAS

5 DISCUSSÃO

O diabetes e a síndrome metabólica são condições que desafiam os cientistas há muitas décadas. Com o advento da cirurgia bariátrica e mais recentemente da cirurgia metabólica, há um crescente interesse nos estudos relativos a essas doenças.

Enquanto a resistência periférica à insulina é comum durante a obesidade e o avançar da idade, tanto em ratos quanto em humanos, a progressão do diabetes tipo 2 é catalisada pela disfunção e apoptose de células beta, levando a uma incapacidade de compensar a resistência à insulina (COZAR-CASTELLANO *et al.*, 2006; TSCHEN, S.I. *et al.*, 2009). Do ponto de vista experimental, para estudar o diabetes e a síndrome metabólica, muitos pesquisadores optaram por modelos mistos em roedores, com o uso de estreptozotocina em baixas doses e dietas hipercalóricas (PASCOE, 1990; SRINIVASAN, 2005; GILBERT, FU; LIU, 2011).

Os estudos de Portha e colaboradores demonstraram a eficácia no uso de injeção intraperitoneal de estreptozotocina em ratos jovens na indução de diabetes não insulino dependente, que piora com dietas hipercalóricas, o que acontece em seres humanos com muita semelhança (PORTHA, 1982; PORTHA *et al.*, 1989). Ao analisarmos esses estudos e os estudos de Kawasaki e colaboradores que induziram resistência periférica à insulina e intolerância à glicose em ratos Wistar utilizando dieta enriquecida em sacarose em 30% (KAWASAKI *et al.*, 2005) decidimos pela utilização de um modelo misto utilizando estreptozotocina intraperitoneal em baixas doses (35 mg/kg) em ratos Wistar jovens associada à dieta enriquecida em sacarose em 30%. Este mesmo modelo experimental foi escolhido para o atual estudo por se tratar de modelo relativamente simples, de fácil reprodução, em animal resistente, de fácil manipulação e economicamente viável em nosso meio.

Optamos em realizar grupos com oito e 16 semanas de estudo para definir a melhor época para a realização de experimentos no modelo. Existem estudos com tempo de dieta hipercalórica de três semanas (PASCOE; STORLIEN 1990), 15 semanas (NADERALI; FATANI; WILLIAMS, 2004), chegando a 42 semanas (KAWASAKI *et al.*, 2005).

O grupo de oito semanas não apresentou ganho de peso significativo ao compararmos o grupo controle com o grupo experimental ($p=0,370$). Já ao

compararmos os animais em estudo ao final das 16 semanas observamos que o grupo experimental apresentou peso significativamente maior ($p < 0,001$). Kawasaki *et al.* em 2005, demonstraram que a dieta enriquecida em sacarose fez com que houvesse elevação mais acentuada de peso no grupo experimental a partir de 18 semanas, com aumento progressivo da diferença até 42 semanas do estudo. Em 1990, Pascoe *et al.* demonstraram ganho de peso maior nos animais submetidos à dieta hipercalórica em ratos Wistar que receberam baixas doses de estreptozotocina no período neonatal ao final de 11 semanas de vida, quando comparados aqueles apenas com administração de estreptozotocina neonatal e dieta padrão.

Não observamos redução do peso em relação ao grupo controle devido à injeção intraperitoneal de estreptozotocina nas primeiras semanas do estudo, fato demonstrado em outros experimentos como o de Takada *et al.* (2007) que utilizaram estreptozotocina em altas doses (150 mg/kg) no período neonatal de ratos Wistar e observaram queda significativa em relação ao grupo controle em oito semanas. Já em 2005, Srinivasan *et al.* utilizaram dieta hipercalórica por duas semanas em ratos com 180 gramas e injetaram 25, 35, 45 ou 55 mg/kg de estreptozotocina intraperitoneal, formando grupos distintos. Demonstraram perda de peso em ratos que receberam as doses de 45 ou 55 mg/kg em comparação aos controles. Em nosso estudo utilizamos doses baixas de estreptozotocina e a administração aconteceu em ratos com cinco semanas de vida o que pode explicar a manutenção do peso por efeitos mais amenos da estreptozotocina, sem causar destruição maciça de ilhotas pancreáticas e sem causar quadros semelhantes ao diabetes tipo 1.

O peso das vísceras abdominais e da gordura retroperitoneal pode traduzir a presença de obesidade visceral, muitas vezes sendo um dos primeiros indícios da síndrome metabólica. Em nosso estudo obtivemos o fígado, o pâncreas, o epidídimo e a gordura retroperitoneal para essa avaliação. No grupo de animais avaliados com oito semanas de estudo, houve aumento significativo no peso do epidídimo e da gordura retroperitoneal em relação ao grupo controle ($p = 0,032$ e $p < 0,001$). A gordura retroperitoneal teve seu peso quadruplicado, sem alterações significativas no peso corporal total dos animais. Não houve diferença nos pesos do fígado e do pâncreas. Já no grupo de 16 semanas, além da diferença no peso do epidídimo e da gordura retroperitoneal, que se mostraram ainda mais evidentes, houve aumento no peso do fígado em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Ressalta-se novamente a grande diferença obtida na gordura retroperitoneal, que demonstra uma nova disposição dos

tecidos adiposos, como ocorre na obesidade visceral na síndrome metabólica. O peso do pâncreas não sofreu alterações no experimento.

Soria, D'Alessandro e Lombardo (2001) alimentaram ratos Wistar de 180 a 200 gramas com dieta rica em sacarose (63%) por 15 semanas e compararam com grupo controle. Avaliaram o epidídimo com sua gordura peri-epididimal. Não observaram diferença no peso com três semanas de estudo. Após 15 semanas de estudo observaram diferença significativa no peso do tecido adiposo epididimal, com média de $5,07 \text{ g} \pm 0,27$ no grupo controle e $8,65 \text{ g} \pm 0,55$ no grupo experimental, sem observar aumento significativo no ganho de peso. O aumento do tecido adiposo epididimal deveu-se à hipertrofia adipocitária com aumento do volume dos adipócitos ao longo das 15 semanas de estudo. Foi comprovado também presença de resistência periférica à insulina. Em nosso estudo encontramos diferença significativa no peso do epidídimo, porém com valores absolutos menores, o que pode ser explicado por utilizarmos apenas o peso do epidídimo, separado da gordura periepididimal que fazia parte da gordura retroperitoneal. Duarte *et al.* (2006) alimentaram ratos Wistar por 15 semanas com dieta hiperlipídica palatável. Houve aumento significativo no peso do tecido adiposo epididimal e gordura retroperitoneal em relação ao grupo controle. Essa dieta não alterou o peso do pâncreas. Achados semelhantes ocorreram em outros estudos (BERNARDES, 2004; ROZEN; BRIGANT; APFELBAUM, 1994).

O peso do fígado encontra-se alterado em vários experimentos que visaram desenvolver modelos de roedores diabéticos com as mais variadas técnicas. Merzouk *et al.* (2000) encontraram diferença no peso do fígado e da gordura retroperitoneal de ratos que tiveram diabetes e macrosomia induzida por injeção de estreptozotocina intraperitoneal (40 mg/kg) em fêmeas grávidas. Panchal *et al.* (2011) induziram síndrome metabólica com aumento de peso do fígado e esteatose hepática em ratos Wistar submetidos à dieta rica em carboidratos e lipídeos por 16 semanas. Gilbert *et al.* (2011) ao compararem grupos de camundongos submetidos ou não a dieta hiperlipídica e dividi-los em grupos que receberam de uma a cinco injeções intraperitoneais de estreptozotocina em baixa dose observaram esperado aumento no peso do fígado e gordura retroperitoneal no grupo da dieta hiperlipídica. Os animais que receberam quatro ou cinco aplicações de estreptozotocina apresentaram redução de peso do fígado e da gordura retroperitoneal, apesar da dieta hiperlipídica. Isso não ocorreu nos grupos com uma, duas ou três injeções do

quimioterápico, aparecendo inclusive aumento significativo em relação ao controle. Nosso estudo ao utilizar baixa dose de estreptozotocina e dieta hipercalórica obteve resultados semelhantes ao grupo de Gilbert *et al.* (2011) que utilizaram três injeções de estreptozotocina e dieta hiperlipídica.

Nesse mesmo estudo, Gilbert *et al.* (2011) encontraram aumento significativo no peso do pâncreas em grupos com dieta hiperlipídica sem estreptozotocina e nos animais que receberam uma injeção do produto. O modelo de diabetes grave com dieta hiperlipídica e cinco injeções de estreptozotocina apresentou peso do pâncreas significativamente menor que o controle hiperlipídico sem estreptozotocina. Não obtivemos diferença significativa no peso do pâncreas, independente do tempo de estudo de oito ou 16 semanas em nosso trabalho. A presença de aumento no peso do pâncreas em alguns estudos está geralmente ligada a modelos com dieta hiperlipídica (CHEN; NYOMBA, 2003), enquanto nós utilizamos dieta enriquecida com sacarose. Já modelos com diabetes grave e doses maiores de estreptozotocina tem mostrado diminuição no tamanho do órgão.

Existem muitos modelos de diabetes com dislipidemia. Hipercolesterolemia em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina é resultante de aumento da absorção intestinal e da síntese do colesterol (MATHÉ, 1995). No presente estudo demonstramos aumento significativo nos níveis de colesterol total no grupo experimental de 16 semanas ($p < 0,001$). Porém no grupo com oito semanas essa diferença não se observou. Já a dosagem de triglicerídeos não apresentou diferença em nenhum dos grupos no modelo estudado.

Reed *et al.* (2000) desenvolveram um modelo de diabetes e hipertrigliceridemia em ratos Sprague-Dawley ao alimentar animais com sete semanas com dieta hiperlipídica por duas semanas e após, aplicar estreptozotocina intraperitoneal na dose de 50 mg/kg, considerada dose moderada. Demonstrou elevação de triglicerídeos, acentuada principalmente pela elevada presença de quilomicrons contidos na dieta hiperlipídica. Isso representa uma anormalidade no metabolismo de lipoproteínas, característica do diabetes tipo 2. Por outro lado, Soria, D'Alessandro e Lombardo (2001) utilizando somente dieta rica em sacarose também demonstraram alteração no metabolismo lipídico com hipertrigliceridemia e elevação de ácidos graxos livres com aumento moderado da lipólise basal e queda da ação antilipolítica da insulina nos adipócitos.

No modelo de Gilbert *et al.* (2011), já apresentado, apenas camundongos que receberam quatro ou cinco doses de estreptozotocina associada à dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo nos níveis de colesterol total e triglicerídeos. Colesterol HDL aumentou apenas no grupo com cinco doses de estreptozotocina. Animais que receberam dieta padrão e quatro ou cinco doses do quimioterápico tiveram índices menores de triglicerídeos que os controles. Não foi observado presença de dislipidemia em animais que receberam apenas dieta hiperlipídica, sugerindo a participação da estreptozotocina nos aumentos de triglicerídeos e colesterol. Em nosso estudo observamos elevação de colesterol após 16 semanas de estudo, porém com doses menores de estreptozotocina.

Observamos resultados positivos em relação aos níveis de glicemia de jejum em nosso estudo. Tanto o grupo experimental de oito como o de 16 semanas demonstraram aumento significativo quando comparados com os controles, demonstrando intolerância à glicose, provavelmente em decorrência a resistência periférica à insulina causada pela dieta rica em sacarose. Resultados semelhantes já foram publicados por Portha (1982).

Luo *et al.* (1998) induziram resistência periférica à insulina com dieta enriquecida em frutose ou lipídeos em camundongos jovens. Ao aplicar dose baixa de estreptozotocina que não induzia diabetes em animais com dieta normal, demonstraram queda dos níveis de insulina em relação aos níveis altos obtidos com a dieta hipercalórica, porém sem cair ao nível do grupo controle. Dessa maneira conseguiram-se resultados positivos com ratos hiperglicêmicos com níveis de glicemia de 388 mg/dl \pm 38 e 366 mg/dl \pm 58 nos grupos com frutose e lipídeos respectivamente, demonstrando a intolerância à glicose e diabetes tipo 2. Os animais do estudo responderam a tratamento com hipoglicemiantes orais tendo seus níveis de glicemia reduzidos.

Em nosso modelo não obtivemos níveis de glicemia que representem diabetes franco como os encontrados no estudo acima, entretanto foi demonstrado níveis de intolerância à glicose nos animais estudados por oito semanas com glicemia de jejum média de 108,5 mg/dl \pm 14,43 e diabetes inicial no grupo de 16 semanas com glicemia de jejum média de 114,25 mg/dl \pm 11. A intolerância à glicose foi confirmada com o teste oral de tolerância à glicose com diferença significativa entre o grupo de estudo e o grupo controle tanto em oito como em 16 semanas, em todos os tempos aferidos. Stark, Timar e Madar (2000) submeteram

ratos Sprague-Dawley a dieta hiperlipídica ou rica em frutose e sacarose por 12 semanas e não obtiveram diferenças significativas no teste oral de tolerância à glicose quando comparados a animais que receberam dieta padrão, resultado não obtido em estudos que utilizaram dietas hipercalóricas e indução química do diabetes com estreptozotocina (ZHANG *et al.*, 2003).

Há algumas explicações para a progressão para quadros de diabetes após injeção de estreptozotocina em ratos que consomem dietas hipercalóricas. O animal que consome dieta hipercalórica, tanto rica em sacarose ou frutose quanto hiperlipídica desenvolve resistência periférica à insulina com aumento da secreção insulínica pelas células beta. O ponto chave está na destruição das células beta pela estreptozotocina e na incapacidade das células beta residuais de produzir níveis adequados de insulina para compensar a resistência periférica (DONATH *et al.* 2006). A exposição crônica à dietas hipercalóricas pode resultar em alterações metabólicas que alterem a sensibilidade das ilhotas pancreáticas, reduzindo sua resposta a essa resistência.

6 CONCLUSÕES

- Concluimos que o modelo experimental com oito semanas sugere a presença de obesidade visceral e intolerância à glicose, enquanto o modelo experimental com 16 semanas representa um modelo animal com obesidade, obesidade visceral, hipercolesterolemia e diabetes tipo II.
- Não houve aumento de peso nos animais que receberam estreptozotocina e dieta enriquecida em sacarose por oito semanas. Porém foi comprovada obesidade nos animais que foram estudados por 16 semanas.
- Houve aumento do peso de gordura visceral tanto nos animais com oito semanas de estudo como nos com 16 semanas, demonstrando obesidade visceral.
- Houve elevação nos níveis de glicemia de jejum e alteração positiva no teste oral de tolerância à glicose no grupo experimental tanto com oito quanto com 16 semanas, demonstrando intolerância à glicose e diabetes inicial.
- Os animais do grupo experimental com 16 semanas apresentaram aumento nos níveis de colesterol total, enquanto não houve aumento nos níveis de triglicérides em nenhum momento do estudo.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care for diabetes. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 17, p. 1514-1522, 2007.
- ASPLUND, K. *et al.* Partial protection against Streptozotocin-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol. **Acta Endocrinol.**, Copenhagen, v. 107, p. 390-394, 1984.
- BERDANIER, C.D. The BHE rat: an animal model for the study of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **FASEB J.**, Bethesda, v.5, p.2139-2144, 1991.
- BERNARDES, D. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.**, São Paulo, v.18, n.2, p.191-200, abr./jun. 2004.
- BONNER-WEIR, S. *et al.* Responses of neonatal rat islets to streptozotocin. **Diabetes**, New York, v. 30, p. 64-69, 1981.
- BORAI, A. *et al.* Selection of the appropriate method for the assessment of insulin resistance. **BMC Med. Res. Methodol.**, London, v.11, p.158-165, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Diabetes mellitus: guia básico para diagnóstico e tratamento.** Brasília, 1996.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, London, v.414, n.6865, p. 813-820, 2001.
- BUCHWALD, H. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, Chicago, v. 292, n.14, p.1724-1737, 2004.
- CAPELLA, R.F.; CAPELLA, J.F. Vertical banded gastroplasty-gastric bypass: preliminary report. **Obes. Surg.**, Oxford, v.1, p.389-395, 1991.
- CESARETTI, M.L.R.; KOLMANN, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.50, p.190-197, 2006.
- CHEN, L.; NYOMBA, B.L. Glucose intolerance and resisting expression in rat offspring exposed to ethanol in utero: modulation by postnatal high-fat diet. **Endocrinology**, Baltimore, v.144, p.500-5008, 2003.
- COZAR-CASTELLANO, I. *et al.* Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic β -cell. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.27, p.356-370, 2006.
- CREUTZFELDT, W. The incretin concept today. *Diabetologia*. Berlin, v.16, p. 75-85, 1979.

DANDONA, P. *et al.* Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. **Circulation**, Dallas, v.111, p.1448-1454, 2005.

Da SILVA, A. A. da *et al.* Role of endothelin-1 in blood pressure regulation in a rat model of visceral obesity and hypertension. **Hypertension**, Dallas, v.43, p.383-387, 2004.

DONATH, M.Y. *et al.* Mechanisms of β -cell death in type 2 diabetes. **Diabetes**, New York, v.54, Suppl.2, p.108-113, 2005.

DUARTE, A.C.G.O. *et al.* Dieta hiperlipídicas e capacidade secretória de insulina em ratos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 19, p. 341-348, 2006.

FIELD, A. E.; COAKLEY, E. H.; MUST, A. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. **Arch. Intern. Med.**, v. Chicago, 161, p. 1581-6, 2001.

FOBI, M. Why the operation I prefer is silastic ring vertical gastric bypass. **Obes. Surg.**, Oxford, v.1, p.423-426, 1991.

GILBERT, E.R; FU Z; LIU, D. Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes. **Exp. Diabetes Res.** Cairo, 2011: 416254. doi: 10.1155/2011/416254. Published online 2011 Nov. 29.

GOUVEIA, L.M.; KETTELHUT, I.C.; FOSS, M.C. Abnormalities of glucose metabolism in spontaneously hypertensive rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.33, p.1357-1362, 2000.

GUIDONE, C. Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. **Diabetes**, New York, v. 55, p. 2025-2031, 2006.

HALUZIK, M.; NEDVIDKOVA, J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications. **Physiol. Res.**, Praha, v. 49, p. 37-42, 2000.

HESS, D.S. Biliopancreatic diversion with a duodenal switch. **Obes. Surg.**, Oxford, v.8, p.267-282, 1998.

INABNET, W.B. A rodent model of metabolic surgery for study of type 2 diabetes and positron emission tomography scanning of beta cell mass. **Surg. Obes. Relat. Dis.**, New York, v.5, p.212-217, 2009.

ISLAS-ANDRADE, S. *et al.* Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: Comparison of the two models in rats. **Acta Histochem. Cytochem.**, Tokyo, v.33, p.201-208, 2000.

KAKU, K.; PRIVINCE, M.; PERMUTT, M.A. Genetic analysis of obesity-induced diabetes associated with a limited capacity to synthesize insulin in C57BL/KS mice: evidence for polygenic control. **Diabetologia**, Berlin, v.32, p.636-643, 1989.

KARASIK, A.; HATTORI, M. Use of animal models in the study of diabetes. In: KAHN, C.R.; WEIR, G.C. **Jolin's diabetes mellitus**. 13 th ed., 1994.

KAWASAKI, T. *et al.* Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. **Br. J. Nutr.**, London, v. 93, p. 613-618, 2005.

LEAHY, J.L.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C. Minimal chronic hyperglycemia is a critical determinant of impaired insulin secretion after an incomplete pancreatectomy. **J. Clin. Invest.**, New York, v.81, p.1407-1414, 1988.

LIKE, A.A.; ROSSINI, A.A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science**, Washington, v.193, p.415-417, 1976.

LIM, G.E. Glucagon-like peptide 1 secretion by the I-cell: the view from within. **Diabetes**. New York, v. 55, Suppl,2, p.S70-S74, 2006.

LUO, J. *et al.* Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, Baltimore, v.47, p.663-668, 1998.

MACHADO, U.F.; SCHANN, B.D.; SERAPHIN, P.M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.50, p. 177-189, 2006.

MASON, E.E. Ileal [correction of ilial] transposition and enteroglucagon/GLP-1 in obesity (and diabetic?) surgery. **Obes. Surg.**, Oxford, v. 9, p.223-228, 1999.

MATHÉ D. Dyslipidemia and diabetes: animal models. **Diabete Metab.**, Paris, v.21, p.106-111, 1995.

MERZOUK, H. *et al.* Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Clin. Sc.**, London, v.98, p.21-30, 2000.

MISTRY, S.B.; OMANA, J.J.; KINI, S. Rat models for bariatric surgery and surgery for type 2 diabetes mellitus. **Obes. Surg.**, Oxford, v.19, p.655-660, 2009.

NADERALI, E.K.; FATANI, S.; WILLIAMS, G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.172, p.63-69, 2004.

NAIR, M. Diabetes mellitus, part 1: physiology and complications. **Br. J. Nurs.**, London, v.16, p.184-188, 2007.

NCEP - The National Cholesterol Education Program. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, Chicago, 285, n.19, p.2486-2497, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, The world health report. Press release. 1998.

PANCHAL, S.K. *et al.* High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular modeling in rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v.57, p.611-24, 2011.

PANKOW, J.S. *et al.* Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes Care**, Alexandria, v.27, p.77-82, 2004.

PASCOE, W.S.; STORLIEN, L.H. Inducement by fat feeding of basal hyperglycemia in rats with abnormal β -cell function. **Diabetes**, New York, v. 39, p. 226-233, 1990.

PENICAUD, L. *et al.* Development of obesity in Zucker rats: early insulin resistance in muscles but normal sensitivity in White adipose tissue. **Diabetes**, New York, v.36, p.626-631, 1987.

PICON, P.X. *et al.* Análise dos critérios de definição da síndrome metabólica nos pacientes com diabetes melito tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v.50, p. 264-270, 2006.

PI-SUNYER, F.X. Obesity: criteria and classification. **Proc. Nutr. Soc.**, London, v.59, p.505-509, 2000.

PORTHA, B. Effect of diet on glucose tolerance and insulin response in chemically diabetic rats. **Metabolism**, Baltimore, v. 31, p. 1194-119, 1982.

PORTHA, B. *et al.* The rat models of non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabetes Metab.**, Paris, v.15, p.61-75, 1989.

REAVEN, G.M.; HO, H. Low-dose streptozotocin-induced diabetes in the spontaneously hypertensive rat. **Metabolism**, Baltimore, v. 40, p. 335-337, 1991.

REED, M.J. *et al.* A new rat model of type 2 diabetes: the fat-feed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism**, Baltimore, v. 49, p 1390-1394, 2000.

RICE, M.G.; ROBERTSON, R.P. Reevaluation of the sand rat as a model for diabetes mellitus. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.239, p.E340-E345, 1980.

ROZEN, R.; BRIGANT, L.; APFELBAUM, M. Effects of cycles of food restriction followed by ad libitum refeeding on body composition and energy expenditure in obese rats. **Am J Clin Nutr.**, Bethesda, v. 59, p.560-565, 1994.

RUBINO, F.; MARESCAUX, J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. **Ann Surg.**, Philadelphia, v.239, p.1-11, 2004.

SCHNEDL, W.J. *et al.* STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2- expressing cells. **Diabetes**, New York, v. 43, p.1326-1333, 1994.

SCOPINARO, N. Bilio-pancreatic bypass for obesity: II. Initial experience in man. **Br. J. Surg.**, Bristol, v.66, p.618-620, 1979.

SHANG, W. *et al.* Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. **Pancreas**, New York, v.25, p.393-399, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes. Disponível em: http://ww2.prefeitura.sp.gov.br//arquivos/secretarias/saude/programas/0007/Diretrizes_SBD_2007.pdf Acesso em 12/9/2010.

SORIA, A.; D'ALESSANDRO, M.E.; LOMBARDO, Y.B. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. **J. Appl. Physiol.**, Washington, v. 91, p. 2109-2116, 2001.

STARK, A.H.; TIMAR, B.; MADAR, Z. Adaptation of Sprague Dawley rats to long-term feeding of high fat or high fructose diets. **Eur. J. Nutr.**, Darmstadt, v.39, p.229-234, 2000.

SRINIVASAN, K. *et al.* Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model of type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacol. Res.**, London, v. 52, p.312-320, 2005.

STRADER, A.D. Weight loss through ileal transposition is accompanied by increased ileal hormone secretion and synthesis in rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 288, p.447-453, 2005.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, Praha, v. 50, p. 537-546, 2001.

TAKADA, J. *et al.* Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism**, Baltimore, v.56, p. 977-984, 2007.

TSCHEN, S.I. *et al.* Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. **Diabetes**, New York, v.58, p. 1312-120, 2009.

US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). **Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity: the evidence report.** Washington DC: US Government Press, 1998.

VERSPOHL, E.J. Recommended testing in diabetes research. **Planta Medica**, Stuttgart, v.68, p.581-590, 2002.

VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E.N.; TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.21, p.425-429, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications:** Report of WHO a Consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Genebra, 1999.

ZHANG, F. *et al.* The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. **Exp. Anim.**, Tokyo, v. 52, p. 401-407, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES DO GRUPO CONTROLE DE OITO SEMANAS (PESO EM GRAMAS)

	SEM 0	SEM 2	SEM 4	SEM 6	SEM 8
GC8-1	146	215	280	328	346
GC8-2	124	181	258	300	324
GC8-3	148	225	300	332	365
GC8-4	147	217	299	343	377
GC8-5	138	207	272	303	326
GC8-6	131	179	230	253	270
GC8-7	132	207	262	322	337
GC8-8	82	185	225	271	284
GC8-9	101	192	248	250	265
GC8-10	120	174	250	261	269
GC8-11	94	164	242	263	283
GC8-12	101	163	237	270	275

APÊNDICE 2 - DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES DO GRUPO EXPERIMENTAL DE OITO SEMANAS (PESO EM GRAMAS)

	SEM 0	SEM 2	SEM 4	SEM 6	SEM 8
GE8-1	150	214	264	294	321
GE8-2	143	195	245	281	292
GE8-3	150	202	252	282	299
GE8-4	142	222	294	342	370
GE8-5	147	235	315	304	395
GE8-6	131	199	240	280	300
GE8-7	159	218	276	319	343
GE8-8	139	216	294	316	340
GE8-9	88	198	285	340	369
GE8-10	95	215	278	309	321
GE8-11	118	240	298	334	345
GE8-12	135	232	301	318	346

APÊNDICE 3: - DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES DO GRUPO CONTROLE DE 16 SEMANAS (PESO EM GRAMAS)

	SEM 0	SEM 2	SEM 4	SEM 6	SEM 8	SEM 10	SEM 12	SEM 14	SEM 16
GC16-1	137	217	213	241	234	252	260	275	262
GC16-2	139	123	245	203	296	259	287	310	282
GC16-3	106	219	261	250	280	268	298	317	323
GC16-4	124	173	244	245	286	274	270	276	289
GC16-5	104	168	270	256	265	280	292	313	315
GC16-6	112	216	248	260	296	284	289	302	295
GC16-7	102	168	233	208	258	263	274	291	265
GC16-8	136	197	201	238	290	271	275	263	277
GC16-9	105	162	230	255	283	300	296	317	281
GC16-10	102	124	243	230	224	235	268	293	273
GC16-11	102	201	250	253	259	265	283	332	299
GC16-12	119	201	249	237	280	298	301	330	309

APÊNDICE 4 - DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES DO GRUPO EXPERIMENTAL DE 16 SEMANAS (PESO EM GRAMAS)

	SEM 0	SEM 2	SEM 4	SEM 6	SEM 8	SEM 10	SEM 12	SEM 14	SEM 16
GE16-1	139	210	251	264	301	293	310	309	364
GE16-2	105	234	190	211	225	256	276	258	393
GE16-3	132	210	210	266	278	279	296	290	369
GE16-4	144	236	270	327	335	368	377	368	349
GE16-5	137	202	254	275	310	321	323	345	394
GE16-6	132	222	271	289	286	308	316	316	364
GE16-7	129	204	204	262	325	265	378	376	389
GE16-8	128	203	247	277	294	299	307	310	365
GE16-9	124	197	245	292	318	292	314	313	354
GE16-10	116	194	245	268	309	296	309	307	348
GE16-11	132	208	248	260	320	295	298	297	370
GE16-12	129	202	240	301	302	283	300	299	361

APÊNDICE 5 - DADOS DE GLICEMIA DE JEJUM NA SEMANA 0, GLICEMIA DE JEJUM NA SEMANA 8, TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE, COLESTEROL TOTAL E TRIGLICERÍDEOS NOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL DE OITO SEMANAS

	GLICEMIA JEJUM 0	GLICEMIA JEJUM 8	TOTG -0 MIN	TOTG - 30 MIN	TOTG - 120 MIN	CT	TRIG
GC8-1	72	100	100	120	75	52	70
GC8-2	102	92	92	130	94	70	72
GC8-3	95	83	83	122	95	45	65
GC8-4	100	77	77	129	83	50	52
GC8-5	94	97	97	135	91	53	57
GC8-6	78	79	79	121	91	78	73
GC8-7	85	103	103	143	100	61	66
GC8-8	76	87	87	143	103	52	75
GC8-9	74	78	78	135	96	64	56
GC8-10	79	99	99	124	83	45	65
GC8-11	78	103	103	147	105	49	68
GC8-12	83	89	89	129	96	43	62
GE8-1	110	112	112	165	107	61	67
GE8-2	101	101	101	144	98	55	72
GE8-3	119	136	136	150	106	49	50
GE8-4	90	80	80	148	93	54	80
GE8-5	87	99	99	147	116	59	90
GE8-6	102	110	110	129	72	63	89
GE8-7	98	106	106	125	89	78	65
GE8-8	96	102	102	139	117	55	57
GE8-9	74	104	104	133	116	58	67
GE8-10	102	108	108	148	112	58	71
GE8-11	82	130	130	152	110	63	67
GE8-12	68	114	114	163	129	58	55

APÊNDICE 6 - DADOS DE GLICEMIA DE JEJUM NA SEMANA 0, GLICEMIA DE JEJUM NA SEMANA 16, TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE, COLESTEROL TOTAL E TRIGLICERÍDEOS NOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL DE 16 SEMANAS

	GLICEMIA JEJUM 0	GLICEMIA JEJUM 16	TOTG -0 MIN	TOTG - 30 MIN	TOTG - 120 MIN	CT	TRIG
GC16-1	77	95	95	115	90	45	89
GC16-2	70	78	78	147	89	45	92
GC16-3	65	86	86	134	81	63	79
GC16-4	53	89	89	138	95	59	73
GC16-5	62	91	91	127	78	52	65
GC16-6	79	76	76	129	80	45	86
GC16-7	50	83	83	122	87	45	88
GC16-8	69	80	80	145	92	52	71
GC16-9	76	72	72	133	85	45	91
GC16-10	67	85	85	143	79	45	83
GC16-11	78	78	78	135	83	45	58
GC16-12	87	89	89	118	81	45	83
GE16-1	80	125	125	165	112	69	79
GE16-2	60	98	98	196	118	58	92
GE16-3	98	99	99	161	105	84	66
GE16-4	93	110	110	163	103	56	87
GE16-5	59	132	132	152	100	85	74
GE16-6	67	115	115	151	107	82	98
GE16-7	75	108	108	178	115	68	84
GE16-8	82	116	116	197	124	59	83
GE16-9	79	117	117	234	111	59	76
GE16-10	70	130	130	175	132	70	114
GE16-11	75	105	105	154	117	54	110
GE16-12	71	116	116	160	126	60	98

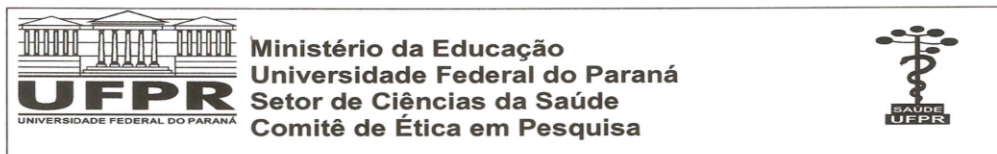
APÊNDICE 7 - DADOS DE PESO DO FÍGADO, PESO DA GORDURA RETROPERITONEAL, PESO DO PÂNCREAS E PESO DO EPIDÍDIMO NOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL DE OITO SEMANAS

	P FÍGADO	P GORD RP	P PÂNCREAS	P EPIDÍDIMO
GC8-1	12,68	2,89	0,6	0,96
GC8-2	11,25	3,45	1,82	2,03
GC8-3	15,26	3,64	1,74	1,14
GC8-4	9,56	6,67	2,29	3,8
GC8-5	7,74	2,34	1,18	1,16
GC8-6	11,18	2,97	1,1	1,19
GC8-7	8,33	1,82	2,02	1,9
GC8-8	12,67	1,47	0,55	0,82
GC8-9	15,62	3,12	0,85	0,47
GC8-10	14,47	3,46	1,35	1,06
GC8-11	12,35	2,52	1,15	0,61
GC8-12	11,36	3,45	1,36	0,98
GE8-1	12,44	10,32	1,93	2,07
GE8-2	13,9	12,03	3,28	1,93
GE8-3	10,4	8,9	2,04	1,88
GE8-4	11,85	10,28	1,86	2,16
GE8-5	14,97	11,81	2,1	2,16
GE8-6	11,12	5,53	2,42	2,26
GE8-7	13,35	7,86	2,44	2,16
GE8-8	11,76	6,9	2,83	2,91
GE8-9	15,13	8,65	1,26	0,85
GE8-10	13,72	5,56	0,86	1,02
GE8-11	12,13	8,53	1,32	0,71
GE8-12	14,39	8,07	1,36	1,13

APÊNDICE 8 – DADOS DE PESO DO FÍGADO, PESO DA GORDURA RETROPERITONEAL, PESO DO PÂNCREAS E PESO DO EPIDÍDIMO NOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTAL DE 16 SEMANAS

	P FÍGADO	P GORD RP	P PÂNCREAS	P EPIDÍDIMO
GC16-1	6,86	2,67	0,92	0,9
GC16-2	9,08	4,27	1,06	0,93
GC16-3	12,1	2,54	0,84	0,51
GC16-4	12,29	2,66	1,06	0,84
GC16-5	11,1	0,56	0,92	0,69
GC16-6	10,85	0,64	0,93	1,07
GC16-7	10,59	2,66	0,94	0,8
GC16-8	7,56	0,5	0,67	0,55
GC16-9	9,01	3,16	0,91	0,84
GC16-10	8,07	2,1	0,83	0,75
GC16-11	9,49	1,9	1,07	0,6
GC16-12	10,78	2,49	1,09	1,01
GE16-1	12,82	9,4	0,81	1,65
GE16-2	12,02	13,56	0,77	1,01
GE16-3	10,82	8,89	0,96	1,74
GE16-4	12,93	9,93	0,65	1,07
GE16-5	14,13	11,87	0,86	0,79
GE16-6	13,64	16,61	1,28	1,33
GE16-7	14,58	12,24	1,04	1,98
GE16-8	11,12	12,46	1,55	1,33
GE16-9	10,55	9,86	1,33	0,76
GE16-10	11,62	10,01	1,29	0,72
GE16-11	12,93	10,57	0,89	1,09
GE16-12	13,4	7,42	1,38	0,83

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPR

Curitiba, 04 de março de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Wagner Herbert Sobottka

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Uso de estreptozotocina e dieta enriquecida em sacarose na indução de obesidade, resistência periférica à insulina e intolerância à glicose em ratos**” está de acordo com as normas éticas orientadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 04 de março de 2009.

Registro **CEP/SD**: AN.018.001.09.02

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 03/09/2009.

Atenciosamente



Prof.ª. Dr.ª. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – C EP 80060-240
Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO BÁSICA DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA AOS RATOS (NUVILAB CR1®)

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos (DL-metionina e lisina).
Umidade (máximo): 12,5%
Proteína bruta (mínimo): 22%
Cálcio (máximo): 1,4%
Fósforo (mínimo): 0,8%
Etrato etéreo (mínimo): 4%
Material mineral (máximo): 10%
Matéria fibrosa (máximo): 8%
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina.
Microelementos: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto.

FONTE: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil