

**Vanessa Ramos Kirsten**

**CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL  
NOD (*NONOBESE DIABETIC*) EM AMBIENTE CONVENCIONAL**

**Porto Alegre**

**2006**

VANESSA RAMOS KIRSTEN

**Caracterização do modelo experimental  
NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da PUCRS para a obtenção do título de Mestre em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração Nefrologia.

**Orientador: Prof. Dr. David Saitovitch**

**Porto Alegre**

**2006**

## Ficha Catalográfica

K61c **Kirsten, Vanessa Ramos**

Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional / Vanessa Ramos Kirsten; orient. David Saitovich. Porto Alegre: PUCRS, 2005.

97 f.: il. graf. tab.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Nefrologia.

1. DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL. 2. INCIDÊNCIA DE DIABETES. 3. CAMONDONGOS NOD. 4. Modelos animais. I. Saitovich, David. II. Título.

C.D.D. 616.462

C.D.U. 616.379-008.64:599.323.4(043.3)

N.L.M. WK 810

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia/Bibliotecária

CRB10/I96

**VANESSA RAMOS KIRSTEN**

**Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic)  
em ambiente convencional**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Medicina da PUCRS para  
a obtenção do título de Mestre em  
Medicina e Ciências da Saúde, área de  
concentração Nefrologia

Aprovada em 20 de Janeiro de 2006

Dra. Denise Cantareli Machado - PUCRS

---

Dr. Ivan Carlos Ferreira Antonello - PUCRS

---

Dra. Nance Nardi – UFRGS

---

*Dedico este trabalho à minha família  
Que trabalhou em dobro,  
Sacrificou seus sonhos em favor dos meus,  
Que não foram somente pais e irmão,  
Mas meus melhores amigos...  
A vocês toda a minha gratidão.*

*Ao meu amor Ricardo ...  
Por ser incentivador de todas as minhas causas,  
E me fazer sentir tão bem amada...*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu querido amigo, orientador e mestre David Saitovitch, por ter sido a primeira pessoa a acreditar no meu potencial, ter me acolhido com toda a sua generosidade, humildade e sabedoria. Serei eternamente grata pela ajuda, orientação, amizade e pelos diversos ensinamentos. OBRIGADA POR TUDO.

A minha grande amiga, colega, mestra, Patrícia Sesterheim. Amiga e profissional que me ensinou tudo sobre bioterismo e ciência dos animais de laboratório. Com certeza, és a maior colaboradora deste trabalho. Obrigada por sempre estar ao meu lado, dando forças, ensinando, lutando por mim. ESTE TRABALHO NÃO TERIA SIDO REALIZADO SEM A TUA AJUDA!!!

A Família de Gravataí: João Ricardo Bittencourt, Aline Duran Bittencourt, Beatriz Bittencourt, Maria Bittencourt, Elida Duran da Silveira, Acrimar Lopes da Silveira e Élen Duran da Silveira. Vocês me acolheram como se fossem meus pais e irmãos de verdade e me proporcionaram um lar repleto de carinho e ternura. Fizeram com que eu pudesse me sentir em casa, e este sentimento não tem preço. Vocês fazem parte deste momento tão importante da minha vida e serei eternamente grata por tudo. OBRIGADA DE CORAÇÃO.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas e serviços que possibilitaram a realização deste trabalho:

Agradeço ao Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), por ser um local com profissionais acolhedores e prestativos. Agradeço em especial aos médicos nefrologistas e professores da Pós-Graduação: Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Domingos D'Avila e Ivan Carlos Antonello pelo aprendizado, companheirismo, amizade e apoio nestes dois anos de convivência.

Aos colegas do curso de Nefrologia: Dirceu, Florence, Iara, Karine, Sheila e Salvador, pelos momentos de coleguismo, trocas, momentos de diversão e alegria. Em especial ao colega Giovane Gadonski pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Aos professores da pós-graduação, em especial ao Professor Mário Bernardes Wagner pelo apoio bioestatístico e pelos conselhos profissionais.

A secretaria da Pós Graduação, em especial a Sônia e ao Maurício, pelos serviços prestados sempre com muita agilidade, organização, coleguismo e bom humor.

Ao serviço da Biblioteca da Faculdade de Medicina do HSL da PUC, pelo serviço prestativo.

A PUC e ao Hospital São Lucas, pela educação de qualidade e serviços de excelência que ofertam aos seus alunos.

Ao CEDEME (Centro de desenvolvimento de modelos experimentais) da UNIFESP pelo fornecimento dos camundongos NOD.

A Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), em especial a Coordenação de Produção e Experimentação Animal (CPEA) pelo abrigo aos atores principais deste trabalho.

“Aos bioteristas, que com seu senso ético, profissionalismo e habilidade proporcionam conforto e bem-estar aos animais de laboratório, contribuindo significativamente para o desenvolvimento da pesquisa, do ensino, da produção e do controle de imunobiológicos e fármacos na área da ciência e tecnologia em saúde”.  
(Antenor Andrade)

A Luísa Macedo Braga pelo carinho e ajuda, e a Marta Speck, por ter sido o anjo da guarda dos camundongos NOD, uma das principais colaboradoras deste estudo.

Aos colegas da Especialização Gabriela, Graciela, Ceres e Rafael Soares, por terem plantado a sementinha da pesquisa na minha vida.

A UNIFRA, por ter acreditado em mim, e ter disponibilizado minha iniciação na carreira docente.

Aos colegas de trabalho, em especial Professora Marizete Mesquita de Oliveira e Professor Thiago Durand Mussoi, por entenderem momentos de ausência e colaborarem para o andamento final deste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

*“Descobri como é bom chegar  
quando se tem paciência,  
e para se chegar onde quer que seja,  
aprendi que não é preciso dominar a força,  
mas a razão.  
É preciso, antes de mais nada, querer.*

*Um dia é preciso parar de sonhar,  
Tirar os planos das gavetas e,  
De algum modo, partir...”*

*(Almir Klink)*

## RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença auto-imune mediada por células T. Os camundongos NOD (nonobese diabetic) são o modelo experimental de doença auto-imune órgão-específica mais utilizado em todo o mundo. Apresentam destruição das células beta associada com insulite e produção de auto-anticorpos. A incidência de diabetes nestes camundongos é variável, dependendo do ambiente em que estão alocados, assim como do sexo dos mesmos. Dados na literatura demonstram que em biotério SPF (*Specific Pathogen Free*), a incidência de diabetes em fêmeas varia de 60 a 100% e em machos de 20 a 60%. No entanto, não são descritos valores de incidência de diabetes nestes camundongos em biotério convencional. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a incidência de diabetes mellitus insulino-dependente de camundongos NOD em biotério convencional, além de verificar a sobrevida dos animais. Três casais de camundongos NOD foram endocruzados para a obtenção dos animais desta pesquisa. Setenta e nove machos e 58 fêmeas foram acompanhadas durante 32 semanas de vida em biotério convencional. Peso e glicemia foram mensurados após o desmame, a cada 15 dias, e as mortes contabilizadas. Foram considerados diabéticos, os animais que apresentavam glicemia acima de 250mg/dl. Em 32 semanas de seguimento, 38% da amostra tornou-se diabética; as fêmeas (51%) tornaram-se significativamente ( $P<0,001$ ) mais diabéticas do que os machos (27%). Além disso, verificou-se que o início do diabetes, em ambos os sexos, ocorreu por volta da oitava semana de vida. A sobrevida dos camundongos NOD em biotério convencional, em 32 semanas de vida, foi de 60%, as fêmeas tiveram sobrevida de aproximadamente 40% e os machos de 85%, sendo esta diferença significativa ( $P<0,02$ ). Conclui-se que, em ambiente convencional, os camundongos NOD do sexo feminino desenvolvem mais diabetes que os machos, similarmente aos camundongos NOD criados em biotério SPF. As fêmeas possuem sobrevida menor que os machos, provavelmente devido a presença do diabetes. Desta forma, verifica-se que, mesmo em ambiente convencional, é possível que camundongos NOD, apresentem diabetes em proporções que possibilitem sua utilização experimental.

**Palavras-chave:** camundongos NOD, diabetes espontâneo, incidência de diabetes, ambiente convencional.

## **ABSTRACT**

Type 1 diabetes is an autoimmune disease mediated by T cells. Nonobese diabetic mice (NOD) are the most important experimental model of organ specific autoimmune disease. These animals develop beta cells damage associated to insulinitis and autoantibodies, and diabetes similar to the human type 1 diabetes. The incidence of diabetes in NOD mice is not constant, depending on gender and environment. Recent publications demonstrated that in germ free environment (SPF), the incidence of diabetes in females ranges from 60 to 100%, and from 20 to 60% in males. However, there are no data describing the incidence of diabetes employing this model in conventional environment. The aim of this study was to verify the incidence of diabetes in NOD mice placed in conventional environment, as well as to verify the survival of these animals. Initially, three NOD couples were bred to produce offsprings for the research. During 32 weeks, 79 males and 58 females were followed. Every 15 days, weaning, non-fasting glucose blood levels and body weight were measured and the number of deaths were registered. Diabetes was considered in those animals presenting glucose blood levels above 250 mg/dl. After 32 weeks, 38% of these animals became diabetic. The incidence was significantly higher in females (51%) when compared to males (27%,  $P < 0,05$ ). Moreover, diabetes diagnosis was made around the 8<sup>th</sup> week in both genders. The total NOD mice survival in eight months was 60%. Survival was significantly higher in males (85%) than in females (60%,  $P < 0,05$ ). In conclusion, the incidence of diabetes in females NOD mice in conventional environment is significantly higher than in males, similarly to what is observed in germ free environment. Females Survival is lower in females than males, probably related to higher incidence of diabetes. Therefore, these data demonstrate that, even in conventional environment NOD mice breed grow and develop diabetes in an acceptable rate, which allows its experimental use.

**Key words:** NOD mice, spontaneous diabetes, diabetes incidence, survival, conventional environment .

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DO DIABETES MELLITUS TIPO 1 .....	16
1.1.1 Epidemiologia .....	17
1.1.2 Patogênese do diabetes mellitus tipo 1 .....	19
1.1.3 Complicações .....	22
1.1.4 Tratamento e futuras perspectivas .....	23
1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS .....	25
1.2.1 Modelos experimentais de diabetes .....	28
1.2.2 Diabetes experimental induzido quimicamente .....	29
1.2.3 Diabetes experimental espontâneo .....	30
1.3 CAMUNDONGOS NOD .....	31
1.3.1 Background da linhagem NOD .....	31
1.3.2 Processo inflamatório .....	33
1.3.3 Características do diabetes no modelo experimental NOD .....	35
1.3.4 Suscetibilidade para o desenvolvimento do dm1 nos camundongos NOD .....	35
1.3.5 Divergência entre o sexo .....	41
1.4 HIPÓTESES DO TRABALHO .....	44
2 OBJETIVOS .....	45
2.1 OBJETIVO GERAL .....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
3 METODOLOGIA .....	46
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	46
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
3.2.1 Animais .....	46
3.2.2 Produção e manutenção da linhagem NOD .....	46
3.2.3 Características ambientais do biotério convencional .....	49
3.2.4 Aferição de peso e glicemia .....	51
3.2.5 Transplante cutâneo .....	53
3.3 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS .....	55
3.4 TREINAMENTO DAS TÉCNICAS .....	56
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
4 RESULTADOS .....	58
4.1 ACASALAMENTOS E NÚMERO DE FILHOTES .....	58

---

4.2 PESO DOS CAMUNDONGOS NOD.....	58
4.3 GLICEMIA DOS CAMUNDONGOS NOD.....	60
4.4 OCORRÊNCIA DE DIABETES NOS CAMUNDONGOS NOD.....	62
4.5 SOBREVIDA .....	64
4.6 TRANSPLANTE CUTÂNEO.....	68
5 DISCUSSÃO .....	70
CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXOS .....	92

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Aumento da incidência de diabetes tipo 1 em crianças com idade menor a 14 anos .....	18
Figura 2. Modelo de patogênese e história natural dos diabetes tipo 1 .....	22
Figura 3. Camundongos NOD .....	32
Figura 4. Incidência de DM1 em camundongos NOD em alguns laboratórios .....	42
Figura 4a: Laboratório Taconic.....	42
Figura 4b: Laboratório Jackson .....	43
Figura 4c: Colônia Ba - St.Bartholomew's Hospital Medical College .....	43
Figura 5: Fichas de identificação .....	48
Figura 6: Pesagem dos Camundongos NOD .....	52
Figura 7: Mensuração da glicemia .....	53
Figura 8. Transplante Cutâneo.....	55
Figura 9: Camundongo que recebeu enxerto cutâneo sem rejeição .....	69
Figura 10: Gráfico que demonstra o ganho de peso de camundongos NOD do Laboratório Taconic.....	76

Gráfico 01: Peso médio (g) dos camundongos NOD .....	58
Gráfico 02: Peso médio (g) dos camundongos NOD, de acordo com a presença ou não de diabetes.....	59
Gráfico 03: Peso médio (g) dos camundongos <b>não diabéticos</b> e <b>diabéticos</b> de acordo com sexo.....	60
Gráfico 04: Glicemia média (mg/dl) dos camundongos NOD.....	61
Gráfico 05: Glicemia média (mg/dl) dos camundongos NOD de acordo com a presença ou não de diabetes. ....	61
Gráfico 06: Glicemia média (mg/dl) dos camundongos NOD <b>não diabéticos</b> e <b>diabéticos</b> , de acordo com sexo. ....	62
Gráfico 07: Proporção de diabetes nos camundongos NOD em 32 semanas de seguimento.....	63
Gráfico 08: Proporção de diabetes, em 32 semanas de seguimento, em % de Camundongos NOD em biotério convencional, de acordo com sexo e idade.....	64
Gráfico 09: Sobrevida de Camundongos NOD em biotério Convencional.....	65
Gráfico 10: Sobrevida, em 32 semanas, dos camundongos NOD, de acordo com o sexo.....	66
Gráfico 10a: Curvas de sobrevida de camundongos NOD não diabéticos, machos e fêmeas.....	67
Gráfico 10b: Curvas de sobrevida de camundongos NOD diabéticos, machos e fêmeas.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACF: Adjuvante Completo de Freund  
ADA: *American Diabetes Association*  
APC: Célula Apresentadora de Antígeno  
BB: *BioBreeding*  
BCG: Bacillus Calmette Guérin  
BSA: Albumina Sérica Bovina  
CEDEME: Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais  
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
CPEA : Coordenação de Produção e Experimentação Animal  
DM: Diabetes Mellitus  
DM1: Diabetes Mellitus tipo 1  
DM2: Diabetes Mellitus tipo 2  
DNA: Ácido desoxiribonucleico  
FEPPS: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde  
GAD 65: Ácido Glutâmico Descarboxilase  
HLA: Antígeno Leucocitário Humano  
IAAs: Auto Anticorpo Contra Insulina  
ICAS: Anticorpo Anti-ilhota  
IFN-  $\gamma$ : Interferon Gama  
IL: Interleucina  
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade  
NAD<sup>+</sup>: Nicotina Adenina Dinucleotídeo  
NK: *Natural Killer*  
NOD: *Non Obese Diabetic*  
SPF: *Specific Patogen Free*  
STZ: Estreptozotocina  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa  
1,25(OH)2D3: 1,25- dihidroxi vitamina D3

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DO DIABETES MELLITUS TIPO 1

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina que levam à hiperglicemia (1).

Os sintomas decorrentes da hiperglicemia acentuada incluem inexplicada perda de peso, poliúria, polidipsia, infecções, visão turva e complicações agudas que podem levar ao risco de vida, como cetoacidose diabética e síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica (2,3).

As formas de diabetes mellitus são classificadas de acordo com a sua etiologia e não mais como “insulino dependente” ou “não-insulino dependente” (2).

O diabetes tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2) são as formas mais prevalentes e incidentes e se destacam pela diferença na forma de apresentação clínica. O tipo 1 caracteriza-se por resposta imunológica auto-imune, fatores genéticos predisponentes e influência do meio ambiente na destruição das células-beta produtoras de insulina. Ocorre mais freqüentemente em pessoas jovens e a instalação clínica é abrupta. O diabetes tipo 2 age na resistência à ação da insulina e está associado à obesidade, levando à perda progressiva das células beta pancreáticas. Manifesta-se predominantemente após os 40 anos e na grande maioria dos casos não é necessária à utilização de insulina exógena (4).

### **1.1.1 Epidemiologia**

A prevalência do diabetes vem crescendo de forma notável, e o advento da industrialização e urbanização populacional ocorrido nos últimos anos acelera este processo. As mudanças no estilo de vida reduziram a atividade física que, juntamente com uma alimentação mais calórica, favoreceram a ocorrência de obesidade, stress e hipertensão arterial (4).

O “Diabetes Health Economics Study Group” da Federação Internacional de Diabetes, estima que em 2025, cerca de 300 milhões de pessoas apresentarão esta doença (5). Embora o diabetes mellitus tipo 2 tenha a maior parte da atenção devido a sua prevalência crescente nos últimos anos, o diabetes tipo 1 cresce paralelamente. Este, sempre foi conhecido como uma doença de crianças e adolescentes, mas estudos epidemiológicos recentes indicam que a sua incidência é comparável em adultos (4).

Globalmente, entre 10 a 20 milhões de pessoas são afetadas na atualidade (6). Nos Estados Unidos, há uma estimativa que 123.000 crianças e 1,4 milhões de adultos tenham o diabetes tipo 1. Anualmente, no mínimo 60.000 crianças são diagnosticadas em todo o mundo, incluindo 12.000 nos Estados Unidos (7) e de 18 a 20/100.000 crianças no Reino Unido (8).

O estudo EURODIAB, que envolveu 44 países da Europa, indicou um aumento na incidência anual do diabetes tipo 1 em 3-4% conforme demonstrado na figura 1 (8), e poderá ser 40% maior em 2010 em relação a 1997 (9).

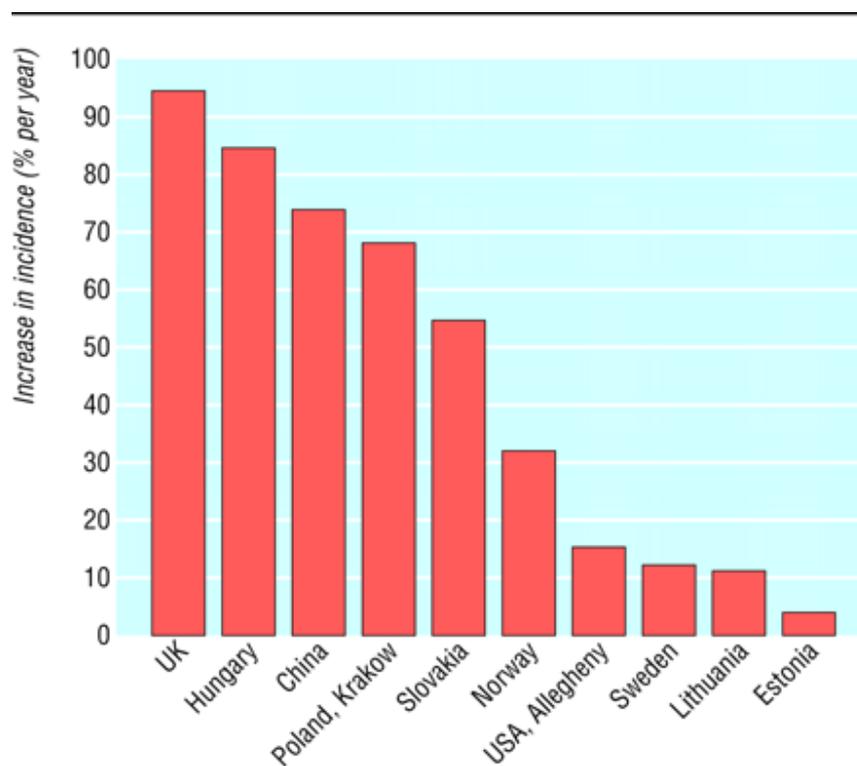


Figura 1. Aumento da incidência de diabetes tipo 1 em crianças com idade menor a 14 anos (8).

Esta incidência é rapidamente progressiva em regiões específicas e mostra tendência em direção ao início precoce, podendo ter alta variabilidade sobre os diferentes grupos étnicos populacionais. Dados sugerem um gradiente polar-equatorial descrito pela incidência da doença. Por exemplo, Europa, Kuwait e Porto Rico são regiões que possuem altas taxas de incidência. Na Finlândia, onde a incidência triplicou desde 1953, ocorreram 45 casos por 100.000 habitantes no ano de 1996 (10); na Escandinavia, 20% do total de pacientes diabéticos são do tipo 1 (11). Por outro lado, em populações como no Peru (0.7/100.000 habitantes/ano), Japão e China (menos que 1% dos pacientes com diabetes possuem DM1) baixas taxas de diabetes tipo 1 são observadas (10).

Suscetibilidade genética e fatores ambientais, individualmente ou em conjunto, podem colaborar para tais disparidades (8).

No Brasil, existem poucos estudos epidemiológicos sobre o diabetes tipo 1. Ferreira e colaboradores, estudando três cidades do interior paulista, constataram incidência de 7,6/100.000 habitantes naquela população (12), em Londrina no estado do Paraná a taxa encontrada foi de 12,7/100.000 (13).

### **1.1.2 Patogênese do Diabetes Mellitus Tipo 1**

A *American Diabetes Association* (ADA), recomenda o termo *diabetes tipo 1* para o diabetes imuno-mediado, com destruição das ilhotas pancreáticas (8).

A história natural do diabetes tipo 1 inclui quatro estágios distintos: (I) pré-clínico: auto-imunidade dirigida às células beta, com uma diminuição aguda e progressiva da resposta insulínica à glicose intravenosa ou oral; (II) início do diabetes clínico; (III) remissão transitória; (IV) diabetes associado com complicações agudas, crônicas e morte (7).

O estágio pré-clínico é caracterizado pela presença de auto-anticorpos contra constituintes da célula beta pancreática, que participam da sua autodestruição (14).

A descoberta dos auto-anticorpos anti-ilhotas pancreáticas, reforçou o papel da auto-imunidade na fisiopatologia do diabetes tipo 1 (14). Marcadores como o anticorpo anti-ilhota (ICAs), anti-insulina (IAAs), ácido glutâmico descarboxilase (GAD-65) e contra as tirosinas fosfatases IA-2 e 1A-2B, estão relacionados com o desenvolvimento do DM1 (15). Geralmente, pelo menos um destes marcadores está presente em 85-90% dos indivíduos com hiperglicemia de jejum, diagnosticado no início da doença (1). Embora o processo patogênico destes auto-anticorpos não esteja bem caracterizado, a sua dosagem possibilita rastrear indivíduos com risco elevado para o desenvolvimento da doença. Por exemplo, pessoas com ICA possuem risco de até 42% para desenvolver DM1, quando associados à presença de IAA, o risco eleva-se para 77%, em prazo menor que dez anos (14).

O processo auto-imune é mediado por macrófagos, linfócitos B e T (7), verificando-se diminuição progressiva da função secretória das células beta, que se traduz, inicialmente, por perda da primeira fase de secreção de insulina e elevação gradual dos níveis glicêmicos (14).

Além disso, a doença tem forte associação com o sistema HLA (Antígenos Leucocitários Humanos), sendo um determinante genético para o diabetes tipo 1 (1).

Mais de 90% dos pacientes que desenvolvem DM tipo 1 possuem haplótipos DR3, DQ2 ou DR4, DQ8. Desta forma, alelos ou variantes genéticas associadas com

diabetes tipo 1 podem suscetibilizar ou proteger a doença. Uma interação entre suscetibilidade genética e ambiental é fundamental para o desenvolvimento da doença (8). Estudos em irmãos gêmeos determinam riscos estimados envolvendo gêmeos monozigotos entre 20 e 50% (16). No entanto, 90% dos indivíduos com DM1 diagnosticados não possuem parentes em primeiro grau que apresentem a doença e a chance de gêmeos idênticos terem a doença, segundo Balda (17) é de apenas 33%.

Além disso, estudos em gêmeos têm revelado que 70 a 75% do risco para o DM1 é relacionado aos efeitos genéticos e 25 a 30% aos fatores ambientais (10).

Dentro destes achados, as informações disponíveis sugerem que o DM1 é uma doença multifatorial dependente da complexa interação entre fatores genéticos, imunes e ambientais (figura 2).

Os determinantes ambientais, mais estudados, podem ser classificados em 3 grupos: infecções virais (citomegalovírus, rubéola, caxumba, sarampo), dieta precoce na infância (amamentação versus introdução precoce de ingredientes do leite de vaca, cereais e glúten) e toxinas (por exemplo, derivados de N-nitroso). Outros fatores não-genéticos modificadores da doença incluem administração de vacinas, estresse emocional, influências climáticas, sazonalidade, agentes sanitários e acesso ao cuidado de saúde (7,8,9).

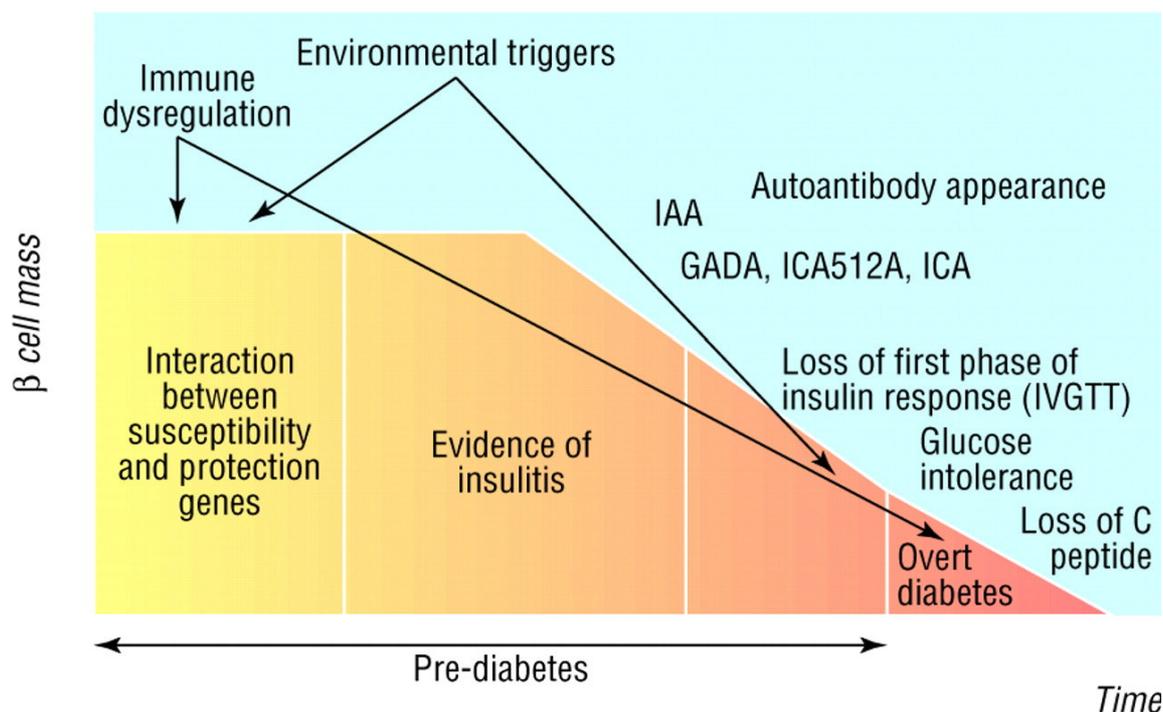


Figura 2. Modelo de patogênese e história natural dos diabetes tipo 1 (8).

De acordo com Atkinson e Eisenbarth (9) os agentes ambientais agem como modificadores da patogênese da doença, podendo servir como “gatilhos”.

### 1.1.3 Complicações

O controle da glicemia nas pessoas com diabetes é crítico por três razões: (I) A insulina é necessária para a prevenção de cetoacidose fatal; (II) A falta do controle da glicemia e a conseqüente hiperglicemia, associam-se a sintomas como polidipsia, poliúria, fadiga, entre outros; (III) indivíduos com diabetes de longa data, possuem risco aumentado para o desenvolvimento de complicações secundárias (18), como retinopatia, nefropatia e vasculopatia, além de maior suscetibilidade a certas infecções por fungos, bactérias e vírus (19).

Uma adequada quantidade de insulina previne cetoacidose e minimiza os sintomas (18) e é indiscutível, atualmente, que o bom controle glicêmico do DM (hemoglobina glicada normal) diminui enormemente as chances de complicações microvasculares, notadamente: nefropatia, retinopatia e neuropatia (20).

#### **1.1.4 Tratamento e Futuras Perspectivas**

O tratamento intensivo com insulina, efetivamente, adia o início da progressão de doenças crônicas secundárias em pacientes com DM tipo 1. Os efeitos benéficos deste tratamento, podem não ser garantidos à comunidade em geral, pelo alto custo envolvido (21). Além disto, um controle glicêmico estrito associa-se na ocorrência mais freqüente de hipoglicemias (22).

Novas alternativas de aplicação de insulina, como o uso de bombas de insulina de ação rápida, por infusão contínua subcutânea, que permitem menor oscilação da glicemia nas 24 horas do dia, ou insulinas de ação ultra prolongada, cujo efeito persiste por 24 horas, permitindo assim uma única aplicação durante o dia, vêm sendo desenvolvidas, e buscam oferecer maior liberdade e qualidade de vida ao paciente diabético (23).

Alternativas terapêuticas que oferecem controle rigoroso do metabolismo da glicose são o transplante de pâncreas e o transplante de ilhotas pancreáticas (21).

O transplante de pâncreas apresentou importantes avanços nos últimos anos. Entre 1994 e 1997 a sobrevida dos pacientes no primeiro ano pós-transplante era de mais de 90%, e a sobrevida dos enxertos (definido como insulino-dependência) no primeiro ano era de 82%, nos casos de transplante simultâneo de pâncreas/rim (24).

De acordo com dados americanos, 5% de todos os transplantes de pâncreas de 1990 até 2000 foram retransplantados (24). Este procedimento exige alta complexidade técnica, o que pode levar a este número de retransplantes. Além dos efeitos colaterais associados ao uso de drogas imunossupressoras, existe o risco inerente ao procedimento cirúrgico e a rejeição. A mortalidade destes pacientes é de cerca de 2% após 2 anos da alta hospitalar (25).

O transplante de ilhotas em seres humanos, ainda em fase experimental, tem o objetivo de ser menos invasivo que o transplante de pâncreas, além de diminuir tempo de internação e complicações. O sucesso deste procedimento conduz um otimismo para a substituição do transplante de pâncreas. O transplante de ilhotas é um método que não envolve cirurgia, permite pouco grau de medicamentos imunossupressores, e poderá ser menos caro para o receptor (26).

Além destes tratamentos, as pesquisas atuais estão sendo orientadas para a gênese do próprio processo auto-imune. Espera-se que, através destas pesquisas, possam ser desenvolvidos tratamentos capazes de prevenir o processo

autoimunológico antes da destruição das células produtoras de insulina, permitindo assim, a manutenção de uma função endócrina normal (27).

A importância do diabetes mellitus tipo 1 do ponto de vista social e econômico é inegável, devido às altas taxas de morbidade, mortalidade e de incapacitação para o trabalho. Assim, fica evidente que tal doença mereça uma atenção e cuidados especiais no sentido de uma detecção precoce dos indivíduos susceptíveis para que haja possibilidade de intervenção profilática nos mesmos (17).

Desta forma, a utilização de modelos animais experimentais torna-se de grande valia para que o estudo no campo de doenças auto-imunes se difunda e possa colaborar principalmente na prevenção do processo autoimunológico (27). A utilização de modelos animais que expressam a doença de forma similar que nos humanos proporciona um melhor entendimento da fisiopatologia, oferecendo oportunidades de pesquisa na formulação de novas modalidades terapêuticas.

## **1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS**

Grande parte dos conhecimentos científicos que o homem adquiriu na área da biomedicina visando, primordialmente, à saúde humana e à dos animais domésticos foi possível, em grande parte, graças ao uso dos animais de laboratório em suas pesquisas (28).

Esta íntima relação entre pesquisa biomédica e uso de animais de laboratório se deve, principalmente, ao conhecimento científico adquirido a respeito destes animais. (28).

Animais de laboratório são definidos como aqueles criados e produzidos sob condições ideais e mantidos em ambiente controlado, com conhecimento e acompanhamento microbiológico e genético seguros, obtidos por monitoração regular (29). Após vários anos de pesquisa, foram criadas numerosas linhagens de animais consangüíneos e híbridos capazes de reproduzir as variáveis causadas por diferenças genéticas e, mais recentemente, os animais foram classificados quanto ao *status* sanitário ou ecológico, visando a prevenção de erros induzidos por diferenças ambientais (30).

O ambiente inclui organismos associados aos animais e organismos presentes dentro dos limites do ambiente físico e barreiras sanitárias. Quanto mais eficazes forem as barreiras sanitárias deste ambiente, menor a contaminação dos animais por vírus, bactérias, fungos ou parasitas (30).

A padronização dos animais utilizados em pesquisas é indispensável, pois diminui o número de animais necessários para atingir a exatidão ou reprodutibilidade do experimento. Assim, o ambiente onde os animais são mantidos e/ou criados deve

prevenir erros induzidos por diferenças ambientais, denominados padrão sanitário, e se definir conforme a relação dos animais com o seu ambiente (31).

Em função das barreiras sanitárias existentes, podemos classificar os animais conforme seu padrão sanitário, ou seja, quanto à microbiota a eles associada:

- Animais SPF (Specific Pathogen Free): O termo SPF significa que o animal é livre de uma variedade de microorganismos (patógenos e parasitas) específicos, porém não necessariamente livre de outros não-específicos. Animais SPF originam-se de animais germ-free e não apresentam microbiota capaz de lhes determinar doenças, ou seja, possuem somente microorganismos não-patogênicos (28). Esta nomenclatura é recomendada pelo Comitê Internacional de Animais de Laboratórios, desde 1964 (31).
- Animais Gnotobióticos: possuem microbiota associada definida e devem se mantidos em ambientes dotados de barreiras sanitárias absolutas (isoladores) (31).
- Os animais convencionais: são aqueles que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas (30,31). A maioria dos animais usados em

experimentação, ainda é criada em colônias de acasalamento convencional (28).

É válido ressaltar que o padrão de qualidade no cuidado aos animais pode interferir significativamente no resultado dos experimentos, direta ou indiretamente. Desta maneira, pode-se avaliar o que significariam possíveis “falsos positivos” nos resultados obtidos em virtude da utilização de modelos animais de padrões inadequados (31).

A maior parte dos animais usados em pesquisa, nos últimos 30 anos, tem sido proveniente de ambiente convencional. Eles são relativamente mais baratos para se produzir e manter, e têm sido usados praticamente em todo tipo de pesquisa, desde a genética até a cirúrgica (30)

### **1.2.1 Modelos Experimentais de Diabetes**

Os modelos animais de diabetes têm sido usados extensivamente na obtenção do esclarecimento sobre esta doença (32). Eles têm fornecido inúmeros benefícios para os humanos, incluindo o tratamento de complicações oculares ou vasculares, e o desenvolvimento das técnicas de transplante de pâncreas, evidenciando o aumento ao entendimento do início de uma base imune no diabetes tipo 1, entre outros (33).

No caso do Diabetes Mellitus tipo 1, existem modelos experimentais que são utilizados largamente em pesquisas e que podem ser classificados em 2 tipos: (I) diabetes mellitus induzido quimicamente e (II) diabetes mellitus espontâneo.

### 1.2.2 Diabetes Experimental Induzido Quimicamente

A indução química do diabetes em animais experimentais ocorre após a destruição química seletiva das células beta pancreáticas. As substâncias mais usadas para esta indução em ratos, camundongos e coelhos são a *Alloxana* e a *Estreptozotocina (STZ)*. A dose destas drogas para indução do diabetes, depende da espécie do animal e do seu peso (34).

A STZ, na dosagem de 160 a 250 mg/kg, têm um efeito citotóxico direto nas células beta de camundongos. A STZ causa dano no ácido desoxirribonucléico (DNA), depletando Nicotina Adenina Dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>), que inibe a biossíntese e a secreção de insulina e, deste modo inicia a morte das células beta, através da depleção de energia. Em doses sub-diabetogênicas (40mg/kg) a STZ pode produzir insulite pancreática, com morte progressiva das células beta levando também ao diabetes mellitus. O aparecimento de lesão inflamatória nas ilhotas sugere que, múltiplas baixas doses de STZ agem pela iniciação de reação imune mediada por células (35).

A Alloxana é mais freqüentemente administrada por aplicações intravenosas, intraperitoneais ou subcutâneas. As ilhotas humanas são mais resistentes a alloxana do que as de ratos e camundongos. A dose intravenosa mais freqüentemente usada para

induzir diabetes em ratos é 65mg/kg. A dose intraperitoneal ou subcutânea efetiva deve ser 2 a 3 vezes maior do que este valor, pois abaixo de 150mg/kg pode ser insuficiente para causar diabetes em ratos que, em jejum, se tornam mais suscetíveis à ação da droga (34).

### 1.2.3 Diabetes Experimental Espontâneo

Os animais que desenvolvem espontaneamente o diabetes insulino-dependente têm sido estudados por 2 fatores patogênicos que se complementam: os defeitos imunológicos e a predisposição genética. Existem várias espécies, como o Hamster Chino, o coelho Branco da Nova Zelândia e o cachorro Keshond, porém estes animais não são suficientemente caracterizados e convenientes para serem comparáveis com o DM1 dos seres humanos (36).

Entretanto, o DM1 possui dois excelentes modelos animais espontâneos para a doença: os ratos BB (Biobreading) e os camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*) (32,37,38,39).

Nos ratos BB, que foram descobertos no Laboratório BioBreeding de Ottawa (Canadá), os sintomas aparecem ao redor dos 3 meses de idade. Tem-se reportado tratamentos aplicados a estes ratos que interferem na resposta imunológica e previnem o diabetes, como timectomia neonatal, irradiação linfóide total, tratamento com soro antilinfocítico ou ciclosporina (36).

A predisposição genética destes animais é demonstrada através de estudos que empregam o entrecruzamento entre distintas linhagens entre si, de ratos BB com outras linhagens co-sangüíneas, e identificaram 3 genes: [I] iddm1 – Lyp (linfopenia) autossômica recessiva, localizado no cromossomo 4 e induz a ausência de células T periféricas das subpopulações CD8+ e RT6+ desde o nascimento, [II] iddm2 – MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) presente no cromossomo 20, que induz suscetibilidade a insulite e ao diabetes, [III] iddm3 confere resistência ao diabetes. Fenotipicamente, apresentam linfopenia e um fenômeno poliendócrino como a tireoidite auto-imune (36).

### 1.3 CAMUNDONGOS NOD

Os camundongos NOD são o modelo mais estudado de doença espontânea auto-imune órgão-específico em todo o mundo (40,41,42). As razões para a preferência deste modelo incluem um genoma bem definido, maior quantidade de reagentes monoclonais para a análise de componentes do sistema imune e um custo razoavelmente baixo, comparado com a utilização de ratos (39).

#### 1.3.1 *Background* (linha evolutiva genética) da linhagem NOD

Os camundongos NOD foram descobertos em 1974, no Laboratório de Investigações Shinogui, em Osaka - Japão (36). Possuem fenótipo albino (figura 3) e são procedentes de uma derivação da sublinhagem Jc 1 – ICR *outbreed* que desenvolvia catarata (39).



Figura 3. Camundongos NOD (39).

Segundo o *Laboratório Jackson*, na 6<sup>ª</sup> geração, os progenitores dos futuros NOD/Shi foram acasalados *inbreed* com camundongos livres de catarata, mas com níveis elevados de glicemia de jejum. Na 13<sup>ª</sup> geração, os progenitores foram separados da nova linhagem NOD/Shi. Os níveis plasmáticos elevados de glicose continuaram a ser a base para a seleção da última linhagem, enquanto que seus progenitores – da geração 13 – foram selecionados na base de níveis normais de glicose sangüínea plasmática. Em 1974, na 20<sup>ª</sup> geração, uma fêmea de linhagem normoglicêmica desenvolveu espontaneamente diabetes mellitus, depleção de insulina sérica e insulite. A reprodução seletiva da linhagem desta fêmea diabética produziu a linhagem “*Nonobese Diabetic*” - NOD (43).

Originalmente restrita ao Japão, a linhagem NOD foi distribuída durante o ano de 1980 para a Austrália e Estados Unidos. Hoje, no Laboratório Jackson (que se localiza na cidade de Bar Harbor - Maine nos Estados Unidos), sua produção já ultrapassou a 83<sup>ª</sup> geração isogênica (43).

### 1.3.2 Processo inflamatório

Estes camundongos exibem autoimunidade espontânea que causa diabetes através da destruição das células produtoras de insulina, de forma semelhante à observada em humanos (44). A destruição auto-imune é caracterizada por insulite, infiltrado leucocitário nas ilhotas pancreáticas. Esta infiltração é composta predominantemente por células dendríticas, macrófagos, por células T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) e células B – e ocorre do ducto perivascular para regiões periféricas das ilhotas pancreáticas de Langerhans (peri-insulitis) (40). Algumas células NK (*Natural Killer*) também são achadas no infiltrado (45).

Este estágio é acompanhado por uma lenta, progressiva e seletiva destruição das células beta, mediada principalmente, por células T, inicia-se em 3-4 semanas e estendendo-se por 4-6 meses de idade (40). Segundo Gross e colaboradores (46), o infiltrado nas ilhotas é similar ao que é observado nos pacientes com início recente do diabetes tipo 1. No entanto, para Atkinson (39), a insulite em pacientes diabéticos de início agudo é muito diferente da encontrada nas ilhotas dos NOD.

Este infiltrado progride e invade as ilhotas (insulite) em poucas semanas, levando a um quadro severo de insulite em 10 semanas de idade (74).

Paralelamente, há uma liberação de citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon-Gama (IFN-  $\gamma$ ) e Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ). Estas citocinas, secretadas pelas células apresentadoras de antígeno (APC) e células

T, podem favorecer a iniciação e progressão da resposta auto-imune. Além disso, estas citocinas podem ser finalmente reguladas por outras citocinas e quimiocinas numa complexa rede de interações recíprocas (47).

Uma das peculiaridades da linhagem é a acumulação de algumas células T auto-reativas nos órgãos linfóides periféricos, pâncreas e glândulas salivares submandibulares. Este acúmulo de linfócitos T possibilita o reflexo de baixos níveis de IL-2 e a resistência de timócitos e células T periféricas para a indução de apoptose (39). Os camundongos NOD também desenvolvem doença auto-imune generalizada, afetando múltiplos órgãos e tecidos, incluindo salivar, lacrimal, tireóide, paratireóide, adrenal, testículos e hemáceas (48,49).

Somente após a destruição de pelo menos 95% das células beta produtoras de insulina é que, se manifesta, o diabetes nos camundongos NOD (36).

Similar aos humanos, os camundongos NOD geralmente expressam autoanticorpos anti-insulina no soro antes de apresentarem hiperglicemia (42). De acordo com Gross e colaboradores (46), a variedade de autoanticorpos contra proteínas das ilhotas pancreáticas, incluindo insulina, ácido glutâmico descarboxilase (GAD) e ICA512, foi identificada tanto no modelo animal quanto no homem.

A insulite por sua vez, pode ser prevenida mediante vários procedimentos imunomoduladores, que compreendem a timectomia neonatal, transplante de medula óssea, irradiação, transfusão de sangue, ciclosporina A, corticosteróides, nicotinamida,

eliminação de radicais livres (36) e tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD4 e anti-CD8 (40).

### **1.3.3 Características do Diabetes no Modelo Experimental NOD**

Embora todos os camundongos NOD desenvolvam insulite, isto não é sempre acompanhado de diabetes (42).

Neste modelo experimental, o início do diabetes é marcado por glicosúria moderada e glicemia maior que 250mg/dl. Eles são hipoinsulinêmicos e hiper glucagonêmicos, confirmando a destruição seletiva das células beta pancreáticas (43). A glicosúria e a hiperglicemia tornam-se progressivamente mais severas por volta da 34<sup>a</sup> semana, quando a perda de peso, a polidipsia e a poliúria ocorrem. Sem o tratamento com insulina exógena, os camundongos diabéticos tornam-se severamente hiperglicêmicos e cetônêmicos, mas eles não se tornam cetoacidóticos (50).

Na maior parte de colônias criadas em ambiente SPF, os camundongos NOD sem tratamento sobrevivem de 3 a 4 semanas após a primeira detecção de glicosúria (50).

### **1.3.4 Suscetibilidade para o desenvolvimento de Diabetes nos camundongos NOD**

Os fatores ambientais em conjunto com a genética, claramente modificam a incidência do diabetes tipo 1 nos modelos experimentais espontâneos. A suscetibilidade

destes camundongos é poligênica e ambiental, enfatizando condições de habitação (ambiente gnotobiótico), sanitárias, dietéticas e de gênero (41,43).

Isto se deve ao fato que a diabetogênese nos camundongos NOD é uma consequência hereditária de imunodeficiência dentro do complexo poligênico. A penetrância desta suscetibilidade é fortemente influenciada pelo ambiente físico, particularmente a dieta e a exposição a patógenos microbianos. Uma das características mais fascinantes dos camundongos NOD é a estimulação do sistema imune pelos patógenos ambientais que levam ao desenvolvimento de um sistema imune mais normal e menos suscetível ao diabetes. Assim, estes animais precisam ser alocados em condições livre de patógenos (SPF) para expressar o fenótipo do diabetes (51).

#### 1.3.4.1 *Genética*

A herança genética da suscetibilidade para a doença em humanos (DM1) e nos camundongos NOD é poligênica (52). Os alelos de classe II do MHC constituem um dos mais importantes fatores de risco genéticos para a suscetibilidade ao DM1. Os camundongos NOD são homocigotos para o haplótipo H-2<sup>g7</sup> (K<sup>d</sup>, I-A<sup>g7</sup>, I-E<sup>null</sup>, D<sup>b</sup>) que mapeia o locus *idd-1* no cromossomo 17, e contribui para disfunções severas de células apresentadoras de antígenos (APC), que podem promover o desenvolvimento de células T- autoreativas às ilhotas (40,49). Esta região é necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento visível do diabetes (52).

Recentemente, foram correlacionadas as seqüências codificadoras da Interleucina 2 (IL-2) e o polimorfismo da molécula CTLA-4 no desenvolvimento de diabetes em camundongos NOD (49).

#### 1.3.4.2 *Dietética*

Fatores dietéticos modificam o desenvolvimento do diabetes autoimune em modelos animais de diabetes (camundongos NOD e os ratos BB) (53).

Em alguns estudos, proteínas ou peptídeos, constituem fatores desencadeantes para o diabetes, além de alguns componentes das rações padronizadas para roedores, que contém trigo, soja e alfafa, também podem desencadear diabetes tanto nos camundongos NOD como nos ratos BB (36,54). A ingestão de leite ou albumina sérica bovina (BSA) durante a infância tem sido sugerida como importante fator desencadeante de diabetes tipo 1 em humanos. No entanto, estudos em animais são divergentes quanto a este respeito (36,54).

Além desses componentes, foi verificado que, nestes camundongos, a introdução precoce de dieta isenta de glúten, influencia o início e a incidência de diabetes, assim como a insulite e o número de linfócitos na mucosa intestinal, retardando significativamente o diabetes (55). Dietas restritas em ácidos graxos essenciais, como o ácido araquidônico, também previnem o desenvolvimento do diabetes nestes animais (36).

De acordo com Mathieu e colaboradores (56), camundongos NOD tratados precocemente (começando aos 3 dias de idade até os 70 dias de vida), com vitamina D ou com 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) desenvolvem diabetes em menor quantidade. O efeito da deficiência de vitamina D é maior que o da suplementação, sugerindo um papel importante para esta molécula na patogênese desta patologia.

#### 1.3.4.3 Exposição a microorganismos

Teoricamente, infecções por vírus podem contribuir para o aumento ou diminuição da incidência do diabetes tipo 1 (54)(57). Em modelos experimentais, o diabetes pode ser prevenido nos camundongos NOD pela infecção em idade jovem com micobactéria, vírus da coriomeningite linfocítica, vírus da hepatite murina, vírus da encefalomiocardites (58). De acordo com Christen e colaboradores (59), injeções com Coxsackie vírus não somente melhoram, mas também previnem a doença nos NOD.

Segundo Leiter (50), a imunoestimulação geral deve ser subjacente à proteção ao desenvolvimento de diabetes, porque o tratamento de NODs pré-diabéticos com vários tipos de imunomoduladores exógenos, incluindo citocinas (IL-1, TNF, IL-2, IL-4), previnem em geral o aparecimento desta doença.

Camundongos NOD vacinados com o *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) durante as primeiras semanas de vida previnem o aparecimento do diabetes. Da mesma forma, as enterotoxinas estafilocócicas também previnem o aparecimento do diabetes nestes animais (36).

#### 1.3.4.4 *Estresse Crônico*

O estresse crônico nos camundongos NOD (como rotação, vibração, limitação de espaço) entre a sexta e a oitava semana de vida, assim como repetidas injeções contendo salina diminuem a incidência de diabetes em ambos sexos. O estresse pré-natal acelera o início do diabetes.

Suspeita-se que o estresse modula o desenvolvimento do diabetes por interações neuroendócrinas-imunes envolvendo glucocorticóides e citocinas (54).

#### 1.3.4.5 *Ambiental*

Para um melhor manejo em biotérios, os camundongos NOD, deverão estar em ambiente SPF, alocados em gaiolas com filtro e autoclavadas, em locais com irradiação e fluxo laminar (51). Somente animais com boa qualidade microbiológica podem oferecer garantia de um resultado experimental sem interferências de outras variáveis, por isso as utilizações desses animais (em SPF) vêm crescendo à medida que os pesquisadores necessitam de resultados mais fidedignos de seus experimentos (28).

Em camundongos NOD alocados em instalações padrão, o diabetes afeta primeiramente as fêmeas, com incidência entre 60-90% ao redor da 30<sup>a</sup> semana de idade, em oposição aos machos os quais se tornam diabéticos em apenas 30% dos casos. A incidência cumulativa, entretanto, é reportada próximo de 100%, independente do gênero (54).

A transferência de machos NOD de biotério convencional, no Japão, para biotério SPF aumentou a incidência de diabetes nos machos de 6 para 70% (50).

A incidência de diabetes nos camundongos NOD é muito divergente entre os laboratórios, conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1: Colônias de NOD e suas taxas de diabetes em ambiente SPF (54)

<b>COLÔNIAS</b>	<b>INCIDÊNCIA DE DIABETE</b>	<b>Referências</b>
NOD/Lt (Leiter)	90% fêmeas, 83% machos	(60)
NOD/Shi (Shionogi)	70-80 fêmeas, <20% machos	(61)
NOD/Wehi (Walter and Eliza Hall Institute)	< 10% Fêmeas, < 1% nos machos	(62)

No Biotério do Laboratório Jackson a incidência relatada de diabetes é de 85% na colônia de fêmeas e 37% nos machos, em 30 semanas de idade (43). Delovitch e Singh (40) reportam que a incidência nas fêmeas varia de 80-90% enquanto nos machos de 10-40%. De acordo com Hanafusa e colaboradores(45) em 30 semanas de idade, a incidência de diabetes alcança 80% nas fêmeas e 20% nos machos.

Segundo Leiter (50) a incidência de diabetes em NOD machos serve como um indicador útil da presença de fatores ambientais afetando a penetrância da linhagem na

suscetibilidade para o diabetes. Expor camundongos NOD a uma variedade de vírus de murinos (por exemplo, vírus da encefalomiocarditis, hepatite, coriomeningite) previne o desenvolvimento de diabetes.

Estes agentes infecciosos aparentemente, protegem pelo fornecimento de imunoestimulação geral, devido ao tratamento de NOD pré-diabéticos com vários tipos de imunomoduladores exógenos, incluindo ACF e citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4), todos evitam o desenvolvimento do diabetes (50).

### **1.3.5 Divergência entre os sexos**

A incidência de diabetes em camundongos NOD é aproximadamente quatro vezes maior em fêmeas do que em machos (54).

Em análises de colônias NOD, em todo o mundo, verificou-se que a incidência cumulativa de diabetes na 30ª semana é mais variável: menor nos machos do que nas fêmeas (figura 4). Embora algumas diferenças das colônias possam ser explicadas por divergências genéticas entre linhagens NOD separadas das colônias originais, estas parecem depender muito mais de fatores ambientais (52).

Conforme Delovitch e Singh (40), as fêmeas NOD desenvolvem uma forma mais agressiva de insulite e a conseqüente incidência mais alta de diabetes comparadas aos machos.

De acordo com Hernandorena (36) e Bieg (54), o início da doença pode ser acelerado em machos castrados. O inverso é observado em fêmeas tratadas com andrógenos. Estes achados sugerem um papel imunomodulador para os hormônios sexuais. Estas observações do modelo animal contrastam com as do diabetes tipo 1 em seres humanos, no qual não há diferença de incidência entre homens e mulheres (63).

O fato dos camundongos NOD serem isogênicos, a necessidade de condições de habitação controlada, a facilidade para mudar a fisiologia natural através de manipulação genética e a relativa facilidade para a prevenção da doença tem causado alguns questionamentos sobre a qualidade do modelo. Fica claro que o curso do diabetes tipo 1 em humanos não será facilmente alterado, ao contrário do observado nos modelos murinos isogênicos, onde o risco genético é o mesmo para todos e, intervenções podem ser iniciadas em muitos estágios da doença (39).

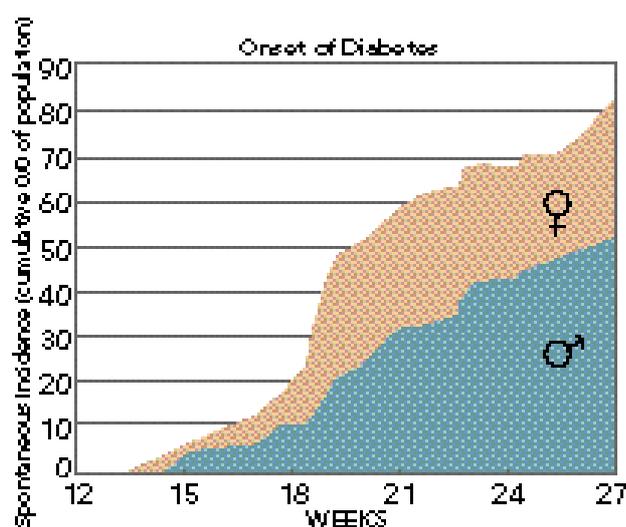


Figura 4. Incidência de diabetes de camundongos NOD em alguns laboratórios. 4a: Laboratório taconic (64)

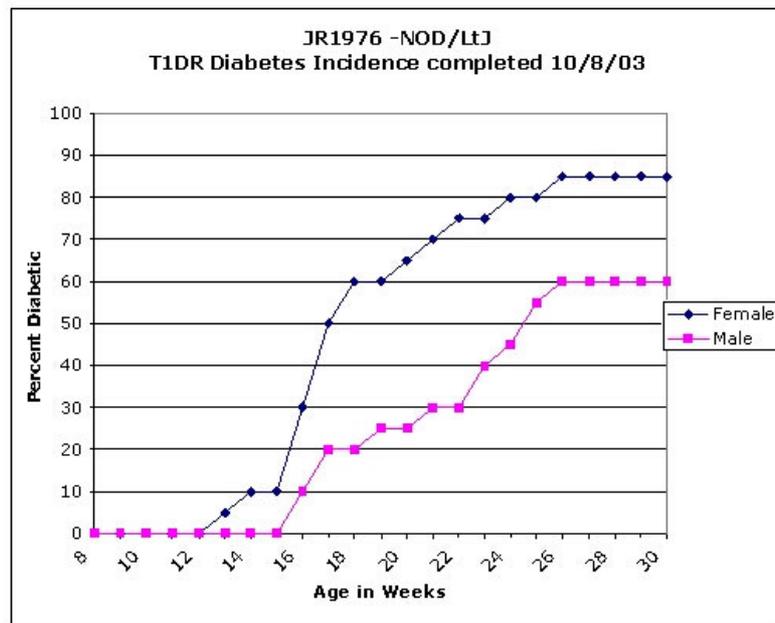


Figura 4b: Laboratório Jackson (65)

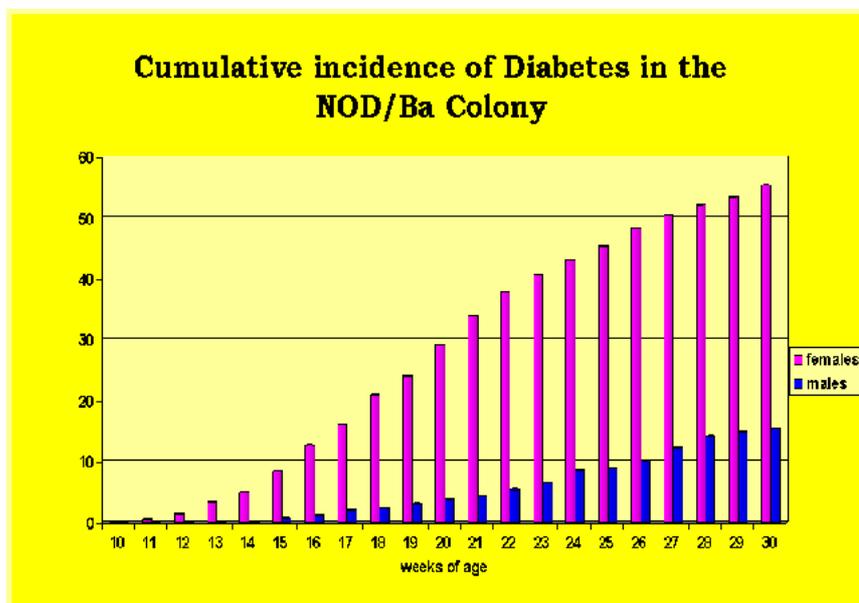


Figura 4c: Colônia Ba - St.Bartholomew's Hospital Medical College (66)

Assim, não se pode assumir que os modelos disponíveis de diabetes espontâneo em ratos e camundongos representem um equivalente à doença em humanos (39). Entretanto, estes parecem ser instrumentos importantes de pesquisa, principalmente, da patogênese e terapia do diabetes humano.

O custo envolvido com instalação e manutenção de ambiente livre de patógenos é extremamente alto, o que leva vários biotérios no mundo, e principalmente no Brasil, a utilizarem ambientes convencionais. Desta forma, são poucas as universidades que possuem biotérios do tipo SPF no país. No Rio Grande do Sul, não há este tipo de biotério.

#### **1.4 HIPÓTESE DO TRABALHO**

Visto que não há relatos na literatura sobre tentativas de desenvolvimento de colônias NOD em biotério convencional em nosso meio, no presente trabalho objetivamos verificar a incidência de diabetes deste modelo em ambiente convencional.

- H0 (Hipótese Nula): Em ambiente Convencional, os Camundongos NOD não desenvolvem taxas significativas de diabetes.
- H1 (Hipótese alternativa): Em ambiente convencional, os Camundongos NOD desenvolvem taxas significativas de diabetes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar o modelo experimental NOD em ambiente convencional.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a incidência de diabetes mellitus de camundongos NOD criados em ambiente convencional;
- Avaliar a sobrevivência dos camundongos NOD com a presença do diabetes sem tratamento;
- Avaliar a isogenicidade da linhagem NOD.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Este estudo caracteriza-se como experimental, informando a frequência e a distribuição do diabetes mellitus na colônia NOD (67).

#### **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo teve seu início após sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob o ofício nº 669/05 –CEP (Anexo 1).

##### **3.2.1 Animais**

Para o início do desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 3 machos e 3 fêmeas, irmãos da mesma ninhada, de camundongos isogênicos da linhagem NOD, criados sob condições de biotério estéril (animais *Specific Pathogen Free - SPF*), doados pelo Biotério Central da Escola Paulista de Medicina (EPM).

##### **3.2.2 Produção e manutenção da linhagem NOD**

Após o período de ambientação (10 dias) na Coordenação de Produção e Experimentação Animal (CPEA), da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em

Saúde do estado do Rio Grande do Sul (FEPPS), os animais foram acasalados através do método de criação isogênica (*inbred*) *Brother & Sister*.

As proles oriundas deste acasalamento consangüíneo alcançaram a idade adulta, em torno de 55 dias de idade, formaram novos reprodutores que foram acasalados sucessivamente, entre irmãos, formando a colônia de produção da linhagem NOD.

Todos os animais, após o desmame, o qual ocorreu em torno do 21<sup>o</sup> dia de vida, foram submetidos à sexagem e mensuração de peso e glicemia. Para a identificação individual dos animais foram realizadas, aleatoriamente, marcações circulares com caneta na cauda dos animais.

A sexagem foi realizada no momento do desmame, baseada na distância anogenital, que é duas vezes maior nos machos que nas fêmeas, além de se poderem visualizar os testículos através da parede abdominal (28).

Cada unidade reprodutiva, ou unidade de recria formada a partir do desmame, continha suas fichas de identificação individual, a qual fornecia informações suficientes a respeito dos acontecimentos na colônia, como: data do acasalamento, nascimentos, número de filhotes nascidos, data do desmame, proporção de fêmeas e machos desmamados e mortos (Figura 5).

**A**

Nº	Grupo Nº	Acasalamento	Progenit.	CAIXA Nº		Nº	Grupo Nº	Acasalamento	Progenit.					
M				GRUPO Nº		M								
F						F								
DATA NASCIM.	Nº	+	DATA DESMAMA	M	F	PM	Nº	DATA NASCIM.	Nº	+	DATA DESMAMA	M	F	PM
							1							
							2							
							3							
							4							
							5							
							6							
							7							
TOTAL							TOTAL							
DESTINO							DESTINO							

**B**

**RECRIA**

Nº

DATA:

DATA DESM.:

PROCEDÊNCIA:

DESTINO:

OBS.:

Figura 5: Fichas de identificação. A: Ficha para controle de acasalamentos; B: Ficha para animais em criação

Dos dez (10) casais formados no período de novembro de 2004 a julho de 2005, o total de camundongos NOD analisados foi 79 machos e 58 fêmeas. Estes eram avaliados, à medida que nasciam, e portanto, este total de animais não foi acompanhamento por um período igual. Os resultados foram analisados por

prevalência. O tempo de acompanhamento total foi de 32 semanas, para as primeiras crias.

Cabe ressaltar que no presente estudo, não foram incluídos os dados das fêmeas que procriaram e amamentaram para não induzir o aumento na incidência de diabetes.

Conforme a rotina de manutenção do biotério, todos os animais foram ambientados com ração balanceada padrão para roedores da empresa NUVITAL, maravalha de pinus selecionada autoclavada, água *ad libitum* e mantidos em gaiolas devidamente identificadas, em fotoperíodo de doze horas claro e doze horas escuro (06:00 / 18:00h) e em temperatura média de 21°C.

### **3.2.3 Características ambientais do biotério convencional**

O biotério da CPEA em sua concepção separa-se em duas áreas básicas:

I – área “limpa”: destinada ao preparo do material a ser enviado para as salas de animais, incluindo o corredor de distribuição – “corredor limpo”;

II – área “suja”: o material a ser limpo é recolhido através do “corredor sujo” e destinado à área de lavagem.

O fluxo de material e pessoal era feito em sentido unidirecional (da área “limpa” para área “suja”). Em seus 560 m<sup>2</sup>, além das áreas acima mencionadas, eram distribuídas cinco salas de produção, três salas de experimentação, dois vestiários, uma sala de administração, um *hall* de entrega de animais e um almoxarifado.

A temperatura ambiental do biotério da CPEA variou entre 13 e 27°C conforme a variação do ambiente externo, enquanto que os padrões internacionais recomendam temperatura ambiental de 20 a 24°C para roedores (28). Por não haver controle atmosférico, a otimização na qualidade sanitária dos animais foi impedida, já que não há movimentação do ar nas salas de criação que remova poluentes e que mantenham o conforto térmico (28).

A iluminação das salas foi feita através de 4 lâmpadas fluorescentes 40W de potência, à 3,5m do piso. O fotoperíodo foi controlado por um *timer* que mantém um regime de 12 horas claro X 12 horas escuro.

### 3.2.3.1 Barreiras sanitárias

#### a) Físicas

A *autoclave* é o principal equipamento, utilizado pela CPEA, na esterilização de materiais e insumos. Utiliza o processo de calor úmido para esterilização em consequência da pressão e do isolamento térmico, obtendo-se temperaturas elevadas, podendo atingir até 135°C.

De modo geral, o ciclo de esterilização de maravalha, gaiolas plásticas, tampas de gaiolas, bicos e “camas”, utilizado pela CPEA, é de 120°C durante 30 minutos.

### *b) Químicas*

A CPEA possui três *tanques de imersão*, sendo que dois deles têm capacidade para 700 litros (L) e outro com 350 L. As gaiolas eram submersas em solução de *hipoclorito de sódio* diluída em água a 5%, por 24 horas, e após enxaguadas.

Todas as áreas envolvidas direta ou indiretamente com a criação eram, rotineiramente, limpas e desinfetadas.

A solução de hipoclorito de sódio também era utilizada nestes casos, porém na concentração que varia de 1,5% a 2%, em estantes, paredes, pisos, portas, teto e pias.

### *c) Higiene Pessoal*

Fundamental para evitar-se a contaminação dos animais, através do manuseio, por microorganismos associados à flora microbiológica normal do ser humano. Era realizado da seguinte maneira:

Para evitar essa contaminação, alguns procedimentos são adotados:

- Retirada de toda a roupa de rua, dos acessórios pessoais e banho;
- Paramentação apropriada ( calçados, calça , jaleco e luvas);
- Não se deve comer, beber ou fumar dentro do biotério.

### **3.2.4 Aferição de peso e glicemia**

As ninhadas provenientes dos acasalamentos foram acompanhadas durante 40 semanas de vida.

Após o desmame, aos 21 dias de idade, sempre sob a supervisão do técnico de biotério e do pesquisador, os animais eram sexados e, a partir deste momento eram realizadas as mensurações do peso e da glicemia, procedimentos repetidos quinzenalmente.

Antes do momento da verificação da glicemia, os animais eram pesados em balança analítica (Marte<sup>®</sup>, AM220 – Carga máxima de 500g) (Figura 6).



Figura 6: Pesagem dos Camundongos NOD

Para verificação do nível sérico de glicose, uma gota de sangue era obtida, através de uma pequena incisão na ponta da cauda com um bisturi- lanceta (Figura 7). Procedia-se, então, com a aferição, realizada através de fitas reagentes para medição de glicemia, acopladas a medidor Accu-Check Advantage<sup>®</sup> (68).

Segundo as informações do fabricante, o aparelho não quantifica glicemias maiores que 600 mg/dL, sendo esses valores registrados como “HI”(68). Para realização de cálculos estatísticos, representamos esses valores de glicemia em 601 mg/dL.

Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia (*no-fasting*) maior ou igual a 250mg/dL, de acordo com o Laboratório Jackson (43).



Figura 7: Mensuração da glicemia. A:Contensor e monitor de glicemia. B: Obtenção do sangue caudal

### 3.2.5 Transplante Cutâneo

Para este procedimento foram utilizados 5 camundongos machos da linhagem NOD, sendo um doador e 4 receptores, representando cada geração.

Os camundongos receptores foram, depois de pesados em balança analítica, anestesiados com uma solução final de cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer Animal Health) e cloridrato de ketamina 10%(Dopalen®, Agribbrands Brasil Ltda.) diluídos a 2mg/mL e 10mg/mL de solução salina (0,9%) respectivamente. Foi administrada uma dose única de 0,05mL para cada 10g de peso corporal por via intraperitoneal (ip).

Após anestesia, foi realizada a tricotomia dorso-lateral (4 cm<sup>2</sup>) com máquina para tosa (Oster®, USA), seguida de anti-sepsia com álcool etílico 70%.

No doador, foi realizada a eutanásia através de deslocamento cervical preconizada pela Lei 714, de 20 de junho de 2002 que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e outras providências, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (69)(70).

A pele da base da cauda do animal foi seccionada, transversalmente, com lâmina de bisturi nº24 (Solidor®) e após, longitudinalmente. Com o auxílio de uma pinça de dissecação, esta foi tracionada distalmente (base-ponta), retirada do animal e submersa em solução salina 0,9% a 4°C.

Na região tricotomizada do receptor, com uma pinça nº3 e uma tesoura fina reta para íris, foi retirado 1 cm<sup>2</sup> de tecido cutâneo. Com a lâmina de bisturi, foi seccionado um 1 cm<sup>2</sup> da pele total da cauda do doador. Com uma pinça, o fragmento de pele

caudal foi distribuído no seu leito receptor e mantido com sutura simples transfixante nas quatro extremidades do quadrado cutâneo enxertado (Figura 8).

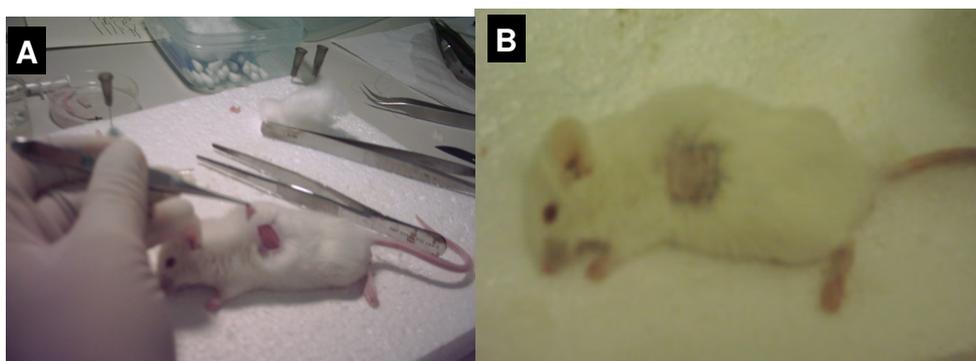


Figura 8. Transplante Cutâneo. A: Implantação do enxerto cutâneo. B: Isotransplante concluído.

Recuperado da anestesia, o animal foi colocado em gaiola individual mantendo o manejo rotineiro adotado pelo biotério da CPEA (71).

Todos os procedimentos adotados, envolvendo os animais do presente estudo, estão de acordo com o que preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, cumprimentando a Constituição do Estado Lei nº 11.915, artigo 82, inciso IV de 21 de maio de 2003 (72).

### 3.3 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS

Este trabalho teve como características metodológicas, o uso das normas da ABNT 2006 no corpo do trabalho, formatado de acordo com a publicação da Biblioteca Central da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

([www.pucrs.br/biblioteca](http://www.pucrs.br/biblioteca)) e as referências bibliográficas estão de acordo com as normas de VANCOUVER (73).

### **3.4 TREINAMENTO DAS TÉCNICAS**

Para a realização das técnicas utilizadas nesta dissertação, os treinamentos dos procedimentos com animais de laboratório iniciaram-se em março de 2004. Para isto, houve aprimoramento no contato com camundongos, estudo de diversas linhagens, indução de diabetes em camundongos *Balb/c*, *C57* e *C3H*, mensuração da glicemia através de punção da veia caudal, acompanhamento das variáveis peso e idade, isolamento e transplante de ilhotas.

Todas estas etapas foram realizadas antes de serem utilizados os procedimentos nos animais do estudo e foram acompanhadas pela Bióloga Patrícia Sesterheim, bioterista especialista em cirurgias de roedores, Coordenadora de Projetos e Membro do Comitê de Ética da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde) de Porto Alegre - RS.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O peso e a glicemia dos animais foram expressos através de média e desvio padrão.

As curvas de sobrevida foram elaboradas utilizando o método de Kaplan-Meier, método não paramétrico que permite a comparação entre diferentes categorias de uma

variável durante o período de sobrevida para o diabetes. O log rank test, permitiu avaliar estatisticamente as curvas. As medidas de precisão das taxas de sobrevida e de diabetes foram o erro padrão e o intervalo de confiança de 95%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ACASALAMENTOS E NÚMERO DE FILHOTES

A partir dos três casais iniciais, acasalando-se consaguinamente os animais durante 4 gerações, formaram-se 10 casais. A média de filhotes por fêmea foi de  $8,25 \pm 3,2$  camundongos. Para a análise dos dados, foram utilizados 79 machos e 58 fêmeas, totalizando 137 camundongos.

### 4.2 PESO DOS CAMUNDONGOS NOD

Verifica-se que, na análise do peso de todos os camundongos a cada mês, o ganho de peso parece não ter sido influenciado pelo diabetes até a 26ª semana. Após este período, verifica-se uma tendência à estabilização nos pesos, tanto de machos como de fêmeas. Nota-se que camundongos machos ganham mais peso naturalmente que as fêmeas (Gráfico 1).

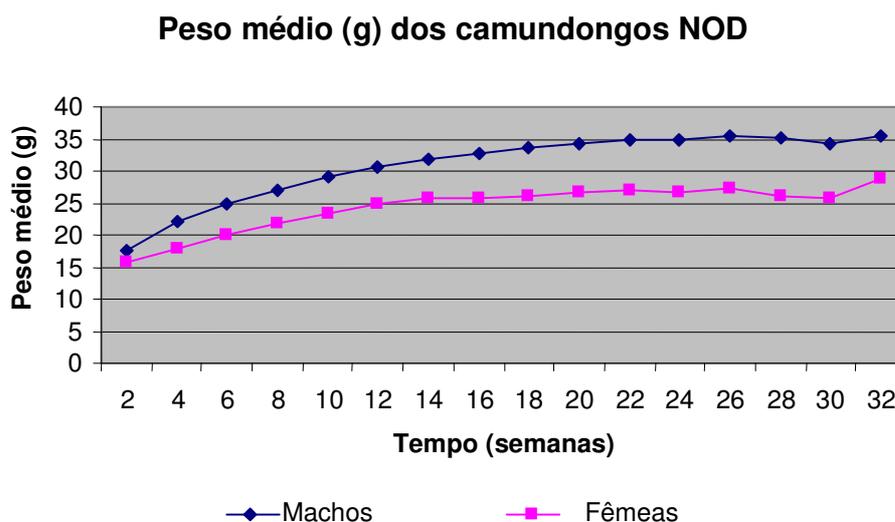


Gráfico 1: Peso (em gramas) dos camundongos NOD.

No entanto, quando se estratificam os camundongos diabéticos dos não diabéticos, verifica-se que os camundongos que se tornam diabéticos possuem uma tendência a serem mais leves do que os não diabéticos a partir da 12<sup>a</sup> semana (Gráfico 02).

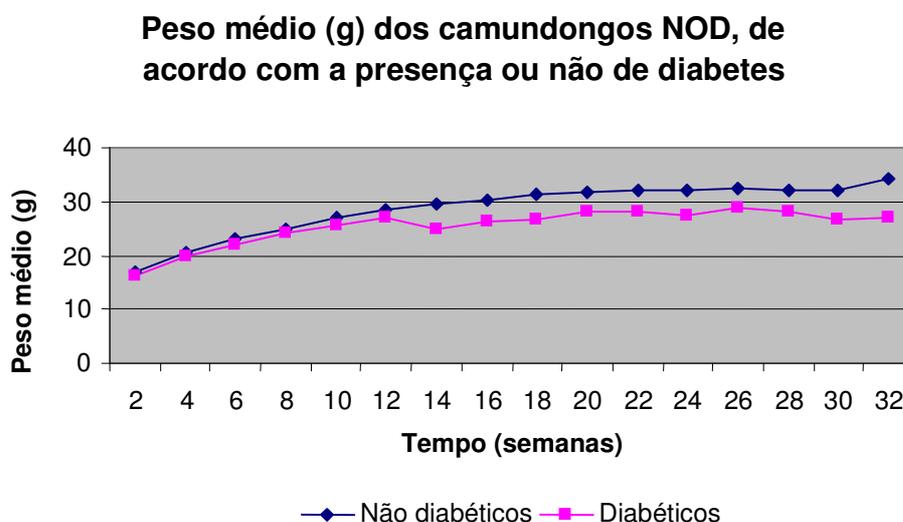


Gráfico 02: Peso médio (g) dos camundongos NOD, de acordo com a presença ou não de diabetes.

Da mesma forma quando se estratifica por sexo e pela presença ou não de diabetes, verifica-se que os camundongos que desenvolvem diabetes possuem pesos semelhantes que os não diabéticos, e só começam a ter uma leve diferença a partir da 30<sup>a</sup> semana nos machos, e nas fêmeas a partir da 26<sup>a</sup> semana. Neste caso, verifica-se que nas primeiras semanas, o peso dos camundongos não diabéticos se equivale ao dos diabéticos. No entanto, à medida que alguns camundongos vão se tornando hiperglicêmicos, há uma tendência do peso diminuir em ambos os sexos (Gráfico 03).

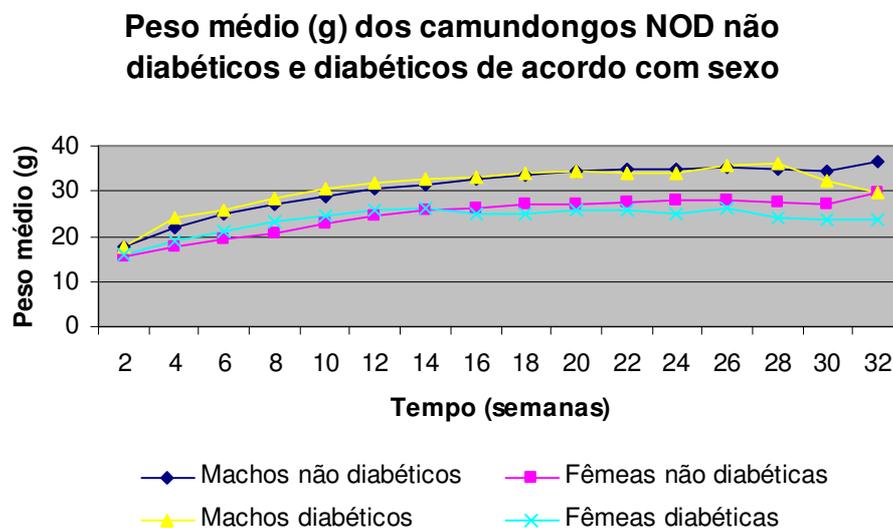


Gráfico 03: Peso médio (g) dos camundongos **não diabéticos** e **diabéticos** de acordo com sexo.

#### 4.3 GLICEMIA DOS CAMUNDONGOS NOD

As médias das glicemias dos camundongos analisados mostram que há um aumento da glicemia não uniforme, a partir do 10<sup>a</sup> semana de vida, dado este, observado pelos valores do desvio-padrão (Anexo 3), que demonstram que alguns camundongos já apresentam hiperglicemia. Quando estes valores foram estratificados pelos sexos dos camundongos, verificou-se que a glicemia das fêmeas aumentou na 12<sup>a</sup> semana, enquanto os machos só apresentaram um aumento significativo a partir da 16<sup>a</sup> semana. Além disso, os valores das fêmeas são mais altos que os valores dos machos a partir da 12<sup>a</sup> semana de vida (Gráfico 04).

No Gráfico 05, verifica-se a diferença das glicemias entre camundongos diabéticos e não diabéticos.

### Glicemia média (mg/dl) dos camundongos NOD

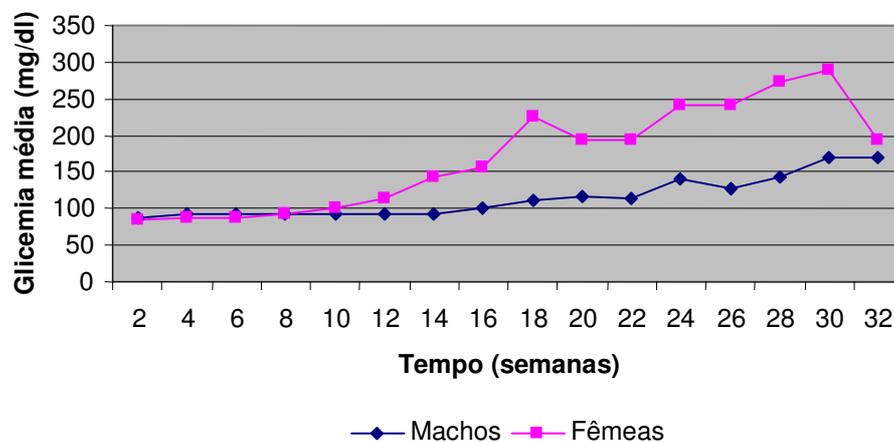


Gráfico 04: Glicemia média (mg/dl) dos camundongos NOD.

### Glicemia média (mg/dl) dos camundongos NOD de acordo com a presença ou não de diabetes

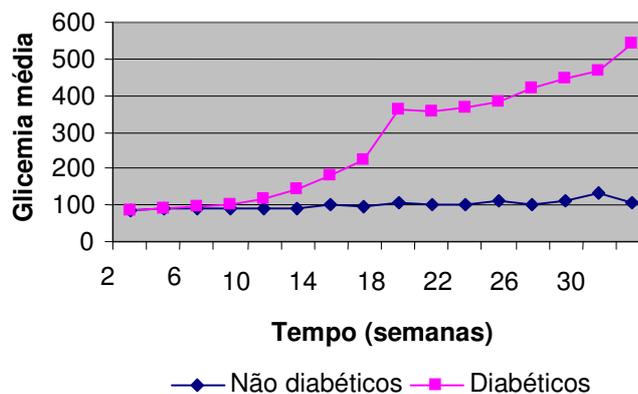


Gráfico 05: Glicemia média (mg/dl) dos camundongos NOD de acordo com a presença ou não de diabetes.

Nos camundongos NOD que não apresentaram diabetes, tanto machos quanto fêmeas, a glicemia variou de 90mg/dl a, no máximo, 150mg/dl. Nos diabéticos,

verificou-se que as fêmeas iniciaram o processo hiperglicêmico na 16ª semana de vida, enquanto os machos na 18ª semana.

Nota-se também, que os valores glicêmicos médios das fêmeas foram maiores que os dos machos em todas as semanas de seguimento, após a instalação do diabetes (Gráfico 06).

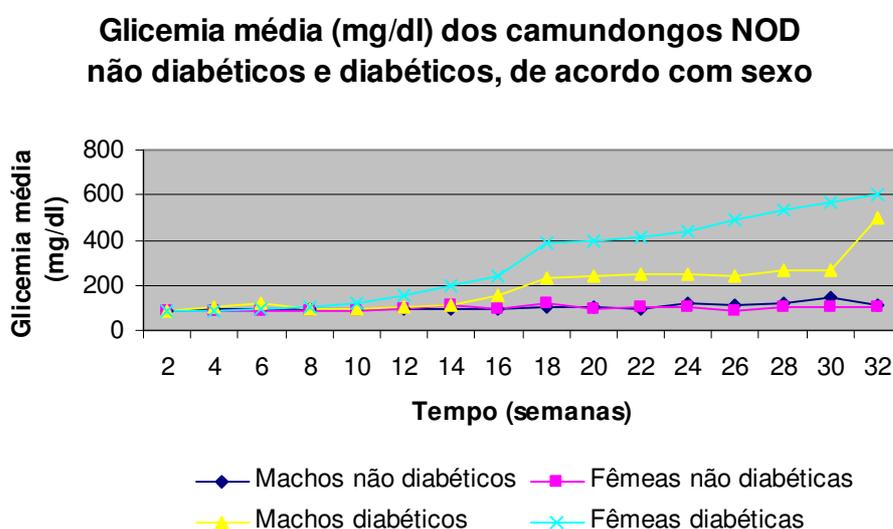


Gráfico 06: Glicemia média (mg/dl) dos camundongos NOD **não diabéticos e diabéticos**, de acordo com sexo.

#### 4.4 OCORRÊNCIA DE DIABETES NOS CAMUNDONGOS NOD

Do total de 137 animais analisados, em 40 semanas, a proporção de diabetes em porcentagem dos camundongos que sobreviveram, analisando o sexo masculino e feminino juntos, foi de 38% (Gráfico 07). Verifica-se no gráfico que, os eventos iniciam em torno da oitava semana e acentuam-se por volta da vigésima semana de vida.

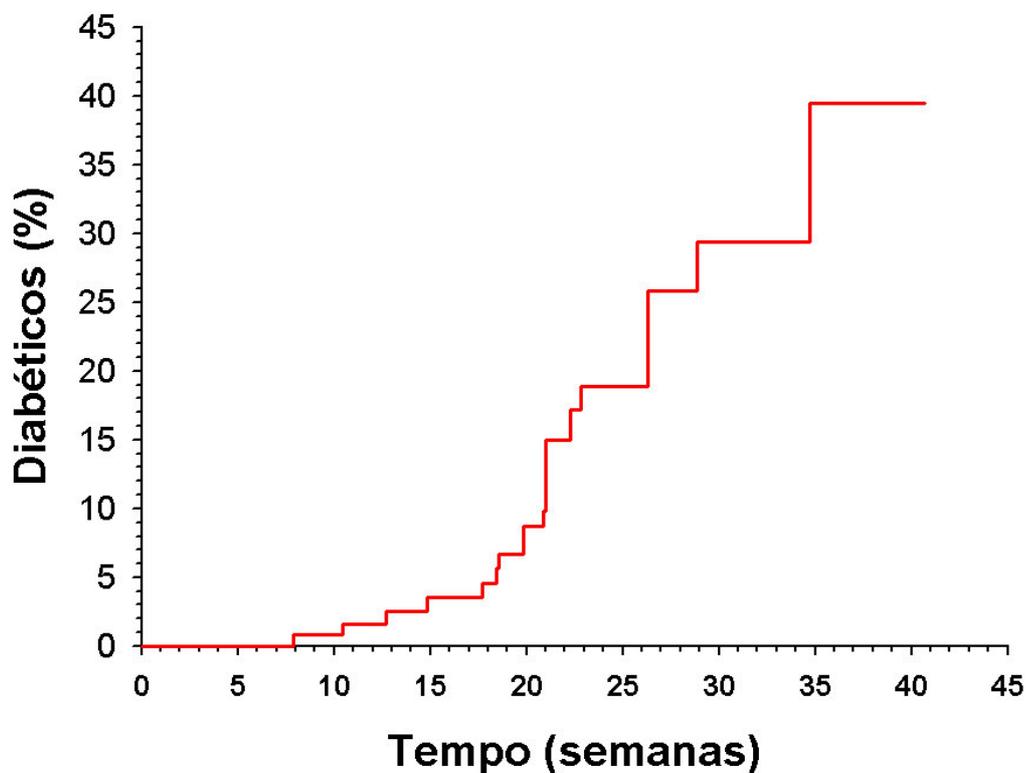


Gráfico 07: Proporção de diabetes nos camundongos NOD em 32 semanas de seguimento

Verificou-se que em oito meses de acompanhamento, analisando-se 79 machos e 58 fêmeas, os camundongos NOD em Biotério Convencional apresentaram as seguintes taxas de diabetes: 51% para as fêmeas e 27% para os machos, com 40 semanas de idade (Gráfico 08). Esta diferença foi significativa ( $P < 0,001$ ).

Além disso, é possível verificar que o início do desenvolvimento do diabetes nas fêmeas é aproximadamente na mesma semana que os machos. No entanto, o processo nas fêmeas ocorre de forma mais acelerada do que nos machos.

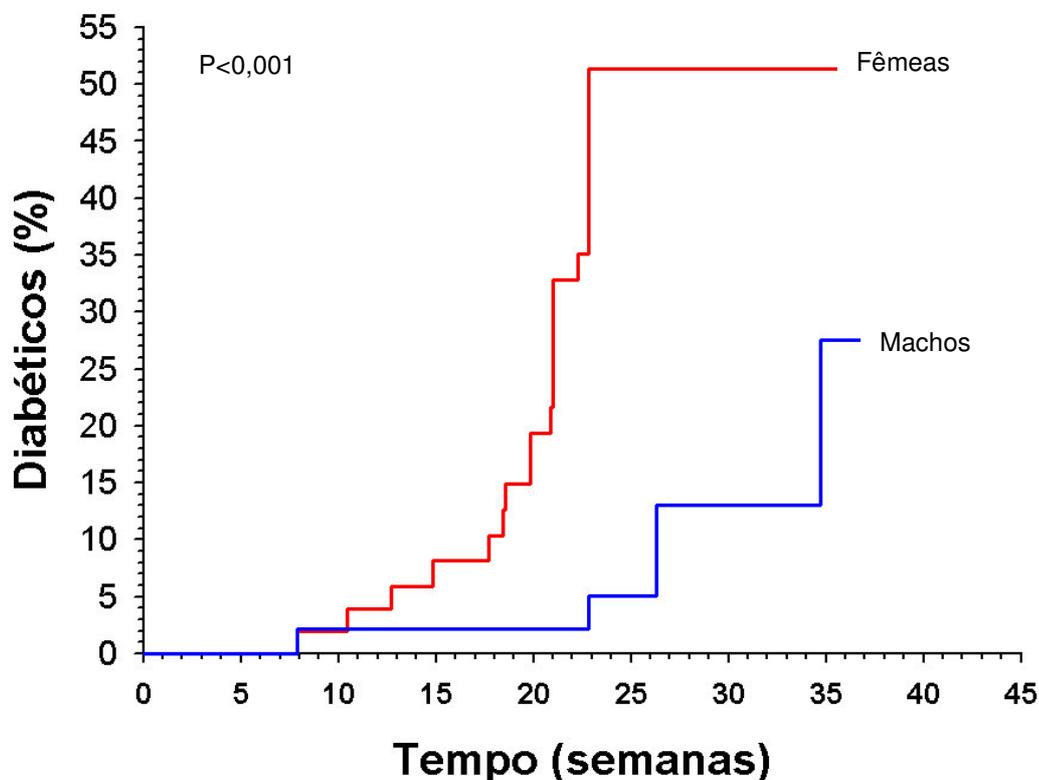


Gráfico 08: Proporção de diabetes, em 32 semanas de seguimento, em % de Camundongos NOD em biotério convencional, de acordo com sexo e idade.

#### 4.5 SOBREVIDA

A sobrevivência dos camundongos, analisando-se os dois sexos, em 32 semanas de idade foi de 60%. Verifica-se que os animais começam a morrer por volta da vigésima terceira (23<sup>o</sup>) semana de vida (Gráfico 09).

Quando a sobrevivência é avaliada de acordo com o sexo, verificou-se para as fêmeas sobrevivência de aproximadamente 40% e para os machos de aproximadamente 85%, sendo esta diferença significativa ( $P < 0,02$ ).

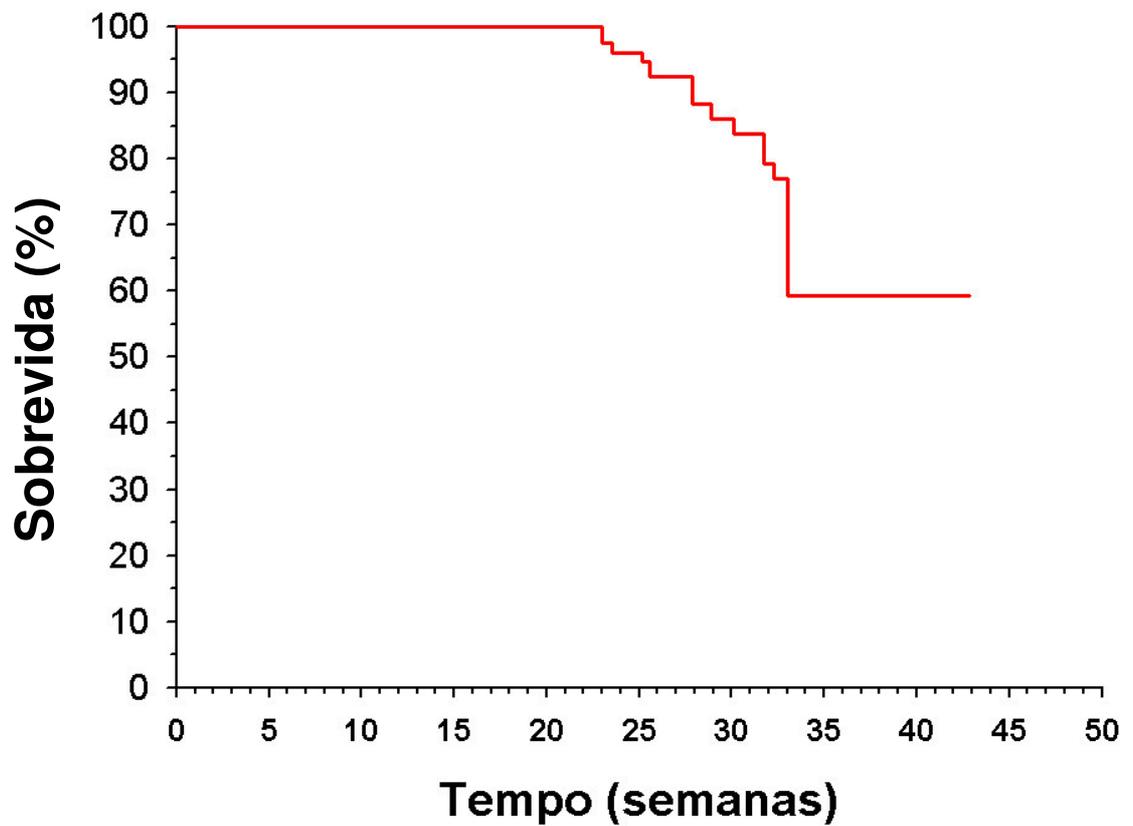


Gráfico 09: Sobrevida de Camundongos NOD em biotério Convencional

Verificou-se ainda, que as fêmeas começam a morrer mais cedo que os machos, por volta da vigésima quarta semana (Gráfico 10).

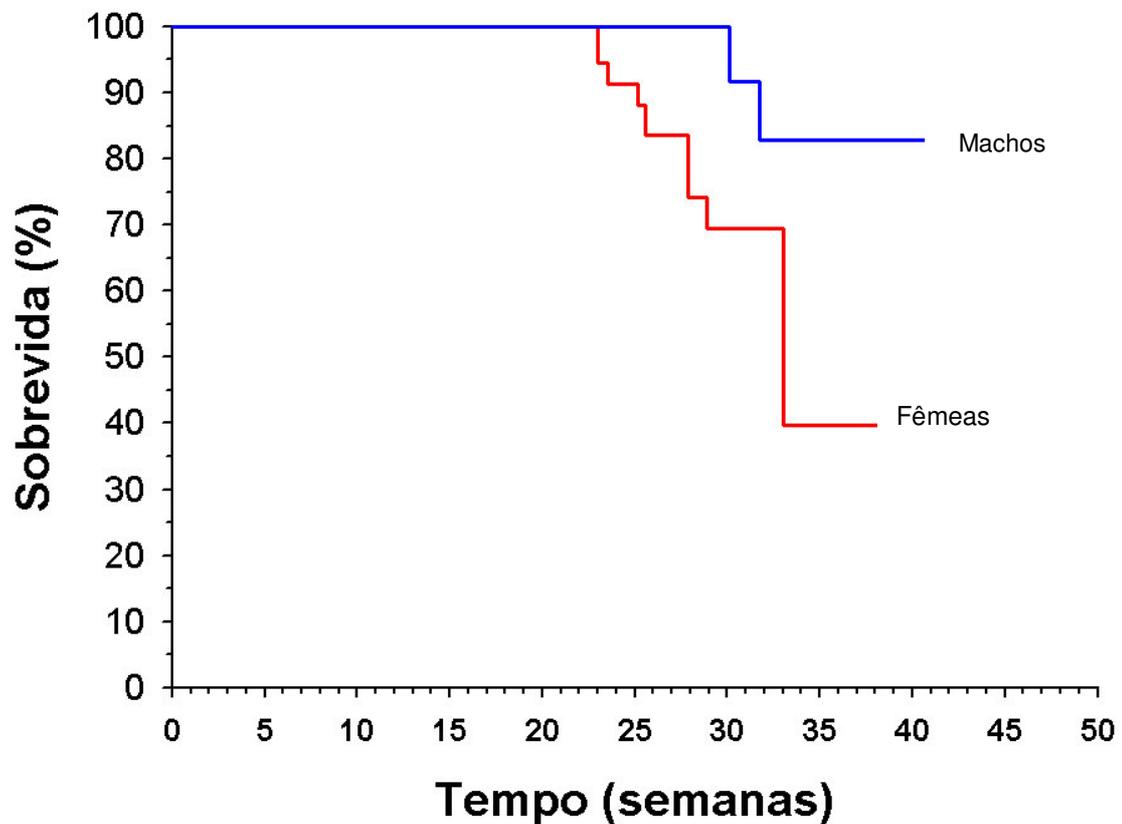


Gráfico 10: Sobrevivência, em 32 semanas, dos camundongos NOD, de acordo com o sexo.

No entanto, quando comparadas às sobrevivências de camundongos machos e fêmeas que não apresentaram diabetes, verificou-se não haver diferença significativa entre elas ( $P < 0,76$ ) (Gráfico 10a).

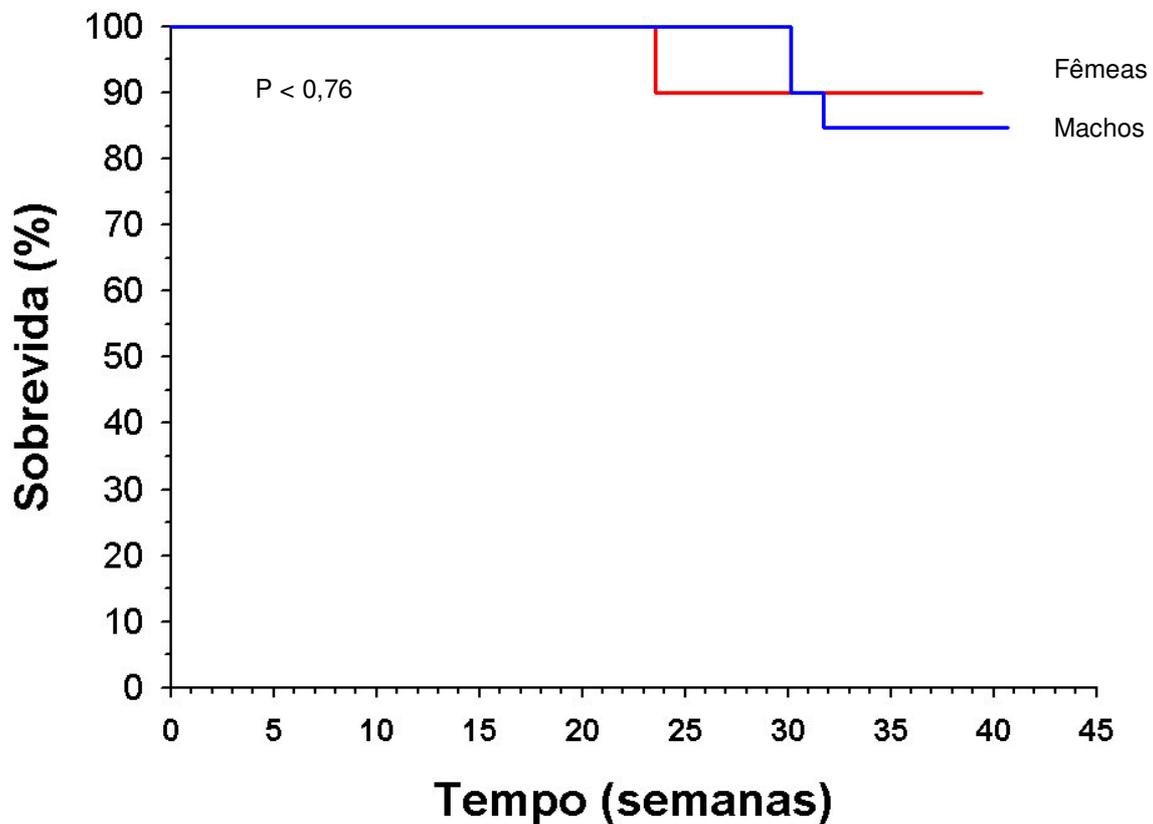


Gráfico 10a: Curvas de sobrevivência de camundongos NOD não diabéticos, machos e fêmeas.

Da mesma forma, quando foram comparadas as sobrevivências dos camundongos machos e fêmeas diabéticos, verificou-se não haver diferença entre estas ( $<0,25$ ) (Gráfico 10b), devido ao pequeno número de camundongos machos diabéticos ( $n=4$ ).

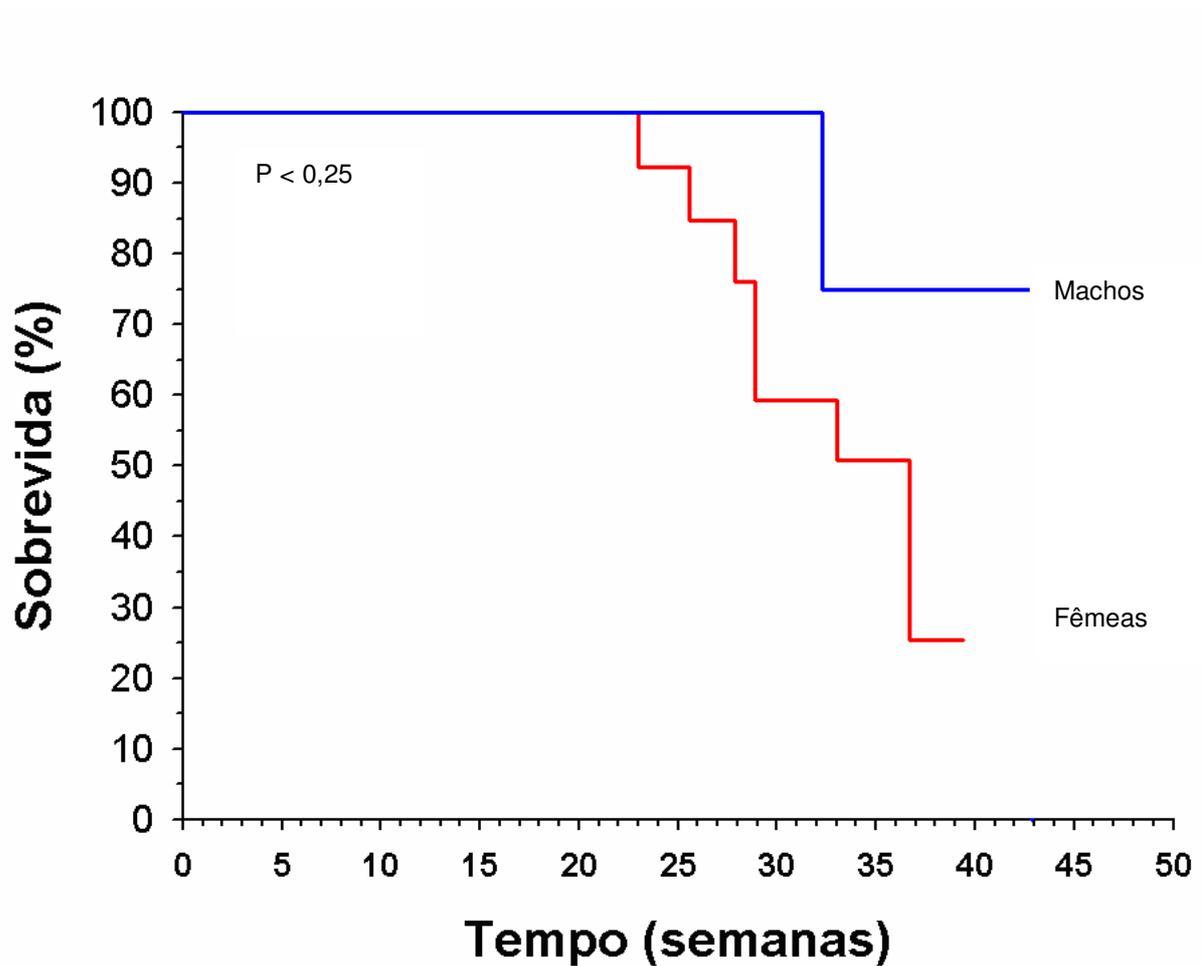


Gráfico 10b: Curvas de sobrevivência de camundongos NOD diabéticos, machos e fêmeas.

#### 4.6 TRANSPLANTE CUTÂNEO

Nos 4 isotransplantes cutâneos realizados, não houve rejeição, confirmando a isogenicidade da colônia. A Figura 9 mostra que, após 100 dias do procedimento, o enxerto está viável.



Figura 9: Camundongo que recebeu enxerto cutâneo sem rejeição.

## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

As dificuldades no tratamento do diabetes (como por exemplo, a necessidade de várias injeções diárias de insulina para o controle glicêmico), a ocorrência de complicações crônicas da doença e o risco de hipoglicemias severas em pacientes com diabetes tipo 1, já justificam, por si só, a pesquisa por estratégias terapêuticas alternativas à aplicação de insulina exógena. Além dos vários tipos de pesquisas que buscam soluções alternativas para o tratamento desta doença, atualmente é verificada uma ênfase em estudos que aprofundem o entendimento da patogenia desta enfermidade (27). Os modelos animais têm-se mostrado bastantes úteis para este fim (36).

A utilização de modelos experimentais com processo patogênico semelhante ao humano, pode auxiliar no aprofundamento da compreensão do desenvolvimento do diabetes tipo 1, assim como permitir o teste de novas modalidades terapêuticas.

Para que isto seja possível, estes animais devem ser bem caracterizados nos ambientes em que são alojados. Isto propiciará melhor qualidade e fidedignidade dos resultados.

## **5.2 MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES**

Os camundongos NOD, modelo experimental utilizado nesta pesquisa, foi escolhido devido a sua grande importância no estudo do diabetes tipo 1 e de doenças auto-imunes.

Os camundongos NOD, desde a sua descoberta há 20 anos atrás, oferecem uma imensa percepção dentro dos complexos processos que envolvem as doenças auto-imunes (74), e representam o melhor modelo animal para o estudo do diabetes tipo 1 (40,41,42).

Experimentos recentes, utilizando estes camundongos, têm começado a fornecer indícios sobre como devem ser moduladas e reguladas as respostas imunes para a proteção do diabetes tipo 1 em humanos (40).

Outras linhagens também podem ser utilizadas para a pesquisa do diabetes, como os ratos BB. No entanto, outras espécies e linhagens de animais apresentam diferenças genéticas e imunológicas em relação ao desenvolvimento de diabetes espontâneo, e não são tão bem caracterizadas como os camundongos NOD (36).

## **5.3 AMBIENTE E INCIDÊNCIA DE DIABETES**

Uma das características que mais se destaca nos camundongos NOD é a divergência dos valores de incidência de diabetes nas várias colônias existentes no mundo (43,52,54). Além disso, a grande disparidade de valores quando comparados os

sexos; fêmeas possuem mais diabetes que machos (54). Em 30 semanas de idade, a incidência de diabetes nas fêmeas é geralmente 80% ou mais, enquanto nos machos, a incidência difere altamente de acordo com as colônias, variando de 0 a 100% em diferentes instituições (43,50). Paralelamente, todos os valores de incidência de diabetes destes camundongos são relativos a Biotérios mantidos em condições SPF, onde os NOD alcançam maiores taxas de diabetes (41).

Os camundongos NOD utilizados neste estudo foram alocados na Coordenação de Produção e Experimentação Animal, mantida pela FEPPS, caracterizada como um Biotério Convencional. Os camundongos desta pesquisa foram mantidos e procriados neste ambiente para que a taxa de diabetes fosse verificada em tais condições. Estes dados não estão bem determinados na literatura científica.

### 5.3.1 Ambiente

#### a) Ração

Vários estudos demonstram que os fatores dietéticos modificam o desenvolvimento do diabetes auto-imune em modelos animais de diabetes tipo 1, incluindo os camundongos NOD (53,75). A ração oferecida aos camundongos NOD neste estudo, foi ofertada de maneira *ad libitum*, peletizada. Esta ração é utilizada há mais de 10 anos pelo biotério da CPEA por atender às exigências nutricionais e microbiológicas dos animais, e possui os seguintes nutrientes: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, complexo mineral vitamínico e aminoácidos.

Não houve preocupação neste estudo em se modificar a dieta, pois o foco central era avaliar a importância do ambiente (convencional) no desenvolvimento de camundongos NOD, principalmente no que se refere à incidência de diabetes mellitus. Além disso, em ambiente SPF, onde a ocorrência de diabetes é elevada, a dieta normalmente não é diferente da empregada na presente investigação.

Esta ração possui alguns ingredientes em que os estudos indicam acelerar o processo diabetogênico, como a soja e o trigo (54). No entanto, não há indicação da quantidade destes, necessária para acelerar este processo. Ressalta-se que a ração oferecida aos camundongos é um alimento padrão, utilizado em larga escala para ratos e camundongos em diversos biotérios do país, não oferecendo desta forma riscos aos camundongos.

#### *b) Patógenos*

Expor camundongos NOD a patógenos virais como o vírus da encefalomiocardite ou o vírus da hepatite murino, assim como a bactérias (por exemplo, *Streptococcus* ou *Mycobacterium*) pode prevenir ou retardar o início do DM1 (52).

Os camundongos NOD, deste estudo, foram expostos a um ambiente que não possui barreiras sanitárias ideais contra a entrada de patógenos. A literatura indica que para que esses animais apresentem taxas elevadas de diabetes, devem ser monitorados com dieta autoclavada, água clorada, uso de filtros (microisoladores) sobre as gaiolas e monitorização da saúde dos animais (28,50,51).

O ambiente convencional em que os camundongos NOD foram alocados possui as seguintes normas de controle higiênico-sanitário: (I) ciclo de esterilização de maravalha, gaiolas plásticas, tampas de gaiolas, bicos e “camas”, de 120°C durante 30 minutos; (II) ração autoclavada; (III) gaiolas submersas em solução de *hipoclorito de sódio* diluída a 5%, por 24 horas, e após enxaguadas; (IV) solução de hipoclorito de sódio também utilizada em estantes, paredes, pisos, portas, teto e pias; (V) funcionários de uniforme.

Este biotério não possui filtros isoladores, mais uma ferramenta no controle de patógenos. Também não é realizada análise microbiológica do micro-ambiente para verificar a presença de algum patógeno que poderia estar influenciando os níveis de incidência de diabetes neste estudo.

#### **5.4 REPRODUÇÃO**

De acordo com Leiter (51), os camundongos NOD são excelentes reprodutores, produzindo grandes ninhadas com uma média de 11 camundongos por prole. Neste estudo, verificou-se que os camundongos NOD tiveram em média ninhada de 8 a 9 filhotes, confirmando a alta reprodução, mesmo em biotério convencional. É importante ressaltar que o stress de amamentar e de procriar aumenta a incidência de diabetes nas fêmeas (51). Por esta razão, não incluímos nas análises as fêmeas em que foram acasaladas.

## 5.5 PESO E GLICEMIA

De acordo com a literatura, os camundongos machos pesam em torno de 40 a 60 gramas e as fêmeas entre 30 e 60g na vida adulta (3 a 12 meses de idade). No entanto, o tamanho e o peso podem variar consideravelmente entre as linhagens (28). Os camundongos NOD na vida adulta variaram de 28 a 33 gramas (Gráfico 01). Leiter (51), afirma que quando os camundongos apresentam glicosúria e hiperglicemia progressiva, ocorre polidipsia e poliúria, além da perda de peso.

A perda de peso é um fator que pode ser indicativo de saúde precária dos animais, ou decorrente do procedimento experimental (28). Em nosso estudo, os animais que não desenvolveram diabetes, apresentaram curva de peso normal para idade e sexo. Houve perda de peso nos camundongos que se tornaram diabéticos, a partir da 26<sup>a</sup> semana acompanhamento. Quando os valores foram estratificados por sexo, verificou-se que os machos perdem peso em torno da 28<sup>a</sup> semana de vida, enquanto as fêmeas na 26<sup>a</sup> semana (Gráficos 01).

De acordo com o Laboratório Taconic – Figura 10 (64), no primeiro mês, camundongos machos chegam a  $22,5 \pm 2,5$  gramas e as fêmeas com  $18 \pm 2$  gramas. Os machos apresentaram, em média,  $22,1 \pm 2,74$  gramas e as fêmeas  $18 \pm 2,0$  gramas, no primeiro mês (Anexo 3).

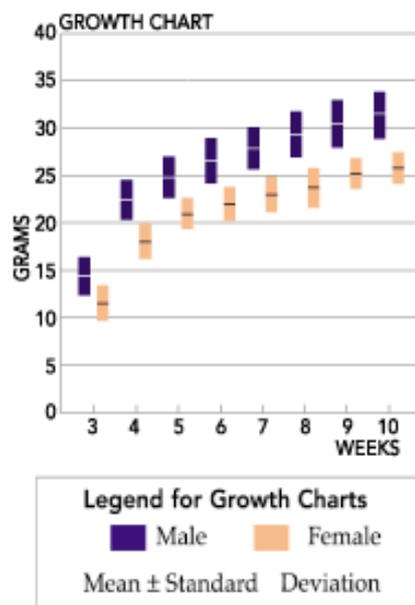


Figura 10: Gráfico que demonstra o ganho de peso de camundongos NOD do Laboratório Taconic (64).

A literatura indica que a glicemia dos camundongos NOD deve ser monitorada apenas após a décima semana de vida (51). No entanto, como este trabalho se propõe a caracterizar o modelo em biotério convencional, foram realizadas medidas de glicemia após o desmame, por volta da terceira semana de vida. Foi considerado diabético o camundongo que apresentasse glicemia maior que 250mg/dl, conforme Leiter (50) do Laboratório Jackson (43).

O que vimos foi que, o diabetes iniciou nos camundongos NOD por volta da 16<sup>a</sup> semana de vida. Toyoda (76) relata que o início da doença em fêmeas ocorre antes que os machos, iniciando entre a oitava e décima semana de idade. Um pouco depois é mostrado no Laboratório Jackson (43) e em outras instituições, onde o início é por volta da décima a décima segunda semana (64,65,66).

## 5.6 PROPORÇÃO DE DIABETES EM BIOTÉRIO CONVENCIONAL

A literatura mundial indica que, quando os camundongos NOD são mantidos em Biotério SPF, sua incidência de diabetes atinge níveis máximos possíveis (51), e que quando são mantidos em ambiente convencional há uma diminuição drástica destes valores (36,50,52,54,74). Leiter (51) relata que se em 30 semanas de idade, a incidência de diabetes em camundongos machos for menor que 20% e nas fêmeas menor que 60%, a presença de um patógeno ou outro agente imunomodulatório na colônia é indicado.

A base para este efeito é incerta, mas tem-se sugerido que a ausência de barreiras sanitárias reflete em um fino ajustamento do sistema imune que ocorre durante a exposição a proteínas estranhas e protege indivíduos de alergia, autoimunidade, e outras doenças da desregulação imune (74).

O dimorfismo sexual na incidência do diabetes humano não é tão óbvia quanto nos camundongos NOD. Todavia, no diabetes tipo 1, mulheres possuem risco aumentado de outras doenças autoimunes, particularmente tireoidite. Assim, doenças com suscetibilidade sexual, têm recebido atualmente atenção especial (76), da mesma forma, os camundongos NOD também desenvolvem outras doenças auto-imunes (74).

Este estudo, que acompanhou em 32 semanas camundongos NOD em biotério convencional, verificou que em 30 semanas 13% dos machos atingem o estado diabético, enquanto 51% das fêmeas. Neste sentido, confirma-se o que o autor acima descreve, que em condições não SPF, a incidência fica abaixo dos valores citados

anteriormente. Se observarmos o que Suzuki (77) comenta, transferir NOD machos de biotério convencional para um biotério *germ free*, aumenta a incidência de 7 a 70% - O biotério da CPEA chegou a 27% de diabetes nos machos em 40 semanas.

No entanto, se analisarmos os camundongos em 40 semanas de idades, verificamos proporções maiores de camundongos diabéticos: 27% dos machos e 51% das fêmeas. Desta forma, o número de camundongos machos aumenta, ao contrário das fêmeas que continuam nas mesmas proporções. Indicando desta forma, que mesmo em ambiente convencional, o biotério em que os camundongos NOD foram alocados provavelmente possui pouca presença de patógenos.

Cabe ressaltar que no presente estudo, não foram incluídos os dados das fêmeas que procriaram e amamentaram para não induzir o aumento na incidência de diabetes. Isto foi feito com base na literatura, onde é citado que, a gestação e a amamentação aceleram o desenvolvimento do diabetes nos camundongos NOD, sendo uma forma de estresse para a fêmea. Entretanto, nenhum dos autores descreve a retirada destes animais, nem mesmo Leiter (43). A inclusão destas fêmeas provavelmente aumentaria a incidência de diabetes nesta casuística.

Há ainda, relato de baixa incidência de diabetes em camundongos NOD mantidos em biotério SPF (< 10% nas fêmeas e 1% nos machos)(54).

## 5.7 SOBREVIDA

Na maior parte das colônias mantidas em SPF, camundongos NOD diabéticos sem tratamento irão sobreviver por 3 a 4 semanas, após a primeira detecção de glicosúria. É muito difícil manter níveis séricos normais de glicose, com o tratamento de insulina, embora o peso dos animais seja mantido e a expectativa de vida prolongada (50,51). Os animais devem ser eutanaziados após o diagnóstico comprovado (51)

No nosso estudo, acompanhamos os camundongos durante 32 semanas, para ver a sobrevida dos mesmos sem tratamento. Verificou-se que em 32 semanas, a sobrevida dos camundongos NOD em ambiente convencional é de 60% (Gráfico 3). Quando a sobrevida é comparada entre os dois sexos, é notado que há diferença significativa: as fêmeas possuem taxas mais baixas de sobrevida (40%) quando comparados com os machos (85%) (Gráfico 09). Este dado se deve, provavelmente, ao fato das fêmeas tornarem-se diabéticas em maior número e intensidade (dados não demonstrados) que os machos (óbito mais precoce e em maior número que os camundongos machos).

Na análise com base no estado glicêmico (camundongos diabéticos e não diabéticos), nota-se que não existe diferença significativa na mortalidade dos camundongos; machos e fêmeas sobrevivem da mesma forma (este dado provavelmente não demonstrou significância devido ao baixo número de camundongos machos diabéticos).

A interpretação destes dados fica dificultada, visto que a literatura científica não publica dados de sobrevivência destes camundongos sem algum tipo de terapia, diabéticos ou não.

## 5.8 TRANSPLANTE CUTÂNEO

A definição genética dos camundongos NOD é endocruzada, ou *inbred* (64)(65);

*Inbred* é a classificação dos camundongos que exibem uma variação genética como resultado de acasalamentos entre irmãos por pelo menos 20 gerações sucessivas ou o equivalente. O cruzamento consanguíneo deve ser acompanhado de rigorosa seleção para eliminar mutações deletérias e anular a transmissão genética pretendida. Vários métodos incluindo eletroforese, marcadores sorológicos e enxertos de pele são usados no monitoramento genético de linhagens consanguíneas (28).

Neste estudo, optou-se pelo enxerto de pele a cada geração, para verificar o status genético da linhagem. Todos os camundongos transplantados não rejeitaram o enxerto, confirmando a isogenicidade da linhagem.

Faz-se necessário um acompanhamento contínuo desta linhagem neste ambiente, analisando uma amostra de tamanho mais significativo. Assim, será possível verificar se há uma modificação na incidência de diabetes conforme o número de gerações.

No entanto, os resultados deste estudo, já são suficientes para caracterizar valores de referência, para futuros estudos envolvendo camundongos NOD em ambiente convencional.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados no presente estudo é possível concluir que:

Camundongos NOD atingem 40% de incidência de diabetes em 32 semanas de acompanhamento, em ambiente convencional.

Camundongos NOD fêmeas possuem maior incidência de diabetes (51%) em oito meses, comparado aos camundongos machos (27%) em ambiente convencional.

A sobrevivência das fêmeas (40%) é menor do que os machos (85%), em 32 semanas de acompanhamento.

Quando ajustado para presença ou não de diabetes, verifica-se que machos e fêmeas possuem taxas de sobrevivência semelhantes.

Os camundongos NOD neste estudo confirmam isogenicidade da linhagem, através da ausência de rejeição de enxertos cutâneos realizados entre si.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26 Suppl :5-20.

(2) Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso Brasileiro sobre diabetes: Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e Tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2. Rio de Janeiro: 2003.

(3) Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, et al. Diabetes Mellito: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 2002 fev, 46(1):16-26.

(4) Milech A, Oliveira JEP. Diabetes Mellitus – Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar. São Paulo: Atheneu; 2004.

(5) Gruber W, Lander T, Leese B et al. The economics of diabetes and diabetes care. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, p.5, 1998.

(6) Libman I, Songer T, LaPorte R. How many people in the U.S. have IDDM ? *Diabetes Care* 1993; 16: 841-2.

(7) Rewers M, Klingensmith GJ. Prevention of Type 1 Diabetes. *Diabetes Spectrum* 1997; 10(4): 282-292.

(8) Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *British Medical Journal* 2004 mar 24, 328: 750-754.

(9) Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; 358: 221-229.

(10) Pitkaniemi J, Onkamo P, Tuomilehto, Arjas E. Increasing incidence of type I diabetes – role for genes? *BioMed Central genetics* 2004 April 02; 5: 1-13.

- (11) Karam JH. Diabetes mellitus & Hypoglycemia. In: Current: Medical Diagnosis & treatment. 2000.
- (12) Ferreira SRG, Franco LJ, Vivolo MA, Negrato CA, Simões ACP, Venturelli CR. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. *Diabetes Care* 2000; 16: 701-704.
- (13) Campos JJB, Almeida HG, Iochida LC, Franco LJ. Incidência de Diabetes Mellitus Insulino-Dependente (Tipo 1) na cidade de Londrina, PR, Brasil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 1998;42(1):36-44.
- (14) Cesarini PR, Mendonça E, Fernandes V et al. Prevalência dos marcadores imunológicos anti-GAD e anti-IA2 em parentes de primeiro grau de diabéticos do tipo 1 em amostra da população da grande São Paulo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2003; 49(4): 395-400.
- (15) Koczawara K, Schenker M, Schmid S, Kredel K et al. Characterization of antibody responses to endogenous and exogenous antigen in the nonobese diabetic mouse. *Clinical Immunology* 2003; 106: 155-162.
- (16) Melanitou E, Fain P, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A (immune mediated) diabetes. *Journal of Autoimmunity* 2003; 21: 93-98.
- (17) Balda CA, Pacheco-Silva A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. *Revista da Associação Médica Brasileira* 1999; 45 (2): 175-80.
- (18) Rossini AA, Mordes JP, Greiner DL, Stoff JF. Islet Cell Transplantation Tolerance. *Transplantation* 2001 oct 27; vol 72: S43-S46 N8.
- (19) Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infectious in patients with diabetes mellitus. *New England Journal Medicine* 1999; 342(25): 1906-912.
- (20) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *The Lancet* 1998; 352: 854-865.

- (21) Gotoh M, Sato Y, Abe T, Kanazawa Y. New approaches for successful islet transplantation. *Journal Hepatobiliary Pancreatic Surgery* 2000; 7: 358-363.
- (22) The DCCT Research Group. Expanded role of the dietitian in the Diabetes Control and Complications Trial: Implications for clinical practice. *The Journal of the American Dietetic Association* 1993; 93:758-767.
- (23) Dills DC. Novos aspectos da terapêutica com insulina no diabetes tipo 1 e tipo 2. *Current Diabetes Reports Latin America* 2002; 2:125-32.
- (24) Gruessner RWG, Sutherland DER. *Transplantation of the pancreas*. Minneapolis: Springer; 2003.
- (25) Gruessner AC, Sutherland DER, Gruessner RGW. *International Pancreas Transplant Registry*. In: *Transplantation of the pancreas*. Minneapolis: Springer; 2003. 547p.
- (26) Robertson RP. *Islet Transplantation as a Treatment for Diabetes — A Work in Progress*. *New England Journal Medicine* 2004; 350:694-705.
- (27) Stites DP, Terr AI, Paslow TG. *Imunologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan; 2000.
- (28) Gui Mi Ko, Andersen ML, D'Almeida V, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães JE, et al. *Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação*. São Paulo: UNIFESP; 2004.
- (29) Andrade A. O Bioterismo: evolução e importância. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002.
- (30) Couto SER. Classificação dos Animais de Laboratório quanto ao *Status* Sanitário. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002.
- (31) Mezadri TJ, Tomáz VA, Amaral VLL. *Animais de laboratório: Cuidados na iniciação experimental*. Florianópolis: Editora UFSC; 2004.

(32) Buschard K. Meet a research Group Diabetes Research Group, Bartholin Instituted, Kommunehospitalet, Conpenhagen, Denmark. Scand J. Lab. Anim Sci 2001; vol 28 N<sup>o</sup>1.

(33) Sieher FE, Traystman RJ. Ethical Issues Involved in the Development of Animal Models for Type I Diabetes: Models of Type I Diabetes – Part One. Institute for Laboratory Animal Research Journal 1993; vol 35(1): 01-06.

(34) Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the Rat pancreas. Physiology Research 2001, 50:536-546.

(35) Rayat GR, Singh B, Korbutt GS, Rajotte RV. Single injection of insulin delays the recurrence of diabetes in syngeneic islet-transplanted diabetic NOD mice. Transplantation 2000. vol.70, n<sup>o</sup>6, Sept 27, 976-985.

(36) Hernandorena BH, Gonzales JCR, Garcia JCR. Animales de Laboratorio en la Endocrinología: Biomodelos de la Diabetes Mellitus tipo 1. Revista Cubana Endocrinologia 2001; 12(3): 168-77.

(37) Leiter EH, Herrath Mv. Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal. Diabetologia 2004; 47: 1657-1660.

(38) Delarche FH. Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes? Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2001; 34: 437-447.

(39) Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? Nature Medicine 1999 Jun; vol 5 N 6: 601-604.

(40) Delovitch TL, Singh B. The Nonobese Diabetic Mouse as a Model of Autoimmune Diabetes: Immune Dysregulation Gets the NOD. Immunity 1997 dec; vol 7: 727-738.

(41) Rosmalen JGM, Leenen PJM, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. TRENDS in Endocrinology & Metabolism 2002 jul; 13(5): 209-214.

- (42) Eisenbarth GS. Animal Models of type 1 Diabetes: Genetics and immunological function. IN: L Type I diabetes: Molecular, Cellular, and Clinical Immunology [capítulo de livro on line] [capturado 2005 Ago 02]; Chapter 3: Disponível em: <http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/oxch3.html>
- (43) Leiter EH, Staff S. NOD/Ltj Mice Available. [página on line]1993 [capturado 2004 maio 04]; Disponível em: <http://www.jax.org>.
- (44) Kodama S, Kühnreiter W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science* 2003; 302: 1223-1227.
- (45) Hanafusa T, Miyagawa J, Nakajima H, Tomita K, Kuwajima M et al. The NOD mouse. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1994; 24S: S307-S311.
- (46) Gross DJ, Weiss L, Reibstein I, Hedlund G, et al. The immunomodulator Linomide: role in treatment and prevention of autoimmune diabetes mellitus. *International Immunopharmacology* 2001; 1: 1131-1139.
- (47) Giuseppe Matarese, Veronica Sanna, Robert I. Lechler, Nora Sarvetnick, Silvia Fontana, Serafino Zappacosta, Antonio La Cava. Leptin Accelerates Autoimmune Diabetes in Female NOD Mice. *Diabetes* 2002; 51(5):1356-1361.
- (48) Kishimoto H, Sprent J. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nature Immunology* 2001 nov; vol 2 nº11: 1025-1031.
- (49) Aoki CA, Borchers AT, Ridgway WM, Keen CL, Ansan AA, Gershwin ME. NOD mice and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4: 373-379.
- (50) Leiter EH. The NOD Mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and Environment in development of autoimmune disease. *Institute for Laboratory Animal Research Journal Models of type I diabetes – part one*. 1993; V 35(1)
- (51) Leiter EH. The NOD mouse: A model for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Current Protocols in Immunology*. [PDF on line] 1997 [capturado em 2004 nov 10]; 15.9.1. Supplement 24. Disponível em [www.jax.org/t1dr/NOD\\_CPI\\_mod.pdf](http://www.jax.org/t1dr/NOD_CPI_mod.pdf)

(52) Bowman MA, Leiter EH, Atkinson, MA. Prevention of Diabetes in the NOD mouse: Implications for Therapeutics Intervention in Human Disease. *Immunology Today* 1994; vol.15 n° 3: 115-120.

(53) Vaarala O. Intestinal Immunity and Type 1 Diabetes. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 2004; 39(3):S732-S733.

(54) Bieg S, Lernmark A. Animal Models for Insulin-dependent diabetes mellitus. In: Totowa NJ. *Contemporary endocrinology autoimmune endocrinopathies*. Humana Press 1999: 113-139.

(55) Funda DP, Kaas A, Bock T, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K. Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes Metabolic Research* 1999; 15:323–327.

(56) Mathieu C, Etten EV, Decallonne B, Guilietti A, Gysemans C, Bouillon R, Overbergh L. Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D3 as modulators in the immune system. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2004; 89-90: 44-452.

(57) Salminen KK, Vuorinen T, Oikarinen S, Helminen M, Simell S et al. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Endocrinology & Metabolism* 2004; 21:156–164.

(58) Saravia –Fernandez F, Durant S, el Hasnaoui A, Dardenne M, Homo-Delarche F. Environmental and experimental procedures leading to variations in the incidence of diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Autoimmunity* 1996; 24: 113-121.

(59) Christen U, Juedes A, Homann D, Herrath MG. Virally induced inflammation and therapeutic avenues in type 1 diabetes. *Endocrinology Metabolism Clinical North America* 2004; 33: 45-58.

(60) Serreze DV, Gaskins HR, Leiter EH. Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice. *Journal Immunology* 1993; 150: 2534-3543.

(61) Tochino Y. The NOD mouse as a model of type 1 diabetes. *Critical Review Immunology* 1987; 1: 49-81.

(62) McClive PJ, Baxter AG, Morahan G. Genetic polymorphisms of the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Immunology Cell Biology* 1994; 72: 137-142.

(63) Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunology* 2001; 2: 777-780.

(64) Non-Obese Diabetic (NOD) Inbred Mice. Taconic Animal Models [on line] [capturado em 18 de setembro 2004]. Disponível em <<http://www.taconic.com/anmodels/NOD.htm>>

(65) Type 1 Diabetes Research. Incidence Studies: JR 1976 – NOD/Ltj [on line] [capturado em 18 de setembro de 2004]. Disponível em: <[http://www.jax.org/t1dr/incidence\\_jr1976.html](http://www.jax.org/t1dr/incidence_jr1976.html)>

(66) The Department of Diabetes & Metabolic Medicine. Diabetes & Immunology: UnitThe NOD/Ba colony [on line] [capturado em 18 de setembro de 2005]. Disponível em: <http://www.smd.qmul.ac.uk/diabetes/nodweb.htm>

(67) Pereira MG. Cap 1: Conceitos Básicos de Epidemiologia. In: *Epidemiologia: Teoria e Prática*. 1995 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp1-16.

(68) ROCHE DIAGNÓSTICA BRASIL. [on line] [capturado em 07 de novembro de 2005]. Disponível em: <<http://www.roche-diagnostics.com.br/web/default.asp>>

(69) COBEA. *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal: Legislação e Ética*. São Paulo. [on line] [capturado em 20 de março de 2004]. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>

(70) BRASIL. Lei 714, de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. *Conselho Federal de Medicina Veterinária*, art 16, 20 jun. 2002.

(71) Sesterheim P, Saitovitch D. Transplante experimental cardíaco heterotópico e cutâneo em camundongos. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 2005; 20(2): 174-181.

(72) RIO GRANDE DO SUL. Lei 11.915, de 21 de maio de 2003. Institui o Código Estadual de Proteção aos Animais. *Constituição do Estado*, art.82 inc IV, 29 mai. 2003.

(73) Modelo Para Apresentação de Trabalhos Acadêmicos, Teses e Dissertações. Biblioteca Central Irmão José Otão-PUCRS. [on line] [capturado em 20 de novembro de 2005]. Disponível em <[www.pucrs.br/biblioteca](http://www.pucrs.br/biblioteca)>

(74) Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: A Model of Immune Dysregulation. *Annual Reviews Immunology* 2005; 23: 447-485.

(75) Elliot RB, Reddy SN, Bibby NJ, Kida K. Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 1998; 31: 62-64.

(76) Toyoda H. Contribution of T cells to the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Bioessays* 1998; 20 : 750-757

(77) Suzuki Y, Yamada T, Takao T, Fujimura T, Kawamura E et al. Diabetogenic effects of lymphocyte transfusion on the NOD nude mouse. In: *Immune Deficient Animals in Biomedical Research*. Base: Karger; 1987.

## 9. ANEXOS

Tabela 2: Peso (em gramas) dos camundongos NOD.

Mês	Machos (n)	Fêmeas (n)	Total (n)
01	17,7 ± 2,3 (79)	15,7 ± 1,7 (58)	16,9 ± 2,3 (137)
01	22,1 ± 2,7 (79)	18,0 ± 2,0 (58)	20,4 ± 3,2 (137)
02	24,8 ± 2,6 (79)	19,9 ± 2,3 (58)	22,79 ± 3,5 (137)
02	27,0 ± 2,7 (72)	21,7 ± 2,2 (51)	24,8 ± 3,6 (123)
03	29,1 ± 2,9 (72)	23,4 ± 2,3 (51)	26,7 ± 3,9 (123)
03	30,6 ± 2,8 (72)	25,0 ± 2,4 (51)	28,3 ± 3,8 (123)
04	31,7 ± 2,8 (62)	25,8 ± 1,8 (51)	29,1 ± 3,8 (113)
04	32,6 ± 3,0 (52)	25,7 ± 2,7 (44)	29,4 ± 4,4 (96)
05	33,5 ± 2,8 (52)	26,2 ± 2,9 (43)	30,2 ± 4,6 (95)
05	34,3 ± 2,5 (47)	26,7 ± 3,2 (37)	30,9 ± 4,7 (84)
06	34,8 ± 2,6 (41)	27,0 ± 3,0 (33)	31,3 ± 4,8 (74)
06	34,8 ± 2,8 (25)	26,6 ± 3,3 (23)	30,9 ± 5,1 (48)
07	35,4 ± 2,9 (22)	27,3 ± 2,7 (21)	31,5 ± 4,9 (43)
07	35,1 ± 2,3 (19)	26,0 ± 3,4 (15)	31,1 ± 5,3 (34)
08	34,2 ± 3,0 (19)	25,8 ± 3,9 (15)	30,5 ± 5,4 (34)
08	35,4 ± 3,7 (19)	28,7 ± 4,4 (11)	33,0 ± 2,35 (30)

Tabela 3: Peso (em gramas) dos camundongos, de acordo com a presença ou não de diabetes.

Mês	Não Diabéticos (n)	Diabéticos (n)
01	17,0 ± 2,3 (114)	16,2 ± 2,4 (23)
01	20,5 ± 3,3 (114)	19,9 ± 2,6 (23)
02	22,9 ± 3,6 (114)	22,0 ± 2,8 (23)
02	25,0 ± 3,8 (100)	24,2 ± 2,6 (23)
03	27,0 ± 3,9 (100)	25,5 ± 3,2 (23)
03	28,6 ± 3,8 (100)	26,9 ± 3,5 (23)
04	29,5 ± 3,8 (90)	27,4 ± 3,1 (23)
04	30,3 ± 4,0 (74)	26,3 ± 4,5 (22)
05	31,2 ± 4,0 (74)	26,8 ± 5,1 (21)
05	31,6 ± 4,4 (68)	28,0 ± 4,8 (16)
06	32,1 ± 4,5 (60)	28,1 ± 4,9 (14)
06	32,2 ± 4,4 (34)	27,5 ± 5,3 (14)
07	32,3 ± 4,5 (32)	28,9 ± 5,2 (11)
07	32,2 ± 4,3 (25)	28,0 ± 7,0 (9)
08	31,9 ± 4,2 (25)	26,5 ± 6,6 (9)
08	34,1 ± 3,9 (25)	27,2 ± 7,1 (5)

Tabela 4: Peso (em gramas) dos camundongos **não diabéticos** e **diabéticos** de acordo com sexo:

Mês	Não diabéticos		Diabéticos	
	Machos (n)	Fêmeas (n)	Machos (n)	Fêmeas (n)
01	17,7 ± 2,3 (75)	15,6 ± 1,5 (39)	17,5 ± 3,3 (4)	16,0 ± 2,2 (19)
01	22,1 ± 2,7 (75)	17,5 ± 1,8 (39)	23,9 ± 2,0 (4)	19,1 ± 1,9 (19)
02	24,8 ± 2,7 (75)	19,3 ± 2,0 (39)	25,6 ± 1,1 (4)	21,2 ± 2,4 (19)
02	27,0 ± 2,7 (68)	20,8 ± 1,7 (32)	28,2 ± 1,1 (4)	23,3 ± 2,0 (19)
03	28,9 ± 2,9 (68)	22,7 ± 2,2 (32)	30,4 ± 2,7 (4)	24,5 ± 2,3 (19)
03	30,6 ± 2,8 (66)	24,5 ± 2,1 (32)	31,9 ± 2,3 (4)	25,8 ± 2,7 (19)
04	31,6 ± 2,9 (58)	25,6 ± 1,8 (32)	32,9 ± 2,1 (4)	26,2 ± 1,8 (19)
04	32,5 ± 3,1 (48)	26,3 ± 2,0 (26)	33,0 ± 1,5 (4)	24,9 ± 3,4 (18)
05	33,5 ± 2,8 (48)	26,9 ± 1,9 (26)	34,0 ± 3,2 (4)	25,1 ± 3,8 (17)
05	34,3 ± 2,6 (43)	27,0 ± 3,0 (25)	34,2 ± 0,9 (4)	25,9 ± 3,7 (12)
06	34,9 ± 2,7 (37)	27,5 ± 2,5 (23)	34,0 ± 1,0 (4)	25,7 ± 3,7 (10)
06	35,0 ± 2,9 (21)	27,8 ± 2,4 (13)	33,9 ± 2,4 (4)	24,9 ± 3,6 (10)
07	35,4 ± 3,1 (19)	27,9 ± 2,1 (13)	35,7 ± 1,3 (3)	26,3 ± 3,4 (8)
07	34,9 ± 2,4 (16)	27,4 ± 1,8 (9)	36,0 ± 1,9 (3)	23,9 ± 4,3 (6)
08	34,5 ± 2,5 (16)	27,1 ± 1,2 (9)	32,1 ± 5,1 (3)	23,8 ± 5,6 (6)
08	36,5 ± 2,4 (16)	29,8 ± 1,5 (9)	29,6 ± 4,9 (3)	23,5 ± 10,6 (2)

Tabela 5: Glicemia (em mg/dl) dos Camundongos NOD.

Mês	Machos (n)	Fêmeas (n)	Total (n)
01	88,0 ± 10,8 (79)	83,8 ± 7,9 (58)	86,2 ± 9,9 (137)
01	92,4 ± 10,1 (79)	86,9 ± 8,1 (58)	90,0 ± 9,7 (137)
02	94,0 ± 14,8 (79)	88,7 ± 9,7 (58)	91,7 ± 13,1 (137)
02	92,3 ± 8,2 (71)	93,9 ± 31,1 (51)	93,0 ± 21,0 (122)
03	93,9 ± 8,3 (71)	101,4 ± 48,9 (51)	97,0 ± 32,3 (122)
03	93,2 ± 11,2 (71)	114,1 ± 74,9 (51)	101,9 ± 50,0 (122)
04	92,7 ± 11,5 (62)	143,16 ± 127,8(50)	115,2 ± 88,9 (112)
04	100,9 ± 36,7 (52)	156,1 ± 128,6 (44)	126,2 ± 94,7 (96)
05	110,7 ± 73,2 (52)	224,1 ± 206,9 (43)	162,0 ± 158,9 (95)
05	115,6 ± 79,4 (47)	194,2 ± 182,0 (37)	150,2 ± 139,2 (84)
06	113,7 ± 85,2 (41)	194,7 ± 185,6 (33)	149,8 ± 143,9 (74)
06	140,5 ± 107,4 (25)	240,5 ± 208,0(22)	187,3 ± 168,3 (47)
07	126,3 ± 85,4 (22)	241,1 ± 219,3 (21)	182,4 ± 173,0 (43)
07	143,4 ± 110,1 (19)	274,1 ± 226,7 (15)	201,0 ± 181,0 (34)
08	169,0 ± 155,2 (19)	289,7 ± 239,1 (15)	222,2 ± 181,0 (34)
08	169,7 ± 153,1 (19)	193,45 ± 202,4(11)	178,4 ± 169,8 (30)

Tabela 6: Glicemia (em mg/dl) de acordo com a presença ou não de diabetes.

Mês	Não Diabéticos (n)	Diabéticos (n)	Total (n)
01	86,5 ± 10,1 (115)	84,8 ± 8,3 (22)	86,2 ± 9,9 (137)
01	89,8 ± 9,6 (115)	90,9 ± 10,2 (22)	90,0 ± 9,7 (137)
02	91,0 ± 11,8 (115)	95,5 ± 18,2 (22)	91,7 ± 13,1 (137)
02	91,3 ± 8,2 (100)	100,8 ± 46,3 (22)	93,0 ± 21,0 (122)
03	92,6 ± 8,9 (100)	117,2 ± 71,6 (22)	97,0 ± 32,3 (122)
03	92,5 ± 10,7 (100)	144,8 ± 107,3 (22)	101,9 ± 50,0 (122)
04	98,5 ± 52,3 (89)	179,8 ± 153,3 (23)	115,2 ± 88,9 (112)
04	97,0 ± 21,4 (74)	224,4 ± 160,9 (22)	126,2 ± 94,7 (96)
05	106,0 ± 63,0 (74)	359,5 ± 217,9 (16)	162,0 ± 158,9 (95)
05	101,6 ± 28,5 (68)	356,8 ± 217,9 (16)	150,2 ± 139,2 (84)
06	99,6 ± 28,4 (60)	365,1 ± 226,2 (14)	149,8 ± 143,9 (74)
06	112,8 ± 41,1 (34)	382,1 ± 217,0 (13)	187,3 ± 168,3 (47)
07	100,4 ± 19,0 (32)	421,0 ± 201,1 (11)	182,4 ± 173,0 (43)
07	112,8 ± 33,2 (25)	446,3 ± 199,5 (9)	201,0 ± 181,0 (34)
08	134,2 ± 101,3 (25)	466,8 ± 217,2 (9)	222,2 ± 181,0 (34)
08	106,2 ± 32,5 (25)	539,6 ± 84,0 (5)	178,4 ± 169,8 (30)

Tabela 07: Glicemia (em mg/dl) dos camundongos **não diabéticos** e **diabéticos**, de acordo com sexo:

Mês	Não diabéticos		Diabéticos	
	Machos (n)	Fêmeas (n)	Machos (n)	Fêmeas (n)
01	88,0 ± 11,0(75)	83,4 ± 7,5(39)	86,3 ± 6,8 (4)	84,6 ± 8,7 (19)
01	92,0 ± 10,1(75)	85,7 ± 6,9(39)	101,6 ± 6,6(4)	89,21 ± 9,8(19)
02	92,9 ± 12,4 (75)	87,4 ± 9,8(39)	120,6 ± 40,2(4)	91,5 ± 9,2(19)
02	92,3 ± 8,2 (68)	89,1 ± 8,0 (32)	93,3 ± 11,0(4)	102,0 ± 9,8(19)
03	93,7 ± 8,4(68)	90,1 ± 9,6(32)	96,67 ± 6,6(4)	120,4 ± 76,7(19)
03	92,7 ± 10,0(32)	92,1 ± 10,0(32)	105,3 ± 4,5(4)	151,1 ± 114,6(19)
04	91,6 ± 9,4(58)	111,5 ± 87,1(31)	108,7 ± 25,3(4)	194,7 ± 165,1(19)
04	96,7 ± 15,8(48)	97,6 ± 29,5(26)	151,7 ± 123,5(4)	240,6 ± 166,7(18)
05	100,4 ± 23,6(48)	116,2 ± 101,8(26)	234,2 ± 245,5(4)	389,0 ± 219,9(17)
05	103,9 ± 33,4(43)	97,6 ± 17,1(25)	241,2 ± 240,9(4)	395,4 ± 205,9(12)
06	98,5 ± 33,1(37)	101,2 ± 19,0(23)	253,7 ± 234,0(4)	409,7 ± 219,0(10)
06	119,1 ± 50,2(21)	102,6 ± 16,1(13)	252,7 ± 235,6(4)	439,6 ± 194,3(9)
07	108,0 ± 14,7(19)	89,3 ± 19,8(13)	242,6 ± 226,3(4)	488,0 ± 156,1(8)
07	120,5 ± 38,0(16)	99,1 ± 16,3(9)	265,6 ± 267,8(3)	536,6 ± 86,9(6)
08	150,1 ± 124,5(16)	105,8 ± 18,0(9)	269,6 ± 287,1(3)	565,5 ± 86,9(6)
08	108,0 ± 37,6(16)	102,8 ± 22,4(9)	498,6 ± 88,6(3)	601,0 ± 0,0(2)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 669/05-CEP

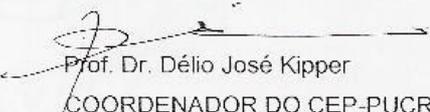
Porto Alegre, 29 de julho de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "A caracterização do modelo experimental NOD (nonObesity diabetic) em ambiente convencional para o estudo do diabetes mellitus tipo 1".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente

  
Prof. Dr. Délio José Kipper  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Mest Vanessa Ramos Kirsten  
N/Universidade

Vanessa Ramos Kirsten



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA



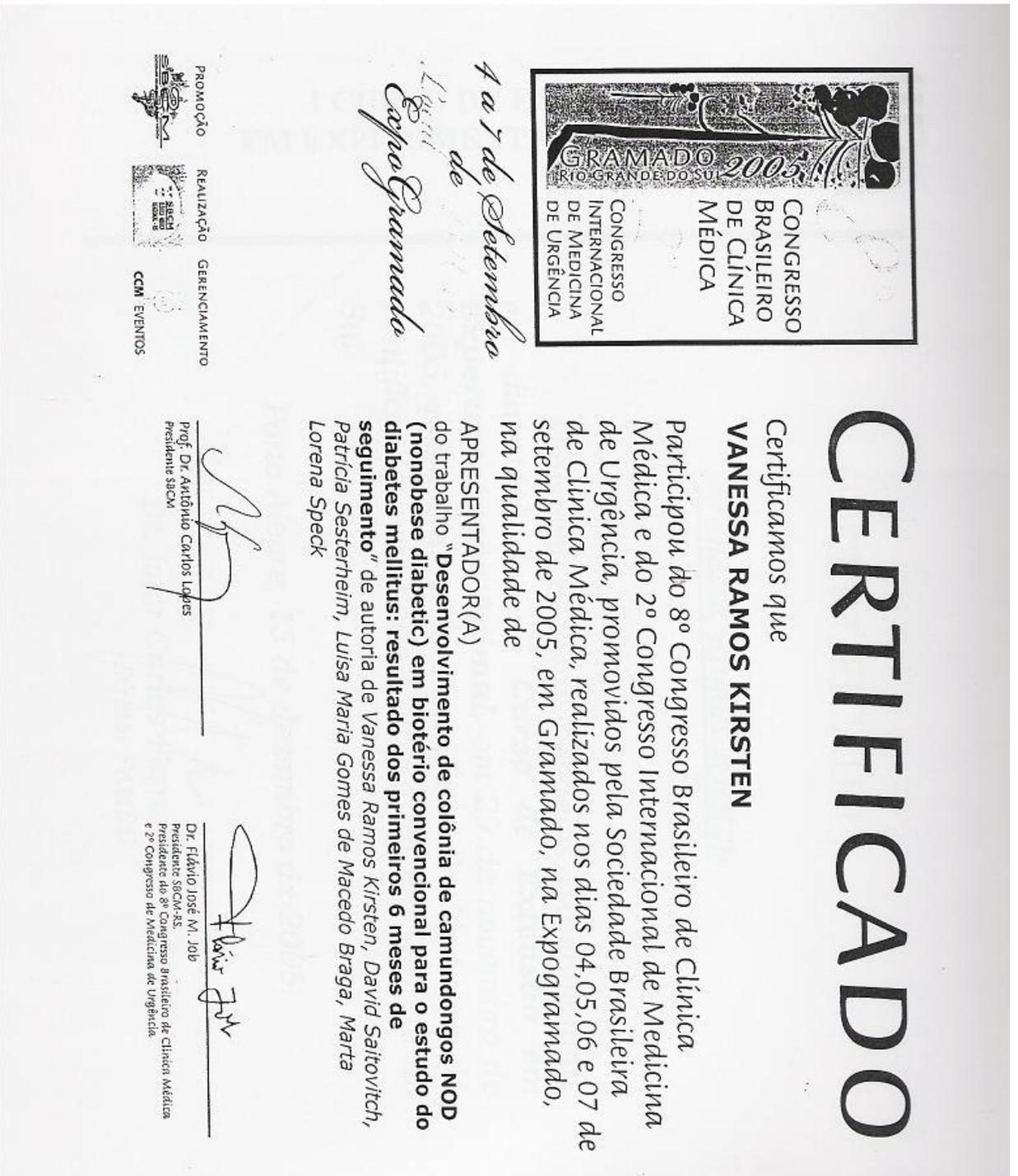
A Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no uso de suas atribuições

Certifica, para os devidos fins, que VANESSA RAMOS KIRSTEN realizou prova de proficiência em Língua Inglesa, no dia 11/12/2004, sob a coordenação do Departamento de Letras Estrangeiras da Faculdade de Letras da PUCRS, com indicação de PROFICIENTE.

Porto Alegre, 25 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
em Medicina e Ciências da Saúde

Vanessa Ramos Kirsten





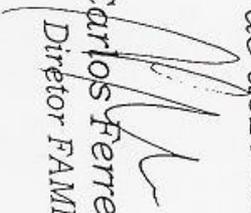
## I CURSO DE EXTENSÃO EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

### CERTIFICADO

Vanessa Ramos Kirsten

Ministrou o tema "Modelos experimentais em diabetes", no **I Curso de Extensão em Experimentação Animal**, em 29 de novembro de 2005, promovido pela Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 15 de dezembro de 2005.

  
Dr. Iuan Carlos Ferreira Antonello  
Diretor FAMED