**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**RAQUEL RIBEIRO DE AGUIAR**

# ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICA SÉRICA EM RATOS WISTAR COM *DIABETES MELLITUS* INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2017**

**RAQUEL RIBEIRO DE AGUIAR**

# ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICA SÉRICA EM RATOS WISTAR COM *DIABETES MELLITUS* INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

**Orientador: Profª. D.Sc. Adriana Jardim de Almeida**

**Co-orientadora: Profª. D.Sc. Fernanda Antunes**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2017**

**RAQUEL RIBEIRO DE AGUIAR**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICA SÉRICA EM RATOS WISTAR COM *DIABETES MELLITUS* INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Sanidade Animal.

**Aprovada no dia 13 de abril de 2017**

**Banca Examinadora:**

_____

Profª. D.Sc. Adriana Jardim de Almeida

_____

Profª. D.Sc. Fernanda Antunes

_____

Prof. D.Sc. Antônio Peixoto Albernaz

_____

D. Sc. Daniela Fantini Vale

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2017**

Dedico este trabalho à minha mãe ***Maria Aparecida***, meu amor maior.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu agradecimento em primeiro lugar. Meu tudo e minha segurança. É para Ele que faço todas as coisas.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por ter me recebido todos esses anos, por ter me formado como profissional Médica Veterinária e Mestre. Guardo no coração cada momento vivido.

Às orientadoras Profa. Adriana Jardim e Profa. Fernanda Antunes pela paciência, oportunidade, confiança e amizade para comigo. Além da dedicação e apoio a este trabalho.

À Unidade de Experimentação Animal (UEA) que me ensinou o amor pela pesquisa, me incentivou a continuar nesse caminho e me ofereceu toda estrutura necessária desde a Iniciação Científica até o Mestrado.

Aos amigos pós-graduandos da UEA (Silvia Ruiz, Marcelo Borges e Guilherme Vieira) pela ajuda nesses dois anos, sem a qual não teria conseguido.

Aos professores Antônio Albernaz, Karoll Torres e Carlos Logullo. Meu muito obrigada pela colaboração e disponibilidade de sempre.

À CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

À minha mãe e meu irmão, por todo amor e apoio (profissional e emocional). A eles, dedico todas as minhas vitórias ao concluir esta etapa, mesmo com as maiores dificuldades ao longo desse ano.

A todos os amigos que fiz em Campos durante esses 7 anos de estadia. Carrego cada um no coração na certeza de que “perto estás se dentro estás”. Vou sentir saudades de cada um!

Ao meu namorado, André, pela paciência, auxílio e amor. Meu melhor amigo que tanto fez por mim e torce para que eu conquiste meus sonhos. Meu melhor revisor de inglês.

## RESUMO

O diabetes mellitus é um distúrbio no metabolismo de carboidratos, caracterizado por deficiência na produção e secreção do hormônio insulina (tipo 1) ou resistência dos tecidos a este mesmo hormônio (tipo 2), causando hiperglicemia crônica. Níveis elevados de glicose no sangue em longo prazo podem gerar diversas complicações como alterações micro e macrovasculares, que são consideradas as principais consequências do diabetes mellitus, principalmente do tipo 2 (DM2). Devido à prevalência cada vez maior dessa doença, novos estudos relacionados ao DM2 são necessários para que haja melhor manejo dos pacientes e das possíveis complicações. Dessa forma, este estudo objetivou estudar as alterações fisiológicas e estruturais causadas pelo DM2 em ratos Wistar machos (n=20) e fêmeas (n=20). Para indução da doença, utilizou-se injeção de estreptozotocina por via intravenosa em dose única de 60 e 40mg.kg$^{-1}$ em ratos previamente engordados. Os animais foram mantidos em condições de vida adequadas para a espécie. Os índices glicêmicos foram monitorados durante as 12 semanas de experimentação, e foram considerados diabéticos os animais que mantiveram >300 mg/dL. Na terceira e sexta semanas, os animais passaram por coleta de sangue para realização das análises bioquímicas séricas e, com 12 semanas, foram submetidos ao eletrocardiograma e ecocardiograma para as avaliações cardiológicas. Após aferição dos parâmetros, os animais foram submetidos à morte sem dor, e fragmentos de fígado, rim e coração foram fixados para análise histopatológica de possíveis lesões. A dose de 40 mg.kg$^{-1}$ demonstrou ser uma dose segura para experimentação, causando baixa mortalidade com relação à de 60 mg.kg$^{-1}$. Os animais doentes de ambos os sexos desenvolveram alterações hepáticas e renais importantes, caracterizadas por acúmulo lipídico e hidrópico nas células, além de aumento de enzimas hepáticas (Alanina aminotransferase, Aspartato aminotransferase, Fosfatase alcalina e Gamaglutamiltranspeptidase) e renais (Ureia e creatinina). Porém, as fêmeas desenvolveram lesões mais avançadas com focos de degeneração hidrópica e gordura em miocárdio após 12 semanas de indução, podendo sugerir evolução mais rápida de cardiomiopatia diabética neste sexo.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Estreptozotocina; Bioquímica sérica; Disfunção sistólica.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a disorder of carbohydrate metabolism, characterized by deficiency in the production and secretion of the hormone insulin (type 1) or tissue resistance to this same hormone (type 2), causing chronic hyperglycemia. High blood glucose levels can generate several long-term complications, such as micro- and macrovascular changes, which are considered the main consequences of diabetes mellitus, mostly type 2 (DM2). Due to the increasing prevalence of this disease, new studies related to DM2 are necessary to better manage patients and possible complications. Thus, this project aimed to study the physiological and structural changes caused by DM2 in male (n = 20) and female (n = 20) Wistar rats. For induction of the disease, intravenous injection of streptozotocin was administered, in a single dose of 60 and 40mg.kg$^{-1}$, to rats previously fattened. The animals were kept in adequate living conditions for their species. Glycemic indices were monitored during 12 weeks of experimentation, and animals that maintained >300 mg/dL were considered diabetic. In the third and sixth weeks, the animals were undergone blood sampling to carry out the biochemical serum analysis; in the 12$^{th}$ week, they were submitted to electrocardiogram and echocardiogram for cardiac evaluations. After measuring the parameters, the animals were put to death without pain, and fragments of liver, kidney and heart were fixed for histopathological analysis of possible lesions. The dose of 40 mg.kg$^{-1}$ was shown to be a safe dose for experimentation, causing a low mortality compared to the 60 mg.kg$^{-1}$. The diseased animals of both sexes developed important hepatic and renal alterations, characterized by lipid and hydropic accumulation in the cells, besides increase of hepatic (Alanine aminotransferase, Alkaline phosphatase, Aspartate aminotransferase and Gamma-glutamyl transpeptidase) and renal enzymes (Urea and creatinine). However, females developed more advanced lesions with focus of hydropic and fat degeneration in myocardium after 12 weeks of induction. These results may suggest a more rapid evolution of diabetic cardiomyopathy in this sex.

Keywords: Diabetes mellitus; Streptozotocin; Serum biochemistry; Systolic dysfunction.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Esquema representativo das ilhotas de Langerhans com seus tipos celulares e hormônios produzidos (Figura adaptada) (EFRAT e RUSS, 2012).....21

**Figura 2:** Principais eventos no processo de regulação da secreção de insulina nas células beta-pancreáticas (Linhas tracejadas = eventos indefinidos; linhas sólidas = eventos estabelecidos) (HABER, CURI, et al., 2001).....23

**Figura 3:** Prevalência comparativa do diabetes por idade (20-79 anos) e sexo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015) (Figura adaptada).....25

**Figura 4:** Principais complicações relacionadas ao Diabetes mellitus (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013) (Figura adaptada).....28

**Figura 5:** Neovascularização e espessamento de vasos da retina. Fotomicrografia de imunofluorescência da retina de ratos controle (A) e diabéticos após 2 meses de indução por estreptozotocina (GONG, LU, et al., 2013).....30

**Figura 6:** Efeito da diabetes na estrutura cardíaca e fibrose em ratos. (A) Animais controle; (B) Animais diabéticos; (C) Animais após 12 semanas de indução do diabetes experimental (CHUN-JUN, QIU-MEI, et al., 2009).....31

**Figura 7:** Indução anestésica por meio de garrafa pet adaptada, conectada ao circuito anestésico (arquivo pessoal).....37

**Figura 8:** Animal com máscara facial adaptada com seringa de 20 mL (arquivo pessoal).....38

**Figura 9:** Mensuração da glicemia em ratos Wistar através da veia da cauda (arquivo pessoal).....39

**Figura 10:** Animal em decúbito dorsal com eletrodos posicionados para confecção de eletrocardiograma e com tricotomia torácica para ecocardiograma (arquivo pessoal).....40

**Figura 11:** Fotomicrografia de tecido hepático em coloração HE. (A) Fígado de

animal controle em aumento de 20x; (B) Fígado de animal controle em aumento de 40x; (C) Fígado de macho diabético em aumento de 40x; (D) Fígado de macho diabético em aumento de 20x; (E) Fígado de fêmea diabética em aumento de 40x; (F) Fígado de fêmea diabética em aumento de 40x. (Animais diabéticos após 12 semanas de indução).....45

**Figura 12:** Fotomicrografia de tecido renal em coloração HE. (A) Rim de animal controle em aumento de 20x; (B) Rim de animal controle em aumento de 40x; (C) Rim de fêmea diabética em aumento de 20x; (D) Rim de fêmea diabética em aumento de 20x; (E) Rim de macho diabético em aumento de 40x. (Animais diabéticos após 12 semanas de indução).....46

**Figura 13:** Comparação do soro límpido de fêmeas controle (A) e soro intensamente lipêmico de fêmeas diabéticas (B).....54

**Figura 14:** Fotomicrografia de tecido cardíaco em coloração HE. (A) Miocárdio de animal controle em aumento de 20x; (B) Miocárdio de animal controle em aumento de 40x; (C e D) Miocárdio de fêmea diabética em aumento de 40x; (E e F) Miocárdio de macho diabético em aumento de 40x. (Animais diabéticos após 12 semanas de indução).....58

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** Porcentagem de sobrevivência de ratos Wistar (machos e fêmeas) após injeção de 60 mg.kg-1 de estreptozotocina intravenosa. Análise estatística determinada por teste Log-rank, p<0,05).....43

**Gráfico 2:** Porcentagem de sobrevivência de ratos Wistar (machos e fêmeas) após injeção de 40 mg.kg-1 de estreptozotocina intravenosa. Análise estatística determinada por teste Log-rank, p<0,05).....43

**Gráfico 3:** Aumento da glicemia em ratos Wistar após injeção intravenosa de estreptozotocina. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas= comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....44

**Gráfico 4:** Níveis de alanina aminotransferase (ALT) no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....47

**Gráfico 5:** Níveis de aspartato aminotransferase (AST) no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....48

**Gráfico 6:** Níveis de fosfatase alcalina (FA) no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....48

**Gráfico 7:** Níveis de gamaglutamiltranspeptidase (GGT) no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de

indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....49

**Gráfico 8:** Níveis de ureia no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....50

**Gráfico 9:** Níveis de creatinina no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....50

**Gráfico 10:** Níveis de colesterol total no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....53

**Gráfico 11:** Níveis de triglicerídeos no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....54

**Gráfico 12:** Frequência cardíaca em ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM12=Após 12 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....56

**Gráfico 13:** Fração de ejeção em ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM12=Após 12 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05),

(n=15/grupo).....57

**Gráfico 14:** Fração de encurtamento em ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM12=Após 12 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).....57

# LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Bioquímica sérica de ratos Wistar fêmeas diabéticas (DM3 = após 3 semanas de indução; DM6 = após 6 semanas de indução). Apresentação de valores mínimos, máximos e desvios padrões.....51

**Tabela 2:** Bioquímica sérica de ratos Wistar machos diabéticos (DM3 = após 3 semanas de indução; DM6 = após 6 semanas de indução). Apresentação de valores mínimos, máximos e desvios padrões.....52

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **ADP** | Adenosina difosfato |
| **ALT** | Alanino aminotransferase |
| **AST** | Aspartato aminotransferase |
| **ATP** | Adenosina trifosfato |
| **AVC** | Acidente vascular cerebral |
| **CMPD** | Cardiomiopatia diabética |
| **DAG** | Diacilglicerol |
| **DHGNA** | Doença hepática gordurosa não alcoólica |
| **DM** | Diabetes Mellitus |
| **DM1** | Diabetes Mellitus tipo 1 |
| **DM2** | Diabetes Mellitus tipo 2 |
| **ECG** | Eletrocardiograma |
| **EUA** | Estados Unidos da América |
| **FA** | Fosfatase Alcalina |
| **G6P** | Glicose-6-fosfato |
| **GGT** | Gamaglutamil transpeptidase |
| **HE** | Hematoxilina e eosina |
| **IAM** | Infarto agudo do miocárdio |
| **IDF** | International Diabetes Federation |
| **iECA** | Inibidores da enzima conversora da angiotensina |
| **IP** | Intraperitoneal |
| **IP3** | Inositol 1-4-5-trifosfato |
| **IV** | Intravenosa |
| **Km** | Quilômetro |
| **LDH** | Lactato desidrogenase |
| **OMS** | Organização Mundial da Saúde |
| **PDH** | Piruvato desidrogenase |
| **STZ** | Estreptozotocina |
| **UEA** | Unidade de Experimentação Animal |
| **UENF** | Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro |
| **VE** | Ventrículo esquerdo |

## SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO..... 17**
**2. JUSTIFICATIVA..... 18**
**3. OBJETIVOS..... 19**
3.1. OBJETIVOS GERAIS..... 19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 19
**4. REVISÃO DE LITERATURA..... 20**
4.1. O DIABETES MELLITUS..... 20
4.1.1. Fisiologia..... 20
4.1.2. Tipos de Diabetes Mellitus..... 23
4.1.3. Epidemiologia..... 24
4.1.4. Modelo experimental do Diabetes Mellitus..... 26
4.2. COMPLICAÇÕES MICRO E MACROVASCULARES RELACIONADAS AO DIABETES..... 27
4.2.1. Nefropatia diabética..... 28
4.2.2. Retinopatia diabética..... 29
4.2.3. Neuropatia diabética..... 30
4.2.3. Cardiomiopatia diabética..... 31
4.3. METABOLISMO ENERGÉTICO E FUNÇÃO CARDÍACA NO DIABETES..... 32
4.4. ALTERAÇÕES NA BIOQUÍMICA SÉRICA NO DIABETES..... 34
4.5. ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO DIABETES..... 35
**5. MATERIAL E MÉTODOS..... 36**
5.1. LOCAL..... 36
5.2. AMOSTRAGEM..... 36
5.3. INDUÇÃO DO DIABETES..... 37
5.4. PROTOCOLO ANESTÉSICO..... 37
5.5. EXAMES LABORATORIAIS E GLICEMIA..... 38
5.6. ELETROCARDIOGRAMA..... 39
5.7. ECOCARDIOGRAMA..... 40
5.8. MORTE SEM DOR..... 40
5.9. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA..... 40
5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 41

**6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 42**
6.1. MÉTODO DE INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS..... 42
6.2. FUNÇÕES HEPÁTICA E RENAL..... 44
6.3. ALTERAÇÕES CARDÍACAS..... 55
**7. CONCLUSÃO..... 59**
**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 60**

# 1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é um distúrbio que consiste na resposta secretória defeituosa ou deficiente de insulina, bem como a resistência dos tecidos a esse hormônio, causando alteração de todo metabolismo de glicose no organismo, e culminando em hiperglicemia crônica (KAUR, 2014). Os distúrbios do metabolismo de glicose podem causar diversas complicações como nefropatia, retinopatia, neuropatia e inclusive cardiopatias (SIVITZ, 2001; GU, COWIE e HARRIS, 1999).

As doenças cardiovasculares que podem decorrer do diabetes mellitus são a hipertensão arterial sistêmica, doença coronariana e insuficiência cardíaca, sendo de extrema importância o diagnóstico precoce, visto que tais patologias representam 50-75% das causas de morte de pacientes diabéticos (GRUNDY, HOWARD, *et al.*, 2002; STAMLER, VACCARO, *et al.*, 1993). Estes distúrbios cardiovasculares ocorrem principalmente em mulheres com mais de 55 anos, pois apresentam mais predisposição natural a eventos cardiovasculares do que homens, representando um importante número de óbitos: 53% em comparação a 4% de óbitos por câncer de mama (BRASIL, 2006). Essa predisposição do diabético a cardiopatias é responsável por um pior prognóstico nesses pacientes, pois são frequentes a disfunção miocárdica sistólica e diastólica, alterações bioquímicas e funcionais no órgão, levando à insuficiência cardíaca (BELL, 2003).

Sendo assim, o diabetes mellitus tem tomado maior destaque por sua prevalência ascendente, aumento da obesidade na população, maior predisposição a essas doenças, bem como pior prognóstico, apresentando menor sobrevida e pior resposta ao tratamento cirúrgico (BLOOMGARDEN, 2003). Em especial, as mulheres têm sofrido mais por essa mortalidade e prevalência. Segundo HU, COWIE e HARRIS (1999), houve um declínio da mortalidade de homens norte-americanos diabéticos por doenças cardíacas de 13,1%, porém, em mulheres, houve aumento de 23%.

Dessa forma, objetivou-se avaliar as mudanças fisiológicas e estruturais ocasionadas pelo diabetes em coração de ratos, e realizar análise comparativa entre machos e fêmeas, visto que existem diferenças importantes de morbidade e mortalidade entre os sexos. Além disso, avaliar o possível acometimento de órgãos importantes, como fígado e rim.

## 2. JUSTIFICATIVA

O diabetes mellitus tem sido classificado como uma doença emergente e como o novo “mal do século” em humanos. Deste modo, existe uma grande necessidade de maiores pesquisas sobre a síndrome em questão e suas complicações crônicas, tanto macro quanto microvasculares, visto que representam grande casuística de mortes.

A literatura também carece de informações acerca das diferenças de alterações fisiológicas e bioquímicas entre diferentes sexos. Essa diferenciação é importante, uma vez que levantamentos epidemiológicos feitos há mais de 30 anos já mostravam que mulheres diabéticas possuem cinco vezes mais risco de desenvolver insuficiência cardíaca do que não diabéticas. Já, em homens diabéticos, esse risco é menor, de duas vezes mais do que não diabéticos (KANNEL, HJORTLAND e CASTELLI, 1974).

Também segundo a INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2015), a prevalência do diabetes mellitus em mulheres, em todas as faixas etárias do estudo, foi maior do que a de em homens nas Américas do Sul e Central. Com relação à mortalidade, nas regiões da África, Europa, Sudeste Asiático, Américas do Sul e Central, o diabetes representa uma proporção maior de mortes em mulheres do que em homens, podendo alcançar ¼ das mortes de mulheres de meia-idade. Já no cenário mundial, há uma estimativa de que, para 2040, as mulheres tenham aumento de casos de 157,04% e os homens, de 152,60%.

Deste modo, este estudo comparativo pode contribuir para uma melhor compreensão acerca dessas alterações e para o surgimento de novas abordagens terapêuticas, que levem em consideração o sexo do indivíduo e suas necessidades particulares.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações bioquímicas gerais, fisiológicas e estruturais no coração, ocasionadas pelo diabetes mellitus tipo 2 induzido, bem como a monitoração do acometimento de órgãos importantes como fígado e rim.

## 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Instituir um protocolo viável para indução do diabetes experimental em ratos Wistar;
- Monitorar os animais em seus parâmetros bioquímicos: funções renal, hepática e lipídios;
- Avaliar os efeitos do diabetes na contratilidade e na função cardíaca por meio do eletrocardiograma e do ecocardiograma;
- Verificar a estrutura do miocárdio;
- Comparar resultados entre machos e fêmeas.

# 4. REVISÃO DE LITERATURA

## 4.1. O DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus é uma síndrome metabólica e multifatorial, que se caracteriza por um metabolismo desordenado de glicose e hiperglicemia. Essas alterações podem surgir de duas origens distintas: produção insuficiente de insulina (tipo 1), congênita ou adquirida, e ineficácia da insulina (tipo 2) (AIRES, 2008). Essa alteração faz com que a glicose continue a circular no sangue em altos níveis (hiperglicemia), gerando uma série de complicações ao longo do tempo (BIDASEE, ZHANG, *et al.*, 2004; FANG, 2004; NISHIO, TESHIMA, *et al.*, 2012), como doenças cardiovasculares (DHALLA, PIERCE, *et al.*, 1982; DUNCAN, 2011), arterosclerose, acidente vascular cerebral, doença renal, dificuldade de raciocínio, infecções, feridas, distúrbios músculo-esqueléticos, complicações na gestação, cetoacidose diabética, entre outras (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

### 4.1.1. Fisiologia

O pâncreas é um órgão de extrema importância para o metabolismo. Além de suas funções exócrinas (digestivas), como a produção de enzimas realizada nos ácinos, ele é responsável pela produção de dois hormônios importantes: insulina e glucagon, produzidos nas ilhotas de *Langerhans*. Esses hormônios são essenciais para a perfeita homeostase do metabolismo de glicose, lipídios e proteínas no organismo (GUYTON e HALL, 2011).

O pâncreas possui de 1 a 2 milhões de ilhotas de *Langerhans,* as quais se organizam em torno de pequenos capilares, onde as células secretam os hormônios para corrente sanguínea. As ilhotas são compostas de três tipos de células: *alfa*, *beta* e *delta*. Essas três células se diferenciam quanto à sua função e coloração (GUYTON e HALL, 2011).

As células *alfa* constituem 25% do total e são responsáveis pela síntese e liberação de glucagon. Já as células *beta* são as responsáveis pela produção e secreção de insulina, constituindo 60% do total de células. As células *delta*, 10% do total, são responsáveis pela produção de somatostatina, um hormônio que inibe o

glucagon e a insulina (Figura 1). Em conjunto, esses hormônios são extremamente importantes para o controle do metabolismo da glicose (AIRES, 2008).

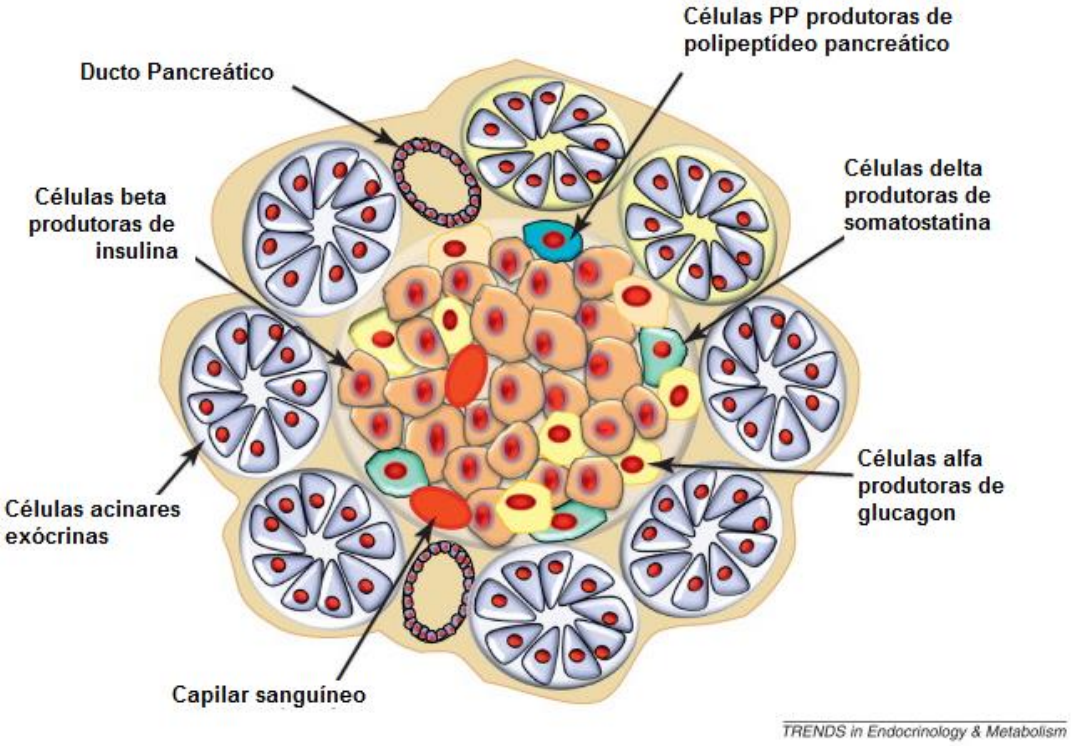


**Figura 1:** Esquema representativo das ilhotas de *Langerhans* com seus tipos celulares e hormônios produzidos (Figura adaptada) (EFRAT e RUSS, 2012).

Nas células *beta*, o principal secretagogo da insulina é a glicose. A glicose sanguínea é transportada para o interior das células pelo transportador GLUT2. Este transportador possui um elevado Km (entre 15 e 20mmol/L, portanto, não saturável em concentrações fisiológicas de glicose) e um Vmax muito elevado, permitindo que o transporte de glicose aumente rapidamente quando a glicemia se eleva. Após a internalização da glicose, ela é fosforilada à glicose-6-fosfato (G6P) por duas enzimas hexoquinases, uma de alta afinidade e outra de baixa afinidade (glicoquinase). A enzima de alta afinidade é facilmente inibida pela G6P, fazendo com que a glicoquinase exerça um papel importante na fosforilação da glicose nas células *beta* (MATSCHINSKY, 1996; BOSCHERO, 1996). O destino preferencial da G6P na célula *beta* é a glicólise, porém também é destinada à via das pentoses-fosfato (cerca de 10%) e a produção de glicogênio também é baixa (PERALES, SENER e MALAISSE, 1991). O piruvato formado pela glicólise no citoplasma é destinado às mitocôndrias, onde é convertido em acetil-coA para entrar no ciclo de

Krebs. O metabolismo de glicose gera adenosinatrifosfato (ATP), e a fração ATP/ADP (adenosinadifosfato) aumenta no citoplasma (MATSCHINSKY, 1996), que causa uma despolarização da membrana celular, abrindo os canais de cálcio sensíveis à voltagem. O aumento do cálcio intracelular causa despolarização suplementar da membrana desencadeando a exocitose (PRENTKI e CORKEY, 1996).

Essa estimulação das células *beta* pela glicose leva à ativação de isoformas da fosfolipase C, promovendo hidrólise de fosfolipídios de membrana e gerando inositol 1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 ativa os canais de cálcio da membrana do retículo endoplasmático, promovendo a saída de cálcio da organela para o citosol. Já o DAG ativa os canais de cálcio sensíveis à voltagem da membrana plasmática, permitindo o influxo de cálcio do meio extra para intracelular (SCHREY e MONTAGUE, 1983; BEST, DUNLOP e MALAISSE, 1984). Além disso, ele ativa a proteína quinase C (PKC) (PERSAUD, JONES e HOWELL, 1991), gerando ativação de proteínas dos grânulos secretórios de insulina que, junto com o aumento de cálcio, promovem a ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos com o intuito de translocar os grânulos para próximo da membrana plasmática a fim de ocorrer a exocitose (HUGHES e ASHCROFT, 1992) (Figura 2).

De forma resumida, o aumento da glicemia causa elevação da secreção de insulina, que age nos tecidos para que o transporte de glicose seja aumentado, diminuindo a glicemia e também o estímulo secretório do hormônio. Com isso, se mantêm valores glicêmicos normais (AIRES, 2008).

Quaisquer modificações nessas respostas secretórias causam também alterações na homeostase interna, relacionadas principalmente com o diabetes mellitus, doença de alta prevalência, obesidade e síndrome metabólica (AIRES, 2008).

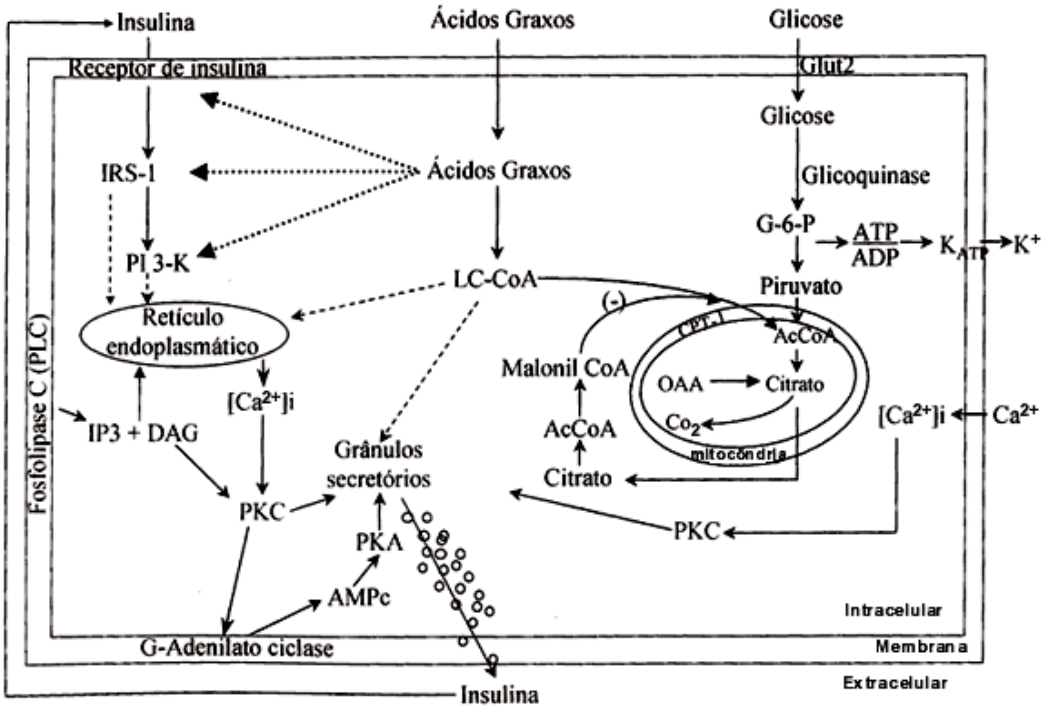


**Figura 2:** Principais eventos no processo de regulação da secreção de insulina nas células beta-pancreáticas (Linhas tracejadas = eventos indefinidos; linhas sólidas = eventos estabelecidos) (HABER, CURI, *et al.*, 2001).

### 4.1.2. Tipos de Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma das patologias mais comuns entre as doenças crônicas da infância e da adolescência, acometendo 2/3 de todos os casos de DM em criança. Atualmente, são estimados cinco milhões de diabéticos tipo 1 no País, sendo cerca de 300 mil com menos de 15 anos. O número de pessoas desenvolvendo este tipo está aumentando, por razões que não estão claras (NASCIMENTO, AMARAL, *et al.*, 2011). Essa patologia é causada por uma reação autoimune, em que o sistema imunológico destrói as células beta-pancreáticas produtoras de insulina, sendo essa reação não totalmente compreendida. Como resultado, o corpo não produz mais a insulina da qual necessita, chegando à deficiência absoluta e à propensão à cetoacidose. Os principais sintomas são poliúria, polifagia, polidipsia e perda de peso. O diagnóstico ocorre quando o paciente possui hiperglicemia associada aos demais sintomas. Porém, pode ocorrer de o tipo de diabetes não ser claro e serem necessários exames adicionais. Pacientes com esse tipo de diabetes precisam de insulinoterapia diariamente para

controlar os níveis de glicose no sangue. Sem este tipo de terapia, a doença evolui até o paciente ir a óbito (LARGAY, 2012; BAZOTTE, 2012).

Já o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é responsável por cerca de 90% dos casos de diabetes, sendo a forma mais comum que ocorre em adultos; porém, atualmente, tem sido também diagnosticado em crianças e adolescentes. O DM2 está associado a complicações macro e microvasculares, elevando os percentuais de morbidade e mortalidade. No DM2, o corpo é capaz de produzir insulina, mas os tecidos se tornam resistentes à sua ação. Os principais sintomas dessa alteração são a polidipsia, poliúria e perda de peso. As causas exatas para o desenvolvimento do DM2 também não são conhecidas, porém existem fatores de risco importantes como excesso de peso, inatividade física, má nutrição, história familiar, idade avançada, etnia e gestação (LYRA, OLIVEIRA, *et al.*, 2006). Diferente dos pacientes DM1, a maioria das pessoas com DM2 não exigem tratamento diário com insulina para sobreviver. O tratamento consiste em atividade física, manutenção do peso normal, e hipoglicemiantes orais para controlar a glicemia (SOUZA, GROSSII, *et al.*, 2012).

#### 4.1.3. Epidemiologia

Estatísticas mostram que o número de pacientes DM2 tem aumentado rapidamente em todo o mundo, quadro que mostra um envelhecimento populacional, aumento da urbanização, redução da alimentação saudável e aumento do sedentarismo. Muitas pessoas com DM2 permanecem sem diagnóstico, pois, geralmente, os sintomas são menos expressivos que no DM1. Porém, em longo prazo, ocorrem danos pela hiperglicemia crônica. Como resultado, muitas pessoas são diagnosticadas com complicações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A prevalência do DM tem aumentado ao longo das últimas duas décadas. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Federação Internacional do Diabetes (IDF), o DM tem se tornado uma epidemia, que não é controlada como as demais doenças, como o câncer e as doenças cardiovasculares, tornando-se, assim, a sexta maior causa de morte no mundo.

Nas Américas do Sul e Central, estima-se que 29,6 milhões, ou 9,4% da população adulta, tinham diabetes em 2015 − nessas regiões, as mulheres são mais

acometidas que os homens. Destes, 11,5 milhões (39%) não são diagnosticados. Mais de 82% das pessoas com diabetes vivem em ambientes urbanos, e 81%, na América Latina, vivem em países com renda média. Porto Rico tem a maior prevalência de diabetes em adultos (12,1%).

O Brasil possui 14,3 milhões de diabéticos, sendo o país com maior número de pessoas com essa doença. Em 2040, o número deve aumentar em mais de 60%, ou seja, para 48,8 milhões. Estima-se que 7.300 crianças desenvolveram DM1 em 2015. Na região como um todo, 45.100 crianças com idade inferior a 15 anos têm DM1. Quase 30.900 destas crianças vivem no Brasil, o que o torna o terceiro país com maior número de crianças com DM1 no mundo, depois dos EUA e da Índia. Em 2015, 247.500 adultos morreram com diabetes (122.100 homens e 125.400 mulheres). Mais de 42,7% dessas mortes ocorreram em pessoas com menos de 60 anos, sendo mais da metade (133.700) no Brasil. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015) (Figura 3).

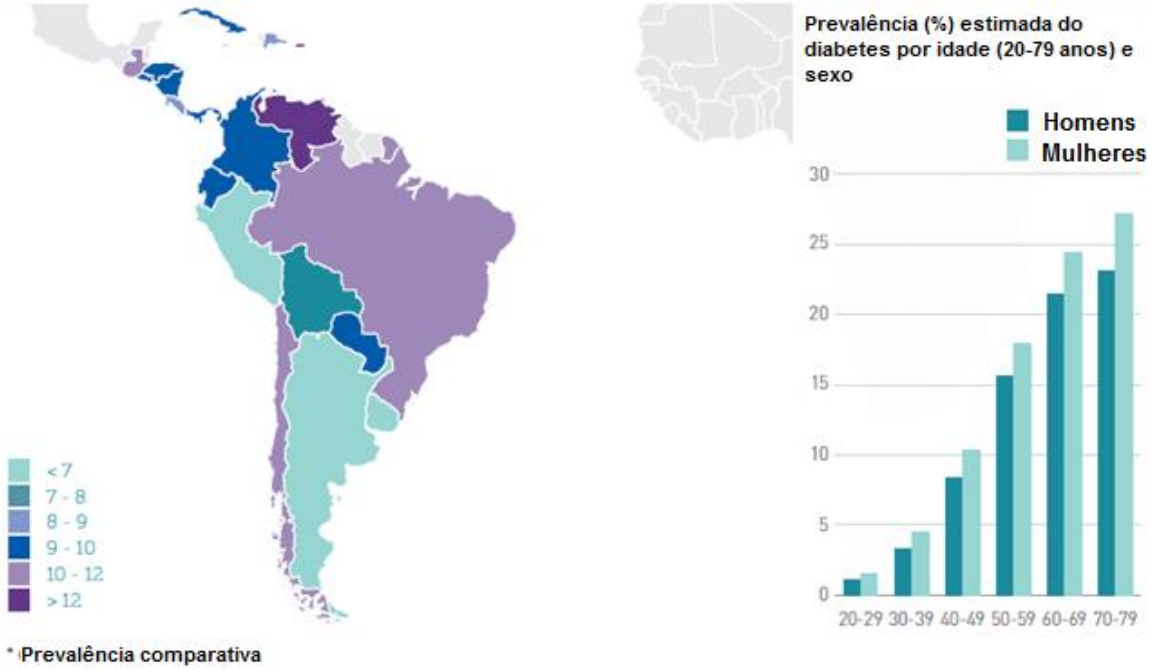


**Figura 3:** Prevalência comparativa do diabetes por idade (20-79 anos) e sexo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015) (Figura adaptada).

Além da prevalência, outra problemática são os custos acerca da doença. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2009), existe um gasto para os cofres públicos de cerca de 2,5-15% do total empregado na saúde. Esta verba é utilizada

anualmente para disponibilização de hipoglicemiantes orais, insulinas, políticas assistencialistas e acompanhamento médico contínuo por toda vida. Além disso, é necessário que haja programas educacionais de prevenção, incorporação de mudanças no estilo de vida da população, a fim de reduzir o número de pessoas afetadas por tal patologia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

#### 4.1.4. Modelo experimental do Diabetes Mellitus

Muitos modelos experimentais são usados em pesquisa sobre diabetes mellitus (MENDEZ e RAMOS, 1994), porém os métodos mais utilizados são as induções químicas pela administração dos tóxicos para células *beta* pancreáticas: aloxana e estreptozotocina (STZ).

A estreptozotocina foi isolada e caracterizada como um antimicrobiano de largo espectro a partir de colônias de *Streptomyces achromogenes*. Em estudos pré-clínicos, foi mostrado que sua administração intravenosa em altas doses produzia diabetes mellitus em ratos e cães. Autores relatam a utilização de altas doses da droga, chegando até 220 $mg.kg^{-1}$ (DEEDS, ANDERSON, *et al.*, 2011) em injeção única para indução de DM1. Foi demonstrado que também existe a possibilidade de administração seriada em doses pequenas por cinco dias consecutivos em camundongos (WEIDE e LACY, 1991).

A administração pode ser feita por via intravenosa (IV) ou intraperitoneal (IP). Em ratos, a via mais usada é a intravenosa com acesso na veia da cauda, porém, este acesso pode ser feito por qualquer outra veia, inclusive sublingual (DELFINO, FIGUEIREDO, *et al.*, 2002). A indução específica de DM2 em ratos se dá por meio da injeção única de baixa dose (30 a 50 $mg.kg^{-1}$) da droga em animais engordados previamente (REAVEN e HO, 1991; REED, MESZAROS, *et al.*, 2000; QIAN, ZHU, *et al.*, 2015).

Em uma série de estudos, foi confirmada a especificidade da STZ para gerar lesão nas células *beta*, sendo observadas evidências histológicas de uma a sete horas; após 24 horas, o conteúdo de insulina é reduzido em 95% ou mais (JUNOD, LAMBERT, *et al.*, 1969). A toxicidade da droga se dá pela similaridade da molécula de STZ com a glicose, o que permite sua internalização via transportadores GLUT2

(SCHNEDL, FERBER, *et al.*, 1994). Esses transportadores também estão presentes em hepatócitos, células epiteliais intestinais e renais e astrócitos de alguns núcleos cerebrais, conferindo capacidade glicosensora às células em que se encontram expressos (MACHADO, 1998).

A ação diabetogênica da STZ está relacionada à citotoxicidade e glicosilação de proteínas das ilhotas pancreáticas devido à inibição seletiva da enzima O-GLcNAcase, que tem como função remover a N-acetilglucosamina da proteína, causando apoptose das células *beta* (KONRAD, MIKOLAENKO, *et al.*, 2001). Outro mecanismo que foi proposto para o efeito diabetogênico da STZ é que a droga promove lesão nas células *beta* por reduzir os níveis de NAD (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) disponível (AKBARZADEH, NOROUZIAN, *et al.*, 2007). A toxicidade da STZ pode ser prevenida pelo tratamento com insulina, causando a diminuição da expressão de GLUT2 das células *beta* pancreáticas (THULESEN, ORSKOV, *et al.*, 1997). A terapia insulínica também reduz as alterações estruturais e bioquímicas no coração diabético, contribuindo para a redução de complicações cardíacas desses pacientes (MOREIRA, ROLO, *et al.*, 2006).

É inegável, portanto, que a indução por estreptozotocina promove diabetes severa e de longa duração, e que, para alcançar a dose diabetogênica, a injeção pela veia da cauda é a mais eficiente (DELFINO, FIGUEIREDO, *et al.*, 2002).

## 4.2. COMPLICAÇÕES MICRO E MACROVASCULARES RELACIONADAS AO DIABETES MELLITUS

As complicações crônicas relacionadas ao diabetes mellitus se devem principalmente pelo controle inadequado da doença e por fatores genéticos. Dentre as alterações microvasculares, encontram-se a nefropatia, a retinopatia e a neuropatia; já, entre as alterações macrovasculares, estão o acidente vascular cerebral (AVC), o infarto agudo do miocárdio, a doença vascular periférica e a cardiomiopatia diabética (TSCHIEDEL, 2014) (Figura 4).

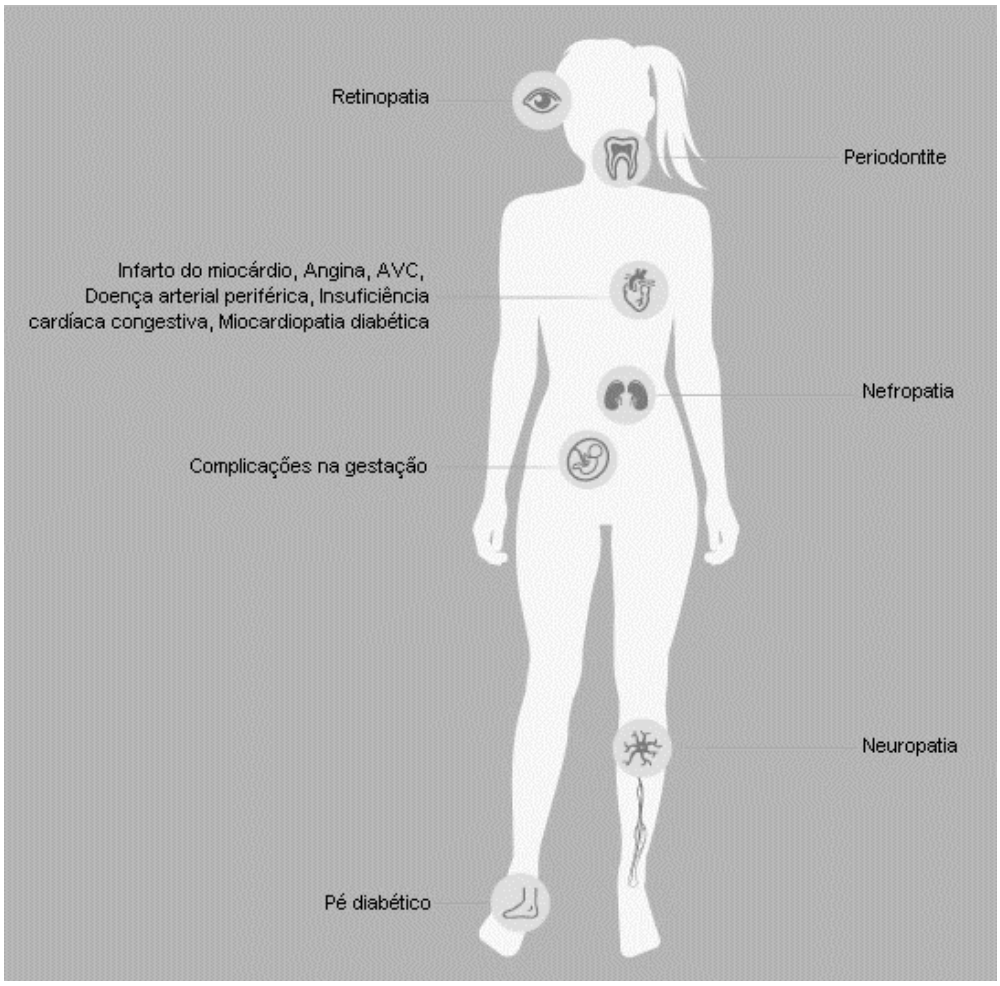


**Figura 4:** Principais complicações relacionadas ao Diabetes mellitus (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013) (Figura adaptada).

### 4.2.1. Nefropatia diabética

A nefropatia diabética é definida como uma complicação crônica que afeta de 20-30% de pacientes com DM1 ou DM2 (MOLITCH, DEFRONZO, *et al.*, 2004) e é responsável pela metade de novos casos de insuficiência renal nos doentes em diálise (BRUNO e GROSS, 2000). Está também associada à mortalidade alta, principalmente cardiovascular (NELSON, PETTITT, *et al.*, 1988). A doença tem início com a ocorrência de microalbuminúria, porém, em estados avançados, essa alteração aumenta, caracterizando macroalbuminúria ou proteinúria, até a insuficiência renal propriamente dita, sendo normalmente associada a outras alterações, como a retinopatia, doenças cardíacas e hipertensão arterial sistêmica. É necessária hiperglicemia crônica para o desenvolvimento deste tipo de nefropatia, mesmo que o indivíduo tenha predisposição genética (TSCHIEDEL, 2014).

Existia uma definição clássica de nefropatia diabética, diagnosticada como proteinúria >0,5g/24h. Porém, a partir dos anos 80, a classificação foi feita baseada na excreção urinária de albumina, que, em pequenas quantidades, já pode ser classificada como grau 1 da doença, ou fase de nefropatia insipiente (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010). A etapa final dessa doença é caracterizada como proteinúria grave, com ou sem síndrome nefrótica e insuficiência renal crônica, levando a uma fase renal terminal (ADLER, STEVENS, *et al.*, 2003). Entretanto, há tratamento que pode e deve ser feito precocemente no momento do diagnóstico da microalbuminúria, utilizando inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA), a fim de impedir o declínio da função renal e a progressão da doença. O controle da hipertensão arterial sistêmica também é indicado (IBSEN, OLSEN, *et al.*, 2008).

#### 4.2.2. Retinopatia diabética

A retinopatia diabética é uma das principais causas de cegueira entre 20 e 74 anos. É uma patologia mais comum em pacientes DM1 do que em DM2, e sua ocorrência está diretamente ligada à duração do diabetes. Geralmente, após cinco anos do diagnóstico, podem começar os primeiros sinais clínicos, se agravando com o passar dos anos (FRANK, 2004). O controle glicêmico é a principal forma de prevenção da doença, podendo postergá-la na maioria dos casos, porém não é uma garantia para 100% dos pacientes (KEENAN, COSTACOU, *et al.*, 2007). As alterações mais frequentemente encontradas são microaneurismas e micro-hemorragias, e a progressão da doença causa diminuição da perfusão capilar, causando hemorragias intra-retinianas, alteração dos calibres dos vasos, neovascularização (Figura 5) (fase proliferativa) e isquemia. Outra alteração importante é a formação de edema macular, característico dos pacientes diabéticos tipo 2, causando diminuição da acuidade visual (WILKINSON, FERRIS, *et al.*, 2003).

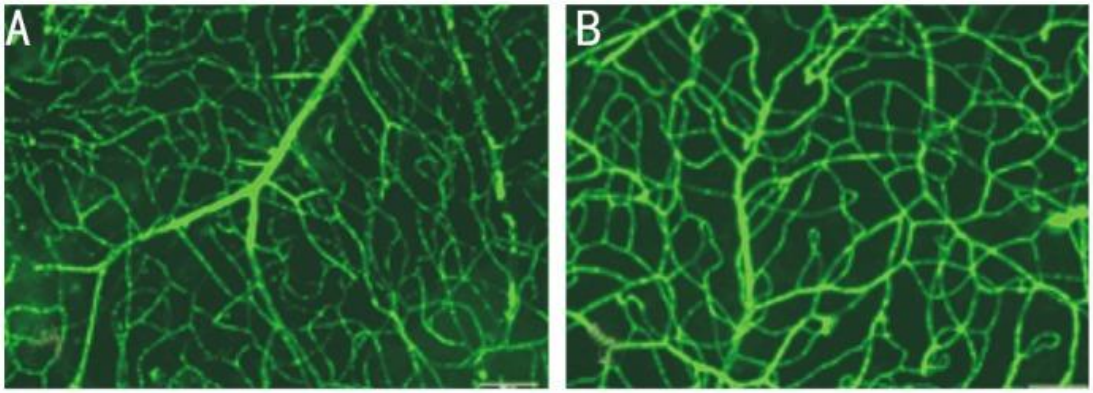


**Figura 5:** Neovascularização e espessamento de vasos da retina. Fotomicrografia de imunofluorescência da retina de ratos controle e (A) diabéticos após 2 meses de indução por estreptozotocina(GONG, LU, *et al.*, 2013).

### 4.2.3. Neuropatia diabética

Com relação à neuropatia diabética, trata-se de uma alteração tardia, rara na infância, frequente, podendo ser evidenciada no diagnóstico de pacientes diabéticos tipo 2 (BOULTON, VINIK, *et al.*, 2005) e consiste na exclusão de outras causas de disfunções de nervos periféricos em diabéticos (BOULTON, 1998). Das complicações crônicas microvasculares, as alterações neurológicas são as mais frequentes, afetando de 40-50% dos diabéticos tipo 2. A doença abrange alterações estruturais e funcionais das fibras sensitivas, motoras e autonômicas, que podem ser reversíveis ou permanentes, variando da forma assintomática até síndromes dolorosas graves e agudas.

A forma mais comum é a polineuropatia sensitivo-motora difusa simétrica periférica, gerando sintomas como parestesia, dor em membros e pés, hiperestesia (dor ao toque de lençóis e cobertores), diminuição ou perda da sensibilidade tátil, térmica ou dolorosa, perda de reflexos tendinosos profundos, fraqueza, perda de motricidade distal, úlceras nos pés. Outros comprometimentos também podem ocorrer na neuropatia diabética, como neuropatia autonômica (perda de função pupilar, submotora, genitourinária, gastrintestinal, erétil, cardiovascular) e mononeuropatia focal (SHAKHER e STEVENS, 2011).

A patogenia desta doença ainda não está completamente elucidada, porém acredita-se que há uma redução da microvascularização neural. Essa alteração é causada pela isquemia dos vasos endoneurais e espineurais, levando ao

espessamento dos mesmos, diminuindo o fluxo e resistência vascular. Com perfusão microvascular diminuída, há fluxo insuficiente e lesão neural (SHAKHER e STEVENS, 2011).

### 4.2.3. Cardiomiopatia diabética

As complicações macrovasculares do diabetes mellitus acometem pacientes com DM1 e DM2, e a maior causa de morte nesses casos é a doença cardiovascular. A hiperglicemia é um dos fatores que aumenta o risco dessas alterações, porém a dislipidemia e os hábitos não saudáveis também estão incluídos (ZHANG, HU, *et al.*, 2012). Essas alterações também são as principais causas de mortes prematuras, devido ao aumento do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, as quais contribuem para 50-80% das mortes dos diabéticos (SCHAAN, HARZHEIM e GUS, 2004).

Nos últimos anos, também têm surgido evidências de doenças miocárdicas em pacientes diabéticos, não relacionadas à doença arterial ou à hipertensão arterial sistêmica, sendo classificadas como cardiomiopatia diabética (CODINACH-HUIX e FREIXA-PAMIAS, 2002). A fibrose perivascular e intersticial e a hipertrofia miocárdica também foram achados frequentes em diabéticos (Figura 6) (GUTIERREZ e HIGUCHI, 1998; CHAVES e JORGE, 1998).

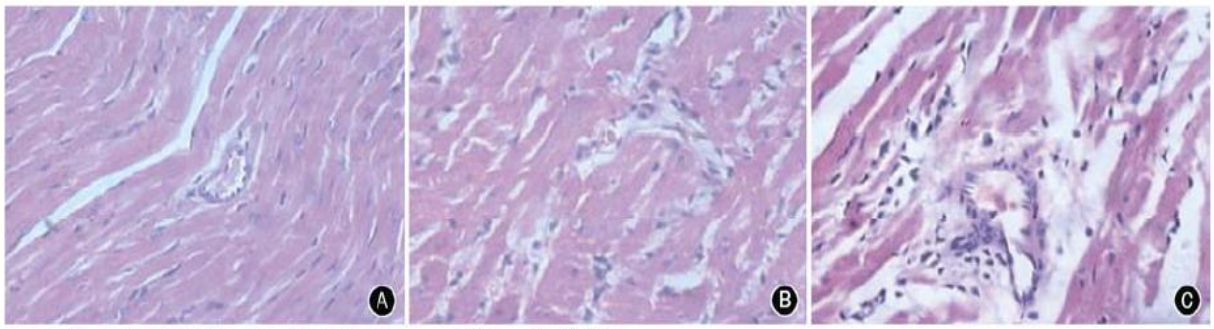


**Figura 6:** Efeito da diabetes na estrutura cardíaca e fibrose em ratos. (A) Animais controle; (B) Animais diabéticos; (C) Animais após 12 semanas de indução do diabetes experimental (CHUN-JUN, QIU-MEI, *et al.*, 2009).

Em 1972, Rubler e colaboradores introduziram o termo “cardiomiopatia diabética” após o estudo de quatro pacientes *post-mortem*, que tiveram insuficiência cardíaca congestiva, com ausência ou evidência de doença arterial coronariana, valvulopatia, doença congênita, hipertensão arterial ou alcoolismo (RUBLER, DLUGASH, *et al.*, 1972).

Há 30 anos, já era constatado que a insuficiência cardíaca ocorria duas vezes mais em homens diabéticos do que em não diabéticos. Já, para as mulheres, os valores são ainda maiores, cinco vezes maior o risco de ocorrer a insuficiência cardíaca em pacientes com a síndrome (KANNEL, HJORTLAND e CASTELLI, 1974).

Mesmo que pacientes não manifestem insuficiência cardíaca, estudos mostram que de 20 a 40% dessas pessoas possuem pequeno comprometimento miocárdico, apresentando aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (VE) e redução do débito cardíaco. Para pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio (IAM), a disfunção diastólica é ainda mais severa (MUKAMAL, NESTO, *et al.*, 2001). Também já foram encontradas evidências de disfunção sistólica do VE (GONZALEZ-VILCHEZ, AYUELA, *et al.*, 2005), porém os estudos com estes parâmetros são mais escassos.

A cardiomiopatia diabética (CMPD) implica uma série de anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes, e também suas consequências celulares (POORNIMA, PARIKH e SHANNON, 2006). Os distúrbios metabólicos principais são: hiperlipidemia, com o aumento de triglicerídeos e ácidos graxos livres; hiperinsulinemia, nas fases mais precoces; e, após falência das células β-pancreáticas, hiperglicemia. Essas alterações induzem uma modificação de ativação de fatores de transcrição celulares dos cardiomiócitos, que modificam a expressão gênica, a utilização de substratos, o crescimento miocárdico, a disfunção endotelial e o aumento da rigidez (HAYAT, PATEL, *et al.*, 2004).

### 4.3. METABOLISMO ENERGÉTICO E FUNÇÃO CARDÍADA NO DIABETES MELLITUS

O coração saudável é capaz de metabolizar uma variedade de substratos, incluindo ácidos graxos, glicose, corpos cetônicos, lactato e aminoácidos, para satisfazer a demanda contínua de adenosinatrifosfato (ATP) (TAEGTMEYER, GOLFMAN, *et al.*, 2004). Porém, podem ocorrer mudanças no metabolismo energético devido a alterações na disponibilidade dos substratos, podendo levar a anormalidades metabólicas como a cardiomiopatia diabética (SAUNDERS, MATHEWKUTTY, *et al.*, 2008).

O ATP constitui a fonte de energia imediata da célula cardíaca, como a maioria das células do organismo, que utiliza sua hidrólise para a realização de suas funções (SCHLANT, 1997; DAVIES, 1970). Sob condições fisiológicas normais, 90% do ATP é produzido por meio da fosforilação oxidativa na mitocôndria (NEELY, ROVETTO e ORAM, 1972), porém o coração pode mudar a sua preferência pelos substratos metabólicos, fazendo com que os cardiomiócitos maximizem a produção de ATP, que é regulada por concentração de substratos, carga de trabalho, hormônios e disponibilidade de oxigênio (TAEGTMEYER, GOLFMAN, *et al.*, 2004).

Devido a essa flexibilidade metabólica, na presença do diabetes mellitus, o coração rapidamente se adapta a usar exclusivamente ácidos graxos para a produção do ATP. A diminuição da utilização de glicose pelas células causa hiperglicemia, aumento da produção hepática de glicose (gliconeogênese) e aumento da lipólise no tecido adiposo, aumentando a síntese de lipoproteínas e circulação de ácidos graxos. Todos esses substratos gerados são estocados nos cardiomiócitos em forma de triglicerídeos e ceramida, gerando lipotoxicidade e redução da função cardíaca. Além disso, o miocárdio aumenta seu consumo de oxigênio devido à maior necessidade deste substrato para o metabolismo de lipídios (BUCHANAN, MAZUMDER, *et al.*, 2005; AN e RODRIGUES, 2006), causando desacoplamento mitocondrial, menor qualidade de força contrátil e redução de potencial de membrana mitocondrial (BAYEVA, SAWICKI e ARDEHALI, 2013).

O DM pode gerar disfunções mitocondriais, que geram efeitos deletérios nos cardiomiócitos. Estudos mostram que animais knockout para genes que controlam as modificações no conteúdo de ATP mitocondrial e fator de transcrição mitocondrial apresentam déficit de energia em situação de cardiomiopatia diabética (AN e RODRIGUES, 2006). O DM também compromete a utilização de lactato como fonte de energia, pois já foi verificado que esse substrato sofre redução em decorrência da redução da enzima lactato desidrogenase (LDH) ou de transportadores de lactato, hipoteticamente (AN e RODRIGUES, 2006). A enzima piruvato desidrogenase (PDH) também sofre depressão no DM-2, reduzindo a oxidação do piruvato, também diminuindo a oferta de substrato para energia (CHATHAM e SEYMOUR, 2002).

Logo, as alterações no metabolismo energético de cardiomiócitos no DM geram demais anormalidades na estrutura e função cardíaca.

## 4.4. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS SÉRICAS NO DIABETES MELLITUS

Devido ao grande número de complicações que o diabetes mellitus pode desencadear nos pacientes acometidos por essa síndrome, é de extrema importância o acompanhamento periódico mediante exames de rotina. Um exemplo disso é que bem antes dos sinais clínicos aparecerem, a resistência à insulina já pode ter se instalado muito tempo antes, e o paciente já pode estar convivendo com a síndrome há 10 anos (TAYLOR, 2004). Muitos biomarcadores podem ser usados para o acompanhamento da progressão da doença, entre eles: proteína C reativa, interleucina-6, fator de necrose tumoral, selectina-E (MEIGS, HU, *et al.*, 2004). Porém, esses biomarcadores não são frequentemente avaliados na prática clínica, consequentemente, são utilizados outros de custo menor, mais simples e eficazes para prevenir a progressão dos pré-diabéticos.

É importante realizar o rastreamento da doença hepática não alcoólica associada ao diabetes tipo 2. Para isso, rotineiramente, são utilizados marcadores moleculares do soro como as enzimas alaninoaminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamiltranspeptidase (GGT). Essa doença causa aumento de ALT, causado pelo acúmulo de lipídios no fígado. Além disso, a fosfatase alcalina (FA) também pode estar aumentada (IOANNOU, WEISS, *et al.*, 2005).

O diabetes tipo 2 também é comumente associado a valores anormais de lipídios no soro. A dislipidemia é uma alteração do metabolismo de lipídios, causada pela resistência à insulina e obesidade. É caracterizada pela hiperglicemia, e hipertrigliceridemia, que ocorre devido ao excesso de ácidos graxos circulantes derivados do tecido adiposo estocado no fígado. A interação entre o desordenado metabolismo lipídico e a hiperglicemia desempenha um papel importante no início, na progressão do diabetes e no desenvolvimento de suas complicações (GOLDBERG, 2001).

A avaliação da função renal também é de suma importância e é um grande desafio para a medicina laboratorial. JAFFE, em 1886, realizou a primeira dosagem de creatinina, e, desde então, pesquisadores vêm buscando descobrir novos biomarcadores que auxiliem no diagnóstico da função renal (SODRÉ, COSTA e LIMA, 2007). Na prática clínica, os marcadores mais utilizados são a ureia e a

creatinina séricas, considerados os parâmetros mais populares para esse tipo de avaliação. A creatinina é um metabólito da creatina excretado na urina, sendo acumulada no sangue devido a alguma lesão renal, impedindo sua eliminação. A ureia é uma substância nitrogenada do organismo, sintetizada no fígado. Os níveis plasmáticos de ureia são mantidos por equilíbrio de função e perfusão renal, além de conteúdo proteico da dieta, catabolismo proteico e hidratação (HENRY, 2008).

### 4.5. ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO DIABETES MELLITUS

O diabetes provoca alterações ao longo dos anos, sendo o rim um dos órgãos mais acometidos, responsável por 40% de prevalência de nefropatia diabética. Alterações predominantes neste quadro em casos crônicos são: alterações glomerulares, proteinúria nefrótica, dislipidemia, edema, hipertensão arterial e queda de filtração glomerular (RITZ e STEFANSKI, 1996).

No fígado, pode ser encontrada doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que representa a doença hepática instalada na ausência de consumo de bebidas alcoólicas. É a hepatopatia, mais comum em países com grande prevalência de obesos e diabéticos (YOUSSEF e MCCULLOUGH, 2002). Clinicamente, representa um amplo espectro de anormalidades histológicas e de achados clínicos, que vão de esteatose hepática a cirrose, e também elevação das aminotransferases (DANIEL, BEN-MENACHEM, *et al.*, 1999). Como método de diagnóstico, a biopsia hepática é considerada o padrão-ouro. (ANGELICO, DEL BEN, *et al.*, 2005).

A DHGNA é histologicamente caracterizada pela deposição de gordura nos hepatócitos do parênquima hepático, podendo avançar de uma esteatose simples macrovesicular para uma cirrose (BRUNT, 2004). É uma alteração associada com diabetes mellitus e dislipidemia (BATMAN e SCHEUER, 1985). Sua patogênese ainda é pouco estabelecida, porém prevalece a hipótese de que vários passos são importantes para causar o dano hepático progressivo (DAY e JAMES, 1998). Propostas recentes sugerem uma combinação de fatores: aumento de ácidos graxos liberados pelo fígado, excesso de carboidratos na dieta e dislipidemia (DAY, 2002).

# 5. MATERIAL E MÉTODOS

## 5.1. LOCAL

Todas as etapas do presente trabalho foram realizadas nas dependências da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) nos setores descritos a seguir:

- Manipulação animal: Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Experimental da Unidade de Experimentação Animal (UEA);
- Análises séricas: Setor de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UENF e do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA);
- Análises histopatológicas: Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA).

## 5.2. AMOSTRAGEM

Foram utilizados 40 machos e 40 fêmeas *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, pesando aproximadamente 350g, provenientes do biotério da Unidade de Experimentação Animal (UEA). Os animais foram divididos em dois blocos casualizados experimentais para indução do diabetes mellitus, sendo eles: 60mg.kg$^{-1}$ e 40 mg.kg$^{-1}$. Os mesmos animais foram utilizados como controle, sendo realizados todos os parâmetros e coletas de dados antes da indução do DM.

Os animais receberam dieta hipercalórica e água *ad libitum*. Foram mantidos em condições de vida adequadas para a espécie, com temperatura ambiente (20±2ºC), 45-55% de umidade e 12h/ciclo de luz. Todos os procedimentos foram feitos dentro dos princípios éticos de experimentação animal, protocolados e autorizados pela Comissão de Ética de Uso Animal Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CEUA/UENF).

## 5.3. INDUÇÃO DO DIABETES

O diabetes foi induzido pela administração única de estreptozotocina[1], diluída em tampão citrato 0,1M pH 4.5, frio, pela via intravenosa, utilizando a veia caudal, nas doses de 60 e 40 $mg.kg^{-1}$ (UMRANI, BODIWALA e GOYAL, 2003). A injeção foi feita após os animais terem alcançado peso mínimo de 350g de peso e coleta de todos os dados para grupo controle.

## 5.4. PROTOCOLO ANESTÉSICO

A indução anestésica para os procedimentos seguintes foi feita com isoflurano[2] em $O_2$ 100% fornecido por meio de uma garrafa pet adaptada. Após a indução, o animal foi mantido por meio de máscara facial adaptada, confeccionada com seringa plástica de 20 mL preenchida com cal sodada, isolada do animal por meio de compressas de gaze, diminuindo a reinalação de gás carbônico. A seringa ficou acoplada a uma torneira de 3 vias ligada diretamente ao circuito do aparelho de anestesia inalatória portátil[3] (Figura 7).

**Figura 7:** Indução anestésica por meio de garrafa pet adaptada, conectada ao circuito anestésico (arquivo pessoal).

---

[1]Streptozotocin S0130-1G – Sigma-Aldrich®
[2]Isoforine® - Cristália, São Paulo-SP, frasco com 100mL
[3]VetCase – Brasmed®

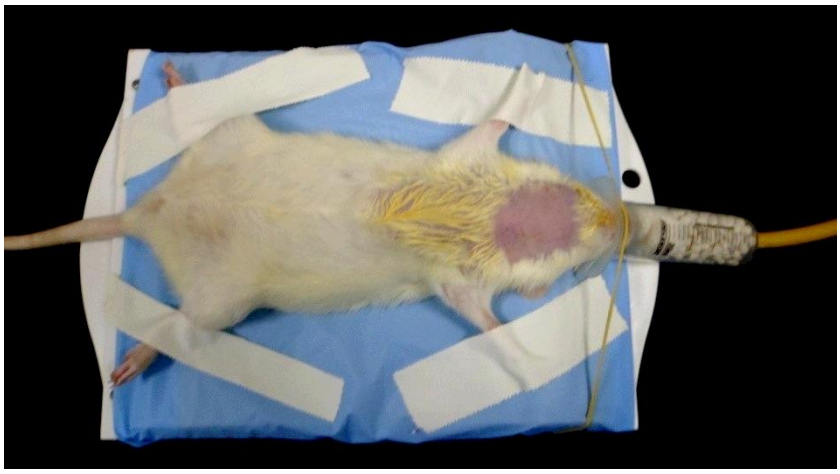

**Figura 8:** Animal com máscara facial adaptada com seringa de 20 mL (arquivo pessoal).

### 5.5. EXAMES LABORATORIAIS E GLICEMIA

Após a indução do diabetes, todos os animais foram avaliados clinicamente, observando seus aspectos físicos, e por exames laboratoriais, sendo eles: triglicerídeos, colesterol total, ureia, creatinina, ALT, AST e FA. Para estas análises, foi utilizado 1 mL de sangue coletado por via intracardíaca (lado direito) sob indução anestésica. Após formação de coágulo, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm, durante 5 minutos, e separada em tubos individuais. A quantificação dos parâmetros foi feita mediante analisador automático de testes bioquímicos[4].

Os parâmetros glicêmicos foram mensurados utilizando uma gota de sangue retirado da veia da cauda dos animais em jejum de 4h. Foram utilizadas tiras reagentes[5] e glicosímetro digital[6]. Consideraram-se diabéticos os ratos com a glicemia >300mg/dL após três dias de indução. Posteriormente, as medições foram feitas a cada três semanas.

[4]LabmaxPlenno – Labtest®
[5] G-Tech® free 1
[6] G-Tech® free

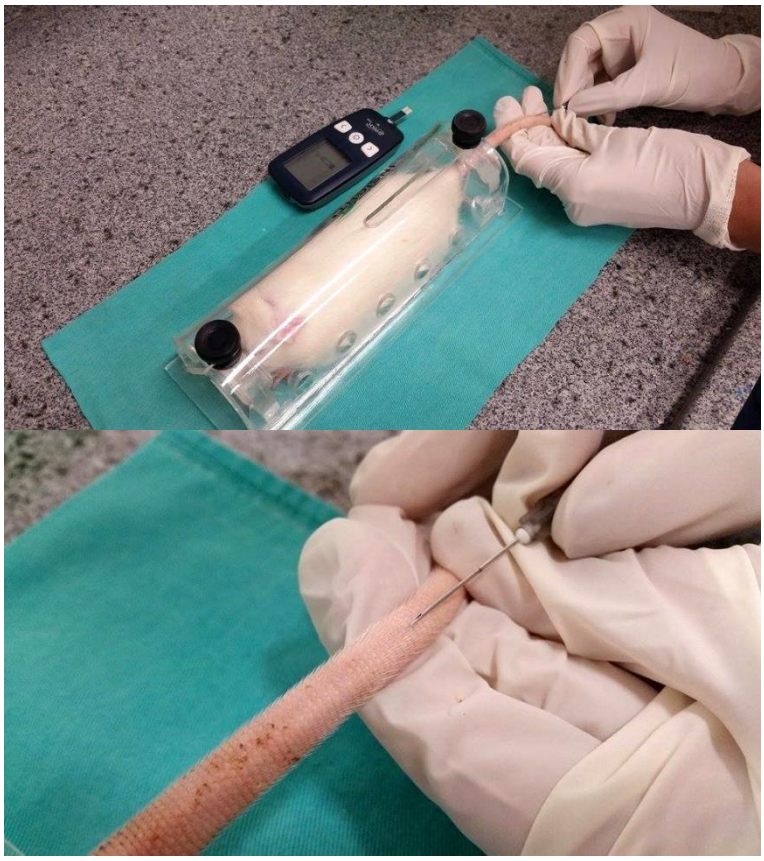

**Figura 9:** Mensuração da glicemia em ratos Wistar através da veia da cauda (arquivo pessoal).

### 5.6. ELETROCARDIOGRAMA

O eletrocardiograma foi realizado na 12ª semana pós-indução. Para confecção dos traçados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, sob anestesia inalatória, sendo utilizada posição padrão dos eletrodos. Os traçados foram registrados durante dois minutos usando aparelho de Eletrocardiograma veterinário e analisados por software[7]. A frequência cardíaca foi obtida pela contagem de ondas R em 1 minuto utilizando a derivação DII.

[7]InCardio Agile – InPulse Animal Health®

**Figura 10:** Animal em decúbito dorsal com eletrodos posicionados para confecção de eletrocardiograma e com tricotomia torácica para ecocardiograma (arquivo pessoal).

## 5.7. ECOCARDIOGRAMA

O ecocardiograma foi realizado na 12ª semana pós-indução. O exame foi feito com animal em decúbito dorsal, com tricotomia torácica, sedado como descrito no protocolo anestésico. O estudo foi feito com aparelho de ultrassom[8] em modo M de Teicholz e transdutor[9] de 13-4 MHz.

## 5.8. MORTE SEM DOR

A morte sem dor dos animais foi realizada pelo fornecimento de superdosagem do agente anestésico isoflurano e administração de cloreto de potássio 19,1%[10] por via intracardíaca.

## 5.9. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Fragmentos de ventrículo esquerdo, rim e fígado foram coletados para avaliação histopatológica, sendo fixados em formol tamponado 10%. As amostras foram desidratadas, diafanizadas e embebidas em parafina em processador

[8] My Lab 30 Vet Gold Cardiovascular –Easote®
[9] Probe LA 523 – Easote®
[10]Cloreto de Potássio 19,1%® - SãoPaulo-SP, ampola de 10 mL

automático de tecidos[11]. Após inclusão, os fragmentos foram seccionados em micrótomo semi-automático[12] para a obtenção de slides de parafina de aproximadamente 5 µm e fixadas em lâmina de vidro previamente limpas e desengorduradas. As lâminas foram coradas pela técnica histológica de rotina hematoxilina e eosina (HE). As fotomicrografias obtidas foram documentadas e arquivadas utilizando máquina fotográfica digital[13], adaptada em microscópio óptico[14].

### 5.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos valores numéricos entre grupos controle, diabéticos de 3 semanas e diabéticos de 6 semanas, e comparação entre grupos (machos x fêmeas), foi utilizado ANOVA pós-teste Tukey. Já para as análises de sobrevivência, foi utilizado teste Log-rank, considerando em todos os casos o nível de significância de 5%.

Os dados foram expressos em média ± desvio padrão e processados no software GraphPad Prism® versão 6.01, gerando os gráficos apresentados.

[11]TP1020– LEICA®
[12] RM2145 – LEICA®
[13]Coolpix 995 – Nikon®
[14] BX41 – Olympus®

# 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1. MÉTODO DE INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS

A insulina é um hormônio extremamente importante para a homeostase do metabolismo de glicose (AIRES, 2008). A deficiência (tipo 1) ou resistência (tipo 2) a esse hormônio caracteriza uma síndrome metabólica multifatorial denominada diabetes mellitus, que tem por principal alteração a hiperglicemia crônica (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). A glicemia de qualquer que seja o ser, humano ou animal, deve permanecer dentro de um padrão de normalidade; caso esses níveis estejam constantemente aumentados, ocorre uma predisposição a alterações em vários órgãos e sistemas (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, 1998).

Atualmente, o diabetes tipo 2 tem se tornado uma síndrome alarmante. Devido aos maus hábitos da população, alimentos industrializados, dieta rica em carboidratos, obesidade e sedentarismo, esses índices têm aumentado cada vez mais. Com isso, a saúde da população vem sendo cada vez mais prejudicada, aumentando o consumo de medicamentos, mortalidade, e ocorrência de outras doenças decorrentes do diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). Com isso, é essencial que sejam feitas pesquisas a fim de elucidar essa doença e suas consequências para auxiliar futuras estratégias terapêuticas.

Para esse tipo de estudo, é preciso que seja eleito um modelo para a experimentação animal e droga para indução. Segundo SZKUDELSKI (2001), as substancias mais usadas para esse estudo em ratos, camundongos e coelhos são a Aloxana e a Estreptozotocina (STZ), com a dose variando dependendo do peso e da idade. A STZ, em doses altas, como 160-250 $mg.kg^{-1}$, possui efeito citotóxico específico nas células *beta* do pâncreas, inibindo a síntese de insulina, sendo, com isso, um bom modelo para diabetes mellitus tipo 1 (RAYAT, SINGH, *et al.*, 2000). Já para estudos com diabetes mellitus tipo 2, são necessárias doses subdiabetogênicas ($40mg.kg^{-1}$) a fim de reduzir a secreção de insulina em ratos previamente engordados, visto que o aumento do peso, e o acúmulo de gordura, causa diminuição da sensibilidade à insulina (QIAN, ZHU, *et al.*, 2015). O presente estudo foi feito com ratos Wistar, previamente engordados, com injeção única

subdiabetogênica de STZ intravenosa na dose de 40 mg.kg$^{-1}$ (Gráfico 2). Esta dose mostrou ser segura para esse tipo de experimentação, pois apresentou uma mortalidade menor que a dose de 60 mg.kg$^{-1}$ (Gráfico 1), boa indução e manutenção do diabetes até a 12ª semana de experimentação. QIAN, ZHU,*et al.* (2015), REAVEN e HO (1991) e REED, MESZAROS,*et al.*, (2000) também utilizaram doses próximas a esta com bons resultados, alcançando doses glicêmicas >300 mg/dL, corroborando com nossos achados (Gráfico 3).

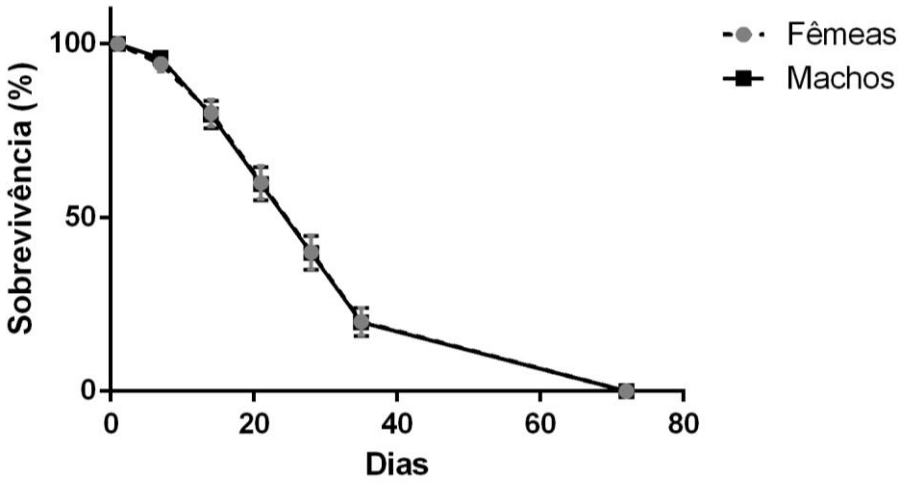


**Gráfico 1**: Porcentagem de sobrevivência de ratos Wistar (machos e fêmeas) após injeção de 60 mg.kg$^{-1}$ de estreptozotocina intravenosa. Análise estatística determinada por teste Log-rank, p<0,05).

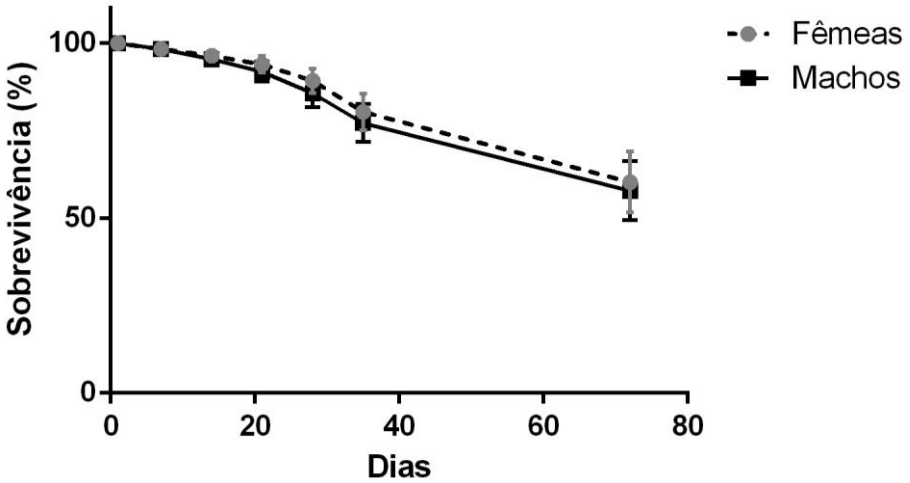


**Gráfico 2**: Porcentagem de sobrevivência de ratos Wistar (machos e fêmeas) após injeção de 40 mg.kg$^{-1}$ de estreptozotocina intravenosa. Análise estatística determinada por teste Log-rank, p<0,05).

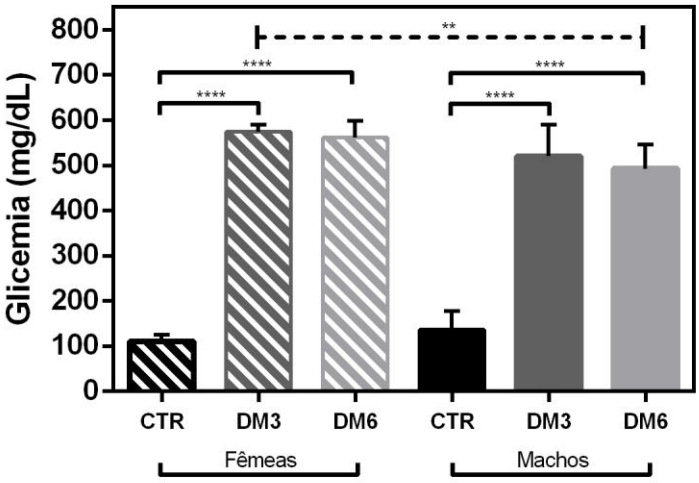


**Gráfico 3:** Aumento da glicemia em ratos Wistar após injeção intravenosa de estreptozotocina. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas= comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

## 6.2. FUNÇÕES HEPÁTICA E RENAL

Evidências clínicas e experimentais de LEITE, VILLELA-NOGUEIRA, *et al.*, (2011) sugerem que o fígado, vasos, rins, retina e nervos são afetados pelo diabetes mellitus. STERN (1997) relata que a resistência à insulina está presente e precede o desenvolvimento do diabetes tipo 2 na maioria dos pacientes. Segundo LEMIUEZ, PRUD'HOMME, *et al.*, (1996), essas alterações podem estar relacionadas a anormalidades genéticas, mas, na maioria das vezes, estão relacionadas com obesidade ou acúmulo de gordura em vísceras. Dados deste estudo mostram que houve acúmulo de lipídios em fígado de animais diabéticos, caracterizando degeneração gordurosa dos hepatócitos de grau moderado em machos (Figura 11C e D) e grau leve em fêmeas (Figura 11E e F). Além disso, também foi encontrado acúmulo lipídico em rim de grau moderado (Figura 12).

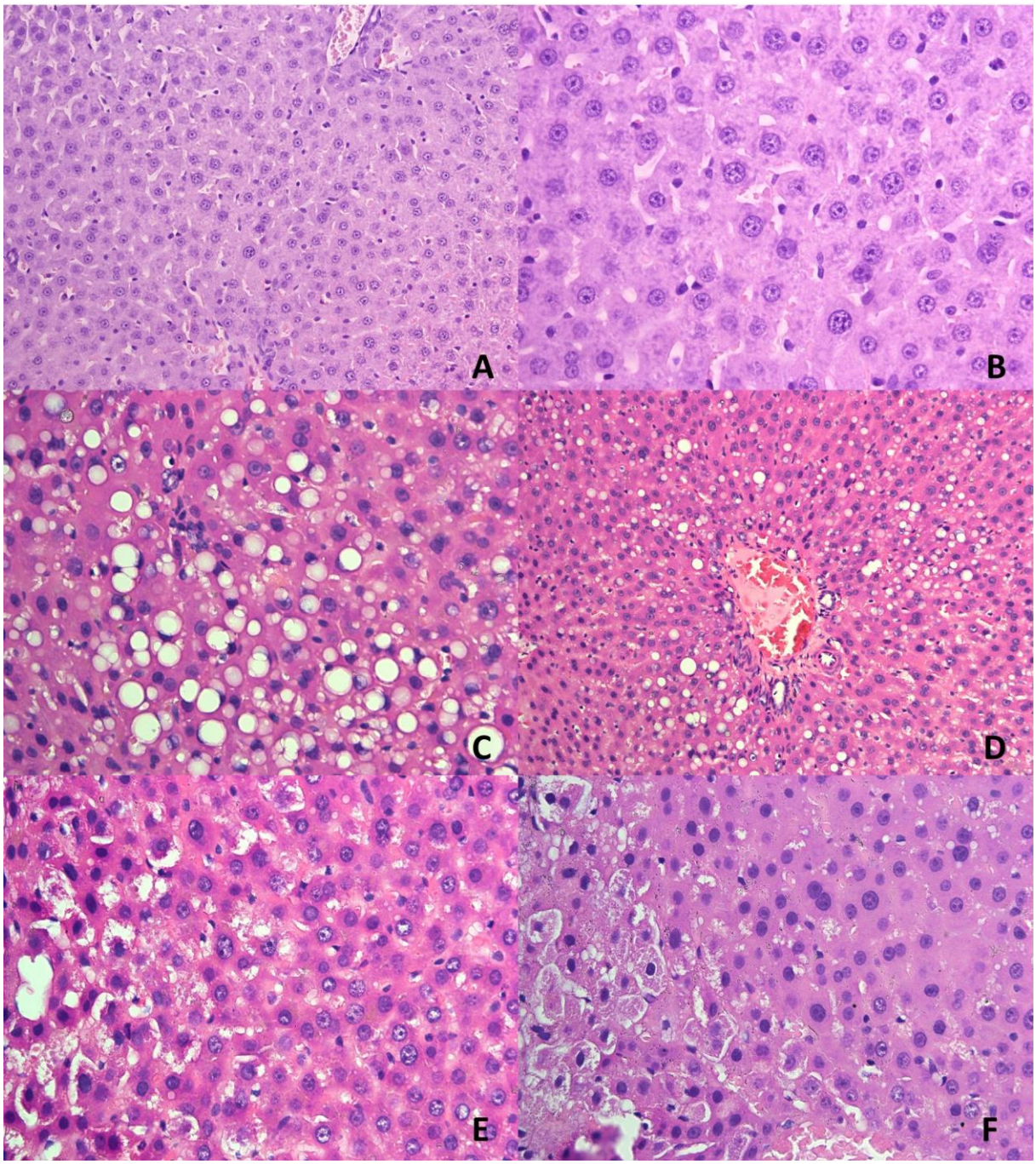


**Figura 11:** Fotomicrografia de tecido hepático em coloração HE. (A) Fígado de animal controle em aumento de 20x; (B) Fígado de animal controle em aumento de 40x; (C) Fígado de macho diabético em aumento de 40x; (D) Fígado de macho diabético em aumento de 20x; (E) Fígado de fêmea diabética em aumento de 40x; e (F) Fígado de fêmea diabética em aumento de 40x (Animais diabéticos após 12 semanas de indução).

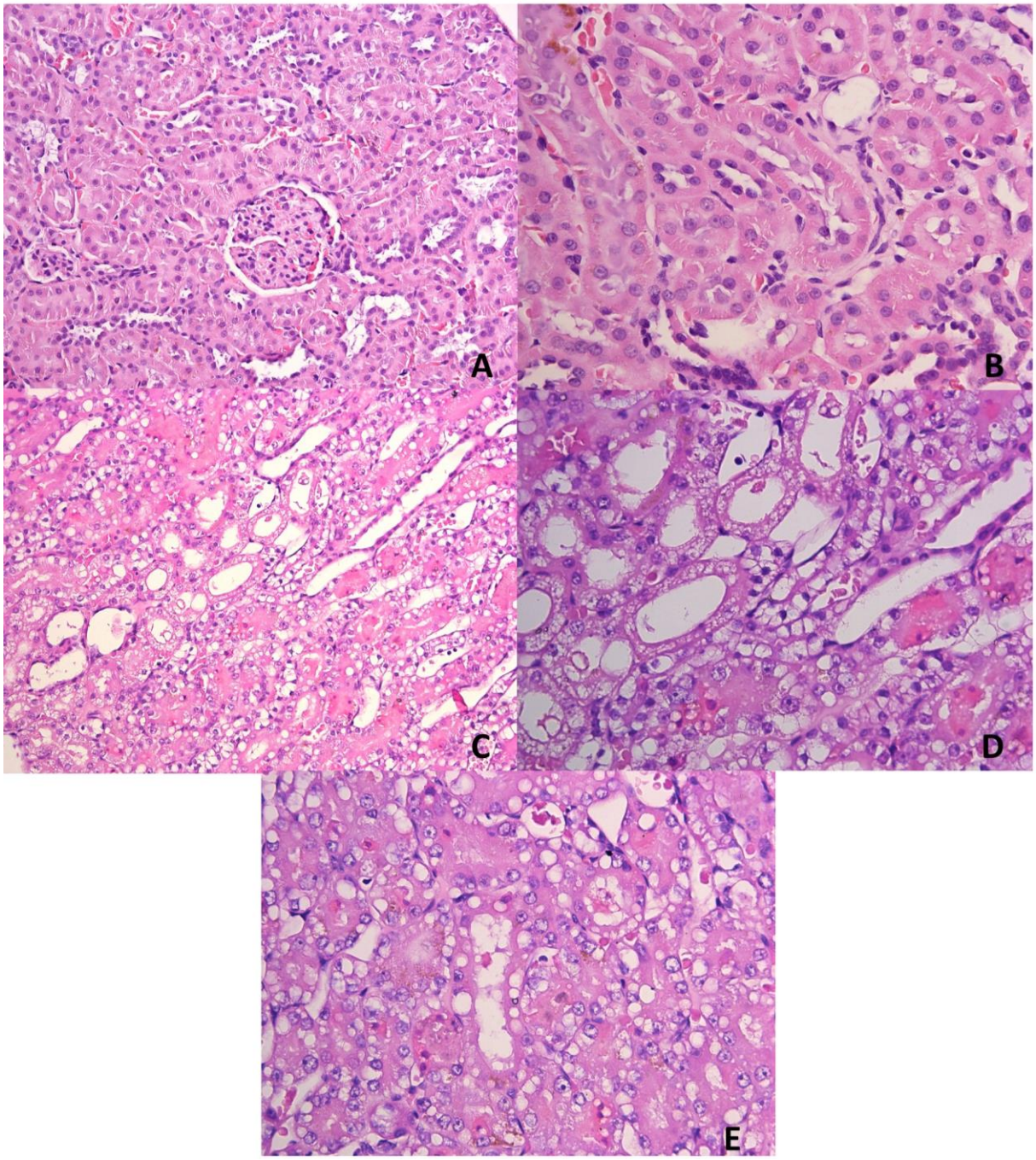


**Figura 12:** Fotomicrografia de tecido renal em coloração HE. (A) Rim de animal controle em aumento de 20x; (B) Rim de animal controle em aumento de 40x; (C) Rim de fêmea diabética em aumento de 20x; (D) Rim de fêmea diabética em aumento de 20x; e (E) Rim de macho diabético em aumento de 40x (Animais diabéticos após 12 semanas de indução).

As enzimas alaninoaminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamiltranspeptidase (GGT) são utilizadas rotineiramente para rastreamento de doença hepática gordurosa não alcoólica, associada ao diabetes tipo 2. Essa doença causa aumento dessas enzimas, sendo a ALT a mais

relacionada com a acumulação de gordura no fígado (IOANNOU, WEISS, *et al.*, 2005). Níveis séricos de fosfatase alcalina (FA) também podem estar elevados em um terço dos pacientes (PINTO, BAPTISTA, *et al.*, 1996). Estudos recentes relatam que níveis elevados de ALT estão associados com diabetes tipo 2 (SATTAR, SCHERBAKOVA, *et al.*, 2004). Wang e colaboradores (2012) demonstraram, em seu estudo feito em Taiwan, que houve uma relação dose-resposta entre níveis de ALT e risco de diabetes (WANG, CHAN, *et al.*, 2012). Outros estudos também mostram que elevados níveis de ALT têm correlação positiva com degeneração gordurosa hepática, doença cardiovascular e diabetes tipo 2 (MARCHESINI, BRIZI, *et al.*, 2001). De acordo com essas informações, foi observado um aumento significativo da enzima ALT em machos de 6 semanas (Gráfico 4), da enzima FA em fêmeas e machos (Gráfico 6) e de GGT em fêmeas (Gráfico 7). Não foram observadas alterações nos níveis séricos de AST (Gráfico 5).

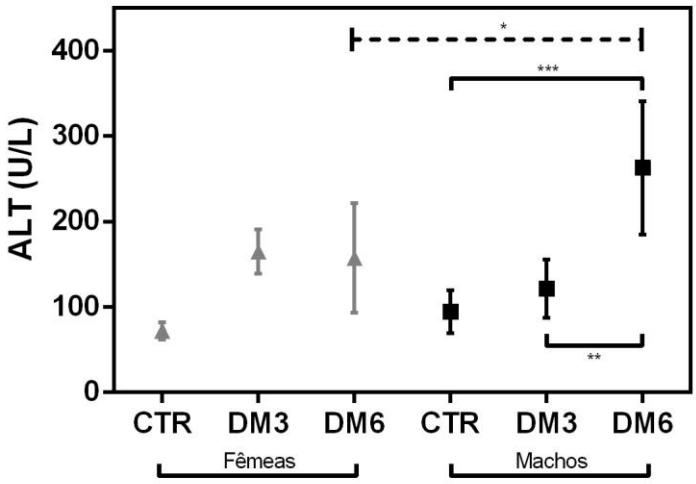


**Gráfico 4:** Níveis de alanina aminotransferase (ALT) no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

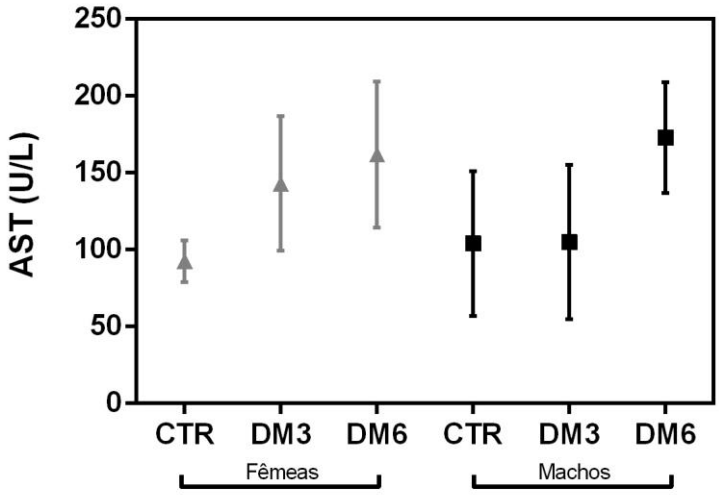


**Gráfico 5:** Níveis de aspartato aminotransferase (AST) no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

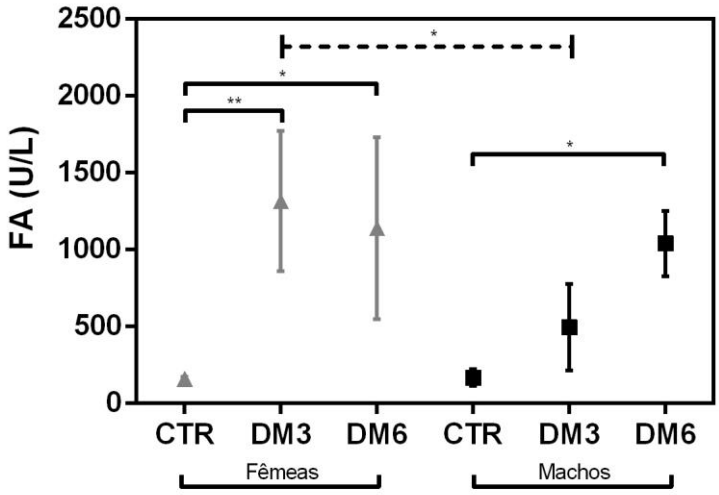


**Gráfico 6:** Níveis de fosfatase alcalina (FA) no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

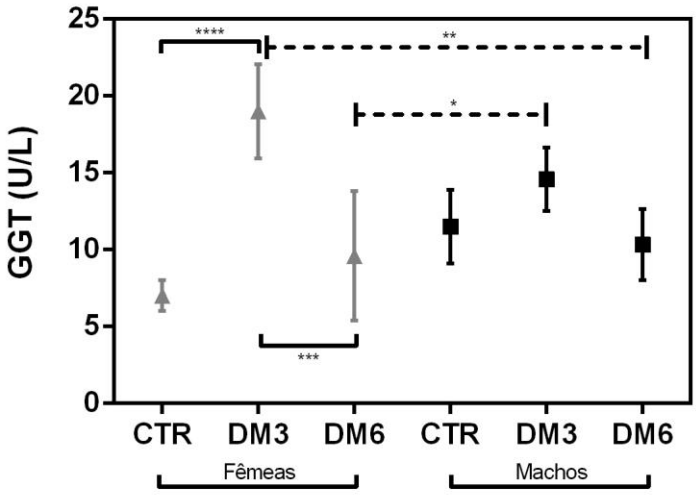


**Gráfico 7:** Níveis de gamaglutamiltranspeptidase (GGT) no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

A hiperglicemia crônica também é importante causadora de nefropatia, por isso a avaliação da função renal é de extrema importância. Na clínica rotineira, a ureia e a creatinina ainda são os paramentos mais utilizados para essa avaliação. Estudos mostram que, em pacientes diabéticos, tanto tipo 1 como tipo 2, podem ser encontrados valores aumentados de ureia e creatinina, podendo estar relacionados à diminuição da função renal, desidratação, diminuição do aporte sanguíneo renal, choque, obstrução do trato urinário e doenças musculares (GUIMARÃES, MELO e CARVALHEIRO, 2007).

Nas fêmeas diabéticas induzidas neste estudo, foi observado aumento dos níveis séricos de creatinina na 3ª semana (Gráfico 9), retornando à normalidade, e aumento de ureia na 6ª semana (Gráfico 8). Estes dados demonstram que a poliúria pode estar causando uma desidratação nos animais, caracterizando uma uremia de origem pré-renal.

Os valores absolutos para média, desvio padrão, valores máximos e mínimos obtidos neste estudo estão dispostos nas Tabelas 1 e 2.

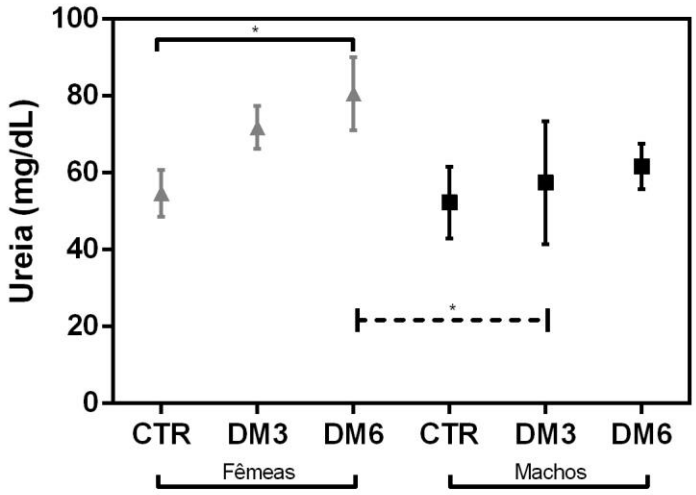


**Gráfico 8:** Níveis de ureia no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

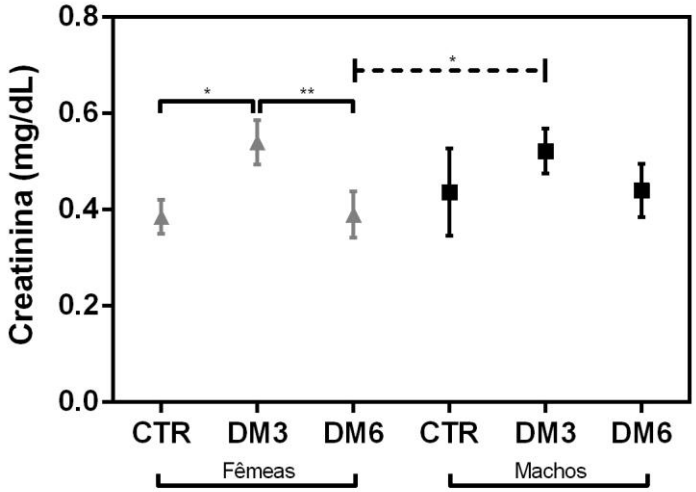


**Gráfico 9:** Níveis de creatinina no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

**Tabela 1:** Bioquímica sérica de ratos Wistar fêmeas diabéticas (DM3 = após 3 semanas de indução; DM6 = após 6 semanas de indução). Apresentação de valores mínimos, máximos, médias e desvios padrões (DP).

| | | Fêmeas DM3 | | | | Fêmeas DM6 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Parâmetros avaliados** | **Controle (média±DP)** | **Mín.** | **Máx.** | **Média** | **DP** | **Mín.** | **Máx.** | **Média** | **DP** |
| ALT (U/L) | 72,0±10,39 | 125,0 | 187,0 | 164,80 | 26,0 | 86,0 | 231,0 | 157,40 | 63,94 |
| AST (U/L) | 92,67±13,58 | 82,4 | 179,0 | 143,08 | 43,88 | 113,0 | 208,0 | 162,0 | 47,49 |
| FA (U/L) | 160,3±14,29 | 681,0 | 1870,0 | 1316,6 | 454,9 | 590,0 | 1920,0 | 1140,75 | 591,19 |
| GGT (U/L) | 7,0±1,0 | 15,0 | 23,0 | 19,0 | 3,08 | 5,0 | 15,0 | 9,60 | 4,22 |
| Ureia (mg/dL) | 54,67±6,03 | 64,0 | 77,0 | 71,80 | 5,54 | 72 | 94 | 80,60 | 9,48 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,39±0,04 | 0,50 | 0,60 | 0,54 | 0,05 | 0,34 | 0,46 | 0,39 | 0,05 |
| Colesterol Total (mg/dL) | 64,0±10,15 | 69,0 | 108,0 | 91,0 | 17,44 | 101,0 | 113,0 | 107,33 | 6,03 |
| Triglicerídeos (mg/dL) | 148,67±3,79 | 152,0 | 294,0 | 215,0 | 59,65 | 84,0 | 134,0 | 109,25 | 23,60 |

**Tabela 2:** Bioquímica sérica de ratos Wistar machos diabéticos (DM3 = após 3 semanas de indução; DM6 = após 6 semanas de indução). Apresentação de valores mínimos, máximos, médias e desvios padrões (DP);

| | | Machos DM3 | | | | Machos DM6 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Parâmetros avaliados** | **Controle (média±DP)** | **Mín.** | **Máx.** | **Média** | **DP** | **Mín.** | **Máx.** | **Média** | **DP** |
| ALT (U/L) | 94,60±24,99 | 82,0 | 158,0 | 121,60 | 34,0 | 200,0 | 350,0 | 263,0 | 77,83 |
| AST (U/L) | 103,97±46,9 | 44,7 | 180,0 | 104,94 | 50,07 | 132,0 | 200,0 | 173,0 | 36,10 |
| FA (U/L) | 168,5±55,3 | 235,0 | 875,0 | 495,33 | 282,29 | 801,0 | 1202,0 | 1040,33 | 211,48 |
| GGT (U/L) | 11,50±2,39 | 13,0 | 19,0 | 14,57 | 2,07 | 9,0 | 13,0 | 10,33 | 2,31 |
| Ureia (mg/dL) | 52,29±9,38 | 41,0 | 83,0 | 57,43 | 16,05 | 55,0 | 66,0 | 61,67 | 5,86 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,44±0,09 | 0,44 | 0,59 | 0,52 | 0,05 | 0,39 | 0,50 | 0,44 | 0,06 |
| Colesterol Total (mg/dL) | 102,71±17,4 | 80,0 | 130,0 | 102,71 | 17,40 | 85,0 | 114,0 | 99,67 | 14,50 |
| Triglicerídeos (mg/dL) | 93,50±42,55 | 51,0 | 233,0 | 116,20 | 73,86 | 118,0 | 147,0 | 137,33 | 16,74 |

A dislipidemia é uma alteração comum observada no diabetes mellitus, causada principalmente pela resistência à insulina e obesidade e é de suma importância para o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares (GOLDBERG, 2001). Em um estudo feito no Hospital da Universidade de Iowa, as injeções intravenosas de lipídios e o diabetes tipo 2 foram as causas mais comuns de dislipidemia grave (MAINALIA, DAVIS e KRASOWSKIB, 2017). Pacientes com diabetes e dislipidemia geralmente têm risco maior de doenças cardiovasculares e sofrem de consequências mais graves do que os não diabéticos (GRUNDY, BALADY, *et al.*, 1998). Para melhor prognóstico cardiovascular dos pacientes com DM2, o diagnóstico precoce e tratamento das dislipidemias são de extrema importância.

Nas fêmeas diabéticas deste estudo, foram encontrados aumentos de colesterol total e triglicerídeos (Gráficos 10 e 11), compatíveis com quadro de resistência à insulina, podendo caracterizar um risco maior de doenças cardiovasculares do que em machos. Em fêmeas, também foi observada prevalência de 26,6% de ocorrência de soro lipêmico (Figura 13).

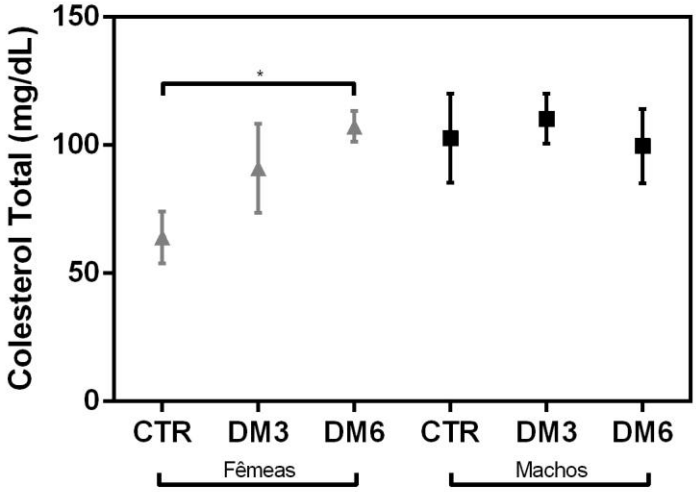


**Gráfico 10:** Níveis de colesterol total no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

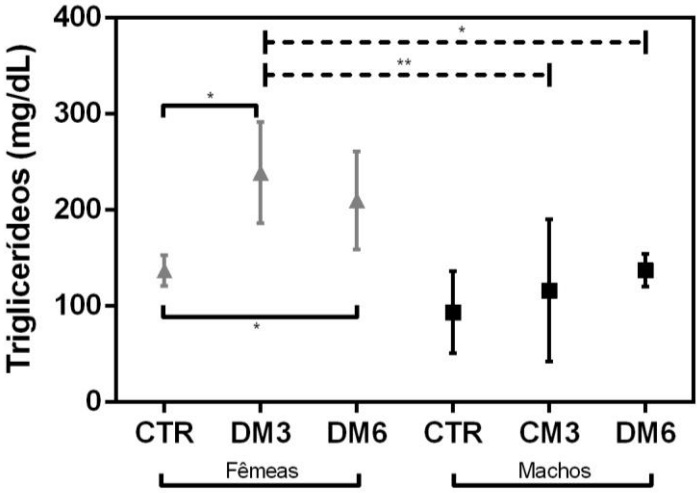


**Gráfico 11:** Níveis de triglicerídeos no sangue de ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM3=Após 3 semanas de indução; DM6=Após 6 semanas de indução; Linhas sólidas=comparação intragrupos; Linhas tracejadas=comparação entre grupos). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

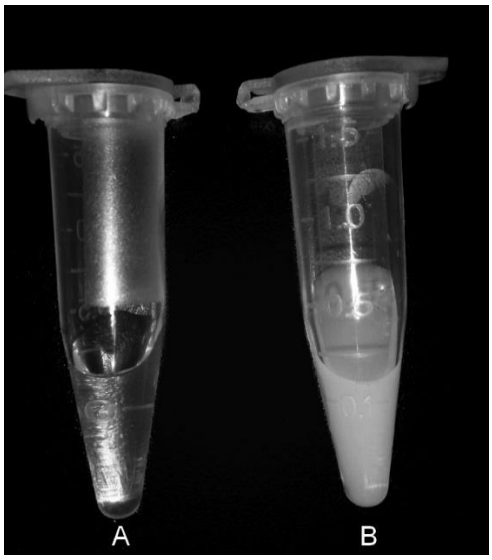


**Figura 13:** Comparação do soro límpido de fêmeas controle (A) e soro intensamente lipêmico de fêmeas diabéticas (B).

## 6.3. ALTERAÇÕES CARDÍACAS

A hiperglicemia causada pelo diabetes também afeta o crescimento, desenvolvimento e processo contrátil de cardiomiócitos, causando desorganização da maquinaria contrátil, apoptose e redução da formação de miofibrilas (filamentos de miosina) (DYNTAR, EPPENBERGER-EBERHARDT, *et al.*, 2001), causando anormalidades na estrutura do órgão. Achados compatíveis foram encontrados neste estudo, com acúmulo hidrópico em cardiomiócitos de machos e fêmeas compatível com degeneração hidrópica cardíaca. Em fêmeas, porém, houve presença de achados compatíveis com necrose (Figura 14), como o ocorrido no estudo de CHUN-JUN, QIU-MEI, *et al.* (2009). Também foi descrito numa revisão recente de MIKI, YUDA, *et al.*, 2013 que todos as alterações fisiopatológicas da cardiomiopatia diabética conduzem a uma via final comum de fibrose intersticial e morte celular de miócitos.

Estudos com ecocardiografia realizados com doentes com DM2 (DEVERAUX, ROMAN, *et al*., 2000; RUTTER, 2003; GALDERISI, ANDERSON, *et al.*, 1991; DI BONITO, CUOMO, *et al.*, 1996) revelaram aumento de massa ventricular, não observado em doentes com DM1 (CARUGO, GIANNATTASIO, *et al.*, 2001; GUL, CELEBI, *et al.*, 2009). A disfunção diastólica é bastante estudada e é indicada como um marcador precoce importante da cardiomiopatia diabética; segundo o estudo de BOYER, THANIGARAJ, *et al*. (2004), foram observadas alterações em 75% dos pacientes analisados. A função sistólica é menos estudada e, na maioria dos estudos, não foram encontradas diferenças significativas na fração de ejeção dos pacientes (MIKI, YUDA, *et al.*, 2013), porém, estudos com doppler tecidual demonstram redução da velocidade de contração miocárdica, apontando disfunção sistólica em pacientes com DM2, não sendo observadas tais alterações no DM1. Neste estudo, foi observada redução de dois marcadores importantes de função sistólica em fêmeas, sendo obtidos dados significativos com relação à função cardíaca de fêmeas, demonstrando queda significativa de fração de ejeção (Gráfico 13) e fração de encurtamento (Gráfico 14), quando em machos não foram observadas tais alterações. GONZALEZ-VILCHEZ, AYUELA, *et al.* (2005) também encontraram evidências de alteração de função sistólica, porém, estudos com esse parâmetro são escassos para comparação com este estudo. Com a diminuição da fração de ejeção (Gráfico 13), há comprometimento do bombeamento do sangue

pelo ventrículo, que não se contrai adequadamente. Também houve queda da fração de encurtamento (Gráfico 14), demonstrando redução percentual do diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo durante sua ejeção máxima (sístole). TADEU (2017) menciona a importância da função sistólica, muitas vezes negligenciada em estudos, podendo ser um marcador mais precoce do surgimento da cardiomiopatia diabética.

A cardiomiopatia diabética implica diversas anormalidades metabólicas e também suas consequências celulares: hiperglicemia, aumento de triglicerídeos e ácidos graxos livres e hiperinsulinemia. Essas alterações geram alterações na ativação de fatores de transcrição celulares, modificação na expressão gênica, utilização de substratos, crescimento miocárdico, disfunção endotelial e aumento de rigidez. O aumento de ácidos graxos livres está diretamente relacionado com a resistência à insulina e disfunção contrátil do coração. (HAYAT, PATEL, *et al*., 2004). MALONE e colaboradores (2007) demonstraram que ratos diabéticos sofreram queda de frequência cardíaca na média de 21%. Essa alteração também foi vista neste estudo, onde foi observada queda da frequência cardíaca nos animais diabéticos, independente do sexo (Gráfico 12), sugerindo, assim, que a diminuição da glicose como fonte de energia miocárdica pode comprometer a frequência cardíaca (MANOLE, *et al.*, 2007).

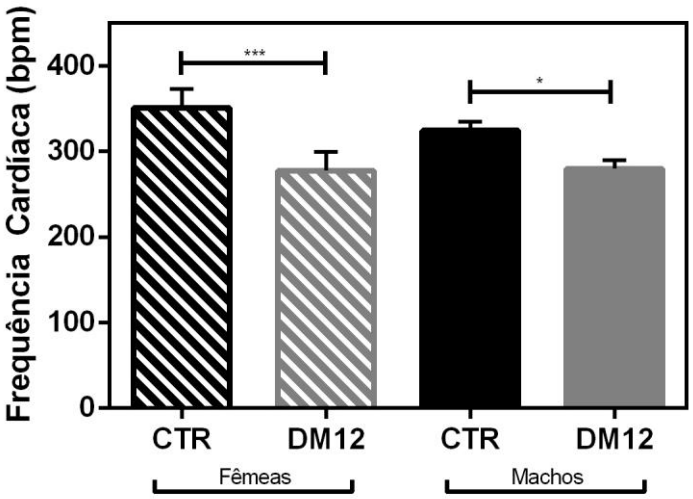


**Gráfico 12:** Frequência cardíaca em ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM12=Após 12 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

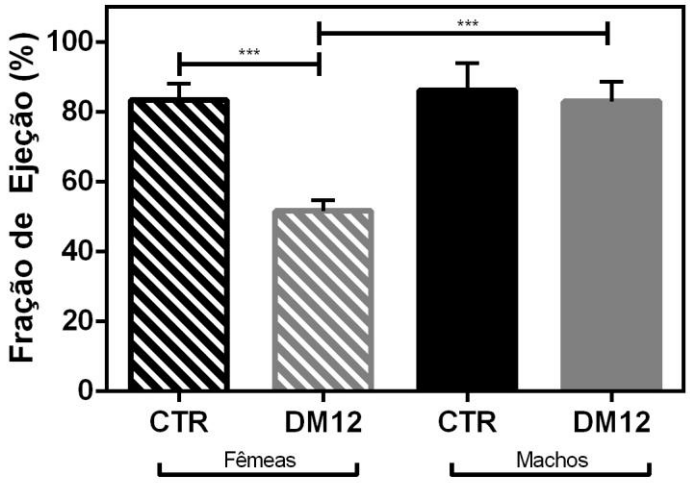


**Gráfico 13:** Fração de ejeção em ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM12=Após 12 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

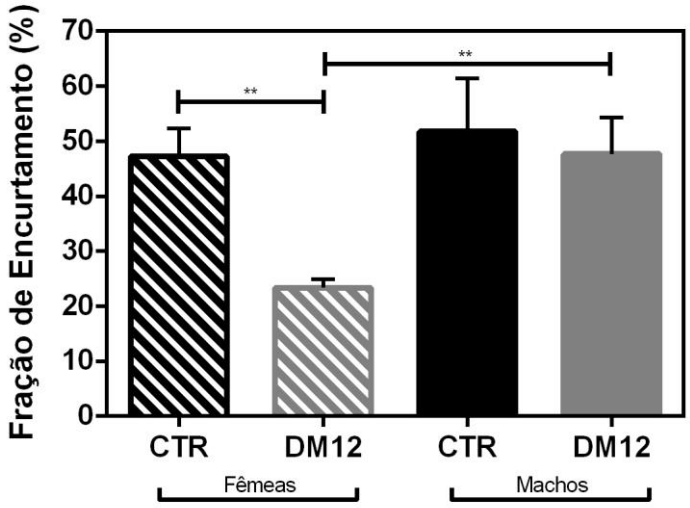


**Gráfico 14:** Fração de encurtamento em ratos Wistar diabéticos. (CTR=Controle; DM12=Após 12 semanas de indução). Análise estatística determinada utilizando ANOVA e pós-teste Tukey (P<0,05), (n=15/grupo).

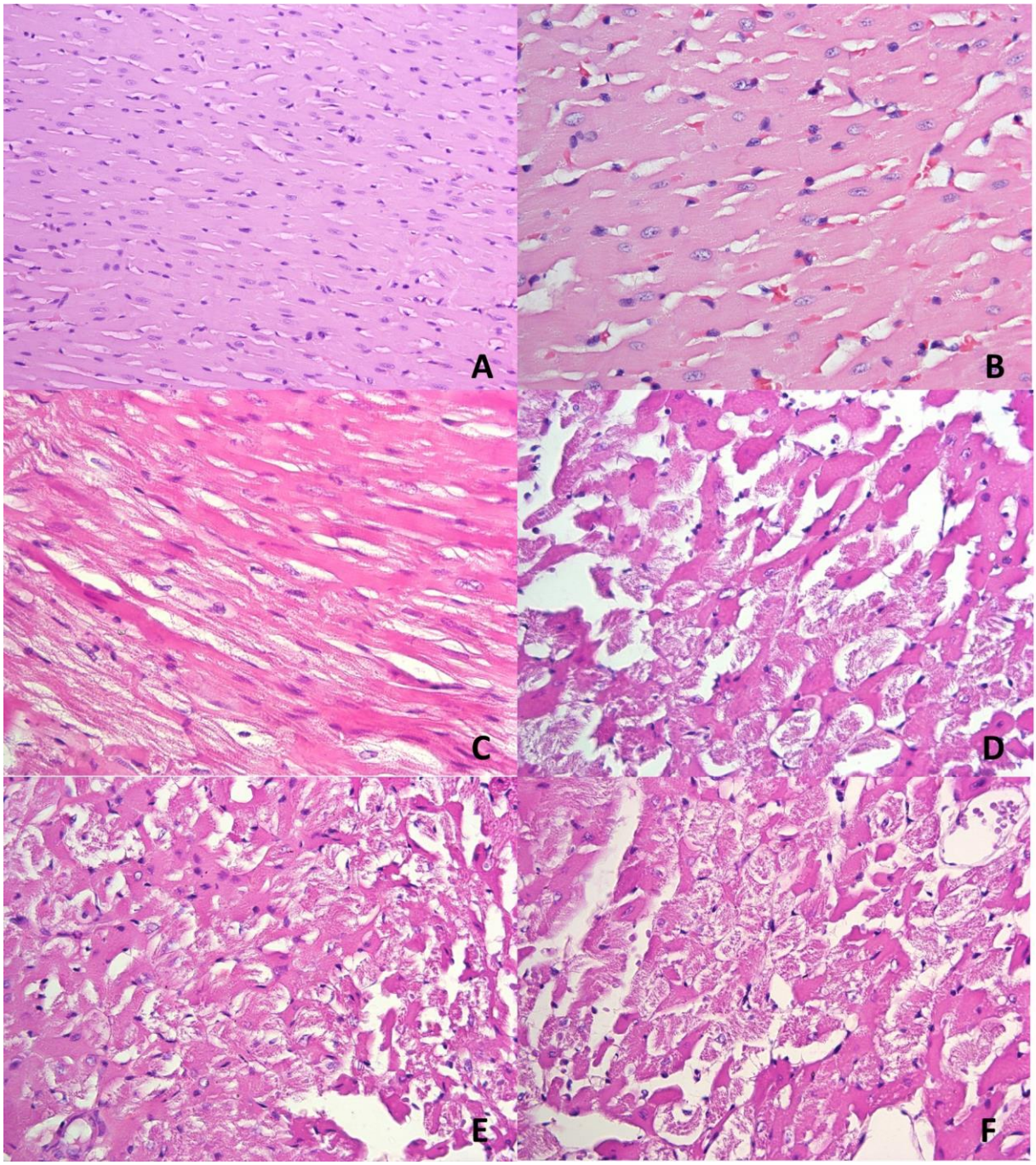


**Figura 14:** Fotomicrografia de tecido cardíaco em coloração HE. (A) Miocárdio de animal controle em aumento de 20x; (B) Miocárdio de animal controle em aumento de 40x; (C e D) Miocárdio de fêmea diabética em aumento de 40x; (E e F) Miocárdio de macho diabético em aumento de 40x (Animais diabéticos após 12 semanas de indução).

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o diabetes mellitus tipo 2 é uma importante doença, capaz de causar diversos comprometimentos à saúde renal, hepática e cardíaca.

- A doença foi induzida seguramente com uma dose de 40mg.kg$^{-1}$ por via intravenosa em ratos machos e fêmeas, e o tempo de execução das avaliações (12 semanas) foi suficiente para detectar alterações nos órgãos estudados, ainda que em estágio inicial;
- A bioquímica sérica demonstrou dislipidemia em fêmeas, alterações não significativas na função renal, aumento de ALT em machos, aumento de FA em machos e fêmeas, aumento de GGT em fêmeas;
- O eletrocardiograma indicou queda significativa da frequência cardíaca em machos e fêmeas e queda de função sistólica em fêmeas;
- A análise histopatológica demonstrou que, em machos, houve degeneração gordurosa moderada e hidrópica leve de hepatócitos, túbulos renais com degeneração gordurosa moderada e hidrópica leve e degeneração hidrópica leve em cardiomiócitos. Em fêmeas, foi observada degeneração gordurosa leve, degeneração gordurosa moderada e hidrópica leve em túbulos renais e degeneração hidrópica cardíaca multifocal moderada associada à necrose e degeneração cardíaca gordurosa leve difusa;
- Tanto as fêmeas quanto os machos sofreram alterações importantes em fígado e rim, porém, com relação ao coração, as fêmeas mostraram lesões mais avançadas no mesmo tempo de estudo, podendo sugerir uma evolução mais rápida de cardiomiopatia diabética neste sexo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ADLER, A. et al. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). **Kidney International**, v. 63, n. 1, p. 225-232, 2003.

AIRES, M. **Fisiologia**. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

AKBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 60-64, 2007.

ALBERTI, S. **Neuropatia diabética experimental: estudo da condução nervosa motora dos nervos ciáticos e caudal em ratos com diabetes induzido pela aloxana**. UNESP - Faculdade de Medicina. Botucatu, p. 121. 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, n. Suppl 1, p. S11-S61, 2010.

AN, D.; RODRIGUES, B. Role of changes in cardiac metabolism in development diabetic cardiomypathy. **The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 4, p. H1489-1506, 2006.

ANGELICO, F. et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 3, p. 1578-1582, 2005.

BATMAN, P.; SCHEUER, P. Diabetic hepatitis preceding the onset of glucose intolerance. **Histopathology**, v. 9, p. 237-243, 1985.

BAYEVA, M.; SAWICKI, K.; ARDEHALI, H. Taking Diabetes to Heart—Deregulation of Myocardial Lipid Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, p. e000433, 2013.

BAZOTTE, R. **Paciente diabético:** Cuidados farmacêuticos. Rio de Janeiro: MedBook, 2012.

BELL, D. Heart failure: the frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 8, p. 2433-2441, 2003.

BEST, L.; DUNLOP, M.; MALAISSE, W. Phospholipid metabolism in pancreatic islets. **Experientia**, v. 40, n. 10, p. 1085-1091, 1984.

BIDASEE, K. et al. Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Saco(endo)plasmic reticulum Ca2+ATPase. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 463-473, 2004.

BLOOMGARDEN, Z. Cardiovascular disease and diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 1, p. 230-237, 2003.

BOSCHERO, A. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 40, p. 149-155, 1996.

BOULTON, A. Guidelines for diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. European Association for the Study of Diabetes, Neurodiab. **Diabetes & Metabolism**, v. 24, n. Suppl 3, p. 55-65, 1998.

BOULTON, A. et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, n. 4, p. 956-962, 2005.

BOYER, J. K. et al. Prevalence of ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic, normotensive patients with diabetes mellitus. **American Journal of Cardiology**, v. 93, n. 7, p. 870-875, 2004.

BRASIL. **Cadernos de Atenção Básica - Prevenção clínica de doença cardiovascular cerebrovascular e renal crônica**. Brasília: Ministério da Saúde, v. 14, 2006.

BRUNO, R.; GROSS, J. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: A 3.6-year follow-up study. **Diabetes and its complications**, v. 14, n. 5, p. 266-271, 2000.

BRUNT, E. Nonalcoholic steatohepatitis. **Seminars of Liver Diseases**, v. 24, n. 1, p. 3-20, 2004.

BUCHANAN, J. et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5341-5349, 2005.

CARUGO, S. et al. Progression of functional and structural cardiac alterations in young normotensive uncomplicated patients with type 1 diabetes mellitus. **Journal of Hypertension**, v. 19, p. 1675-1680, 2001.

CHATHAM, J.; SEYMOUR, A. Cardiac cabohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats. **Cardiovascular Research**, v. 55, n. 1, p. 104-112, 2002.

CHAVES, F. R.; JORGE, P. A. R. Miocardiopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 42, p. 134-139, 1998.

CHUN-JUN, L. et al. Attenuation of myocardial apoptosis by alpha-lipoic acid through suppression of mitochondrial oxidative stress to reduce diabetic cardiomyopathy. **Chinese Medical Journal**, v. 122, p. 2580-2586, 2009.

CODINACH-HUIX, P.; FREIXA-PAMIAS, R. Diabetic cardiomyopathy: concept, heart function, and pathogenesis. **Anales de Medicina Interna**, v. 19, n. 6, p. 313-320, 2002.

CODINACH-HUIX, P.; FREIXA-PAMIAS, R. Diabetic cardiomyopathy: concept, heart function, and pathogenesis. **Anales de Medicina Interna**, v. 19, p. 313-320, 2002.

DANIEL, S. et al. Prospective Evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymtomatic and symtomatic patients. **American Journal of Gastroenterology**, v. 94, n. 10, p. 3010-3014, 1999.

DAVIES, R. Biochemical processes in cardiac function. **Hospital Practice**, v. 5, n. 6, p. 49-56, 1970.

DAY, C. Pathogenesis of steatohepatitis. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 16, p. 663-678, 2002.

DAY, C.; JAMES, O. Steatohepatitis: at tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DEEDS, M. et al. Single dose streptozotocin induced diabetes: Considerations for study design in Islet Transplantation Models. **Lab Animal**, v. 45, n. 3, p. 131-140, 2011.

DELFINO, V. et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DEVEREUX, R. B. et al. Impact of Diabetes on cardiac structure and function: The Strong Heart Study. **Circulation**, v. 101, n. 19, p. 2271-2276, 2000.

DHALLA, N. et al. Calcium movements in relation to heart function. **Basic Research in Cardiology**, v. 77, n. 2, p. 117-139, 1982.

DI BONITO, P. et al. Diastolic dysfunction in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus of short duration. **Diabetic Medicine**, v. 13, n. 4, 321-324, 1996.

DUNCAN, J. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, n. 7, p. 1351-1359, 2011.

DYNTAR, D. et al. Glucose and pamitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2105-2013, 2001.

EFRAT, S.; RUSS, H. Making β cells from adult tissues. **Trens in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 278-285, 2012.

FANG, Z. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms and therapeutic implications. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 543-567, 2004.

FRANK, R. Diabetic retinopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 1, p. 48-58, 2004.

GALDERISI, M. et al. Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (The Framingham Heart Study). **American Journal of Cardiology**, v. 68, n. 1, p. 85-89, 1991.

GOLDBERG, I. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 965-971, 2001.

GONG, C. et al. Streptozotocin induced diabetic retinopathy in rat and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptor. **International Journal of Ophthalmology**, v. 6, n. 5, p. 573-577, 2013.

GONZALEZ-VILCHEZ, F. et al. Oxidative stress and fibrosis in incipient myocardial dysfunction in type 2 diabetic patients. **International Journal of Cardiology**, v. 101, p. 53-58, 2005.

GRUNDY, S. et al. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. **Circulation**, v. 97, n. 18, p. 1876-1887, 1998.

GRUNDY, S. et al. Diabetes and cardiovascular disease—executive summary: conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. **Circulation**, v. 105, n. 18, p. 2231-2239, 2002.

GU, K.; COWIE, C.; HARRIS, M. Diabetes and Decline in Heart Disease Mortality in US Adults. **JAMA**, v. 281, n. 14, p. 1291-1297, 1999.

GUL, K. et al. Tissue Doppler imaging must be performed to detect early left ventricular dysfunction in patients with type 1 diabetes mellitus. **Europe Journal of Echocardiography**, v. 10, n. 7, p. 841-846, 2009.

GUIMARÃES, J. B. M.; MELO, M.; CARVALHEIRO, M. Nefropatia Diabética: Taxa de Filtração Glomerular Calculada e Estimada. **Acta Médica Portuguesa**, v. 20, p. 145-150, 2007.

GUTIERREZ, P. S.; HIGUCHI, M. L. Alterações cardíacas e vasculares no diabetes: aspectos anatomopatológicos. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 8, p. 1020-1024, 1998.

GUYTON, A.; HALL, J. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HABER, E. et al. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, 2001.

HAYAT, S. A. et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. **Clinical Science**, v. 107, p. 539-557, 2004.

HENRY, J. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20ª. ed. Barueri, SP: Manole, 2008. 1734 p.

HUGHES, S.; ASHCROFT, S. Cyclic AMP, protein phosphorylation and insulin secretion. In: FLATT, P. **Nutrient Regulation of Insulin Secretion**. Longon: Portland Press, 1992. p. 271-288.

IBSEN, H. et al. Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy and diabetes. **Journal of Nephrology**, v. 21, n. 4, p. 566-569, 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas. **IDF Diabetes Atlas**, 2013. Disponivel em: <www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 2016.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas. **IDF Diabetes Atlas**, n. 7, 2015. Disponivel em: <www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 2017.

IOANNOU, G. et al. Contribution of metabolic factors to alanine aminotransferase activity in persons with other causes of liver disease. **Gastroenterology**, v. 128, p. 627-635, 2005.

JUNOD, A. et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 2129-2139, 1969.

KANNEL, W. B.; HJORTLAND, M.; CASTELLI, W. P. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. **American Journal of Cardiology**, v. 34, p. 29-34, 1974.

KANNEL, W.; HJORTLAND, M.; CASTELLI, W. Role of diabetes in congestive heart failure. **American Journal of Cardiology**, v. 34, p. 29-34, 1974.

KAUR, J. Comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology Research and Practice**, v. 2014, Artigo ID 943162, 21 páginas, 2014.

KEENAN, H. et al. Clinical factors associated with resistance to microvascular complications in diabetic patients of extreme disease duration: the 50-year medalist study. **Diabetes Care**, v. 30, n. 8, p. 1995-1997, 2007.

KONRAD, R. et al. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. **Biochemical Journal**, v. 356, n. Pt 1, p. 31-41, 2001.

LARGAY, J. Case Study: New-Onset Diabetes: How to Tell the Difference Between type 1 and 2 diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 30, n. 1, p. 25-26, 2012.

LEITE, N. et al. Histopathologic stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. **Liver International**, v. 3, p. 700-706, 2011.

LEMIUEZ, S. et al. Seven year changes in body fat and visceral adipose tissue in women, association with indices of plasma glucose insulin homeostasis. **Diabetes Care**, v. 19, p. 983-991, 1996.

LYRA, R. et al. Prevenção do diabetes mellitus tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 239-249, 2006.

MACHADO, U. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 42, n. 6, p. 413-421, 1998.

MAINALIA, S.; DAVIS, S.; KRASOWSKIB, M. Frequency and causes of lipemia interference of clinical chemistry laboratory tests. **Practical Laboratory Medicine**, v. 8, p. 1-9, 2017.

MANOLE, M. A. et al. Diabetes-induced bradycardia is an intrinsic metabolic defect reversed by carnitine. **Metabolism – Clinical and Experimental**, v. 56, n. 8, p. 1118-1123, 2007.

MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1844-1850, 2001.

MATSCHINSKY, F. Banting Lecture 1995: a lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v. 45, n. 2, p. 223-241, 1996.

MEIGS, J. et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 291, n. 16, p. 1978-1986, 2004.

MENDEZ, J.; RAMOS, H. Animals models in diabetes research. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 4, p. 367-375, 1994.

MIKI, T. et al. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. **Heart Failure Reviews**, v. 18, n. 2, p. 149-166, 2013.

MOLITCH, M. et al. Nephropathy in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. Suppl 1, p. S79-83, 2004.

MOREIRA, P. et al. Insulin attenuates diabetes-related mirochondrial alterations: a comparative study. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 299-308, 2006.

MUKAMAL, K. J. et al. Impact of diabetes on long-term survival after acute myocardial infarction: comparability of risk with prior myocardial infarction. **Diabetes Care**, v. 24, p. 1422-1427, 2001.

NASCIMENTO, L. et al. Diabetes mellitus tipo 1: evidências da literatura para seu manejo adequado, na perspectiva de crianças. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 3, p. 460-465, 2011.

NEELY, J.; ROVETTO, M.; ORAM, J. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 3, p. 289-329, 1972.

NELSON, R. et al. Effect of proteinuria on mortality in NIDDM. **Diabetes**, v. 37, n. 11, p. 1499-1504, 1988.

NISHIO, S. et al. Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 5, p. 1103-1111, 2012.

PERALES, M.; SENER, A.; MALAISSE, W. Hexose metabolism in pancreatic islets: the glucose-6-phosphatase riddle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 1, p. 67-71, 1991.

PERSAUD, S.; JONES, P.; HOWELL, S. The role of protein kinase C in insulin secretion. In: FLATT, P. **Nutrient Regulation of Insulin Secretion**. Longon: Portland Press, 1991. p. 247-270.

PINTO, H. et al. Nonalcoholic steatohepatitis. Clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, n. 1, p. 172-179, 1996.

POORNIMA, I. G.; PARIKH, P.; SHANNON, R. P. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. **Circulation Research**, v. 98, p. 596-605, 2006.

PRENTKI, M.; CORKEY, B. Are the beta cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? **Diabetes**, v. 45, n. 3, p. 273-283, 1996.

PUREZA, D. Y. **Modulação autonômica cardíaca em repouso e durante o exercício em ratos diabéticos: avaliações hemodinâmicas e morfométricas de gânglios parassimpáticos cardíacos**. Universidade São Judar Tadeu. São Paulo. 2006.

QIAN, C. et al. High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats Impacts Osteogenesis and Wnt Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136390, 2015.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, L.; NADKARNI, M. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 29, p. 91-98, 1963.

RAYAT, G. et al. Single injection of insulin delays the recurrence of diabetes in syngeneic islet-transplanted diabetic NOD mice. **Transplantation**, v. 70, n. 6, p. 976-985, 2000.

REAVEN, G.; HO, H. Low-dose streptozotocin-induced diabetes in the spontaneously hypertensive rat. **Metabolism**, v. 40, n. 4, p. 335-337, 1991.

REED, M. et al. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism**, v. 49, n. 11, p. 1390-1394, 2000.

RITZ, E.; STEFANSKI, A. Diabetic nephropathy in type 2 diabetes. **American Journal of Kidney Disease**, v. 27, p. 167-194, 1996.

RUBLER, S. et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. **American Journal of Cardiology**, v. 30, p. 595-602, 1972.

RUBLER, S. et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. **American Journal of Cardiology**, v. 30, p. 595-602, 1972.

SATTAR, N. et al. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 2855-2860, 2004.

SAUNDERS, J. et al. Cardiomyopathy in type 2 diabetes: update on pathophysiological mechanisms. **Herz**, v. 33, n. 3, p. 184-190, 2008.

SCHAAN, B. D.; HARZHEIM, E.; GUS, I. Perfil de risco cardíaco no diabetes mellitus e na glicemia de jejum alterada. **Revista Saúde Pública**, v. 38, p. 529-536, 2004.

SCHLANT, R. Fluidoterapia, eletrólitos e controle ácido-básico. In: ETTINGER, S.; FELDMAN, E. **Tratado de Medicina Interna Veterinária:** Moléstia do Cão e do Gato. São Paulo: Editora Manole, 1997. p. 436-445.

SCHNEDL, W. et al. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**, v. 43, n. 11, p. 1326-1333, 1994.

SCHREY, M.; MONTAGUE, W. Phosphatidylinositol metabolism in isolated guinea-pig islets of Langerhans. **Biochemistry**, v. 216, n. 2, p. 433-441, 1983.

SHAKHER, J.; STEVENS, M. Update on the management of diabetic polyneuropathies. **Diabetes, Metabolism Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 4, p. 289-305, 2011.

SIVITZ, W. Lipotoxicity and glucotoxicity in type 2 diabetes. Effects on development and progression. **Postgraduate Medicine**, v. 109, n. 4, p. 55-64, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes SBD**. 3ª. ed. Irapevi, SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.

SODRÉ, F.; COSTA, J.; LIMA, J. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOUZA, C. et al. Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 56, n. 5, p. 275-284, 2012.

STAMLER, J. et al. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care**, v. 16, n. 2, p. 434-444, 1993.

STERN, M. The insulin resistance syndrome. In: ALBERTI, K., et al. **International textbook of diabetes mellitus**. Chichester: John Wiley & Sons, v. 2, 1997. p. 255-283.

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

TADEU, I. **Impacto da Diabetes *mellitus* tipo 1 na função sistólica do ventrículo esquerdo: Um estudo ecocardiográfico da deformação miocárdica por *speckle tracking***. Universidade da Beira Interior. Castelo Branco: Covilhã. 2014.

TAEGTMEYER, H. et al. Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1015, p. 202-2013, 2004.

TAYLOR, R. Causation of type 2 diabetes -- the Gordian knot unravels. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 7, p. 639-641, 2004.

THULESEN, J. et al. Short term insulin prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 62-68, 1997.

TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do diabetes. **JBM**, v. 102, n. 5, p. 7-12, 2014.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, v. 352, p. 837-853, 1998.

UMRANI, D. N.; BODIWALA, D. N.; GOYAL, R. K. Effect of sarpogrelate on altered STZ-diabetes induced cardiovascular responses to 5-hydroxytryptamine in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 249, n. 1-2, p. 53-57, 2003.

WANG, C. et al. Impact of increasing alanine aminotransferase levels within normal range on incident diabetes. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 111, p. 201-208, 2012.

WEIDE, L.; LACY, P. Low-dose streptozotocin-induced autoimune diabetes is islet transplatation model. **Diabetes**, v. 40, n. 9, p. 1157-1162, 1991.

WILKINSON, C. et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. **Ophthalmology**, v. 110, n. 9, p. 1677-1682, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global reports on diabetes.** 1. ed. Geneva: World Health Organization, 2016.

YOUSSEF, W.; MCCULLOUGH, A. Diabetes mellitus, obesity and hepatic steatosis. **Seminars in Gastrointestinal Disease**, v. 13, p. 17-30, 2002.

ZHANG, Y. et al. Glycosylated hemoglobin in relationship to cardiovascular outcomes and death in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42551, 2012.