

POTENCIAL DIABETOGÊNICO DA STREPTOZOTOCINA EM RATOS: UMA REVISÃO DA LITERATURA

DIABETOGENIC POTENTIAL OF STREPTOZOTOCIN IN RATS: A LITERATURE REVIEW

Jefferson Matsuiti Okamoto^{1*}, Matheo Augusto Morandi Stumpf¹, Aryadyne Bueno Rocha Szesz¹, Vivian Missima Jecohti¹, Ana Cláudia Garabeli Cavalli Kluthcovsky¹, Gianna Carla Alberti Schrut¹.

¹Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Medicina, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

*Autor correspondente: Rua: Casemiro Sindorski, 42- Irati-Pr. E-mail:okamotojeff@gmail.com

RESUMO

Devido ao aumento da prevalência do Diabetes Mellitus em diversos países, faz-se necessária a realização de estudos experimentais para o melhor entendimento da sua fisiopatologia. O método químico com utilização prevalente de estreptozotocina para indução de diabetes mellitus em ratos é um dos mais rápidos e de menor custo, sendo esta técnica o foco do presente trabalho. Através de uma minuciosa revisão de literatura, busca-se as descrições atuais do potencial diabetogênico da streptozotocina em ratos. A busca de referências foi realizada nos portais de periódicos MEDLINE e Scielo entre os meses de junho e agosto de 2016. Utilizou-se as seguintes palavras como descritores, em inglês/português: “*streptozotocin; diabetes mellitus; rats*”. A streptozotocina tem sido utilizada em estudos experimentais para induzir o diabetes em modelos animais, porém percebe-se a necessidade de uma padronização em seu uso para que se obtenham resultados mais efetivos durante as pesquisas. Como o resultado final da ação da streptozotocina depende do modelo animal utilizado e também do modo de preparo, via de administração e dose, devemos recordar que todos esses fatores devem ser levados em consideração quando a pesquisa for iniciada, evidenciando a crucial importância de um melhor entendimento de todos os aspectos do mecanismo de ação da streptozotocina na indução do diabetes. O desenvolvimento de mais estudos com o uso de streptozotocina deve ser encorajado, utilizando-se maior amostragem e estirpes mais sensíveis, para que se possa chegar mais próximo de desvendar a completa fisiopatologia do diabetes.

Palavras-chave: Streptozotocina. Diabetes Mellitus. Ratos.

ABSTRACT

Due to the increasing prevalence of Diabetes Mellitus disease in several countries, it is necessary to conduct experimental studies to understand all its pathophysiology. One of the cheapest and fastest ways to induce diabetes in murine models is the chemical method using the streptozotocin as the main substance, technique that is the focus of this study. The research was done by a thorough literature review about the current descriptions to the streptozotocin uses and its relationship with the diabetogenic potential. The data basis used were Scielo and MEDLINE journals web-portals, between June and August 2016, and the keywords (English and Portuguese) were: “*streptozotocin; diabetes mellitus; rats*”. The streptozotocin has widely been using in experimental studies to induce diabetes in animal models. However, it is necessary to have a standardization in its use to achieve the most effective outcome during the research. The results of streptozotocin application depend on the animal model used and also the method of preparation, route of administration and dose. We must consider all of these factors during the experiments, revealing the importance of the knowledge about streptozotocin

to induce diabetes. More studies should be done with streptozotocin, using larger sample and more sensitive strains, in order to unfold the full pathophysiology of diabetes.

Keywords: Streptozotocin. Diabetes Mellitus. Rats.

INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio-chave na absorção de glicose pelas células do corpo. Sua falta absoluta, ou sua ação pouco efetiva na captação de glicose pelas células, pode levar a um quadro hiperglicêmico que, em determinados níveis, caracteriza o diabetes mellitus (DM)¹. Dados da Federação Internacional do Diabetes demonstram que em 2015 existiam aproximadamente 415 milhões de diabéticos no mundo. A perspectiva é que esse número aumente, sendo que cerca de 642 milhões de pessoas terão a doença até 2040².

O diabetes é uma doença que causa preocupação em todo o mundo, mas ainda diversos aspectos relacionados à patogênese do DM permanecem desconhecidos³. Tendo em vista a dificuldade do estudo da doença em seres humanos, vários modelos animais têm sido utilizados e se tornaram fundamentais para tentar entender alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas provocadas em diversos tecidos e órgãos⁴. Os animais mais utilizados são os ratos e especificamente se dividem em dois grandes modelos: os ratos experimentalmente induzidos ao diabetes e os genéticos⁵. Os primeiros podem ser induzidos cirurgicamente (pancreatectomia) ou quimicamente^{5,6}.

Neste trabalho, haverá enfoque especial aos métodos químicos de indução ao DM, por serem mais simples, baratos e acessíveis^{5,6}. A streptozotocina (STZ) é uma das principais substâncias químicas utilizadas devido ao seu grande potencial diabetogênico e pela possibilidade de manutenção do quadro hiperglicêmico em determinadas doses⁷. O objetivo do presente estudo é realizar uma revisão da literatura sobre o potencial diabetogênico da STZ em ratos, com enfoque em seu mecanismo de ação e de sua aplicação na área de pesquisa científica.

MÉTODO

Trata-se de um estudo de revisão da literatura com instruções acerca da STZ para se analisar sua associação com o potencial diabetogênico. As referências bibliográficas usadas foram os portais de periódicos *Medical Literature Analysis and Retrieval System*

Online (MEDLINE) e da *Scientific Electronic Library Online* (SciELO).

Foram acessados os referidos portais, em agosto de 2016, utilizando-se as palavras-chave em inglês e português na seguinte combinação: “*streptozotocin; diabetes mellitus; rats*”, sem limitação de tempo. Ao total foram identificadas 4662 publicações, sendo todas provenientes do portal MEDLINE. Foram incluídos estudos que abordassem a atividade diabetogênica da STZ, selecionando 93 artigos. Desses foram considerados apenas os artigos experimentais que realizassem a indução química *in vivo* e que instruísem como foi feita a indução, levando em consideração modo de preparo, via de administração e a relação entre a dose da droga e o tempo de indução, além de fornecer dados como do modelo animal utilizado (espécie, sexo, idade, peso e estado nutricional). O resultado foi de 20 artigos.

RESULTADOS

A STZ é um derivado da *Streptomyces achromogenes*, apresentando atividade antibiótica e antineoplásica de amplo espectro, além de sua função diabetogênica^{8,9}. Sua estrutura básica é muito semelhante à da glicose, pois ela é facilmente captada pelos transportadores de glicose GLUT-2¹⁰. Como as células β são mais ativas na captação da glicose, os efeitos citotóxicos da STZ também são mais pronunciados nesse local¹¹. A ação tóxica da STZ ocorre por ser um agente alquilante do DNA, fazendo com que a enzima poli (ADP-ribose) polimerase se ative e ocorra depleção de NAD⁺ celular, levando a redução dos níveis de ATP e, conseqüentemente, inibição da produção e secreção de insulina¹².

Também foi documentado que a STZ aumenta os níveis de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio, o que aumenta o dano ao DNA^{13,14}. O resultado final da ação da STZ depende do modelo animal utilizado (espécie, sexo, idade, peso e estado nutricional) e também do modo de preparo, via de administração e dose^{6,7}.

Em geral, a STZ é administrada em baixa temperatura, devido à instabilidade do composto na temperatura ambiente, e em baixo pH, sendo que a máxima estabilidade da droga é conseguida com pH igual a 4^{9,15}. No entanto, foi relatado que as soluções de STZ com pH mais elevado (7,2-7,4) são tão estáveis como aquelas com um pH de 4,5, isso por pelo menos uma hora a 37° C e pH 6,7-7,8 durante 30 minutos a 0° C^{6,16}. A STZ pode ser dissolvida em solução salina acidificada a 0,9%, mas é obtida maior estabilidade da droga em tampão citrato (pH 4,5), sendo mais adequada para aplicação¹⁶.

Existem diversas vias de administração de STZ: intramuscular, subcutânea, intraperitoneal e intravenosa, sendo as duas últimas as mais utilizadas^{6,17,18,19}. Recentemente, em um estudo realizado em ratos Wistar-Furth isogênicos, com dose de 60 mg/kg de STZ, foram avaliadas as vias intraperitoneal e a intravenosa (pela veia caudal e sublingual). Verificou-se que todas as vias geraram níveis semelhantes de severidade e duração do diabetes¹⁷. Porém, houve 30% de falha tanto na via intraperitoneal quanto na sublingual, além de 10% na caudal. Outros estudos, no entanto, obtiveram diabetes duradouro em 100% dos animais que receberam STZ intraperitonealmente na mesma dose¹⁷.

Para os estudos utilizando ratos machos, a injeção na veia peniana é uma outra opção, pois a técnica é mais simples e de maior acessibilidade¹⁸. Dentro de um ciclo circadiano (24hrs), foi verificada a maior incidência de indução do diabetes quando a STZ foi administrada às 16h00 e a menor incidência às 08h00, indicando um ritmo circadiano¹⁹.

Em ratos Wistar as doses podem ser divididas em altas (maiores que 65 mg/kg de peso corporal), intermediárias (40-55 mg/kg) e baixas (menores que 35 mg/kg)⁷. Uma única dose baixa em ratos não produz efeito significativo e uma dose de 35 mg/kg cursa com recuperação espontânea do estado diabético em 25% da amostra⁷.

A doença estável tem sido observada em doses de 55-65 mg/kg⁷; na dose de 65 mg/kg é observado um aumento nos níveis glicêmicos duas horas após a injeção de STZ, mas sem qualquer aumento de insulina sérica. Sete horas após a aplicação ocorre hipoglicemia, com aumento significativo de insulina sérica sem diminuição da insulina plasmática; após 24 horas, estabelece-se o quadro hiperglicêmico. Esse estado metabólico se mantém inalterado após 7 e 28 dias,

sendo que dados similares são observados nas doses de 55 mg/kg⁷. Uma dose de 65 mg/kg independente da via administrada e, em média, induz o diabetes em 14 a 15 dias^{20,21}. A lipemia está presente, porém a cetonúria só é obtida com doses maiores que 100 mg/kg^{7,20,21}.

O desenvolvimento da hiperglicemia nesses ratos, após a injeção de STZ, é consequente da destruição direta das células β pancreáticas e resulta na deficiência de insulina²². Desta forma, a hiperglicemia observada não é decorrente de um quadro de resistência insulínica. Assim sendo, para se chegar mais próximo de um modelo diabético tipo 2, faz-se necessário um quadro de resistência insulínica e deficiência na produção de insulina pelas células β , o que pode ser conseguido com a utilização baixas doses de STZ e dieta hiperlipídica²².

A sensibilidade à STZ é altamente variável em ratos, dependendo da estirpe do animal. Dados mostram que o grau de sensibilidade para STZ, medido pelo nível de glicose no sangue, é DBA/2J > C57BL/6J > MRL/MpJ > 129/SvEv > BALB/c²³ – essas siglas correspondem à nomenclatura utilizada para definir as linhagens consanguíneas dos ratos. Pode-se ainda separar essas estirpes em grupos de baixos respondedores (MRL/ MpJ, BALB/c, e 129/SvEv) e altos respondedores (C57BL/6J e DBA/2J) à STZ.

Em outro estudo foi observado que a menor dose única de STZ necessária para induzir diabetes em ratos C57BL/6J, ICR, ddY e BALB/c é de 100, 100, 125 e 150 mg/kg, respectivamente²⁴. Embora existam essas tendências na sensibilidade dependente da estirpe, alguns subgrupos podem experimentar sensibilidades diferentes para STZ.

Comparadas a ratos machos, as fêmeas são menos afetadas pelos efeitos da STZ, principalmente devido à atividade anti-apoptótica do estradiol²⁵. Em experiências com ratos C57BL/KsJ foi relatada uma diferença altamente significativa entre os valores médios de glicose sanguínea, sendo que a média de glicemia era 200 mg/dL, superior nos machos em relação às fêmeas, 35 dias após a injeção de STZ²⁵.

Quanto ao estado alimentar, protocolos como os do *National Institutes of Health* (NIH) recomendam que o rato esteja em jejum de pelo menos quatro horas antes do tratamento por STZ²⁶. Esse método é justificado, pois acredita-se que a glicose elevada possa competir pelos receptores GLUT-2 com a STZ, diminuindo sua ação diabetogênica¹⁰. Contudo, foi verificado recentemente que a alimentação não causa alterações

na efetividade da indução da STZ à intolerância a glicose, hiperglicemia, disfunção ou perda de células β . Com isso, as repetidas rodadas de jejum/realimentação necessárias para protocolos de administração em ratos de laboratório acabam sendo somente estressantes para o animal e, portanto, desnecessárias²⁶.

As doses de indução da STZ e seu mecanismo de ação já são bem descritos na literatura. Pode-se dizer, então, que se trata de uma droga segura e efetiva de se induzir diabetes em ratos, devendo ser utilizada para tal finalidade. Estudos recentes que utilizam essa maneira de indução objetivam muitas vezes entender a fisiopatologia do DM, ainda obscura.

CONCLUSÃO

A utilização do STZ é uma maneira relativamente rápida de se induzir o DM, tanto tipo 1 quanto 2, em experimentos com ratos. É importante que o pesquisador saiba sua dosagem e que ela varia entre sexos de animais e estirpes distintas. Com essas informações, há menor risco de imperícia numa futura pesquisa.

Sugere-se que sejam realizados estudos com estirpes mais sensíveis à STZ e que avaliem características do DM, que ainda não se tem conhecimento, como o grau de hiperplasia e hipertrofia intestinal, mudança de microbiota, entre outras alterações histológicas diversas que se deseje investigar.

REFERÊNCIAS

- Ozougwu JC, Obimba, KC, Belonwu CD, Unakalamba CB. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Physiol. Pathophysiol.* 2013; 4(4): 46-57.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 7th Ed. [Internet]. [Acesso em 10 de agosto de 2016]. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>.
- Baynest, HW. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab* 2015; 6(5): 1-9.
- King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* 2012; 166: 877-894.
- Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol.* 2012; 933: 161-74.
- Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab. Anim* 2011; 45: 131-140.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation* 1969; 48(11): 2129-2139.
- Herr RR, Eble TE, Bergy ME, Jahnke HK. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot. Annu* 1960; 7: 236-240.
- Bono VHJ. Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas. *Cancer Treat Rep* 1976; 60(6): 699-702.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 1994; 43: 1326-1333.
- Tjälve H, Wilander E, Johansson E. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J. Endocr* 1976, 69: 455-456.
- Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000; 43: 1528-1533.
- Kröncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitrosourea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Chem Hoppe-Seyler* 1995; 376: 179-185.
- Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 1996; 52: 344-347.
- Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005; 52(4): 313-320.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51: 216-226.
- Delfino VDA, Figueiredo JF, Matsuo T, Favero ME, Matni AM, Mocelin AJ. Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. *J. bras. nefrol* 2002; 24(1): 31-36.
- Evan AP, Mong SA, Gattone VH, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC. The effect of streptozotocin and streptozotocin-induced diabetes on the kidney. *Renal physiology* 1984; 7(2): 78-89.
- Candela S, Hernandez RE, Gagliardino JJ. Circadian variation of the streptozotocin-diabetogenic effect in mice. *Experientia* 1979; 35: 1256-1257.

20. Rabelo SB, Villaverde AGJB, Nicolau RA, Salgado MAC, Melo MS, Pacheco MTT. Comparison between the wound healing at induced diabetic and non-diabetic rats after LLLT. *J. Clin Laser Med. Surg* 2006; 24: 474-479.
21. Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg. Med* 2003; 33(5): 344-351.
22. Qinna NA, Badwan AA. Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 2515-2525.
23. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *American journal of physiology* 2006; 290(1): 214-222.
24. Hayashi K, Kojima R, Ito M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2006; 29(6): 1110-1119
25. Leiter EH. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982; 79(2): 630-634.
26. Chaudhry ZZ, Morris DL, Moss DR, et al. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Laboratory animals* 2013; 47(4): 257-265.