

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA

Carlos Eduardo Diaz Jacques

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE HIPERGLICEMIA
NEONATAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Porto Alegre

2013

Carlos Eduardo Diaz Jacques

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE HIPERGLICEMIA
NEONATAL INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Farmácia/UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do título de
Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Co-orientadora: M.Sc. Andrea Pereira Rosa

Porto Alegre

2013

Dedico este trabalho a minha mãe, Maira,
pelo amor, pelo apoio e incentivo incondicionais,
e pelo exemplo de pessoa que foi. Se hoje eu estou aqui, é por ti!

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”

Sócrates

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e todos seus professores, pelo ensino público e de qualidade.

A minha família, em especial a minha irmã, Taiane, e minha “vó do coração”, Estela, por serem duas verdadeiras mães durante toda minha vida. Eu sei que sou muito “sin verguenza”, mas vocês sabem que eu amo vocês!

Aos meus amigos! Àqueles que eu já tinha e também àqueles que eu conquistei durante esses cinco anos e meio de faculdade. Especialmente ao trio Gabi, Gaby e Gabriel. Vocês tornaram a experiência da graduação muito mais fácil de ser encarada. Muito obrigado! Vocês todos fizeram parte da minha vida e tenho certeza que dela não sairão tão cedo!

Ao meu orientador, Dutra. Obrigado pelo apoio e por me já me orientar há mais de três anos. E que venham mais dois no mestrado!

Às meninas do laboratório, Tarsila, Caroline, Priscila, Juliana, Giovana, Melaine, Julia, Kelen e Raylane. Obrigado por me ensinarem, me ajudarem, me puxarem as orelhas... Enfim, obrigado por terem me ensinado o que é a pesquisa. Mas principalmente, obrigado pela amizade de todas!

E por fim, um agradecimento especial a minha co-orientadora, Andrea. Foram dois anos sendo teu bolsista, meio ano tu sendo minha co-orientadora, mas todo o tempo sendo amigos! Obrigado pela paciência e disponibilidade em me ajudar em tudo. Com certeza este trabalho não existiria sem ti!

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista “Metabolic Brain Disease”
apresentadas em anexo.

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO ANIMAL DE HIPERGLICEMIA NEONATAL
INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Carlos Eduardo Diaz Jacques ¹ , Andrea Pereira Rosa ² , Carlos Severo Dutra-Filho* ^{1,2}

¹ *Departamento de Bioquímica – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade
Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS – Brasil*

² *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica – Universidade Federal
do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS – Brasil*

* Autor Correspondente

Endereço para correspondência:

Carlos Severo Dutra Filho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo

CEP 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +55 51 33085575

Fax: +55 51 33085535

E-mail: dutra@ufrgs.br

Resumo

O Diabetes Neonatal é uma doença rara, caracterizada pela presença de hiperglicemia antes dos seis primeiros meses de vida. Os principais sintomas são: retardo no crescimento intrauterino, baixo peso, déficit no desenvolvimento corporal, febre, desidratação e cetoacidúria. Apenas recentemente esta patologia começou a receber mais atenção da comunidade científica, sendo que a maioria dos estudos atuais envolvem apenas relatos de casos, com uma abordagem basicamente clínica. Diversos modelos de Diabetes Mellitus do tipo I e tipo II já existem em animais, entretanto, não há relatos de modelos em roedores que mimetizem as condições de hiperglicemia em neonatos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi padronizar, em ratos de cinco dias de vida, um modelo de hiperglicemia neonatal. Utilizou-se como droga de escolha a estreptozotocina na dose de 100 mg/kg de peso corporal que foi a dose mínima capaz de produzir um estado hiperglicêmico. A medida dos níveis glicêmicos dos animais foi realizada diariamente, de modo que estes foram notadamente maior nos animais submetidos à droga do que nos animais do grupo controle. Além disso, realizou-se a dosagem de insulina plasmática, a fim de confirmar a ação diabetogênica da estreptozotocina. Os ratos nos quais foi administrada esta substância, ao final de cinco dias, tiveram uma redução significativa nos níveis deste hormônio. Tendo em vista estes resultados, conclui-se que o modelo aqui proposto foi eficaz e espera-se que este possa ser utilizado pela comunidade acadêmica, visando estudar e esclarecer diversos aspectos fisiopatológicos do Diabetes Neonatal ainda não elucidados.

Palavras-chave: Diabetes Neonatal, Hiperglicemia Neonatal, Estreptozotocina, Modelos Animais

Introdução

O Diabetes Neonatal (DN) é uma doença rara, com uma incidência mundial de 1:300000 a 1:500000 nascimentos (Aguilar-Bryan e Bryan 2008). Ela é caracterizada pelo aumento dos níveis glicêmicos antes dos seis primeiros meses de vida, sendo necessária a insulino-terapia além de uma dieta hipercalórica (Polak e Cavé 2007). Esta hiperglicemia, quando desaparece espontaneamente algumas semanas depois, é classificada como Diabetes Neonatal Transitória (DNT), que no total abrange de 50 a 60% dos casos de DN (Polak e Shield 2004). Quando os índices glicêmicos permanecem elevados e persistem pelo resto da vida, denomina-se de Diabetes Neonatal Permanente (DNP). Os principais sintomas do DN são: retardo no crescimento intrauterino, baixo peso, déficit no desenvolvimento corporal, febre, desidratação e cetoacidúria (Fosel 1995), sendo que há diferença na incidência de manifestação destes sintomas entre pacientes com DNT e DNP (Polak e Cavé 2007).

A etiologia do DN é de fundo genético, no qual mutações em genes envolvidos com a homeostasia da glicose acabam, finalmente, por aumentar a glicemia – o que caracteriza a doença (Suzuki et al. 2006; Valampampil et al. 2009). Existem diversas mutações genéticas que causam o DN, sendo que as principais são em genes: envolvidos no desenvolvimento do pâncreas, no processamento da insulina, na liberação da insulina e na apoptose das células β -pancreáticas (Aguilar-Bryan e Bryan 2008). Entretanto, um dos principais problemas no diagnóstico do DN é a diferenciação do Diabetes Mellitus do tipo I (DMI). Vários estudos indicam que no DN não há destruição das células β -pancreáticas por auto-anticorpos como no DMI (Edghil et al. 2006; Gach et al. 2007), sendo esta a principal diferença etiológica entre as duas patologias.

Na prática clínica, o tratamento do DN é basicamente a insulino-terapia. A administração de insulina exógena é capaz de normalizar os níveis glicêmicos independente de onde se origina o déficit endógeno que acaba por aumentar a glicose sanguínea (Aguilar-Bryan e Bryan 2008). Entretanto, em determinados casos pode-se utilizar como alternativa à insulina o uso de hipoglicemiantes orais, como as sulfonilureias (SU). O DN, dentre as suas mais heterogêneas etiologias, pode ser originado por mutações que alteram os canais de K^+ ATP-sensíveis, que são responsáveis pela secreção de insulina do pâncreas, visto que são fundamentais na atividade elétrica celular (Bryan et al. 2005; Gurgel e Moises 2008). Em pacientes nos quais já houve um estudo de investigação do DN a nível molecular e cuja causa é derivada de mutações no canal de K^+ ATP-sensível, pode-se administrar, a critério clínico,

medicamentos como as SU (Flechtner et al. 2008). Esta classe de fármacos é utilizada para o tratamento do Diabetes Mellitus tipo II e atua fechando os canais de K^+ ATP-sensíveis independentemente do ATP, provocando a liberação da insulina das células do pâncreas. Ainda na década passada, Pearson et al. (2006) mostraram em seu estudo que aproximadamente 90% dos pacientes com DN que substituíram a insulina pelas SU conseguiram reduzir e manter os níveis glicêmicos.

Nos últimos anos, o número de trabalhos relacionados ao DN tem aumentado expressivamente, principalmente em revistas de pediatria e neonatologia. Entretanto, os estudos são basicamente clínicos, e há poucos relatos de investigação do efeito deletério da hiperglicemia sobre órgãos e tecidos neste período tão importante que é o neonatal, visto que, para muitos deles, seriam necessárias investigações *post-mortem*. Uma das razões para esta carência de mais estudos que elucidem a fisiopatologia do DN pode ser o fato de que não existe um modelo em animais que mimetize as condições metabólicas de pacientes com hiperglicemia neonatal.

As principais drogas atualmente utilizadas para a indução de hiperglicemia em modelos animais são a estreptozotocina (STZ) e o aloxano (ALX). Ambas são moléculas análogas à glicose, e acabam – ainda que por diferentes mecanismos intracelulares – destruindo as células β -pancreáticas (Lenzen 2008). Ambos apresentam vantagens e desvantagens quanto ao seu emprego, sendo que, comparativamente, a STZ torna-se a droga diabetogênica de escolha, dada a sua elevada estabilidade química em comparação ao ALX (Lenzen e Munday 1991; Lenzen 2008), sendo capaz de manter-se estável por até uma hora, enquanto o ALX degrada-se em torno de 15 minutos.

Considerando a importância de se avaliar a fisiopatologia do DN e os efeitos tóxicos em órgãos e tecidos provocados pela hiperglicemia em pacientes neonatos, e que não há relatos da existência de um modelo animal capaz de viabilizar a realização de mais estudos nesta área, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de hiperglicemia neonatal em ratos, utilizando como droga de indução a estreptozotocina.

Materiais e Métodos

Materiais

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma/Aldrich®. Um espectrofotômetro de feixe duplo com controle de temperatura (SpectraMax/M5[°]® - Molecular Devices, LLC) foi utilizado para as leituras absorciométricas. Para a medida da glicemia, utilizou-se um glicosímetro Accu-Check® Performa Nano (Roche Diagnostics®).

Animais

Ratos Wistar de cinco dias de vida, de ambos os sexos, nascidos no CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório) do Departamento de Bioquímica/UFRGS foram utilizados. O número de animais foi calculado utilizando-se o software MiniTab®, com um poder do teste de 80% e significância de 0,05. Mantiveram-se os animais com as mães até o momento do sacrifício – excetuando-se um curto período de jejum. As mães mantinham livre acesso à água e ração contendo 20% de proteínas. A sala apresentava controle de temperatura (22°C ± 1) e de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas). Durante todos os procedimentos, seguiu-se o “NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Publicado em NIH # 80-23, revisado em 1996) e os princípios estabelecidos pela Declaração de Helsinki (1964 e posteriores alterações).

Delineamento experimental

Para a indução da hiperglicemia neonatal através da estreptozotocina (STZ), oito horas antes de sua administração, os animais foram postos em jejum, a fim de melhorar a atuação da droga. A STZ age ligando-se nos receptores GLUT2 (“*Glucose Transporter 2*”) das células β-pancreáticas, sendo internalizada e provocando a apoptose celular (Szkudelski 2001). O jejum no momento da administração reduz a competição com a glicose por esse receptor, facilitando e aumentando a efetividade da STZ. A solução de STZ foi preparada logo antes de sua administração em uma mistura contendo 80% de solução salina e 20% de tampão fosfato de sódio 20 mM. Foi feita a administração intraperitoneal nos animais do grupo Diabético, enquanto no grupo Controle apenas o veículo foi administrado. Doze horas após a indução, foi injetada glicose na dose de 2 mg/g de peso corporal, intraperitonealmente. Isso se deve ao fato de que a liberação em grandes quantidades de insulina pelas células apoptóticas do pâncreas causa uma hipoglicemia grave, que pode ser fatal. Para fins de controle, a glicose foi administrada em ambos os grupos. Por fim, foi realizada a medida glicêmica diária dos animais, para demonstrar a intensidade da hiperglicemia. Ao final de cinco dias após a

administração de STZ, os animais foram sacrificados. Um resumo do modelo proposto pode ser visto na **Fig. 1**.

Escolha da dose de STZ

A proposta deste trabalho era de induzir uma hiperglicemia consistente, com uma única dose de STZ e que esta fosse a menor possível – a fim de diminuir uma possível mortalidade dos animais. Para tanto, realizou-se uma pesquisa bibliográfica em artigos que relatavam diabetes induzida por STZ em ratos adultos e a dose encontrada foi de 55 mg/kg de peso corporal (Ulus et al. 2003). Conforme se observa na **Fig. 2**, não houve diferença significativa entre a média glicêmica (durante quatro dias) dos ratos do grupo Controle e do grupo Diabético. Com isso, realizou-se uma curva de dose de STZ, acrescentando-se as dosagens de 75 mg/kg e 100 mg/kg.

Medida da insulina plasmática

Para verificar a capacidade do modelo proposto de elevar a glicemia mimetizando as condições de baixa insulina encontrada nos pacientes com DN, foi realizada a dosagem da insulina plasmática. Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina 75 mg/kg e xilasina 10 mg/kg. O sangue foi coletado por punção cardíaca e disposto em tubos contendo heparina sódica e centrifugado a 2000 g por 20 minutos para a separação do plasma. Logo após, sacrificaram-se os animais por decapitação. Realizou-se a dosagem da insulina no plasma por ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche, utilizando-se o kit “Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit” (Crystal Chem. Inc®)

Análise estatística

Os resultados foram analisados por teste *t*-Student ou Análise de Variância (ANOVA) de uma-via seguida do Teste de Tukey. As análises foram realizadas no software GraphPad® e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

No presente estudo, objetivamos desenvolver e padronizar um modelo de hiperglicemia em ratos neonatos, utilizando a STZ como droga indutora. O objetivo inicial foi descobrir a dose mínima efetiva de STZ. A **Fig. 2** mostra a ausência de diferença entre a média glicêmica do

grupo Controle e do grupo Diabético quando testada a menor dosagem de 55 mg/kg, a menor encontrada na literatura. Em função disso, realizou-se uma curva de dose de STZ. A **Fig. 3** mostra que a dose mínima efetiva foi de 100 mg/kg [$F(3) = 16,38$; $p < 0,001$].

A média glicêmica diária dos animais submetidos à dose de STZ de 100 mg/kg de peso corporal pode ser vista na **Fig. 4 a e b**. Excetuando-se o primeiro dia após a indução do modelo – onde há a queda acentuada da glicemia dos animais –, em todos outros os valores da glicose sanguínea dos ratos do grupo Diabético encontraram-se bastante elevados em relação ao grupo Controle, diferença que pode ser observada no gráfico comparativo das Áreas Sob a Curva (AUC) [$T(3) = 15,93$; $p < 0,001$].

Por fim, o efeito do modelo de hiperglicemia neonatal nos níveis de insulina pode ser visto na **Fig. 5**. Os animais do grupo Diabético tiveram significativa diminuição na concentração de insulina plasmática [$T(6) = 4,631$; $p < 0,01$].

Discussão

Recentemente, o número de publicações em periódicos relatando casos de DN e efeitos fisiológicos provocados pela hiperglicemia em pacientes neonatos vem aumentando expressivamente (Polak e Shield 2004; Polak e Cave 2007; Aguilar-Bryan e Bryan 2008; Flechtner et al. 2008; Greeley et al. 2010). Todavia, estes estudos são basicamente relatos clínicos, de modo que ainda se desconhecem com detalhes os mecanismos deletérios da hiperglicemia neonatal. O DMI e outras condições de hiperglicemia em adultos já possuem modelos animais em roedores muito bem estabelecidos (Ulusu et al. 2003; Kabay et al. 2009; Cumaoglu et al. 2011), mas existem pouquíssimos estudos envolvendo diabetes em animais no período neonatal. Com isso, este trabalho objetivou desenvolver e padronizar um modelo de hiperglicemia em ratos neonatos, a fim de que este possa ser utilizado e reproduzido pela comunidade científica.

A STZ é uma molécula análoga à glicose, conforme pode ser visto na **Fig. 6**. Conhecido fármaco antineoplásico para o tratamento de tumores pancreáticos (White 1963; Schein et al. 1967; Schein et al. 1974), foi primeiramente relatada como um possível droga diabetogênica por Rakieten et al. (1963). Quando administrada, ela é internalizada pelas células β do pâncreas através do receptor GLUT2 (Karunanayake et al. 1976) através de uma ligação de

baixa afinidade (Tjälve et al. 1976). Com isso, para a indução o modelo apresentado, visou-se a diminuir previamente os níveis fisiológicos de glicose – através do jejum de oito horas que os animais foram submetidos previamente à administração de STZ –, a fim de aumentar a interação fármaco-receptor e, conseqüentemente, uma maior chance de induzir a hiperglicemia nos animais.

Após sua entrada na célula, a STZ causa a apoptose por uma cascata de diferentes eventos, mas que são engatilhados pela atividade alquilante da molécula presente na sua porção *N*-metil-*N*-nitrosureia (Schein e Loftus 1968; Uchigata et al. 1982; Pieper et al. 1999). Esta atividade causa dano ao DNA, que acaba gerando uma profunda diminuição nos níveis de ATP intracelular, levando, por fim, à morte celular (Heller et al. 1994; Elsner et al. 2002). Conseqüentemente, há a liberação dos estoques de insulina presentes dentro das células β que se romperam e, ao alcançar o sistema circulatório, rapidamente desenvolve-se uma intensa hipoglicemia (Lenzen 2008). Em nosso estudo, a média glicêmica dos animais do grupo Diabético 12 horas após a administração da droga foi inferior ao limite de detecção do glicosímetro (10 mg/dL), ou seja, níveis severamente baixos. Para reduzir a mortalidade destes animais administrou-se glicose na dose de 2 mg/g de peso corporal, o que elevou o nível sanguíneo deste açúcar e reduziu os riscos aos animais.

Diante da elevada toxicidade da STZ e o período de vida dos animais utilizados, a intenção deste modelo era utilizar a menor dose possível em apenas uma administração. Diversos modelos de DMI em ratos e camundongos utilizam-se de múltiplas administrações, em doses menores (Beattie et al. 1980; Weide e Lacy 1991; Wang e Gleichmann 1998) e outros administram doses maiores porém únicas (Ito et al. 1999; Hayashi et al. 2006). Revisando a literatura, a menor dose única de STZ capaz de levar animais adultos a um estado hiperglicêmico consistente foi de 55 mg/kg de peso corporal (Ulus et al. 2003). Entretanto, ao testar esta dose nos animais neonatos, verificou-se não ter havido diferenças significativas com relação à glicemia em comparação ao grupo Controle. Ao realizar um Teste de Tolerância à Glicose (dados não mostrados) com os animais expostos a esta dosagem, os níveis glicêmicos levaram mais tempo para voltar aos valores basais; apesar disso, ao final de duas horas após a administração da glicose, a média já se encontrava muito próxima à do grupo não tratado com STZ. Presume-se assim, haver uma possível diminuição no conteúdo de insulina pancreática (Takada 2007), mas não suficiente para elevar patologicamente a glicemia dos ratos testados. Levando isto em conta, duas outras doses maiores foram testadas,

e dentre elas, a menor dose capaz de induzir a hiperglicemia, foi a de 100 mg/kg de peso corporal. Esta dosagem necessária foi surpreendentemente maior do que o esperado, visto que recém-nascidos apresentam – para a maioria das drogas – uma grande imaturidade na metabolização de fármacos, o que acaba requerendo doses menores do que as utilizadas em crianças e adultos (Smits et al. 2012).

Cinco dias depois da exposição à STZ, os animais foram sacrificados por decapitação. Ao final deste tempo, a mortalidade dos animais submetidos ao modelo foi de 30% – sempre no período em que os animais encontravam-se hiperglicêmicos. No dia do sacrifício, os plasmas foram coletados para a dosagem de insulina. Os valores significativamente reduzidos deste hormônio nos ratos do grupo Diabético corroboram com o modelo, visto que se sugere uma correlação positiva entre os valores glicêmicos e o grau de destruição das células pancreáticas secretoras de insulina, conforme Szkudelski (2001) teoriza em seu trabalho. Além disso, a redução da concentração plasmática de insulina confere um status de “*diabetes-like*” a este modelo de hiperglicemia neonatal, pois se aproxima inteiramente das características fisiológicas presentes no DN: valores glicêmicos elevados e diminuição de insulina.

Os valores glicêmicos persistentemente elevados, e a diminuição da insulina no plasma confirmam o sucesso na elaboração deste modelo. Este trabalho, através dos seus resultados, mostra que a utilização deste modelo pode ser uma boa estratégia para futuras pesquisas a respeito dos mecanismos que levam a hiperglicemia a ser tóxica em um período tão crucial de desenvolvimento que é o neonatal.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Referências

Aguilar-Bryan L, Bryan J (2008) Neonatal diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29:265-291

Beattie G, Lannom R, Lipsick J, Kaplan NO, Osler AG (1980) Streptozotocin-induced diabetes in athymic and conventional BALB/c mice. *Diabetes* 29:146–150

Bryan J, Crane A, Vila-Carriles WH, Babenko AP, Aguilar-Bryan L (2005) Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. *Curr Pharm Des* 11:2699-2716

- Cumaoglu A, Ozansoy G, Irat AM, Aricioglu A, Karasu C, Ari N (2011) Effect of long term, non cholesterol lowering dose of fluvastatin treatment on oxidative stress in brain and peripheral tissues of streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 654:80-85
- Edghill EL, Dix RJ, Flanagan SE, Bingley PJ, Hattersley AT, Ellard S, Gillespie KM (2006) HLA genotyping supports a nonautoimmune etiology in patients diagnosed with diabetes under the age of 6 months. *Diabetes* 55:1895-1898
- Elsner M, Tiedge M, Guldbakke B, Munday R, Lenzen S (2002) Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia* 45:1542-1549
- Flechtner I, Vaxillaire M, Cave H, Scharfmann R, Froguel P, Polak M (2008) Neonatal hyperglycaemia and abnormal development of the pancreas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22:17-40
- Fosel S (1995) Transient and permanent neonatal diabetes. *Eur J Pediatr* 154:944-948
- Gach A, Wyka K, Malecki MT, Noczynska A, Skupien J, Nazim J, Szalecki M, Bodalski J, Sieradzki J, Mlynarski W (2007) Islet-specific antibody seroconversion in patients with long duration of permanent neonatal diabetes caused by mutations in the KCNJ11 gene. *Diabetes Care* 30:2080-2082
- Greeley SA, Tucker SE, Worrell HI, Skowron KB, Bell GI, Philipson LH (2010) Update in neonatal diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:13-19
- Gurgel LC, Moises RS (2008) Neonatal diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52:181-187
- Hayashi K, Kojima R, Ito M (2006) Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol Pharmaceut Bull* 29:1110–1119
- Heller B, Burkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Muller M, Burkart V, Kolb H (1994) Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375:597-602
- Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Naruse A (1999) New model of progressive non-insulin-dependent diabetes mellitus in mice induced by streptozotocin. *Biol Pharmaceut Bull* 22:988–989
- Kabay SC, Ozden H, Guven G, Ustuner MC, Degirmenci I, Olgun EG, Unal N (2009) Protective effects of vitamin E on central nervous system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Invest Med* 32:314-321
- Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G (1976) Streptozotocin: its excretion and metabolism in the rat. *Diabetologia* 12:483-488
- Lenzen S (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216-226

- Lenzen S, Munday R (1991) Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* 42:1385–1391
- Pearson ER, Flechtner I, Njolstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, et al. (2006) The Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med* 355:467-77
- Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3059-3064
- Polak M, Cave H (2007) Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet J Rare Dis* 2:12
- Polak M, Shield J (2004) Neonatal and very-early-onset diabetes mellitus. *Semin Neonatol* 9:59-65
- Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 29:91–98
- Schein PS, Cooney DA, Vernon ML (1967) The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res* 27:2324–2332
- Schein PS, O’Connell MJ, Blom J et al (1974) Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin (NSC-85998). *Cancer* 34:993–1000
- Schein PS, Loftus S (1968) Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res* 28:1501–1506
- Smits A, Kulo A, de Hoon JN, Allegaert K. (2012) Pharmacokinetics of drugs in neonates: pattern recognition beyond compound specific observations. *Curr Pharm Des* 21:3119-3146
- Suzuki S, Makita Y, Mukai T, Matsuo K, Ueda O, Fujieda K (2007) Molecular basis of neonatal diabetes in Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3979-3985
- Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-546
- Takada J, Machado MA, Peres SB, Brito LC, Borges-Silva CN, Costa CE, Fonseca-Alaniz MH, Andreotti S, Lima FB (2007) Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism* 56:977-984
- Tjälve H, Wilander E, Johansson EB (1976) Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol* 69:455–456
- Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H (1982) Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADPribose) synthetase inhibitors against alloxan- and

streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem* 257:6084–6088

Ulus NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, Bali M, Stefek M, Stolc S, Gajdosik A, Karasu C (2003) Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* 28:815-823

Valamparampil JJ, Chirakkarot S, Savida P, Omana S (2009) Clinical profile and etiology of diabetes mellitus with onset at less than 6 months of age. *Kaohsiung J Med Sci* 25:656-662

Wang Z, Gleichmann H (1998) GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47:50–56

Weide LG, Lacy PE Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. *Diabetes* 1991;40:1157–62

White FR (1963) Streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* 30:49–53

LISTA DE LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1 Resumo esquemático cronológico do modelo de hiperglicemia neonatal proposto.

Fig. 2 Efeito da administração de 55 mg/kg de STZ em ratos neonatos nas médias glicêmicas dos grupos durante quatro dias. Resultados expressos em média \pm DP (n=4). Não foram observadas diferenças significativas (Teste *t*-Student).

Fig. 3 Efeito da administração de STZ em diferentes doses nas médias glicêmicas dos grupos durante quatro dias. Resultados expressos em média \pm DP (n=3). *** $p < 0,001$ comparado ao controle (ANOVA de uma-via seguida de Teste de Tukey).

Fig. 4 (a) Monitoramento da glicemia dos animais submetidos a 100 mg/kg de STZ durante os cinco dias de duração do modelo. Resultados expressos em média \pm DP (n=4). **(b)** Áreas Sob a Curva dos gráficos de monitoramento glicêmico diário dos animais Controle e Diabéticos. Resultados expressos em média \pm DP (n=4). *** $p < 0,001$ comparado ao controle (Teste *t*-Student)

Fig. 5 Concentração de insulina plasmática em animais submetidos ou não ao modelo de hiperglicemia neonatal no quinto dia. Resultados expressos em média \pm DP (n=8-11) ** $p < 0,01$ em comparado ao controle (Teste *t*-Student).

Fig. 6 Estruturas moleculares da glicose **(a)** e da estreptozotocina **(b)**.

FIGURAS

Fig. 1

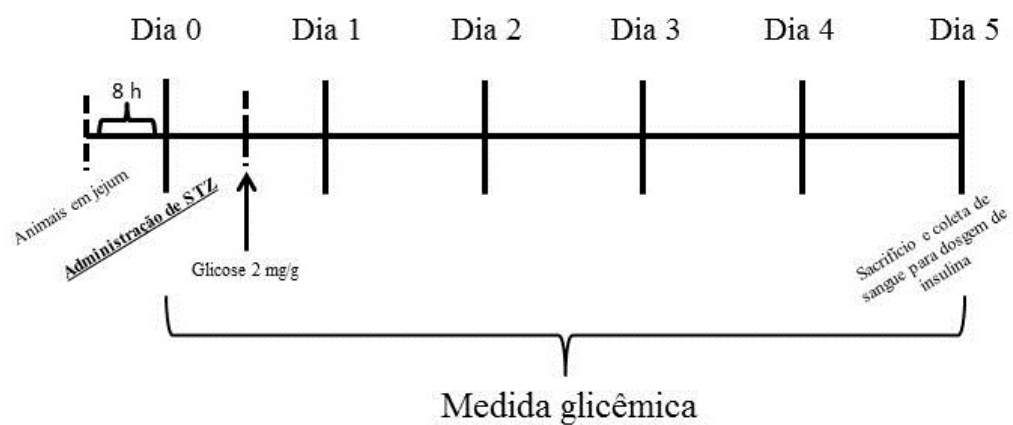


Fig. 2

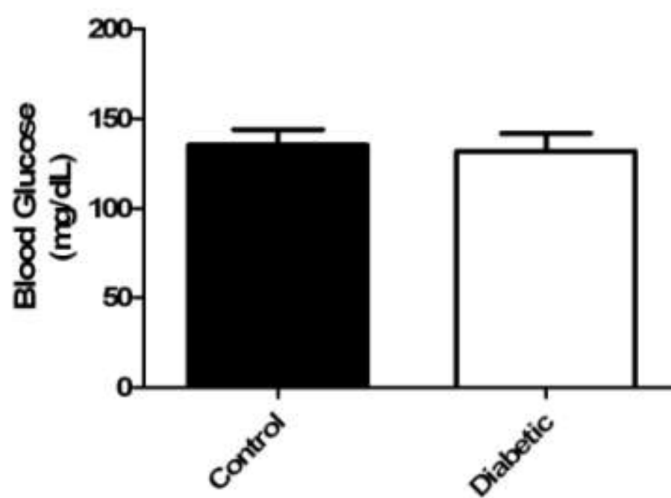


Fig. 3

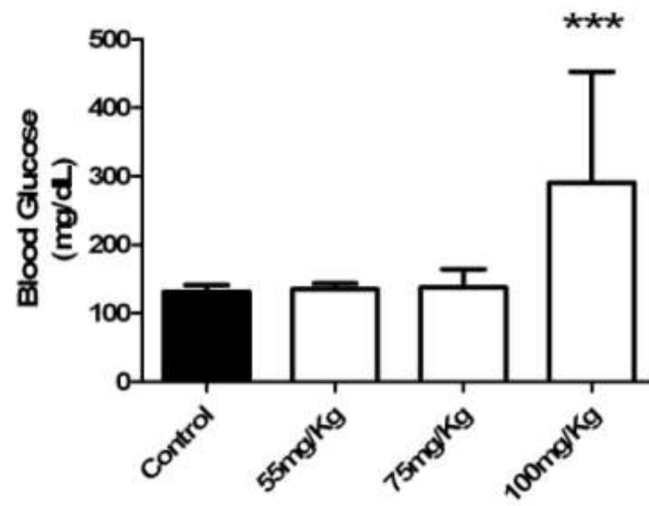


Fig. 4

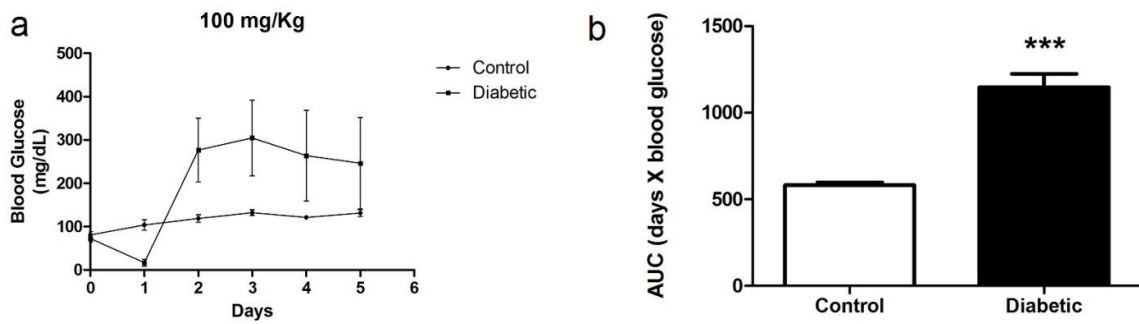


Fig. 5

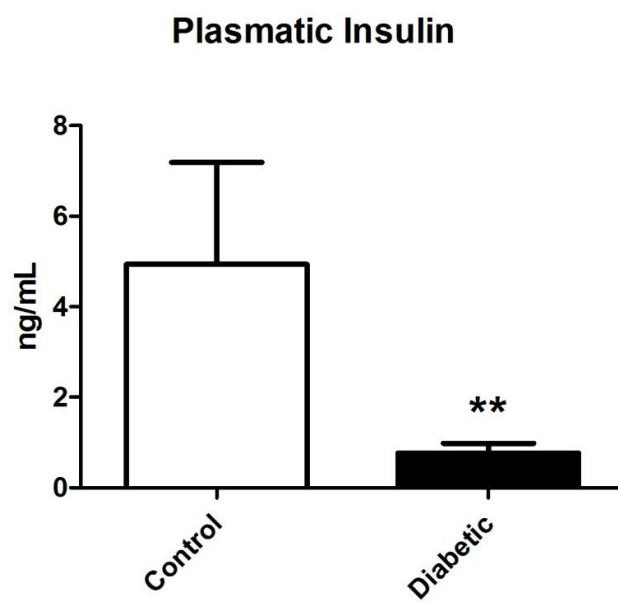
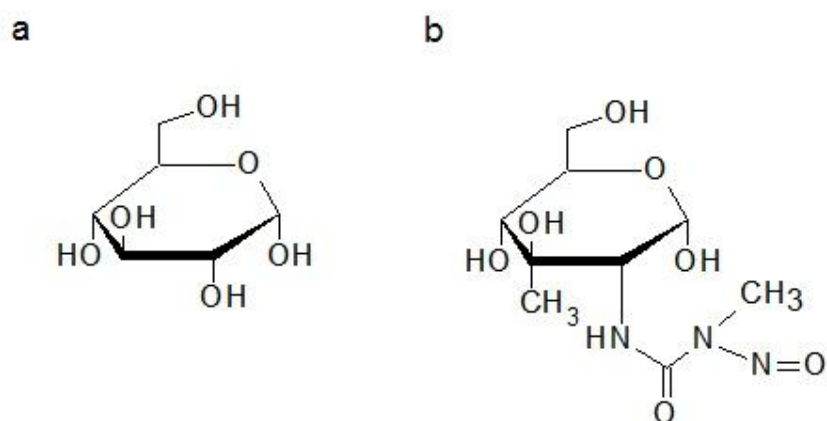


Fig. 6



ANEXO