

**Renato Delascio Lopes**

**HOMOCISTEÍNA, FATOR VON WILLEBRAND E  
LIPÍDEOS EM RATOS ALBINOS PORTADORES DE  
DIABETES MELITO INDUZIDO POR  
ESTREPTOZOTOCINA**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina para obtenção  
do Título de Doutor em Ciências**

**São Paulo  
2006**

Renato Delascio Lopes

HOMOCISTEÍNA, FATOR VON WILLEBRAND E LIPÍDEOS EM RATOS  
ALBINOS PORTADORES DE DIABETES MELITO INDUZIDO POR  
ESTREPTOZOTOCINA

Tese apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Gabriel Junior  
Co-Orientadora: Dra. Lindalva Batista Neves

São Paulo  
2006

Lopes, Renato Delascio

**Homocisteína, fator von Willebrand e lipídeos em ratos albinos portadores de diabetes melito induzido por estreptozotocina. /Renato Delascio Lopes. -- São Paulo, 2006.**

xxi, 114f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Título em inglês: Homocysteine, von Willebrand factor and lipids in albino rats with diabetes Mellitus streptozotocin induced.

1. Homocisteína. 2. Fator de von Willebrand. 3. Lipídeos. 4. Diabetes mellitus experimental. 5. Estreptozotocina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Chefe do Departamento de Medicina:

Profa. Dra. Emília Inoue Sato

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica:

Profa. Dra. Leny Toma

**Renato Delascio Lopes**

**HOMOCISTEÍNA, FATOR VON WILLEBRAND E LIPÍDEOS EM  
RATOS ALBINOS PORTADORES DE DIABETES MELITO  
INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

Presidente da banca: Prof. Dr. Alexandre Gabriel Junior

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Aprovado em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Tese elaborada no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, área de concentração: Clínica Médica (recomendado pelo Conselho Técnico Científico – OF./CTC/Nº 61/2003 de 24/03/2003 de acordo com as normas vigentes, Portaria Ministerial nº 2264 de 19/12/1997) e apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**“A pesquisa científica é infinita porque a cada descoberta aparecem dez novas perguntas. A verdade é que a ciência não é busca indefinida da verdade. É bem mais o processo de compreensão do que o produto de uma busca. Sempre sabemos mais, à medida que expandimos as fronteiras da incerteza”.**

**Carruthers**

**Dedicatória**



A **Deus**,  
em quem tudo se resume.

Aos meus pais, **Antonio Carlos** e **Vera Lúcia**, fonte inesgotável de amor, estímulo e dedicação, que têm permitido minha formação pessoal e médica.

Aos meus irmãos, **Márcio** e **Carla**, cuja amizade e companheirismo têm sido fundamentais para minhas realizações.

Aos meus avós, **Domingos** e **Eduarda**, **Américo** e **Walma**, exemplos de dedicação e humildade.

Ao meu pai, **Prof. Dr. Antonio Carlos Lopes**, meu mentor, exemplo e ídolo, a quem sou eternamente grato pela minha formação pessoal e profissional e pela grande felicidade e orgulho de tê-lo como meu melhor amigo e verdadeiro mestre.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Gabriel Junior**, cuja inteligência brilhante, idealismo e grande capacidade de formação de discípulos, muito têm contribuído para a medicina.

**Agradecimentos**

À querida **Maria Paulina Posada Vergara** pelo constante estímulo e carinho.

À **Dra. Lindalva Batista Neves** pela importante colaboração em todas as fases deste trabalho.

À **Dra. Gleice Margarete de Souza Conceição** pela colaboração no estudo estatístico.

À Bibliotecária **Érika Hayashi Nakayama** pela revisão bibliográfica.

Ao Secretário do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, **Sr. Venâncio Pedroza Ribeiro**, cujo empenho e dedicação têm contribuído para seu elevado nível.

À **Profa. Dra. Vânia D`Almeida** pelo incansável trabalho durante as dosagens bioquímicas.

Aos colegas e amigos, **Endrigo Emanuel Giordani, Hélio Penna Guimarães, Letícia Sandre Vendrame, Marcello Scattolini, Max Artur Fonseca Junior e Salete Aparecida da Ponte Nacif**, pela amizade e apoio indispensáveis para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos funcionários, **Cecília Cabral Jahnel, Gláucia Pelizari, Regina da Silva Fernandes, Renato Hideyoshi Tamanaha, Sandra Regina Abud e Taís Helena Quaglio**, cujo trabalho na Disciplina de Clínica Médica tem permitido seu crescimento infindável.

## Sumário

Lista de Abreviaturas.....	xiv
Lista de Símbolos.....	xv
Lista de Quadro e Tabelas.....	xvi
Lista de Figuras.....	xvii
Resumo.....	xix
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	16
3. Método.....	18
4. Análise estatística.....	26
5. Resultados.....	28
6. Discussão.....	57
7. Conclusões.....	69
8. Referências Bibliográficas.....	71
Abstract	
Bibliografia Consultada	
Anexos	

## Listas de Abreviaturas

5-MTHFR	5-metileno-tetraidrofolato redutase
CBS	cistationina beta sintetase
Cr	creatinina
CT	colesterol total
d	dia
DAC	doença arterial coronária
DCV	doença cardiovascular
DM	diabetes melito
DNA	ácido desoxirribonucléico
dp	desvio padrão
Fig(s)	figura(s)
fvW	fator von Willebrand
Glic inicial	glicemia inicial
Glic final	glicemia final
GP1b	glicoproteínas da membrana da plaqueta 1b
HCl	ácido clorídrico
HDL-colesterol	high density lipoprotein cholesterol
He	homocisteína
HHe	hiper-homocisteinemia
HPLC	high pressure liquid chromatography
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	água oxigenada
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	intervalo de confiança
IP	intraperitoneal
LDL-colesterol	low density lipoprotein cholesterol
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
Na-K-ATPase	sódio-potássio ATPase
OPD	ortophenyldiamina
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio 1
PBS	salina tamponada/fosfato (tampão fosfato)
PKC	proteínocinase C
SAM	S-adenosil metionina
SD	standard deviation
Sem	semanas
STZ	estreptozotocina
Tab	tabela
TG	triglicérides
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
VLDL-colesterol	very low density lipoprotein cholesterol

## Lista de Símbolos

mg/kg	miligrama por quilograma de peso corporal
g/m <sup>2</sup>	grama por metro quadrado de superfície corporal
n <sup>o</sup>	número
°C	grau centígrado
±	mais ou menos
g	grama
β	beta
γ	gama
mg/dL	miligrama por decilitro
U/L	unidade por litro
μmol/L	micromol por litro
μl	microlitro
m/L	mol por litro



## **Lista de Quadro e Tabelas**

Quadro 1– Organograma do desenho do estudo experimental.....	25
Tabela 1– Média (e desvio padrão) do consumo de dieta e do peso de ratos a cada semana, segundo o grupo.....	29
Tabela 2– Medidas descritivas para o peso inicial e final e para o ganho de peso dos animais em cada grupo. ....	30
Tabela 3– Medidas descritivas para as variáveis em estudo, segundo o grupo e nível descritivo da ANOVA.....	32
Tabela 4– Coeficientes de correlações de Pearson entre as variáveis em estudo no grupo diabetes .....	43

## Lista de Figuras

Figura 1– Média e intervalo de confiança (95%) para o ganho de peso dos animais em cada grupo.....	31
Figura 2– Box-plot de glicemia de jejum inicial em cada grupo .....	33
Figura 3– Box-plot de glicemia de jejum final em cada grupo .....	34
Figura 4– Box-plot da homocisteína plasmática total em cada grupo.....	35
Figura 5– Box-plot fator von Willebrand em cada grupo.....	36
Figura 6– Box-plot de colesterol total em cada grupo .....	37
Figura 7– Box-plot de HDL-colesterol em cada grupo.....	38
Figura 8– Box-plot de LDL-colesterol em cada grupo .....	39
Figura 9– Box-plot de VLDL-colesterol em cada grupo .....	40
Figura 10– Box-plot de triglicérides em cada grupo .....	41
Figura 11– Box-plot de creatinina em cada grupo.....	42
Figura 12– Diagrama de dispersão entre glicemia final e ganho de peso no grupo diabetes	44
Figura 13– Diagrama de dispersão entre glicemia final e homocisteína no grupo diabetes ..	45
Figura 14– Diagrama de dispersão entre glicemia final e fator von Willebrand no grupo diabetes.....	46
Figura 15– Diagrama de dispersão entre glicemia final e colesterol total no grupo diabetes.	46
Figura 16– Diagrama de dispersão entre glicemia final e HDL-colesterol no grupo diabetes	47
Figura 17– Diagrama de dispersão entre glicemia final e LDL-colesterol no grupo diabetes.	47
Figura 18– Diagrama de dispersão entre glicemia final e VLDL-colesterol no grupo diabetes .....	48
Figura 19– Diagrama de dispersão entre glicemia final e triglicérides no grupo diabetes.....	48
Figura 20– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e colesterol total no grupo diabetes .....	49

Figura 21– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e HDL-colesterol no grupo diabetes .....	49
Figura 22– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e LDL-colesterol no grupo diabetes .....	50
Figura 23– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e VLDL-colesterol no grupo diabetes.....	50
Figura 24– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e triglicérides no grupo diabetes...51	
Figura 25– Diagrama de dispersão entre homocisteína e fator von Willebrand no grupo diabetes.....	51
Figura 26– Diagrama de dispersão entre homocisteína e colesterol total no grupo diabetes	52
Figura 27– Diagrama de dispersão entre homocisteína e HDL-colesterol no grupo diabetes	52
Figura 28– Diagrama de dispersão entre homocisteína e LDL-colesterol no grupo diabetes	53
Figura 29– Diagrama de dispersão entre homocisteína e VLDL-colesterol no grupo diabetes .....	53
Figura 30– Diagrama de dispersão entre homocisteína e triglicérides no grupo diabetes .....	54
Figura 31– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e colesterol total no grupo diabetes.....	54
Figura 32– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e HDL-colesterol no grupo diabetes.....	55
Figura 33– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e LDL-colesterol no grupo diabetes.....	55
Figura 34– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e VLDL-colesterol no grupo diabetes.....	56
Figura 35– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e triglicérides no grupo diabetes.....	56

## Resumo

## Resumo

---

**Objetivos:** Estudar em ratos albinos portadores de diabetes melito induzido por estreptozotocina: 1. Valores plasmáticos de homocisteína. 2. Concentrações plasmáticas de fator von Willebrand. 3. Valores séricos de colesterol total e frações e triglicérides. 4. Possíveis correlações entre valores plasmáticos de homocisteína, fator von Willebrand, colesterol total e frações e triglicérides.

**Métodos:** 35 ratos (*rattus norvegicus albinus*), machos, adultos (peso 180-200g), com glicemias aferidas foram randomizados em três grupos: 1. Controle (n=10) - não receberam droga ou veículo; 2. "Sham" (n=10) - receberam solução (tampão citrato 0.1M, pH4.5) veículo da estreptozotocina e 3. Diabetes (n=15) - receberam estreptozotocina (Sigma®) para indução do diabetes melito (60 mg/kg de peso) em dose única; via intraperitoneal, diluída em 0.3mL de solução veículo. Foram considerados diabéticos todos os ratos cujos valores de glicemia foram iguais ou superiores a 250mg/dL. Após 08 semanas de indução do diabetes melito os ratos foram pesados, as glicemias aferidas e anestesiados com tionembutal (Sigma®) via intraperitoneal (50mg/kg peso). Colheu-se sangue da artéria aorta abdominal para determinação dos valores de homocisteína plasmática total seguindo metodologia descrita, através de ensaio HPLC (Shimadzu®). O sangue restante foi centrifugado e o soro e o plasma aliqüotados e congelados até determinação do fator von Willebrand (técnica de ELISA) e concentrações séricas de glicose de jejum final, colesterol total e frações HDL-, LDL- e VLDL-colesterol, triglicérides e creatinina. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e quando necessário o teste Brown Forsythe, seguido do procedimento de comparações múltiplas de Dunnett. Para a construção dos diagramas de dispersão das variáveis calculou-se os coeficientes de correlação de Pearson. **Resultados:** O modelo foi reprodutível em 100% dos animais. A média dos valores de glicemia inicial foi: 88,7 $\pm$ 5,9mg/dL (controle); 88,9 $\pm$ 8,2mg/dL ("sham") e 85,1 $\pm$ 5,2mg/dL (diabetes). Através da ANOVA não houve diferença das médias de glicemia inicial entre os grupos (p=0,24).

## Resumo

---

A média da glicemia final foi:  $85,0 \pm 7,1$  mg/dL (controle);  $80,9 \pm 5,0$  mg/dL ("sham") e  $353,5 \pm 98,2$  mg/dL (diabetes). Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo diabetes e os demais ( $p < 0,01$ ). A média das concentrações plasmáticas de homocisteína foi:  $7,9 \pm 2,3$   $\mu$ mol/L (controle);  $8,6 \pm 2,2$   $\mu$ mol/L ("sham") e  $6,1 \pm 1,3$   $\mu$ mol/L (diabetes), com diferença entre os grupos ( $p < 0,01$ ). A média dos valores do fator von Willebrand foi  $0,15 \pm 0,3$  U/L (controle),  $0,16 \pm 0,2$  U/L ("sham") e  $0,18 \pm 0,4$  U/L (diabetes), com diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Os valores de colesterol total tiveram médias de:  $123,9 \pm 40,8$  mg/dL (controle);  $107,0 \pm 38,6$  mg/dL ("sham") e  $87,5 \pm 5,9$  mg/dL (diabetes). A ANOVA mostrou diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ). No grupo diabetes houve correlação inversa entre glicemia final e ganho de peso, homocisteína e colesterol total, homocisteína e fração VLDL-colesterol e homocisteína e triglicérides. **Conclusões:** Neste estudo, utilizando como modelo biológico o diabetes melito induzido por estreptozotocina em ratos albinos, nas condições de experimento apresentadas, torna-se lícito concluir: 1. Os ratos diabéticos apresentaram valores menores de homocisteína. 2. O grupo diabetes apresentou valores maiores de fator von Willebrand. 3. Houve correlação inversa entre homocisteína e colesterol total, homocisteína e fração VLDL-colesterol e homocisteína e triglicérides. 4. Não houve correlação entre glicemia final e homocisteína, glicemia final e fator von Willebrand e homocisteína e fator von Willebrand nos ratos diabéticos. 5. Houve correlação inversa entre ganho de peso e glicemia final nos ratos diabéticos.

**Descritores:** homocisteína; fator de von Willebrand; lipídeos; diabetes mellitus experimental; estreptozotocina.



---

## Introdução



O diabetes melito (DM), doença caracterizada fundamentalmente por distúrbio no metabolismo dos hidratos de carbono, leva a alterações cardíacas, vasculares, renais, retinianas, neurológicas e hepáticas (Kuller, 1976). A glicose da dieta absorvida no intestino delgado é levada pela veia porta ao fígado e armazenada sob a forma de glicogênio, cuja reserva hepática é usada para síntese e liberação de glicose na circulação sanguínea, mantendo a glicemia em níveis fisiológicos principalmente durante períodos de jejum prolongado.

Os tecidos utilizam glicose como fonte de energia para garantir o metabolismo oxidativo, porém a maioria necessita da ação da insulina, hormônio produzido pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, capaz de fazer com que esse hidrato de carbono seja captado pelas células dos diferentes órgãos.

No DM, sob a forma de doença auto-imune, órgão específico, as células produtoras deste hormônio são destruídas progressivamente por auto-anticorpos, com diminuição gradativa de sua produção, o que pode ser comprovada não apenas pelo nível sérico de insulina, como também do peptídeo C, produzido em quantidade equimolar em relação a ela.

Em sua modalidade caracterizada por maior produção de glicose pelo fígado e resistência periférica à insulina, as complicações são mais tardias e na sua evolução surge falência pancreática secundária em relação à produção deste hormônio. Trata-se, portanto, de uma entidade nosológica com etiopatogenias diferentes.

A neuropatia diabética ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes com DM e desempenha importante papel no aumento da sua morbi-mortalidade.

Embora ainda não se conheça totalmente sua fisiopatologia, admite-se que o principal fator seja o nível sanguíneo elevado de glicose por longo tempo. Apresenta-se sob várias formas - neuropatia periférica, autonômica e de nervos cranianos, podendo algumas apresentar início agudo e caquexia diabética neuropática, sendo a mais precoce e comum a periférica. Esta se caracteriza por polineuropatia sensitivo-motora, simétrica, inicialmente distal, de instalação gradual e caráter progressivo (Davidson, 2001).

Nos últimos 15 anos observou-se que a função cardíaca do diabético altera-se mesmo em condições basais, apresentando maior incidência de doença cardiovascular e insuficiência cardíaca (Regan, 1983; Dhalla et al., 1985). A patogênese da cardiomiopatia diabética ainda não está bem definida, embora, alguns aspectos já estejam bem estabelecidos: (1) menor capacidade de elevação da pressão ventricular; (2) queda da pressão máxima ventricular; (3) diminuição da velocidade de relaxamento das miofibrilas; (4) alta pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e (5) queda do volume de ejeção ventricular (Fein, Sonnenblick, 1985).

A nefropatia diabética é a principal causa de doença renal terminal e de morbi-mortalidade relacionada ao DM. A proteinúria presente em indivíduos diabéticos está associada a menor sobrevida e ao aumento do risco cardiovascular. A fisiopatologia dessa nefropatia está relacionada à hiperglicemia crônica, envolvendo também outros elementos como fatores de crescimento, a angiotensina II, a endotelina, as alterações hemodinâmicas na microcirculação renal (hipertensão na cápsula de Bowman, com aumento da pressão capilar

glomerular e conseqüente hiperfiltração) e as alterações estruturais do glomérulo como aumento da matriz extracelular, espessamento da membrana basal, expansão mesangial e fibrose (Powers, 2002; Ribeiro et al., 2006). Na nefropatia diabética a lesão endotelial acomete inicialmente os microvasos pós-glomerulares, sendo o estresse oxidativo e a lesão tubular os responsáveis pelo início desta complicação (Yaqoob et al., 1993).

A associação de nefropatia diabética com retinopatia é muito freqüente (Powers, 2002; Ribeiro et al., 2006). Pacientes com DM apresentam probabilidade 25 vezes mais alta de se tornarem cegos quando comparados àqueles sem DM, devido à retinopatia diabética progressiva e ao edema macular. A retinopatia diabética é classificada em dois estágios: não-proliferativa e proliferativa. A não-proliferativa surge geralmente no final da primeira década da doença e caracteriza-se por microaneurismas vasculares da retina, hemorragias puntiformes e manchas algodinosas. O surgimento de neovascularização em resposta à hipóxia retiniana é a principal característica da retinopatia diabética proliferativa. Os vasos recém-formados podem aparecer no nervo óptico e/ou na mácula, rompendo-se facilmente e causando hemorragia vítrea, fibrose e descolamento da retina (Powers, 2002; Ribeiro et al., 2006).

As principais alterações metabólicas presentes no DM são decorrentes de menor produção de insulina, ou resistência periférica ao hormônio e maior produção de glicose pelo fígado. Dentre elas estão a hiperglicemia, dislipidemia, hiperuricemia, aumento do inibidor do ativador do plasminogênio I (PAI-I), que resultam invariavelmente em disfunção endotelial. Essas alterações levam a

lesões vasculares importantes, resultando em micro e macroangiopatia progressivas. Neste contexto, as complicações vasculares são divididas classicamente em microangiopatia (retinopatia, neuropatia e nefropatia) e macroangiopatia (coronária, vascular periférica e cerebrovascular), responsáveis pela grande morbi-mortalidade associada à doença (Davidson, 2001).

A alteração hepática, decorrente dos distúrbios metabólicos, presente no DM caracteriza-se fundamentalmente pela esteatose macrofocular periportal, responsável pela hepatomegalia presente em pacientes portadores dessa doença. Tal alteração passa a ter maior importância em vista dos conhecimentos atuais sobre a esteatohepatite não alcoólica, que pode evoluir para cirrose hepática.

As complicações do DM têm como elemento essencial a hiperglicemia, que leva à disfunção celular e orgânica por quatro possíveis mecanismos: 1- Aumento de produtos finais da glicação em sua fase avançada, resultando em aterosclerose, disfunção glomerular e endotelial, diminuição de óxido nítrico e alteração da composição e estrutura da matriz extracelular; 2- Ativação da via do sorbitol, pois a hiperglicemia aumenta o metabolismo da glicose através dela, levando à sua conversão em sorbitol pela enzima aldose-redutase. Seus níveis elevados alteram aspectos da fisiologia celular causando sua disfunção; 3- Aumento da formação de diacilglicerol, que leva à ativação de isoformas de proteinocinasas C (PKC). A ativação da PKC pela glicose afeta inúmeros eventos celulares como alteração da transcrição de genes da fibronectina, do colágeno tipo IV, de proteínas contráteis e da matriz extracelular nas células endoteliais e neuronais; retardo no relaxamento vascular induzido por administração de

acetilcolina; aumento precoce da permeabilidade da membrana celular e do endotélio à albumina e a outras proteínas; estimulação da expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); proliferação mesangial; produção aumentada de colágenos tipo IV e VI, fibronectina e laminina; diminuição de proteoglicanos no mesângio com nefropatia e no endotélio vascular; e redução da atividade da bomba sódio-potássio ATPase (Na-K-ATPase) relacionada à integridade celular e funções como contração, crescimento e diferenciação. 4- Estresse oxidativo e geração de radicais livres que aumentam a relação entre oxigênio e óxido nítrico formando peroxinitrito, que por sua vez: aumenta a permeabilidade endotelial, a expressão de moléculas de adesão para leucócitos e plaquetas, o PAI-I com ativação da coagulação, diminui a vasodilatação óxido nítrico dependente e oxida a fração LDL-colesterol acelerando o processo aterosclerótico (Oliveira, 2005; Powers, 2002; Ribeiro et al., 2006).

Com o objetivo de um melhor entendimento de aspectos fisiopatológicos responsáveis pelas complicações do DM, vários modelos experimentais foram desenvolvidos. Dentre eles, o mais estudado é o da estreptozotocina (STZ) (Rakieten et al., 1963; Tomlinson et al., 1992), descrito pela primeira vez em ratos e cães (Rakieten et al., 1963).

A STZ é uma molécula de 2-deoxiglicose que tem metade da porção na posição C-2 substituída por uma nitrosuréia (2-deoximetil-nitroureia-glicopiranosose), capaz de alquilar o ácido desoxirribonucléico (DNA) e promover redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) nas células pancreáticas pela redução na captação dos precursores e pela diminuição na sua síntese (Schein et al.,

1973). Antibiótico extraído da *Streptomyces acromogenes* cuja fórmula empírica é representada por  $C_8H_{15}N_3O_7$ , também exerce atividade antineoplásica (Junod et al., 1967).

Essa droga apresenta ação diabetogênica, gerando hiperglicemia transitória a qual desencadeia processo de reconstituição de massa mínima de células  $\beta$ , que secreta insulina necessária para reversão do estado diabético, compensando resposta inicial à prejudicada secreção de insulina estimulada pela glicose. Entretanto, com o decorrer do tempo, esse mecanismo deixa de ser compensatório e o comprometimento na secreção e ação de insulina começa a se manifestar (Porta et al., 1974; Ahren, Skoglund, 1989). O grau de recuperação das células  $\beta$  depende da gravidade inicial do diabetes e, talvez justifique os efeitos diabetogênicos tão distintos de acordo com a idade do animal (Porta et al., 1974), conforme também observado por Bell et al. (1983), onde o efeito diabetogênico em roedores diminuiu com a idade.

A administração de STZ em ratos com oito semanas de vida ocasiona destruição das células  $\beta$  do pâncreas impedindo a produção de insulina. Estudos de microscopia eletrônica indicam que a droga produz degranulação dessas células com ausência de necrose (Arison et al., 1967; Junod et al., 1967).

Este modelo experimental vem servindo para melhor compreensão da patogênese da lesão endotelial no DM. Demonstrou-se, assim, diminuição da atividade do sistema antioxidante hepático pelo DM que aumenta a susceptibilidade ao dano hepatocelular mediado por radicais livres (Duncan et al., 1997). Os radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio, são importantes no

mecanismo de defesa do organismo contra infecção, mas sua produção excessiva promove formação de peróxidos lipídeos pela ação sobre ácidos graxos insaturados, envolvidos na patogênese da aterosclerose e da doença vascular (Steinberg, 1989; Stringer, 1989). Complicações freqüentes do DM sugerem que a atividade dos radicais livres está aumentada nesta doença (Oberley, 1988; Garg et al., 1996) e o aumento da glicação de proteínas relacionado à hiperglicemia é fonte importante desses radicais (Gillery et al., 1988; Wolff, Dean, 1987). Dessa forma, estabelece-se disfunção endotelial caracterizada por maior expressão de moléculas de adesão na parede do endotélio, estado pró-trombótico e alteração do tônus vascular com predomínio de vasoconstrição.

Outros fatores estão ligados à disfunção endotelial. Dentre eles merece lugar de destaque a homocisteína (He). Ela foi correlacionada à aterosclerose pela primeira vez em 1969, por McCully (1969), ao demonstrar este comprometimento arterial precoce em crianças com homocistinúria, caracterizando sua importância como fator de risco para doença arterial coronária (Faria Neto, Chagas, 2001). Entretanto, na literatura não existem informações sobre seus valores plasmáticos no DM e é intrigante sua possível participação na patogênese da disfunção endotelial.

Esse aminoácido, formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina (aminoácido essencial) da dieta ou do seu catabolismo, contém um grupamento tiol (SH-) e não participa da formação de proteínas (Fonseca et al., 1999). Em situações normais existe uma interconversão entre estes aminoácidos, que dividem as mesmas funções metabólicas e vias regulatórias. A metionina é

essencial para a formação da S-adenosilmetionina (SAM), principal doador de radical metil nas reações biológicas que em altas concentrações causa metilação de estruturas vitais como o DNA, proteínas estruturais e de membrana celular. A SAM é demetilada para a S-adenosil-homocisteína, que após hidrólise formam-se adenosina e He. A He segue, então, duas vias metabólicas distintas e complexas: a da remetilação e da transulfuração (House et al., 1999; Neves et al., 2004; Faria Neto et al., 2005; Gravina-Tadei et al., 2005). Apenas 2-5% da He plasmática livre é encontrada em sua forma reduzida e 70-80% circula ligada a proteínas plasmáticas, principalmente albumina. A He plasmática livre é encontrada na forma oxidada ou formando dissulfetos com compostos contendo enxofre que incluem homocistina (dímero de homocisteína) e homocisteína-cisteína (dissulfetos mistos). A homocisteína total, por convenção, é a soma de todas as formas livres e ligadas às proteínas que contenham um grupamento tiol (Tsai et al., 1995).

A determinação da He deve ser realizada após 12h de jejum (basal) e pelo teste de sobrecarga com metionina que inclui a determinação da He basal, seguida de dose oral padrão de 100mg/kg de peso corpóreo ou 4g/m<sup>2</sup> de superfície corpórea e nova dosagem após 2-8hs (Durand et al., 2001). A prevalência da hiper-homocisteinemia (HHe) é de 5-7% da população geral e valores moderados a intermediários ocorrem em 13-47% de indivíduos com doença vascular aterosclerótica sintomática (Ueland, Refsum, 1989; McCully, 1996; Malinow et al., 1998).



Existem fatores que influenciam os valores de He plasmática: fisiológicos, como sexo e idade; genéticos que estão relacionados à via do metabolismo da He, como deficiência homozigótica das enzimas cistationina  $\beta$  sintetase (CBS) e metileno-tetraidrofolato redutase (MTHFR) e polimorfismo C677T da enzima MTHFR; nutricionais, dentre eles deficiência de folato e vitamina B<sub>12</sub> (Fonseca et al., 1999); drogas, tais como metotrexate, fenitoína, carbamazepina, anestésicos e teofilina (Gambhir, Gambhir, 2000); condições clínicas, como insuficiência renal, hipotireoidismo, artrite reumatóide, psoríase e doenças proliferativas e utilização de hormônios como tamoxifeno, estrógenos e hormônio tireoideano (Fonseca et al., 1999).

Embora o colesterol represente importante fator de risco para doença cardiovascular (DCV), merece realce o fato de que em 30 a 35% dos indivíduos portadores de DCV seus valores encontram-se dentro dos limites admitidos como normais (Faria Neto, Chagas, 2001) e numerosas publicações correlacionam HHe à doença arterial coronária, cerebral e periférica, assim como à trombose venosa (Kang et al., 1992; Stampfer et al., 1992; Boushey et al., 1995; Evans et al., 1997; Graham et al., 1997; Wald et al., 1998; Welch, Loscalzo, 1998; Eikelboom et al., 1999; Durand et al., 2001; Tavares et al., 2002; Gravina-Taddei et al., 2005).

A HHe tem se mostrado como importante fator isolado de risco cardiovascular (Durand et al., 2001). Stampfer et al. (1992) em 5 anos de seguimento de médicos que tiveram infarto agudo do miocárdio (IAM) concluíram que os valores de He foram superiores aos dos controles e o risco de IAM com valores de He no percentil 95 foi três vezes maior do que no percentil 10. Estudo

de metanálise envolvendo mais de 4000 pacientes de 27 estudos, mostraram que para valores de He acima de  $10\mu\text{mol/L}$ , um acréscimo de  $5\mu\text{mol/L}$  da He circulante está associado a 80% de aumento do risco para DCV para mulheres e 60% para homens, e aumento de 50% no risco de doença cerebrovascular e risco 6,8 vezes maior para doença vascular periférica. Aumento de  $5\mu\text{mol/L}$  de He, corresponde a aumento de  $20\text{mg/dL}$  no colesterol total plasmático com maior risco de IAM (Boushey et al., 1995). Graham et al. (1997), concluíram que HHe em jejum ou pós-sobrecarga de metionina corresponde a risco cardiovascular semelhante ao da hiperlipemia e do tabagismo, embora inferior ao da hipertensão arterial sistêmica (Durand et al., 2001). Evans et al. (1997) mostraram correlação entre DCV e HHe em indivíduos portadores de doença arterial coronária (DAC) que tiveram IAM fatal e não-fatal e Wald et al. (1998) mostraram que indivíduos falecidos por IAM, apresentavam valores de He superiores aos dos controles. Estudo de revisão envolvendo numerosos trabalhos retrospectivos e prospectivos sobre a associação entre HHe e risco para DCV, publicados a partir de 1965 até 1999, também demonstraram associação positiva entre ambos, levando à necessidade de estudos de intervenção terapêutica para avaliar se a redução dos níveis de He resulta em redução do risco de DCV (Eikelboom et al., 1999).

A patogenia da lesão vascular determinada pela HHe inclui lesão da célula endotelial, crescimento da musculatura lisa vascular, maior adesividade plaquetária, aumento da oxidação do LDL-colesterol com deposição na parede vascular e ativação direta da cascata da coagulação (Durand et al., 2001). No

entanto, ainda não está bem claro por qual mecanismo fisiopatológico a He pode promover aterotrombose (Becker et al., 2000).

O endotélio, principal órgão endócrino do organismo é, portanto, de grande importância em inúmeras doenças degenerativas e inflamatórias. Dentre os vários métodos para avaliar sua disfunção, a determinação do valor plasmático do fator von Willebrand (fvW) tem se mostrado muito eficiente e com boa sensibilidade .

O fvW, glicoproteína presente no plasma, nos grânulos plaquetários e na matriz subendotelial (Ruggeri, 1999), foi identificado por Zimmerman et al. (1971). Descrito pela primeira vez como marcador de lesão endotelial na doença vascular (Boneu et al., 1975), vem sendo, desde então, utilizado como marcador de disfunção endotelial (Janson et al., 1980; Kahaleh et al., 1981; Carvalho et al., 1982; Cucuianu et al., 1983; Marasini et al., 1992; Pedrinelli et al., 1994; Belicova et al., 1994; Blann et al., 1995; Stehouwer et al., 1995; Mannucci, 1998).

Células endoteliais e megacariocíticas sintetizam, armazenam e secretam o fvW. Essa secreção aumenta quando as células endoteliais são estimuladas ou lesadas e seus valores podem aumentar de duas a dez vezes nessas eventualidades. O fvW liga-se ao colágeno e a outros componentes da parede vascular e, portanto, serve de mediador da adesão das plaquetas ao subendotélio dos vasos comprometidos (Mosher, 1996).

A lesão vascular expõe a matriz de colágeno subendotelial, à qual se liga ao fvW circulante no plasma, que por sua vez se liga à porção extracelular de glicoproteínas da membrana da plaqueta Ib (GPIb), cuja porção intracelular está ligada à filamina do citoesqueleto plaquetário. Tal interação, conhecida por adesão

plaquetária, é suficiente para deflagrar dois fenômenos nas plaquetas: a contração celular e a alteração conformacional (Rang et al., 2004; Guyton, Hall, 1997; Fiorini, et al., 2001).

No DM, em decorrência de fatores genéticos e bioquímicos plasmáticos, a disfunção endotelial é precoce e determina o início e progressão da doença vascular, caracterizando a micro e macroangiopatia diabética. Em estudo bem conduzido, Becker et al. (2000) objetivaram determinar o quanto a He estava associada à disfunção endotelial em ratos diabéticos e não diabéticos e se esta disfunção poderia ser estimada pelos valores plasmáticos de fvW e concluíram que a relação entre He e a aterotrombose não pode ser explicada pela associação da He com fvW. Jensen (1989) e Vukovich et al. (1989) descreveram alterações nos valores de fvW em situações de mudança de pressão arterial, colesterol e picos hiperglicêmicos.

O perfil lipídico, incluindo valores de triglicérides, é de fundamental importância no processo de aterosclerose, correlacionando-se com risco cardiovascular, principalmente na presença de DM. A elevação dos valores séricos de colesterol e triglicérides é considerada, principalmente em pacientes diabéticos, importante fator de risco que acelera o desenvolvimento de complicações cardiovasculares (Colwell et al., 1981; Howard, 1987).

O DM constitui importante fator de risco cardiovascular e possivelmente altera a composição de lipoproteínas bem como suas funções. Isso explica, até certo ponto, o fato de muitos pacientes diabéticos sem dislipidemia apresentarem

alterações na atividade e função das lipoproteínas e maior risco de aterosclerose (Kannel, McGee, 1979; Wasan et al., 1998).

A hiperlipidemia é condição que ocorre em ratos com DM induzido tanto por STZ como por aloxano. Alterações no metabolismo dos lipídeos são frequentemente descritas de maneira genérica e correlações com valores de glicemia, insulina e tipo de dieta ainda não estão elucidadas (Bar-On et al., 1976b; Smith, Novotny, 1980).

Van Tol (1977), admite que o DM induzido por STZ em ratos leva a aumento nos valores de triglicérides e apenas da fração VLDL do colesterol. Segundo o autor, isso ocorre por deficiência na remoção de triglicérides nos ratos diabéticos por provável diminuição da atividade de enzimas hepáticas e/ou do tecido adiposo no seu sítio de hidrólise.

Lerco et al. (2003) demonstraram em estudo de DM experimental que o perfil lipídico, incluindo colesterol total e triglicérides, é muito semelhante nos grupos controle e diabético, sendo em alguns períodos do experimento mais elevado no controle. Ao contrário do que se encontra na espécie humana, os ratos diabéticos não apresentaram alterações significativas do perfil lipídico, sendo esse fato de grande importância na presença da macroangiopatia diabética experimental neste animal.

No DM a disfunção endotelial é precoce e representa importante elemento na etiopatogenia da micro e macroangiopatia. Tal disfunção está associada principalmente à hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Mais recentemente, a HHe tem ocupado lugar de destaque na literatura, como elemento comprometedor

da atividade normal do endotélio, representando por si só, fator de risco para DAC. Dentre as várias formas de se avaliar a disfunção endotelial, o fvW tem-se mostrado útil. Na literatura constata-se que a dislipidemia, HHe e fvW são estudados de forma isolada, havendo necessidade, portanto, de estudá-los em um mesmo experimento, avaliando-se, então, suas características isoladas e possíveis correlações.

## Objetivos

Utilizando como modelo biológico o DM induzido por estreptozotocina, em ratos albinos, o presente trabalho tem como objetivo:

1. Estudar os valores plasmáticos de homocisteína.
2. Avaliar os valores plasmáticos de fator von Willebrand.
3. Determinar os valores séricos de colesterol total e frações e triglicérides.
4. Analisar as possíveis correlações entre os valores de homocisteína, fator von Willebrand, colesterol total e frações e triglicérides.



## Métodos

Trata-se de um estudo experimental. Foram utilizados 35 ratos da linhagem *rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*, machos, adultos, pertencentes à mesma faixa etária (60 dias), com pesos entre 180-200g. Os animais permaneceram no biotério da Disciplina de Histologia e Biologia Celular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM), com controle da temperatura e ciclos claro/escuro de doze horas cada.

O projeto foi avaliado, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP-EPM e protocolado (CEP 1341/05).

Os animais foram pesados no início do experimento e semanalmente até o dia do sacrifício, identificados com tatuagens nas patas e dorso e randomizados em três grupos: Grupo I: Controle (n=10) – os animais não receberam nenhum tipo de droga ou veículo e permaneceram com alimentação e água *ad libitum*. Grupo II: “Pair-fed” ou “Sham” (n=10) – receberam somente a solução veículo da STZ (tampão citrato 0,1M; pH4,5) preparados imediatamente antes da administração e permaneceram em iguais condições de umidade, temperatura e alimentação. Grupo III: Diabetes (n=15) – receberam injeção de STZ (Sigma<sup>®</sup>) via intraperitoneal (IP) diluída em solução tampão.

**Indução do diabetes melito:** Para indução do DM utilizou-se STZ na dose única de 60mg/kg de peso, via IP, diluída em 0,3mL de solução decimal de tampão citrato (0,1M; pH4,5). A solução tampão contém 47mL de solução de ácido cítrico monohidratado 0,1M ( $C_6H_8O_7 - 6H_2O/PM210,44$ ) e 53mL de solução de citrato trissódico diidratado 0,1M ( $(C_6H_5O_7Na_3 - 2H_2O/PM294,10)$ ), que foi diluída

1:10 em água destilada, imediatamente antes da indução (Trachtman et al., 1995; Wongsurawat, Armbrecht, 1991; Grisham, 1993).

Durante as primeiras 48 horas, aos ratos diabéticos foram oferecidas duas soluções de glicose a 2,5% e 5% substituindo a água, para evitar hipoglicemia por hiperinsulinemia resultante da destruição das células beta do pâncreas. Durante as primeiras 72 horas após a indução, a glicemia foi determinada diariamente para comprovar a reprodutibilidade do método, sempre no mesmo horário, utilizando-se aparelho Advantage (Roche<sup>®</sup>) com sangue obtido através de punção de veia da cauda dos animais. Foram considerados diabéticos, os ratos cujos valores de glicemia foram iguais ou superiores a 250mg/dL (Anderson et al., 1993; Geiger et al., 1992; Ghishan, 1993; Wongsurawat, Armbrecht, 1991; Trachtman et al., 1995).

**Dieta:** Os ratos tiveram livre acesso à água e dieta. A ração padrão “pellets” (Nuvilab CR1 - NUVITAL<sup>®</sup>) fornecida pelo Biotério Central foi pesada e controlada diariamente, sempre no mesmo horário, de acordo com a ingestão de dieta feita pelos ratos controles (Neves, 2000). No primeiro dia do experimento foram fornecidos 30g de ração para os três grupos e nos dias subseqüentes, os grupos controle e “sham” receberam quantidades iguais àquelas ingeridas pelos ratos diabéticos.

**Ganho de peso (GP):** Para o cálculo do ganho de peso utilizou-se a seguinte fórmula:  $GP = \text{peso final (Pf)} - \text{peso inicial (Pi)} / \text{Pi}$ .

**Sacrifício dos animais:** Após oito semanas de indução do DM, os animais foram pesados, suas glicemias aferidas e em seguida submetidos a anestesia com tionembutal (Sigma<sup>®</sup>) via IP, na dose de 50mg/kg de peso e complementada com

éter (Merck®) inalatório. Uma vez anestesiados, os animais foram submetidos à coleta de sangue da artéria aorta abdominal e em seguida exsangüinados.

**Armazenamento de sangue:** A coleta de sangue foi realizada através de punção de artéria aorta abdominal, com “jelco” nº 24 e seringa plástica descartável de 10ml. Foram coletados 03mL de sangue, colocados em tubos contendo EDTA como anticoagulante, centrifugado a 3.000rpm por 06 minutos, e o plasma aliqotado em “vials” de 1mL e acondicionados em congelador a -20°C até a determinação dos valores de homocisteína total plasmática e fator von Willebrand. O sangue restante foi colocado em tubo seco, centrifugado e o soro aliqotado em “vials” de 1,5mL, congelados a -20°C, até a realização dos exames bioquímicos.

**Determinação de homocisteína plasmática total:** A dosagem de He plasmática total foi realizada através de ensaio por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), por detecção fluorimétrica, no Laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias do Centro de Genética Médica do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM), seguindo protocolo padronizado e baseado na metodologia descrita por Pfeiffer et al. (1999) e já utilizado por Cruz et al. (2000). O plasma passou por três etapas de preparação: redução, precipitação de proteínas e derivatização. A primeira permitiu a redução e a liberação dos tióis ligados às proteínas plasmáticas. Esta etapa consistiu da mistura de 50µL de plasma, 25µL de padrão interno (solução de cistamina 40µmol/L) e 25µL de tampão salino de fosfato (PBS) pH7,4. Em seguida, 60µL desta solução foram agitados por 30 segundos no vórtex e

incubados, por 30 minutos, à temperatura ambiente com 10 $\mu$ L de tris-2-carboxietilfosfina (TCEP) a 100g/L.

A precipitação das proteínas foi obtida pela adição de 90 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) na concentração de 100g/L contendo 1mmol/L de EDTA ao volume da etapa anterior, seguida de agitação por 30 segundos e de centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. Na terceira e última etapa, 50 $\mu$ L de sobrenadante da centrifugação foram adicionados em microtubo escuro 10 $\mu$ L de NaOH 1,55m/L, 125 $\mu$ L de tampão borato 0,125m/L (pH9,5) com 4mmol de EDTA e 50 $\mu$ L de 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonato (SBD-F) na concentração de 1g/L com a formação de um produto fluorescente. Foram agitados no vórtex, por 30 segundos, 185 $\mu$ L desta solução e incubados a 60°C, por 60 minutos. Após incubação, 10 $\mu$ L foram injetados no cromatógrafo.

A fase móvel do HPLC é composta de tampão ácido acético-acetato 0,1m/L (pH5,5), contendo 30mL/L de metanol em um fluxo de 0,7ml/minuto e temperatura ambiente. A análise iniciou-se com a determinação de uma curva de calibração antes de cada bateria de amostras. Nessa curva, foram feitos cinco cromatogramas com concentrações crescentes e conhecidas de homocisteína: 3,12; 6,25; 12,5; 25,0 e 50,0 $\mu$ mol/L, com padrão interno cistamina, na concentração constante de 10 $\mu$ mol/L. A partir dessa curva de calibração, foi calculado o fator para quantificar os níveis plasmáticos de homocisteína.

O sistema utilizado foi da Shimadzu<sup>®</sup>, constando de auto-injetor modelo SIL-10 Advp, bombas e detector de fluorescência modelo RF-10AXL. A separação foi com uma coluna Prodigy ODS2, 150 x 3,2mm com micropartículas de 5 $\mu$ m

(Phenomenex<sup>®</sup>) e por uma pré-coluna de Adsorbosphere<sup>®</sup> C<sub>18</sub> de 7,5 x 4,6mm com micropartículas de 5µm (Alltech<sup>®</sup>). A detecção foi feita com o detector ajustado para excitação a 385µm e emissão a 515µm. Os resultados foram expressos em µmol/L.

**Determinação do fator von Willebrand:** Foi realizado no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Clínica Médica do Departamento de Medicina da UNIFESP-EPM, pela técnica de ELISA. O ensaio imunoenzimático para a dosagem do fator von Willebrand de amostras plasmáticas foi desenvolvido utilizando-se microplacas em técnica de “sandwich”. Anticorpo anti-fator von Willebrand obtido em carneiro (Dakopatts - Santa Barbara, Califórnia – USA) foi adsorvido à microplaca e após incubação com amostras de plasma, controles e padrões, revelado com soro anti-fator von Willebrand obtido em coelhos (dakopatts – Santa Barbara, Califórnia – USA), marcado com peroxidase. A sensibilidade do ensaio é de 0,012U/l, com um coeficiente de variação de 5,1% (imprecisão). O coeficiente de correlação deste ensaio contra a técnica de eletroimunoensaio foi de 0,941. Os anticorpos utilizados reagiram contra o fator von Willebrand de humanos, ratos, camundongos e cobaias. Não reagiram com os de aves. Outras espécies não foram testadas. Este ensaio tem a finalidade de detectar concentrações de fator von Willebrand sem oferecer, contudo, dados sobre a sua atividade biológica. Sumariamente 100µl de amostra diluída 1:100 em salina tamponada-fosfato (PBS) é adicionada à microplaca previamente marcada com anticorpo anti-fator von Willebrand e em seguida bloqueada com albumina a 3%. Após incubação a 37°C por 60 minutos, as placas foram lavadas com PBS -

0,05% TWEEN 20 e depois 100µl do conjugado diluído 1:500 em PBS albumina 1%, foi adicionado e novamente incubado pelo mesmo período. Após nova lavagem, 100µl do revelador (Ortophenyladiazine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato, pH4,0) foi adicionado e incubado no escuro por 30 minutos. A leitura foi realizada após a reação ter sido interrompida com ácido clorídrico (HCl) 1N - 20ml. A análise inicia-se com a determinação de uma curva de calibração antes de cada bateria de amostras. Essa Curva de calibração foi realizada com concentrações crescentes e conhecidas que variaram de 0,05 a 3,00U/L. Controles previamente testados obtidos de crioprecipitado de fator von Willebrand foram rotineiramente incluídos.

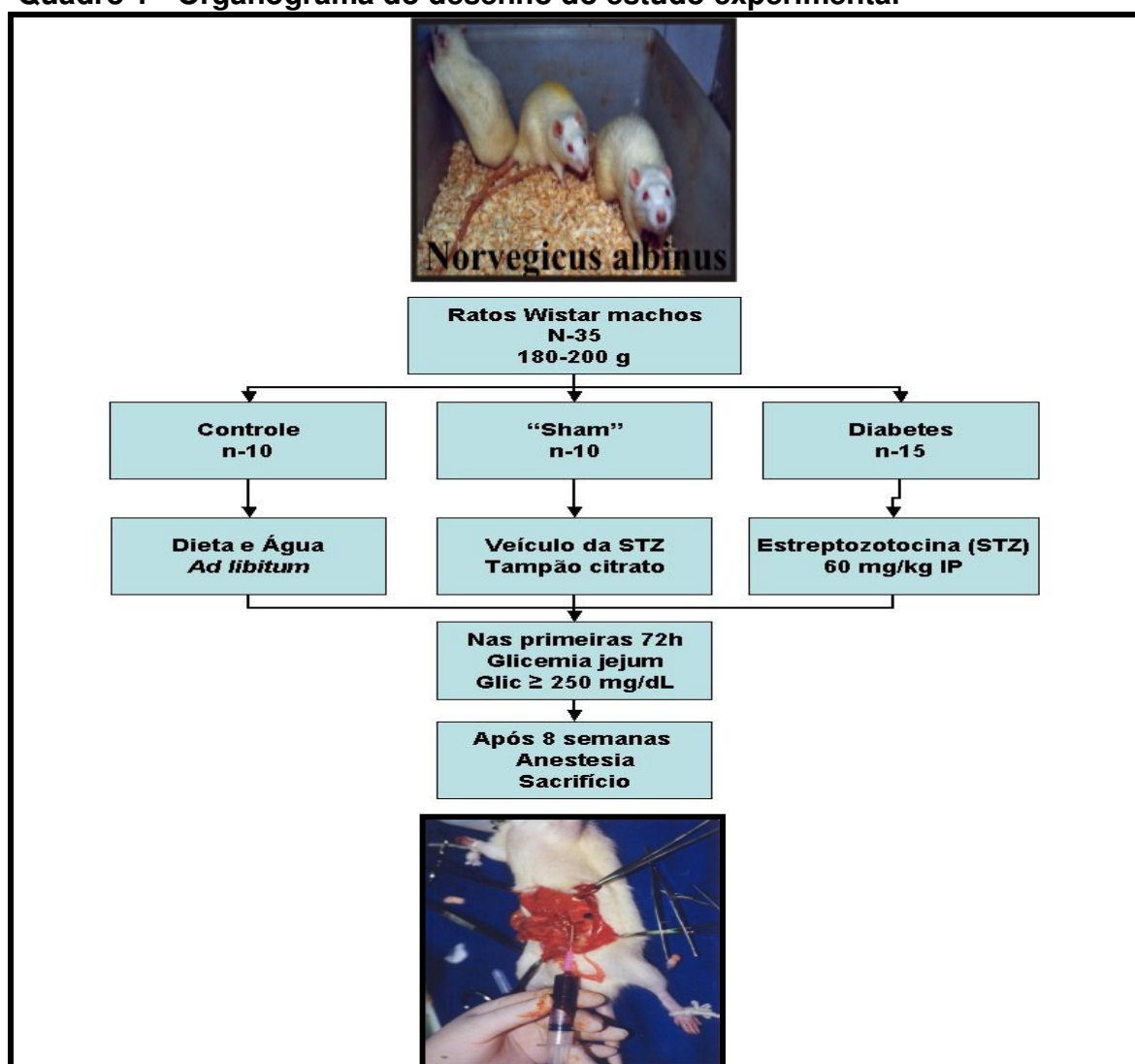
**Exames bioquímicos:** Foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM) da Disciplina de Clínica Médica do Departamento de Medicina da UNIFESP – EPM, seguindo metodologia descrita previamente (Neves, 1994). Foram determinadas as seguintes concentrações séricas:

1. Glicemia de jejum inicial (Glic inicial): método enzimático/colorimétrico - glicose oxidase/peroxidase. (GOD PAP-Celm). Considerado valores de referência entre 75-99mg/dL. Os resultados foram expressos em mg/dL.
2. Glicemia de jejum final (Glic final): reação enzimática colorimétrica glicose oxidase/peroxidase. (GOD PAP-Celm). Os resultados foram expressos em mg/dL.
3. Colesterol total e frações (CT, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol): método enzimático/colorimétrico - colesterol oxidase/peroxidase (Ames). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4. Triglicérides (TG): método colorimétrico, hidrólise pela reação enzimática lipase lipoprotéica glicerol oxidase/peroxidase (Ames). Os resultados foram expressos em mg/dL.
5. Creatinina (Cr): método colorimétrico (Jaffe). Kit Katal<sup>®</sup> da Katal Biotecnológica Ind. e Com. Ltda. Os resultados foram expressos em mg/dL.

O quadro 1 ilustra o organograma do desenho do estudo experimental.

**Quadro 1 - Organograma do desenho do estudo experimental**





**Análise Estatística**

Para avaliar se as médias das concentrações das variáveis em estudo (ganho de peso, glicemia inicial e final, homocisteína, fator von Willebrand, colesterol total e frações, triglicérides e creatinina) eram as mesmas nos três grupos de animais, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com um fator fixo (grupo) e três níveis (controle, “sham” e diabetes).

Quando a ANOVA mostrou que as médias dos grupos não eram iguais, mas a hipótese de homocedasticidade estava satisfeita, utilizou-se o procedimento de comparações múltiplas de Tukey para identificar quais grupos eram responsáveis por essas diferenças. Nas situações em que foi detectada heterocedasticidade, foram utilizadas transformações da variável resposta na tentativa de estabilizar a variância. Quando este objetivo não foi atingido com o auxílio de transformações, foi utilizado o teste de Brown Forsythe, seguido do procedimento de comparações múltiplas de Dunnett.

Para avaliar a presença de associação linear entre as variáveis em estudo, foram construídos diagramas de dispersão e calculados os coeficientes de correlação de Pearson.

O nível de significância foi fixado em 5% em todas as análises.

## Resultados

O modelo experimental de DM, foi reprodutível em 100% dos animais (15/15).

A tabela 1 contém a média e o desvio padrão da quantidade de alimento consumida da dieta e do peso dos animais a cada semana, para cada grupo.

Em relação à dieta, observamos que os ratos diabéticos consumiram, em média, mais alimento do que os animais dos grupos controle e “sham” a partir da segunda semana de experimento. Já em relação ao peso, observamos que a média para os animais diabéticos foi menor do que os dos grupos controle e “sham” durante todo o período. Os grupos controle e “sham” apresentaram valores médios de consumo de alimento e peso semelhantes, semana a semana (Tab. 1).

**Tabela 1– Média (e desvio padrão) do consumo de dieta e do peso de ratos a cada semana, segundo o grupo**

Semana	Dieta consumida (g/dia)			Peso (g)		
	Controle (n-10)	“Sham” (n-10)	Diabetes (n-15)	Controle (n-10)	“Sham” (n-10)	Diabetes (n-15)
0	-	-	-	193,9 (13,4)	191,6 ( 7,4)	188,3 (13,7)
1	26,6 (3,9)	25,4 (4,5)	24,8 (6,3)	204,6 (16,8)	208,0 ( 7,1)	208,2 (20,2)
2	26,3 (2,7)	27,1 (1,7)	30,9 (4,4)	251,8 (18,1)	244,7 (11,3)	245,6 (23,2)
3	26,5 (2,9)	27,3 (1,4)	31,4 (3,9)	274,8 (24,6)	267,0 (15,7)	243,6 (22,3)
4	26,5 (2,4)	26,9 (1,7)	33,5 (5,9)	304,9 (30,4)	299,7 (13,4)	236,5 (30,7)
5	27,6 (3,0)	27,6 (1,7)	37,0 (5,5)	314,5 (31,3)	321,1 (16,5)	242,0 (33,9)
6	28,3 (2,7)	28,8 (1,1)	34,2 (5,6)	338,7 (27,8)	339,6 (18,1)	244,7 (43,0)
7	27,4 (3,1)	27,4 (4,2)	32,1 (5,1)	353,2 (32,3)	357,4 (17,7)	249,2 (49,4)
8	29,6 (4,3)	27,6 (1,3)	35,0 (7,0)	372,5 (36,3)	372,9 (19,6)	249,0 ( 6,4)

A tabela 2 mostra as medidas descritivas (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) para o peso inicial e final e para o ganho de peso dos animais em cada grupo. Observa-se que as médias do peso inicial em cada grupo foram semelhantes. Entretanto, as médias do peso final e ganho de peso no grupo diabetes foram menores do que nos outros dois grupos.

**Tabela 2– Medidas descritivas para o peso inicial e final e para o ganho de peso dos animais em cada grupo**

	<b>Medidas descritivas</b>	<b>Controle (n-10)</b>	<b>“Sham” (n-10)</b>	<b>Diabetes (n-15)</b>
<b>Peso inicial (g)</b>	Média	193,9	191,6	200,6
	Desvio padrão	13,5	7,4	22,2
	Mínimo	176,0	178,0	165,0
	Mediana	195,0	192,0	195,0
	Máximo	211,0	200,0	233,0
<b>Peso final (g)</b>	Média	395,9	399,8	267,3
	Desvio padrão	43,1	23,0	76,8
	Mínimo	327,0	361,0	180,0
	Mediana	396,0	406,0	260,0
	Máximo	465,0	428,0	439,0
<b>Ganho de peso (g)</b>	Média	104,2	108,9	36,6
	Desvio padrão	17,7	12,9	47,6
	Mínimo	85,8	85,6	-22,4
	Mediana	97,1	113,7	30,0
	Máximo	130,8	123,2	131,1

A figura 1 mostra a média e intervalo de confiança para o ganho de peso dos animais em cada grupo. A média do ganho de peso no grupo diabetes foi menor do que nos grupos controle e “sham” ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença entre as médias dos grupos controles e “sham”.

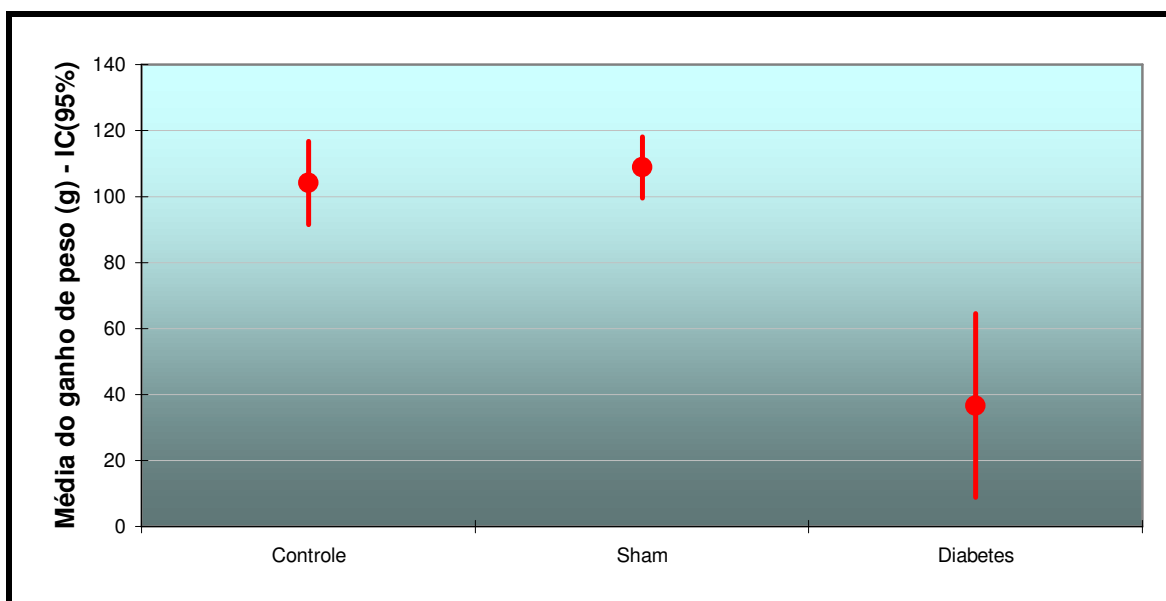


Figura 1- Média e intervalo de confiança (95%) para o ganho de peso dos animais em cada grupo

A tabela 3 contém as medidas descritivas para as variáveis em estudo em cada grupo de animal. Esta tabela apresenta ainda o nível descritivo do teste utilizado para comparar as médias dos três grupos (ANOVA ou Brown Forsythe), para cada variável. Segundo essas análises, não houve diferença entre as médias da glicemia inicial nos três grupos ( $p=0,24$ ). Também não houve diferença entre as médias de HDL-colesterol ( $p=0,14$ ), LDL-colesterol ( $p=0,10$ ), VLDL-colesterol ( $p=0,07$ ), triglicérides ( $p=0,07$ ) e Cr ( $p=0,47$ ) nos três grupos. Para as demais variáveis (glicemia final, He plasmática, fvW e Colesterol total), as médias não foram iguais nos três grupos ( $p<0,01$ ;  $p<0,01$ ;  $p<0,05$  e  $p<0,05$ ; respectivamente).

Tabela 3 – Medidas descritivas para as variáveis em estudo, segundo o grupo e nível descritivo do teste para comparação de médias

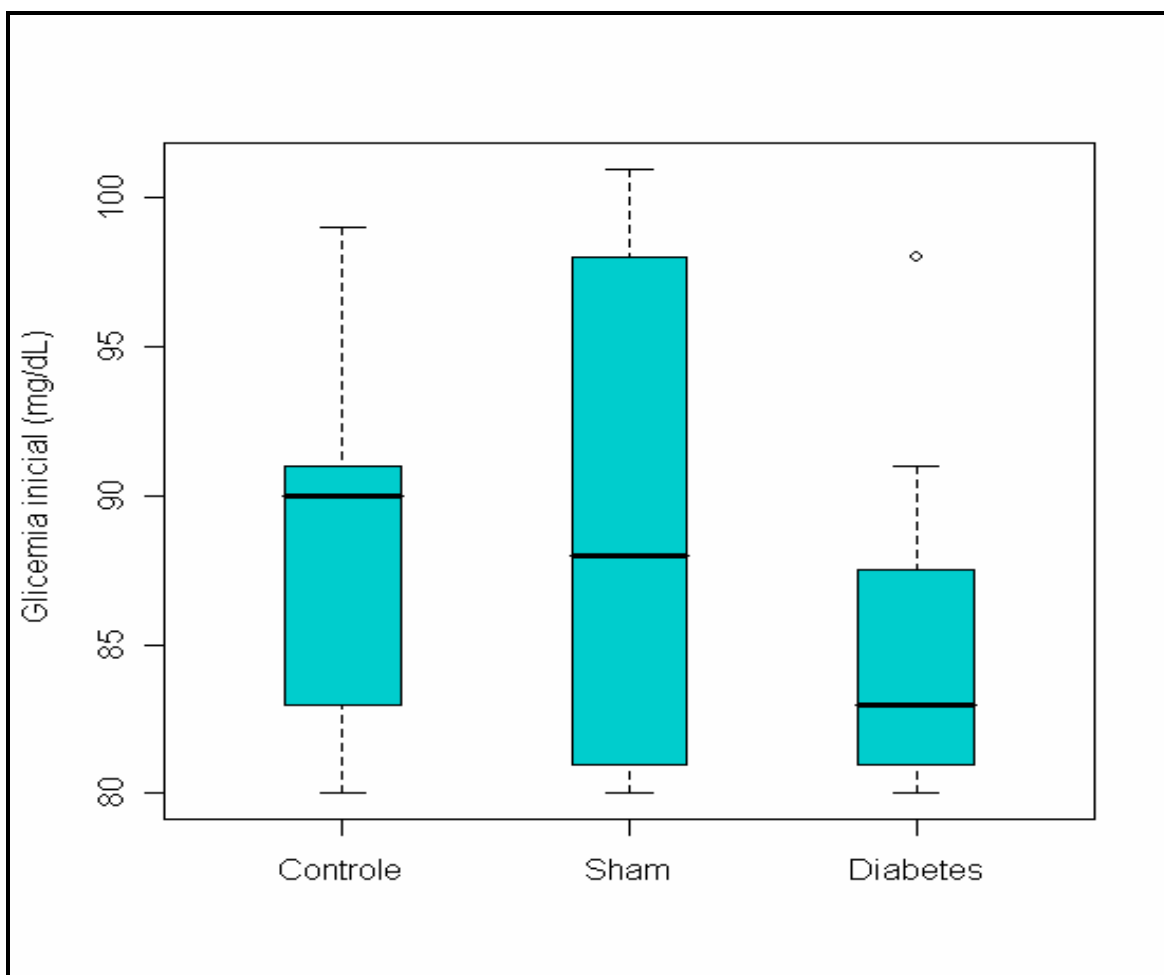
Variáveis	Medidas descritivas	Controle (n=10)	“Sham” (n=10)	Diabetes (n=15)	Nível descritivo
<b>Glicemia inicial*</b> (mg/dL)	Média	88,7	88,9	85,1	0,24
	Desvio Padrão	5,9	8,2	5,2	
	Mínimo	80,0	80,0	80,0	
	Mediana	90,0	88,0	83,0	
	Maximo	99,0	101,0	98,0	
<b>Glicemia final**</b> (mg/dL)	Média	85,0	80,9	353,5	<0,01
	Desvio Padrão	7,1	5,0	98,2	
	Mínimo	76,0	75,0	245,0	
	Mediana	84,5	79,5	349,0	
	Maximo	99,0	91,0	561,0	
<b>Homocisteína*</b> ( $\mu$ mol/L)	Média	7,9	8,6	6,1	<0,01
	Desvio Padrão	2,3	2,2	1,3	
	Mínimo	4,2	6,4	3,2	
	Mediana	7,7	7,8	6,3	
	Maximo	12,0	13,0	8,1	
<b>Fator von Willebrand*</b> (U/L)	Média	0,15	0,16	0,18	<0,05
	Desvio Padrão	0,3	0,2	0,4	
	Mínimo	0,11	0,13	0,14	
	Mediana	0,15	0,15	0,18	
	Maximo	0,19	0,19	0,26	
<b>Colesterol total**</b> (mg/dL)	Média	123,9	107,0	87,5	<0,05
	Desvio Padrão	40,8	38,6	5,9	
	Mínimo	83,0	81,0	81,0	
	Mediana	114,0	85,0	89,0	
	Maximo	188,0	188,0	99,0	
<b>HDL-colesterol*</b> (mg/dL)	Média	38,0	36,8	30,0	0,14
	Desvio Padrão	14,3	10,7	7,7	
	Mínimo	21,0	22,0	21,0	
	Mediana	35,5	36,5	29,0	
	Maximo	64,0	55,0	49,0	
<b>LDL-colesterol*</b> (mg/dL)	Média	66,5	53,2	45,7	0,10
	Desvio Padrão	29,1	29,4	9,2	
	Mínimo	24,6	17,0	27,8	
	Mediana	60,4	47,1	44,4	
	Maximo	111,2	115,2	67,8	
<b>VLDL-colesterol**</b> (mg/dL)	Média	20,2	17,0	11,7	0,07
	Desvio Padrão	10,3	9,6	2,7	
	Mínimo	10,4	10,2	9,8	
	Mediana	16,7	10,8	10,2	
	Maximo	36,0	37,6	17,6	
<b>Triglicérides**</b> (mg/dL)	Média	101,1	85,1	58,6	0,07
	Desvio Padrão	51,7	48,0	13,3	
	Mínimo	52,0	51,0	49,0	
	Mediana	83,5	54,0	51,0	
	Maximo	180,0	188,0	88,0	
<b>Creatinina*</b> (mg/dL)	Média	1,2	1,1	1,1	0,47
	Desvio Padrão	0,2	0,2	0,2	
	Mínimo	1,0	1,0	1,0	
	Mediana	1,0	1,0	1,0	
	Maximo	1,5	1,5	1,5	

\* ANOVA

\*\* Brown Forsythe

As figuras de 2 a 11 apresentam os box-plots para cada variável, segundo o grupo.

A média das concentrações séricas de glicemia de jejum observada no início do experimento dos animais nos grupos controle (n=10) foi 88,7mg/dL, no grupo “sham” (n=10) foi 88,9mg/dL e no grupo diabetes (n=15) foi 85,1mg/dL (Tab. 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias nos três grupos ( $p=0,24$ ; Fig. 2).

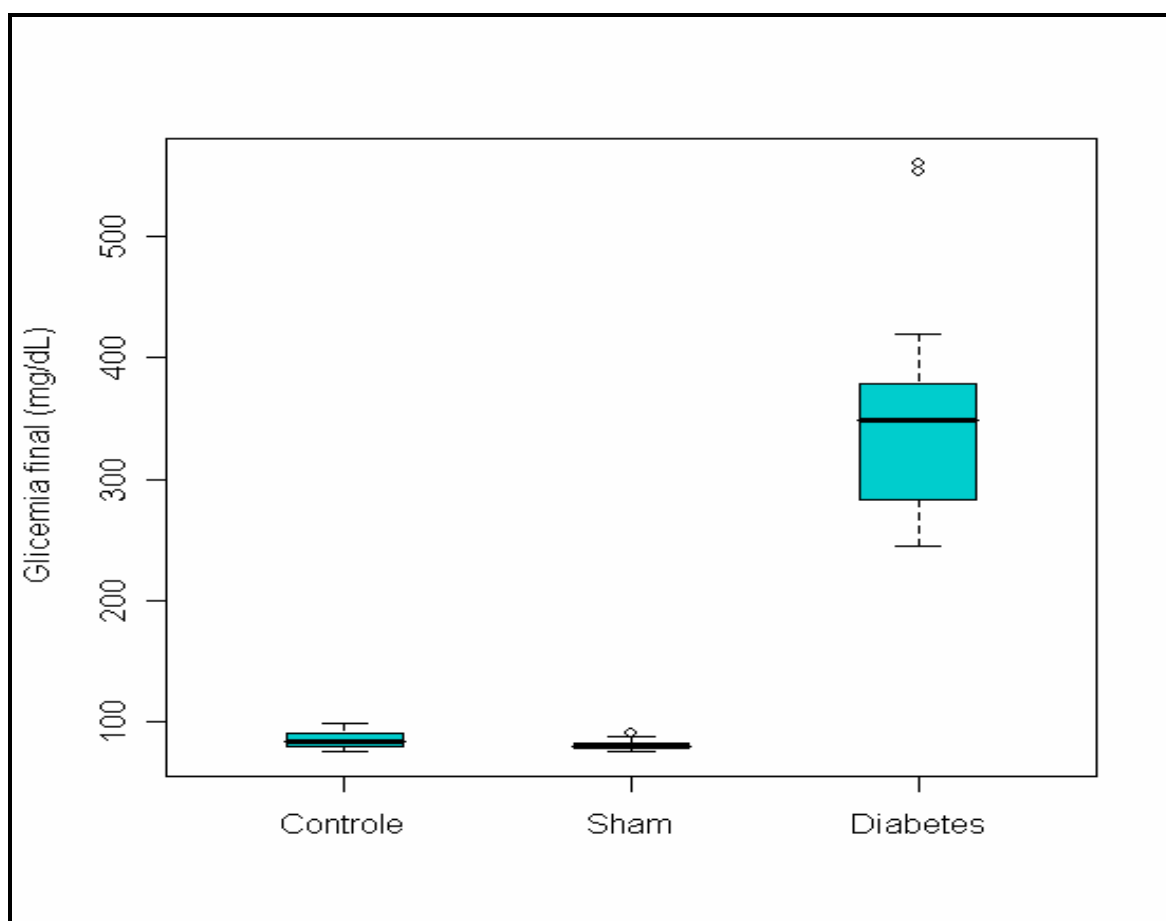


**Figura 2– Box-plot de glicemia de jejum inicial em cada grupo**

Nenhuma diferença entre as médias dos grupos foi detectada ( $p=0,24$ )

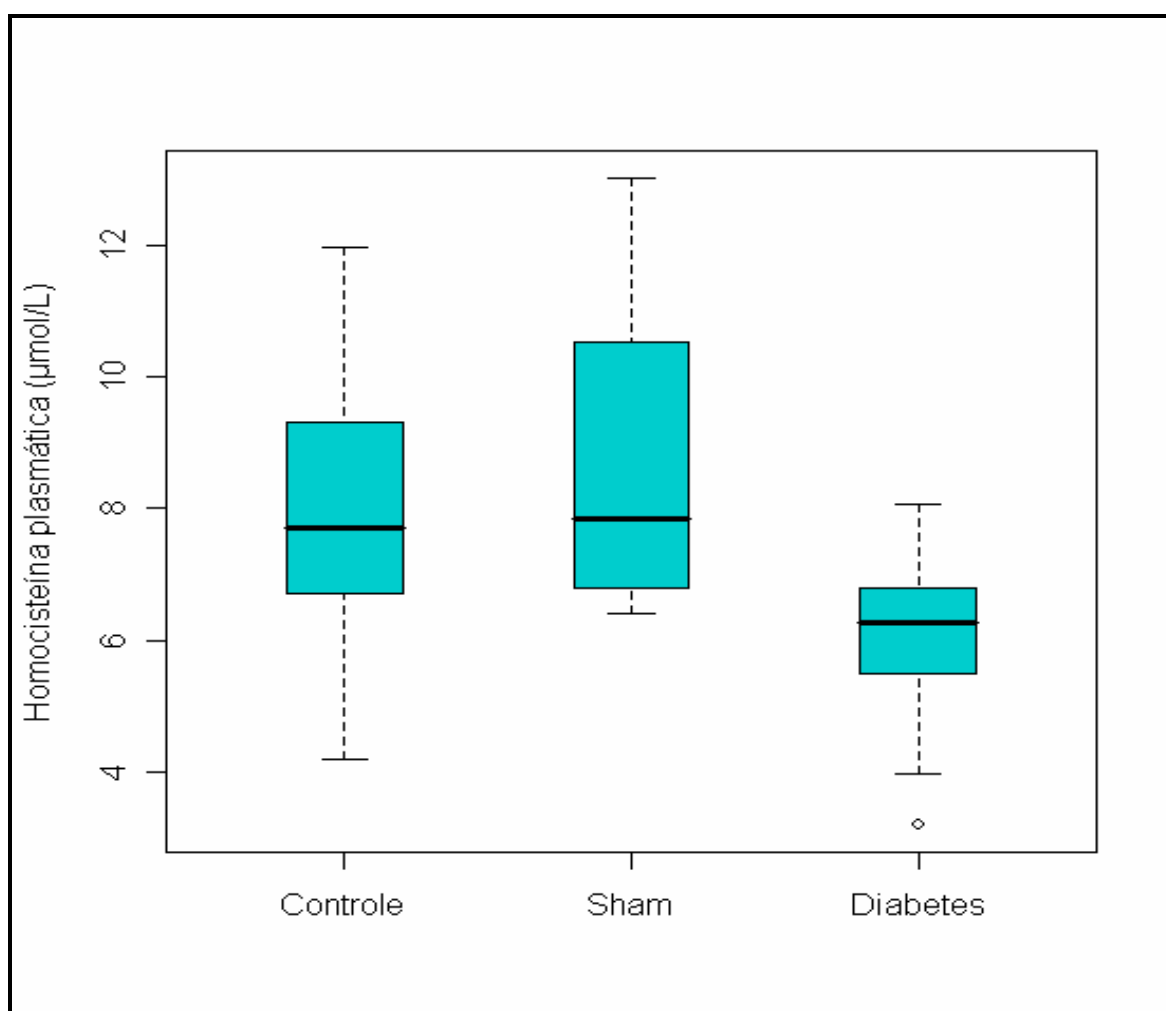


A média das concentrações séricas de glicemia observadas ao final do experimento (no dia do sacrifício dos animais) no grupo controle (n=10) foi 85,0mg/dL, no grupo “sham” (n=10) foi 80,9mg/dL e no grupo diabético (n=15) foi 353,5mg/dL (Tab. 3). Segundo o teste de Brown Forsythe, as médias dos três grupos não foram iguais ( $p < 0,01$ ). Após o procedimento de comparações múltiplas de Dunnet, concluiu-se que a média da glicemia final foi maior no grupo diabetes do que nos grupos controle e “sham”, não havendo diferença entre as médias dos grupos controle e “sham” ( $p < 0,05$ ; Fig. 3).



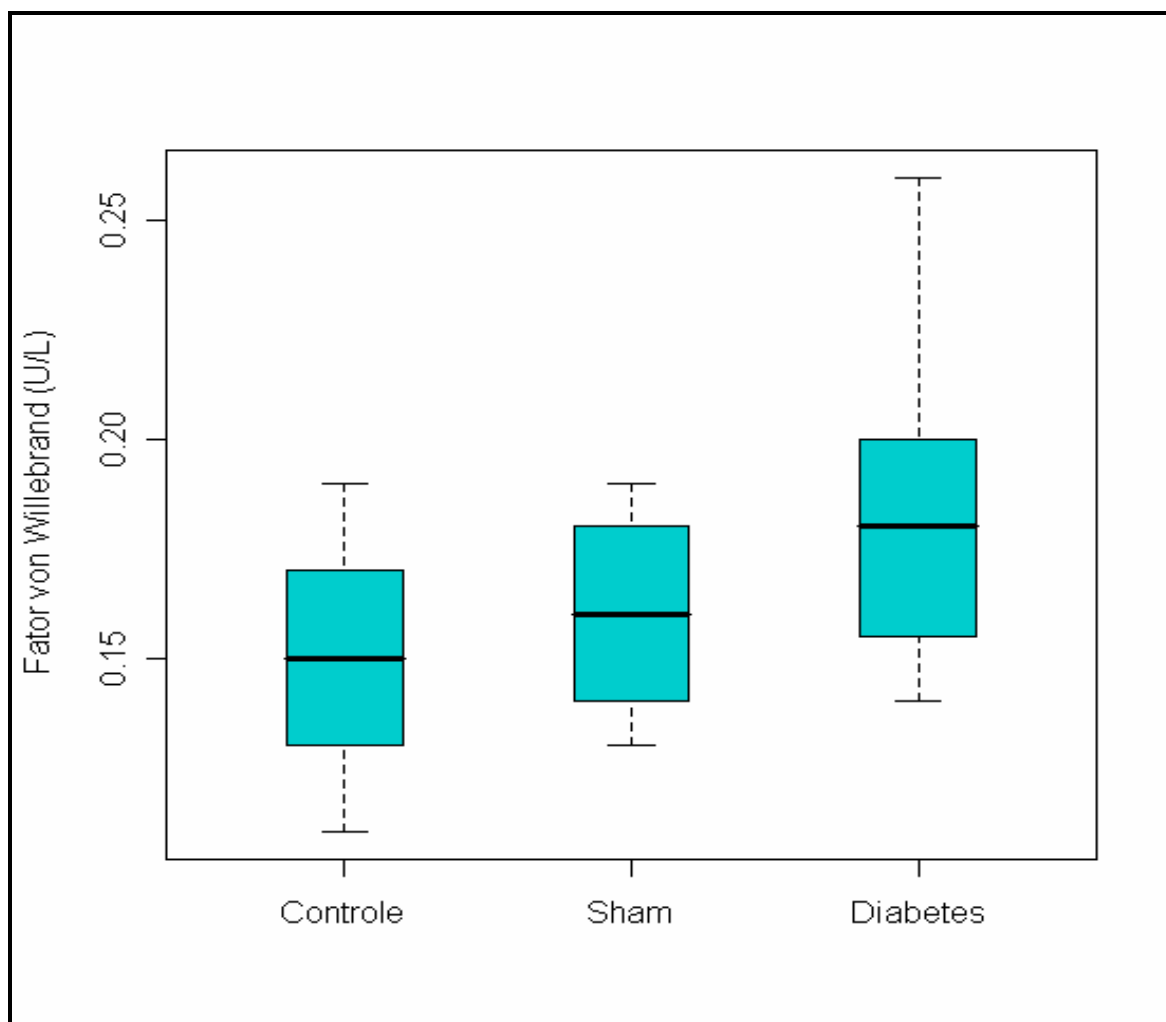
**Figura 3– Box-plot de glicemia de jejum final em cada grupo**  
Diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ): Diabetes x Controle  
Diabetes x “Sham”

A média das concentrações plasmáticas de homocisteína observadas nos grupos controle, “sham” e diabetes foram 7,9; 8,6 e 6,1 $\mu$ mol/L, respectivamente. Através da ANOVA, concluiu-se que a média das concentrações plasmáticas de homocisteína não foi a mesma nos três grupos ( $p < 0,01$ ; Tab. 3). Segundo o procedimento de comparações múltiplas de Tukey, a média foi menor no grupo de animais diabéticos do que no grupo “sham”. Nenhuma outra diferença entre as médias foi detectada ( $p < 0,05$ ; Fig. 4).



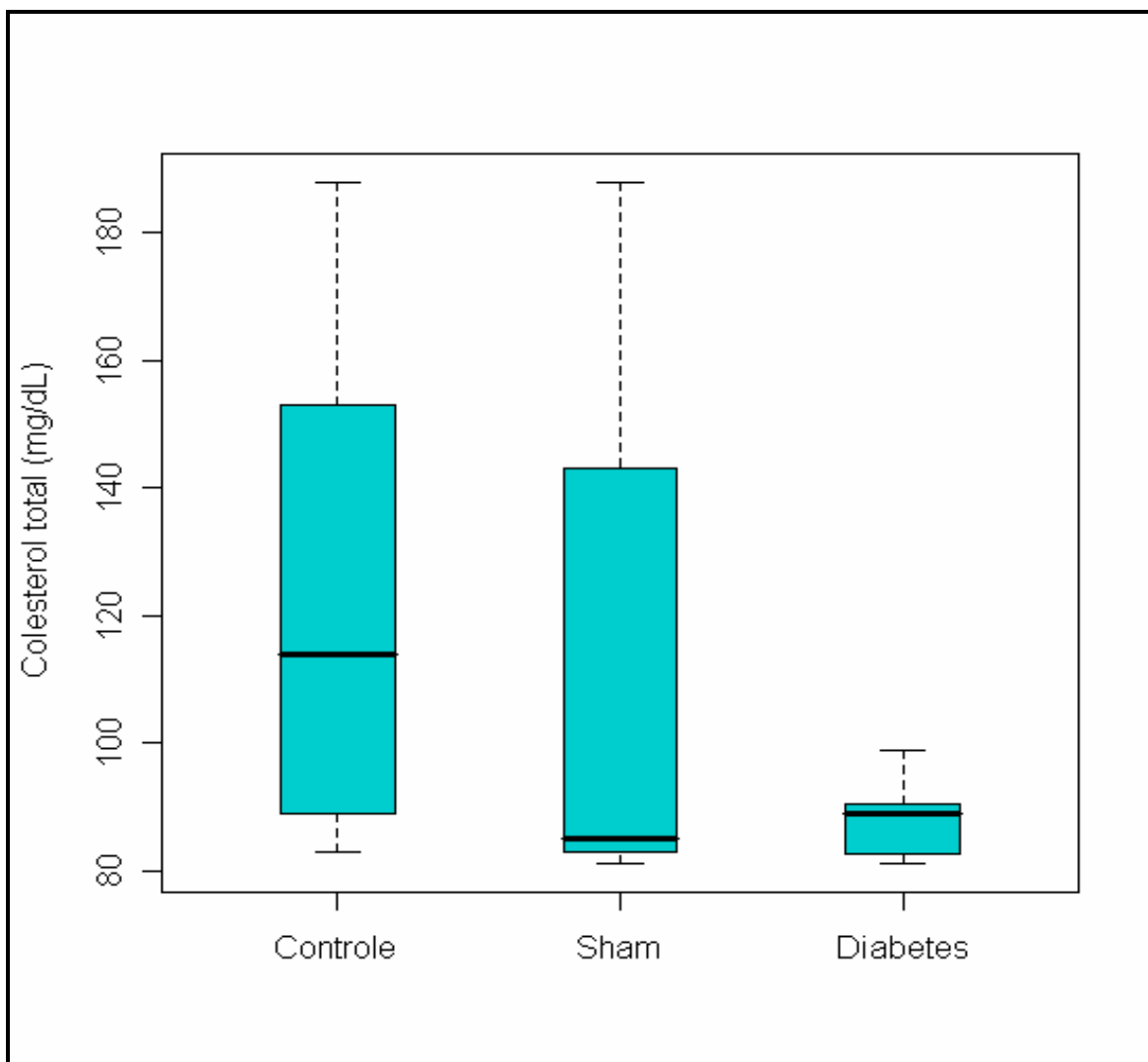
**Figura 4**– Box-plot da homocisteína plasmática total em cada grupo  
Diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ): “Sham” x Diabetes

A média dos valores do fator von Willebrand observados nos grupos controle, “sham” e diabetes foram 0,15; 0,16 e 0,18U/L, respectivamente. Através da ANOVA, concluiu-se que a média não foi a mesma nos três grupos ( $p < 0,01$ ; Tab. 3). Após o procedimento de comparações múltiplas, concluiu-se que a média foi maior no grupo diabetes do que no controle. Nenhuma outra diferença entre os grupos foi detectada ( $p < 0,05$ ; Fig. 5).



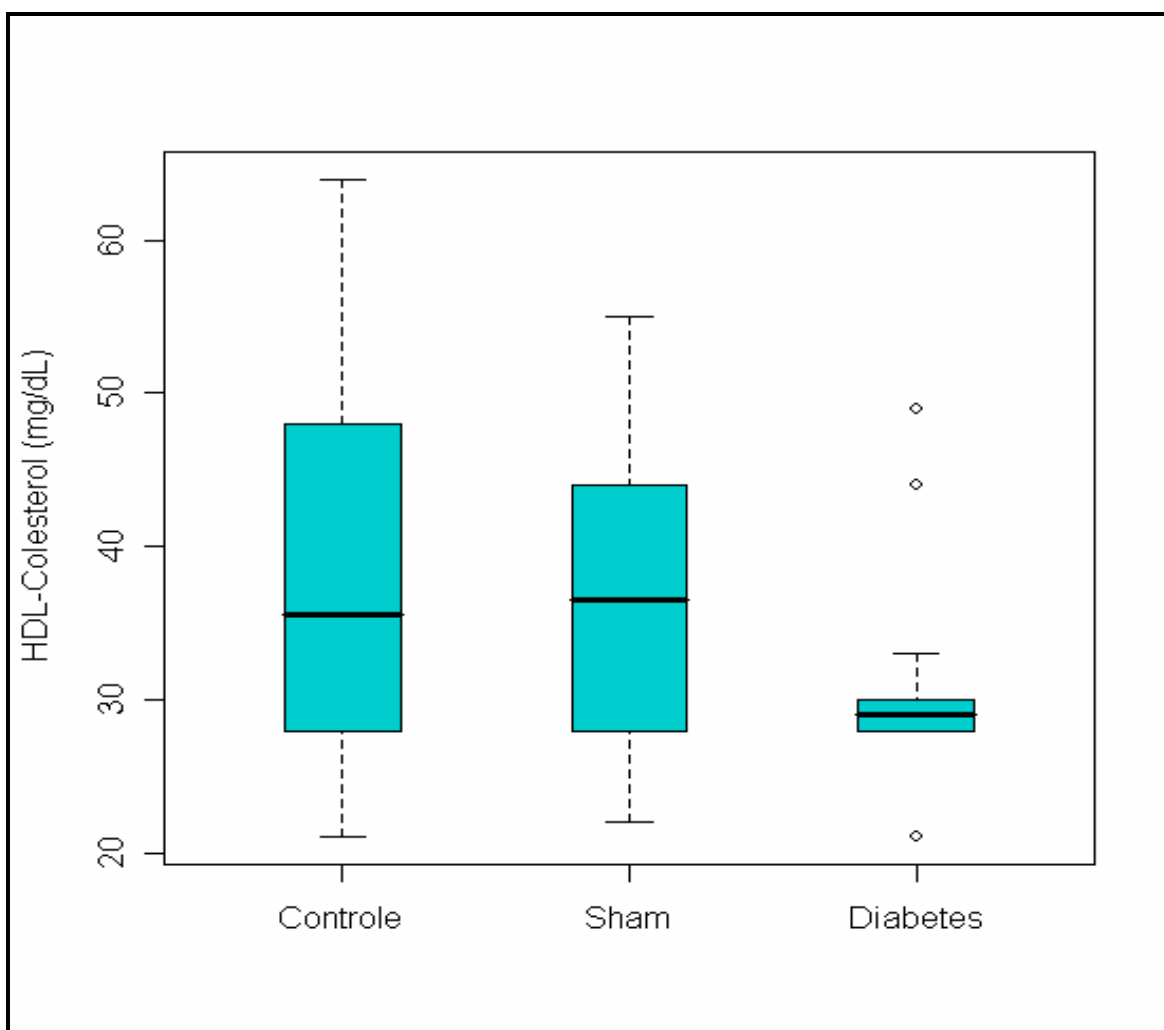
**Figura 5– Box-plot fator von Willebrand em cada grupo**  
Diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ): Controle x Diabetes

A média dos valores de colesterol total no grupo controle (n=10) foi 123,9mg/dL; no grupo “sham” (n=10) foi 107,0mg/dL e no grupo diabético (n=15) foi 87,5mg/dL (Tab. 3). Segundo o teste de Brown Forsythe, as médias dos três grupos não foram iguais ( $p < 0,05$ ), sendo que a média foi menor no grupo diabetes do que no controle. Nenhuma outra diferença entre os grupos foi detectada ( $p < 0,05$ ; Fig. 6).



**Figura 6- Box-plot de colesterol total em cada grupo**  
Diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ): Controle x Diabetes

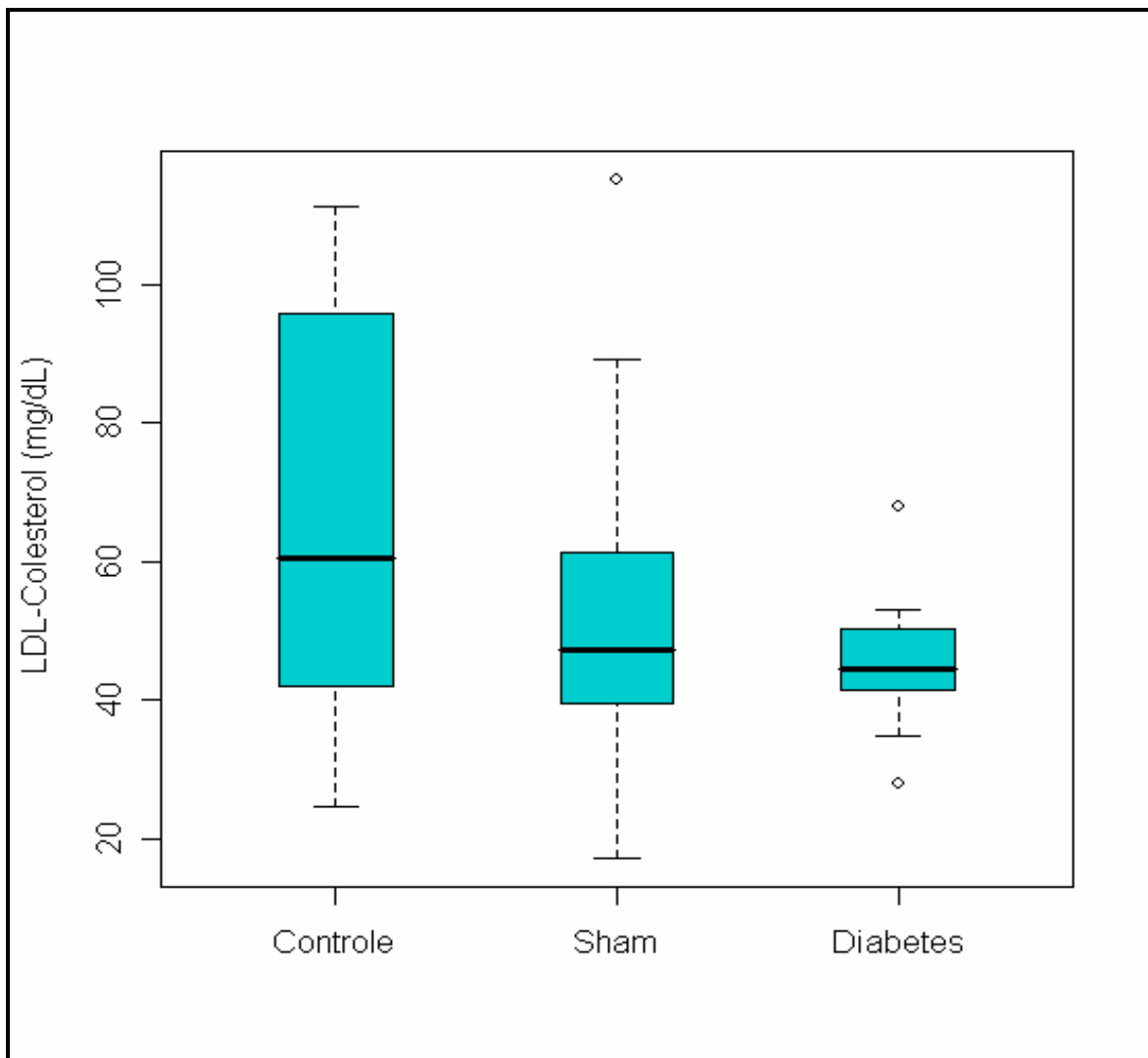
Quanto às frações de colesterol, a média de HDL-colesterol no grupo controle (n=10) foi 38,0mg/dL, no grupo “sham” (n=10) foi 36,8mg/dL e no grupo diabético (n=15) foi 30,0mg/dL (Tab. 3). Segundo o teste de Brown Forsythe, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos três grupos ( $p=0,14$ ; Fig. 7).



**Figura 7– Box-plot de HDL-colesterol em cada grupo**

Nenhuma diferença entre as médias dos grupos foi detectada ( $p=0,14$ )

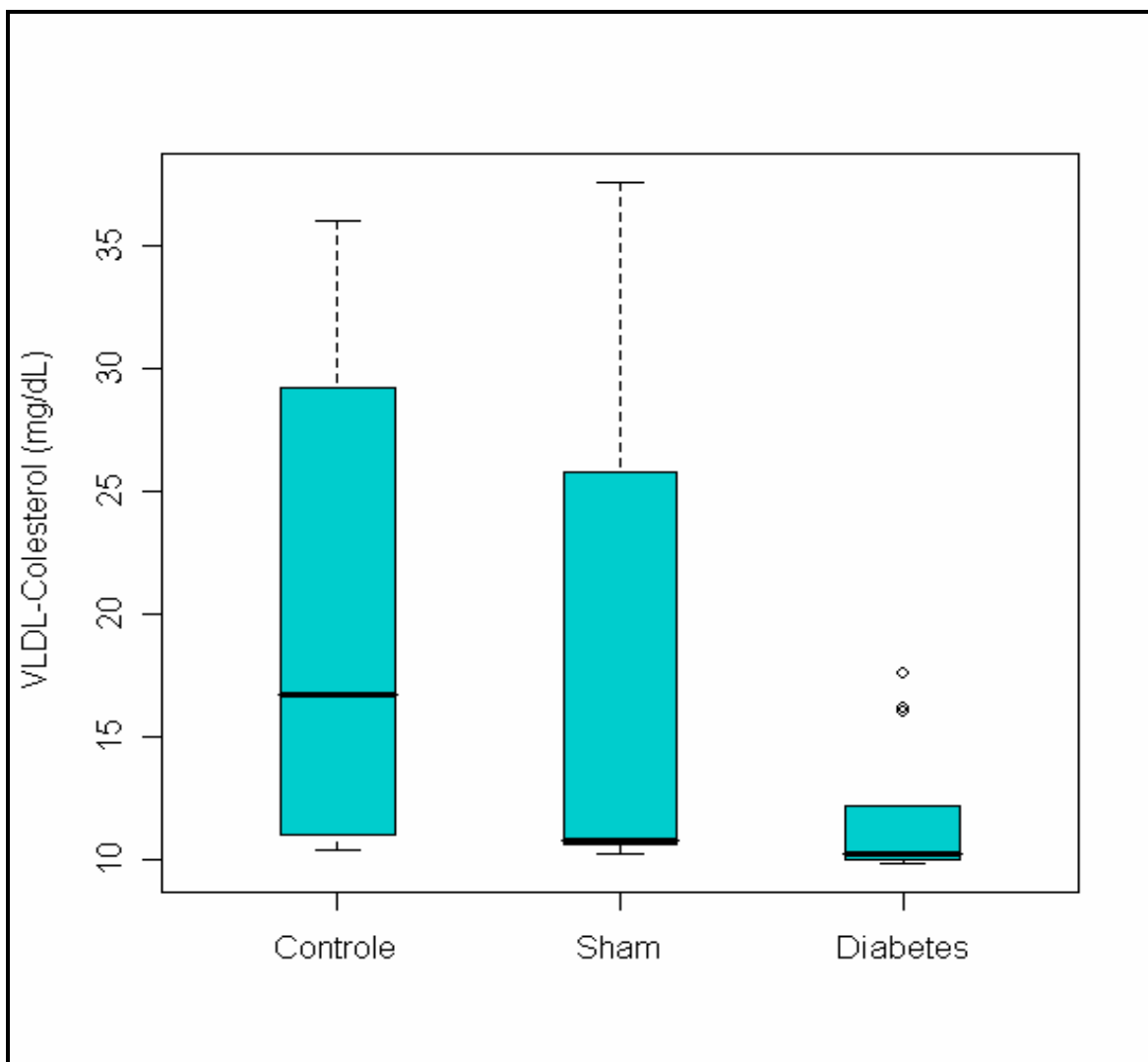
A média do LDL-colesterol no grupo controle (n=10) foi 66,5 mg/dL; no grupo “sham” (n=10) foi 53,2mg/dL e no grupo diabético foi 45,7mg/dL (Tab. 3). Segundo a ANOVA, não houve diferença entre as médias dos três grupos ( $p=0,10$ ; Fig. 8).



**Figura 8– Box-plot de LDL-colesterol em cada grupo**

Nenhuma diferença entre as médias dos grupos foi detectada ( $p=0,10$ )

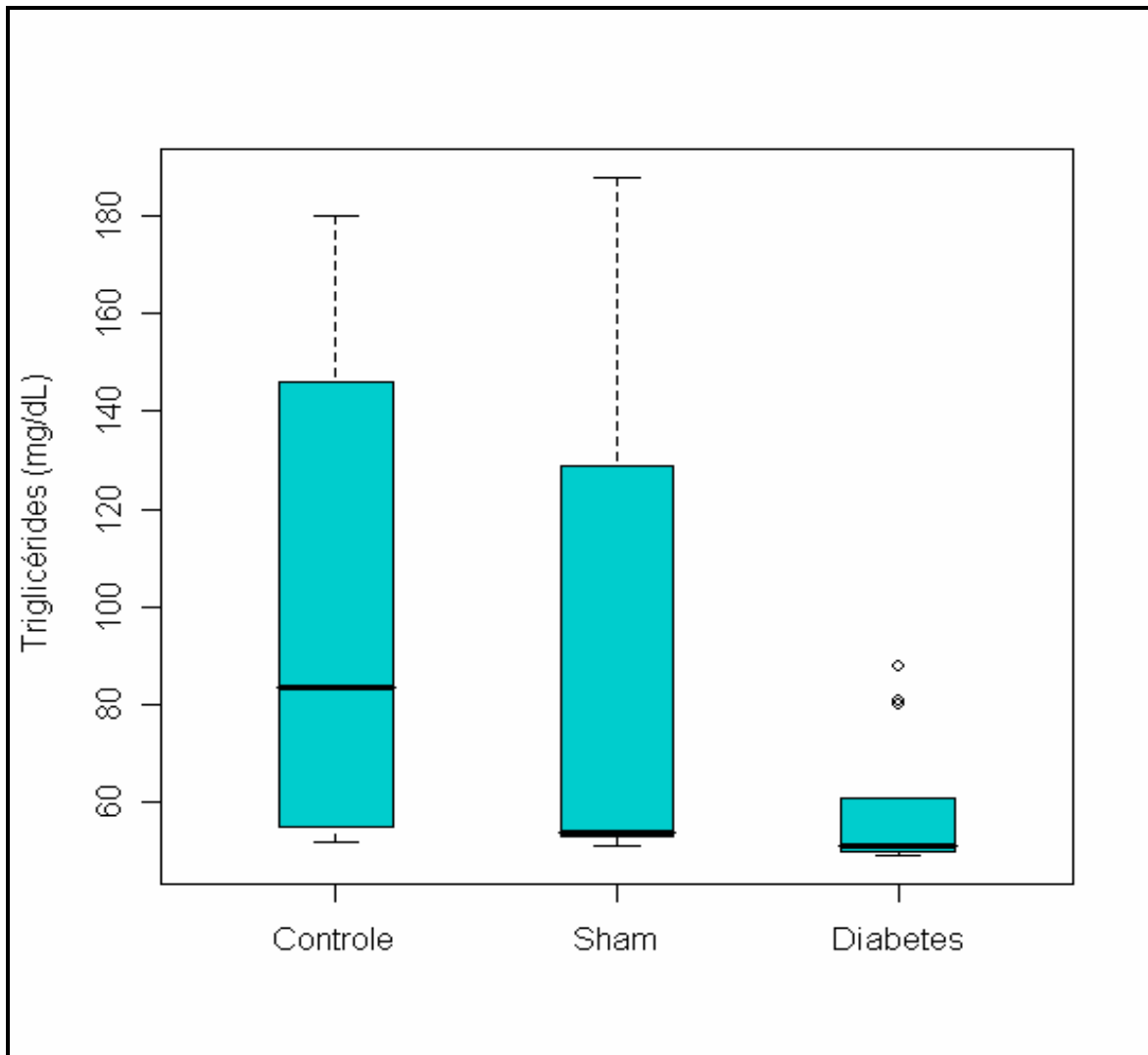
A média de VLDL-colesterol no grupo controle (n=10) foi 20,2mg/dL; no grupo “sham” (n=10) foi 17,0mg/dL e no grupo diabético foi 11,7mg/dL (Tab. 3). Segundo o teste de Brown Forsythe, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,07$ ; Fig. 9).



**Figura 9– Box-plot de VLDL-colesterol em cada grupo**

Nenhuma diferença entre as médias dos grupos foi detectada ( $p=0,07$ )

Quanto aos valores de triglicérides, a média no grupo controle foi 101,1mg/dL; no grupo “sham” foi 85,1mg/dL e no grupo diabético foi 58,6mg/dL (Tab. 3). Segundo o teste de Brown Forsythe, não houve diferença entre as médias dos três grupos ( $p=0,07$ ; Fig. 10).

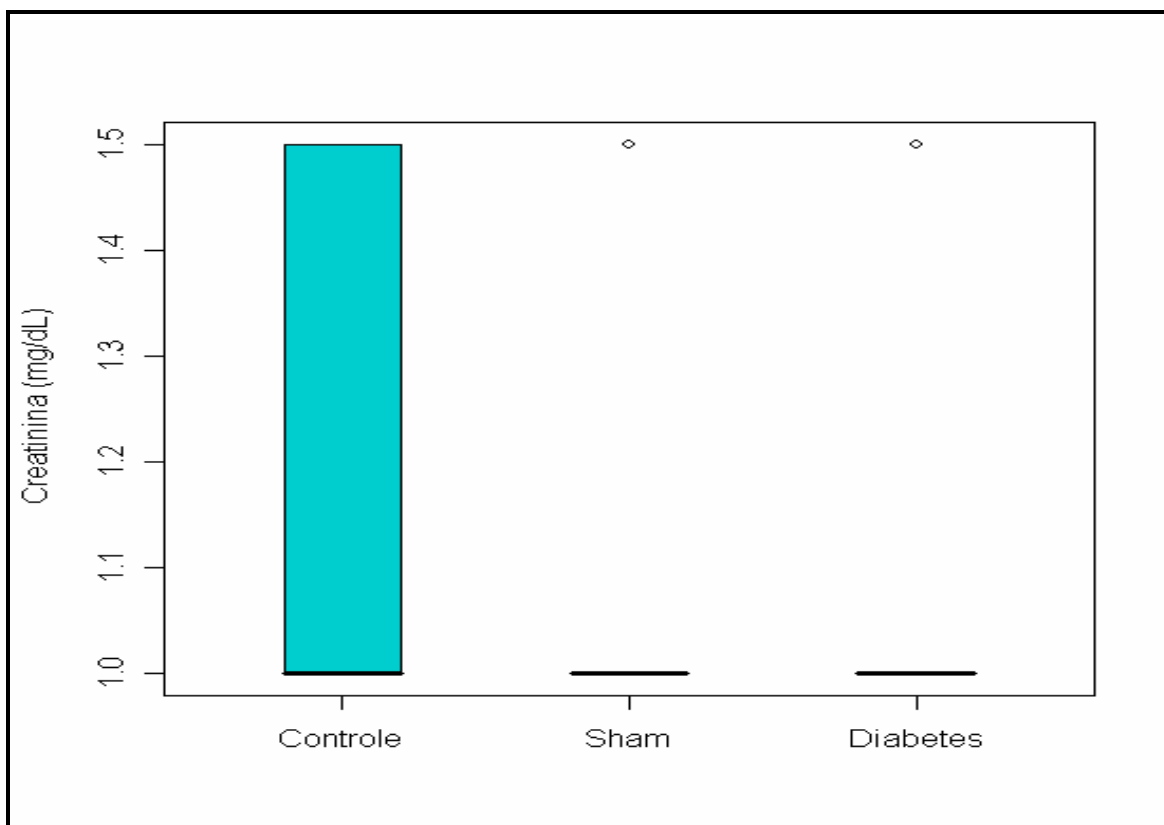


**Figura 10- Box-plot de triglicérides em cada grupo**

Nenhuma diferença entre as médias dos grupos foi detectada ( $p=0,07$ )



A média das concentrações séricas de creatinina no grupo controle foi 1,2mg/dL, no grupo “sham” foi 1,1mg/dL e no grupo diabético foi 1,1mg/dL (Tab. 3). O estudo comparativo das médias entre os grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,47$ ; Fig. 11).



**Figura 11– Box-plot de creatinina em cada grupo**

Nenhuma diferença entre as médias dos grupos foi detectada ( $p=0,47$ )

Houve interesse em conhecer a relação entre algumas das variáveis estudadas no grupo diabetes. A Tabela 4 apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre essas variáveis, para o grupo de animais diabéticos. As figuras de 12 a 35 apresentam o diagrama de dispersão entre essas variáveis, possibilitando uma visualização da relação entre elas.

Tabela 4- Coeficientes de correlações de Pearson entre as variáveis em estudo no grupo diabetes

	Glicemia inicial	Glicemia final	Ganho de peso	Homo-cisteína	Fator von Willebrand	Colesterol total	LDL-colesterol	HDL-colesterol	VLDL-colesterol	Triglicérides
Glicemia final	-0,28									
Ganho de peso	0,42	-0,67**								
Homocisteína	0,01	-0,06	0,05							
Fator von Willebrand	-0,08	0,18	-0,38	0,13						
Colesterol total	0,64*	-0,07	0,32	-0,56*	-0,20					
HDL-colesterol	0,02	-0,11	0,29	-0,34	-0,30	0,10	-0,80**			
LDL-colesterol	0,41	0,10	-0,10	0,10	0,26	0,46				
VLDL-colesterol	-0,09	-0,18	0,20	-0,58*	-0,47	0,35	-0,14	0,09		
Triglicérides	-0,09	-0,18	0,20	-0,58*	-0,47	0,35	-0,14	0,09	1,00**	
Creatinina	-0,28	-0,20	-0,24	0,44	0,21	-0,45	0,20	-0,48	-0,29	-0,29

\* p&lt;0,05

\*\*p&lt;0,01

O coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis glicemia final e ganho de peso ( $r = -0,67$ ) sugere a existência de uma associação linear entre essas variáveis, que pode ser visualizada na figura 12. Observa-se que, quanto maior foi a concentração de glicemia, menor foi o ganho de peso.

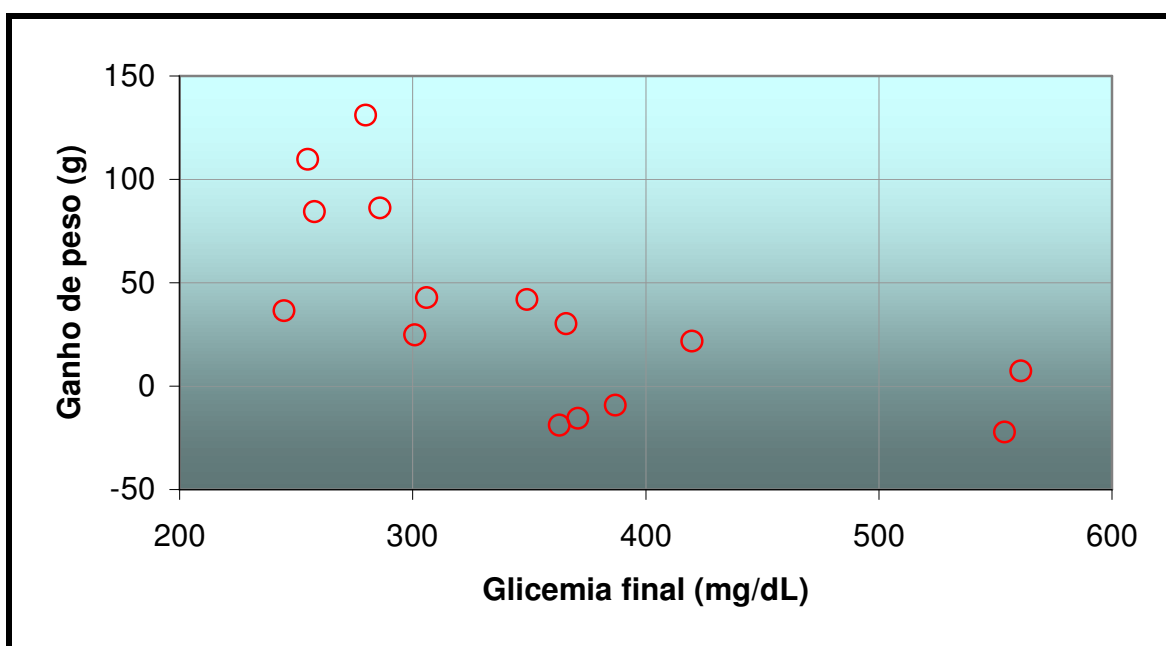


Figura 12– Diagrama de dispersão entre glicemia final e ganho de peso no grupo diabetes ( $r = -0,67^{**}$ )

Observa-se uma relação linear entre homocisteína e colesterol ( $r = -0,56$ ), sendo que à medida que aumenta a homocisteína plasmática, diminui o colesterol total. Isto pode ser visualizado na figura 26.

A mesma relação foi observada entre a variável homocisteína e a fração VLDL-colesterol e homocisteína e triglicérides nos animais diabéticos, sendo que quanto maior foi a homocisteína plasmática, menor foi a fração VLDL-colesterol e os valores de triglicérides (Figs. 29 e 30).

Nenhum outro coeficiente de correlação foi significativamente diferente de zero, ou seja, não há indícios de associação linear entre as demais variáveis estudadas (Figs. 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 27; 28; 30; 31; 32; 33; 34 e 35).

Em particular, não houve correlação entre os valores de homocisteína e fator von Willebrand nos animais diabéticos (Fig. 25).

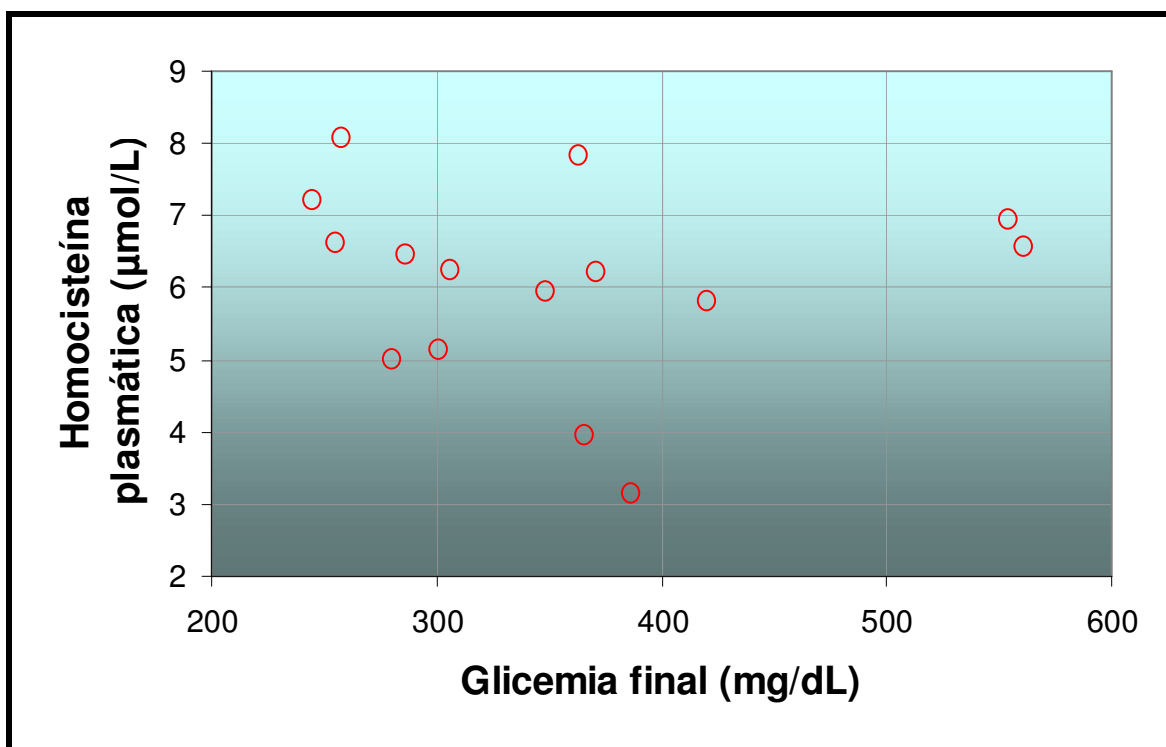


Figura 13– Diagrama de dispersão entre Glicemia final e Homocisteína no grupo diabetes ( $r = -0,06$ )

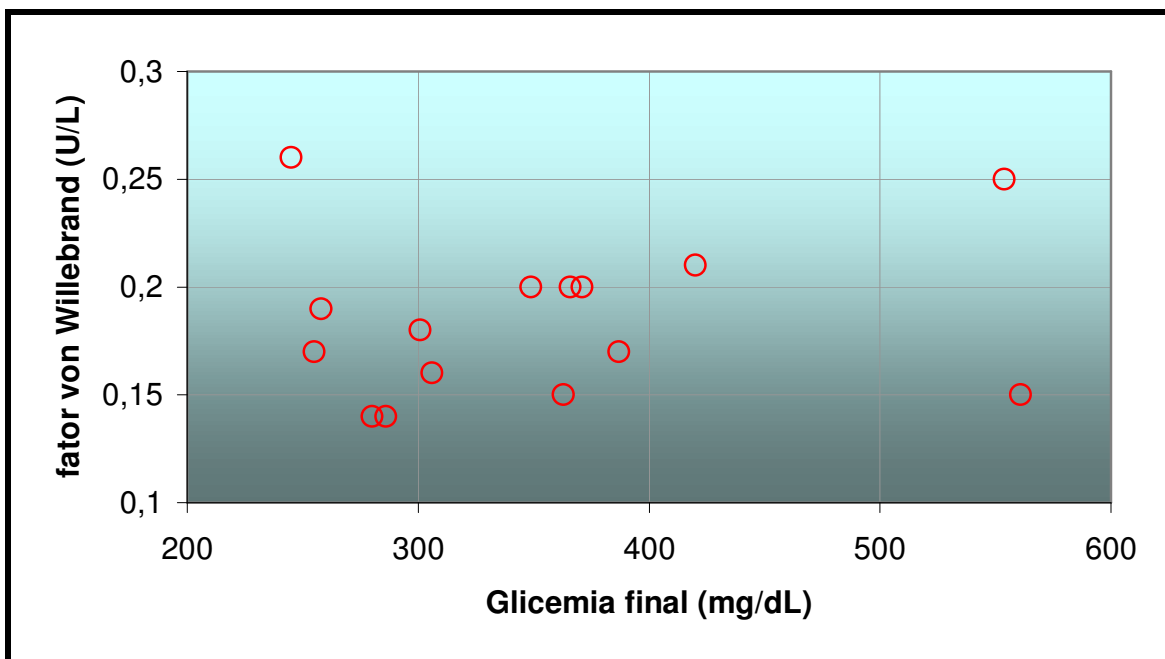


Figura 14– Diagrama de dispersão entre glicemia final e fator von Willebrand no grupo diabetes (r=0,18)

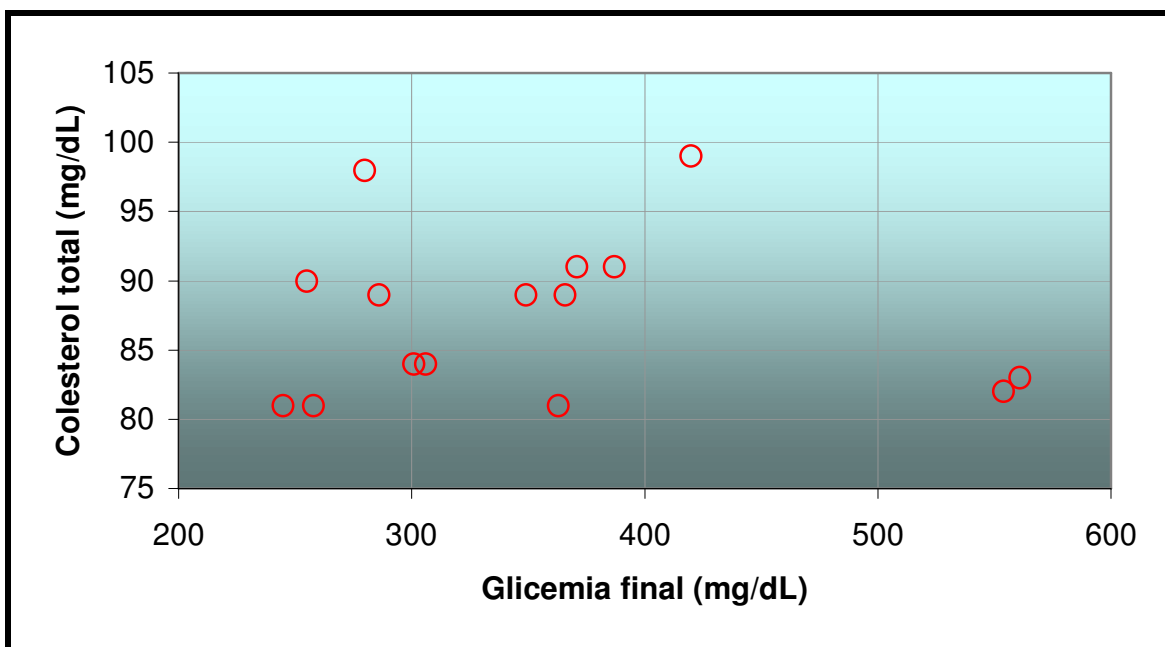


Figura 15– Diagrama de dispersão entre glicemia final e colesterol total no grupo diabetes (r= -0,07)

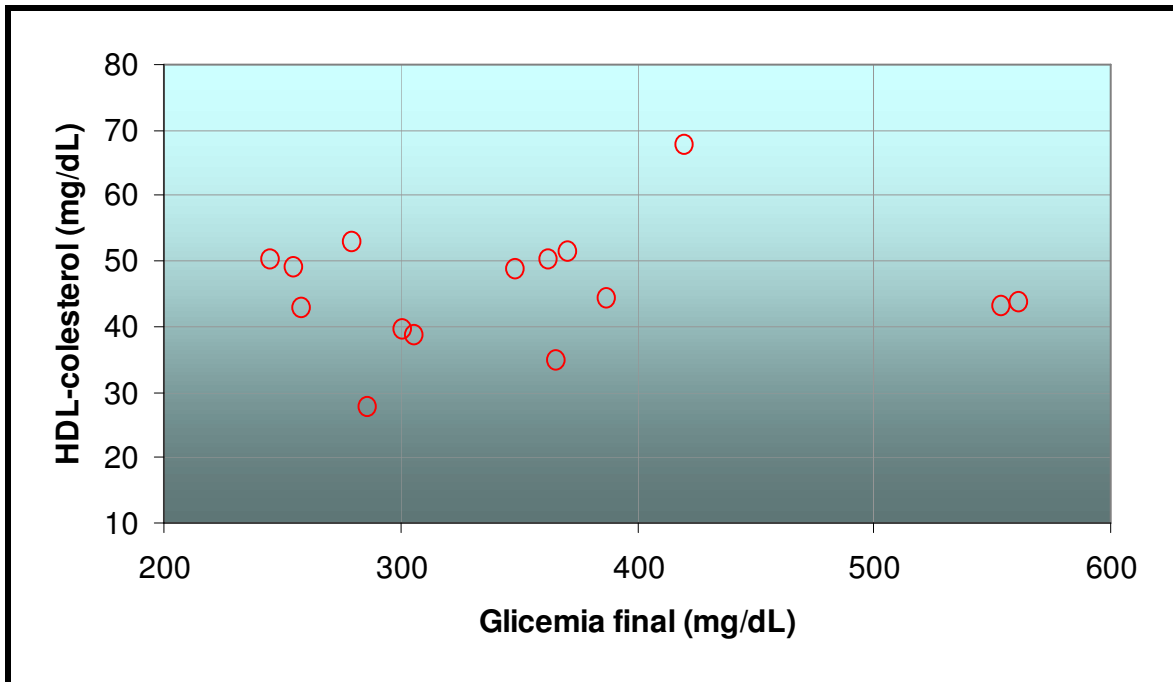


Figura 16– Diagrama de dispersão entre glicemia final e HDL-colesterol no grupo diabetes (r= -0,11)

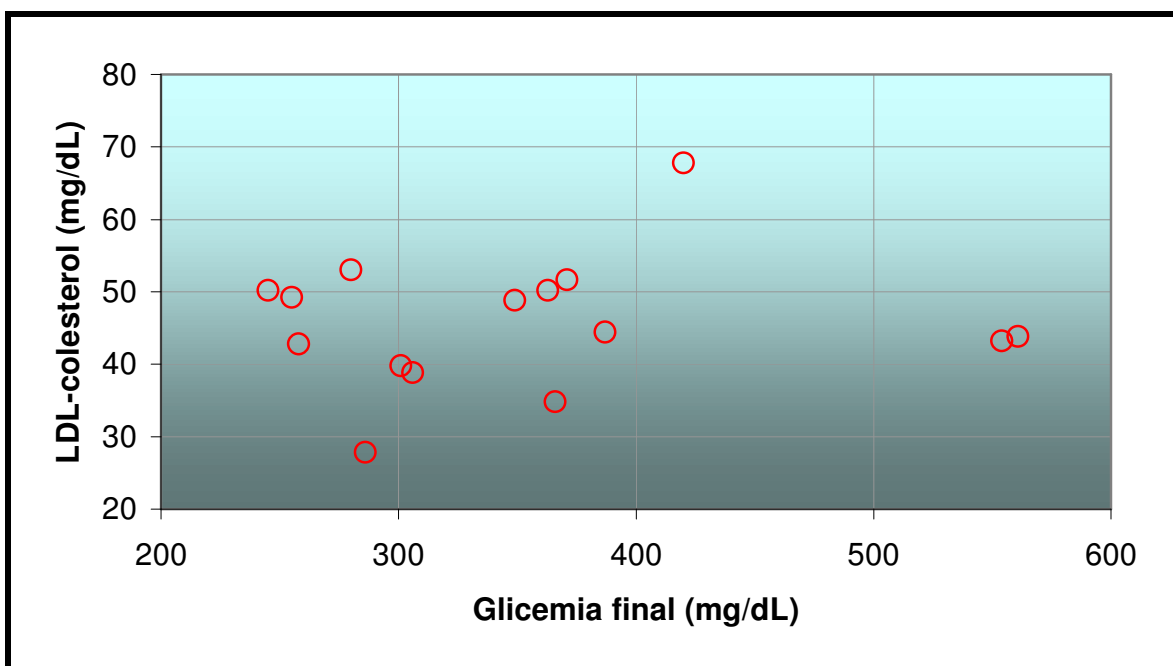


Figura 17– Diagrama de dispersão entre glicemia final e LDL-colesterol no grupo diabetes (r=0,10)

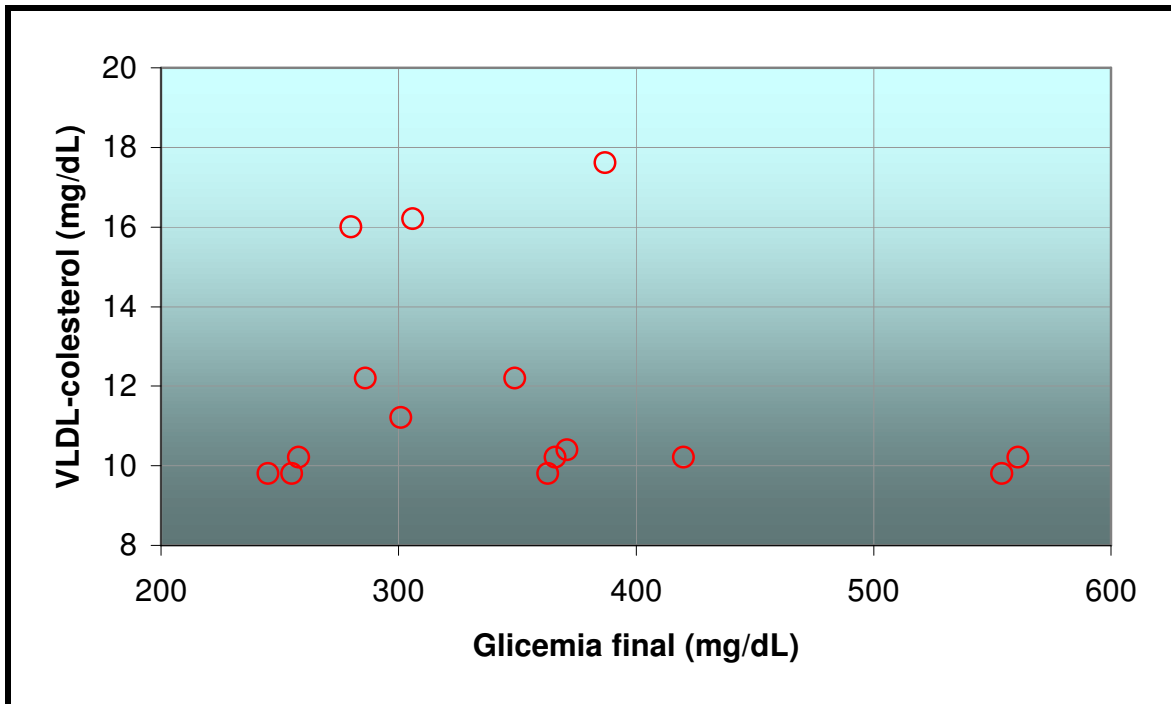


Figura 18– Diagrama de dispersão entre glicemia final e VLDL-colesterol no grupo diabetes ( $r = -0,18$ )

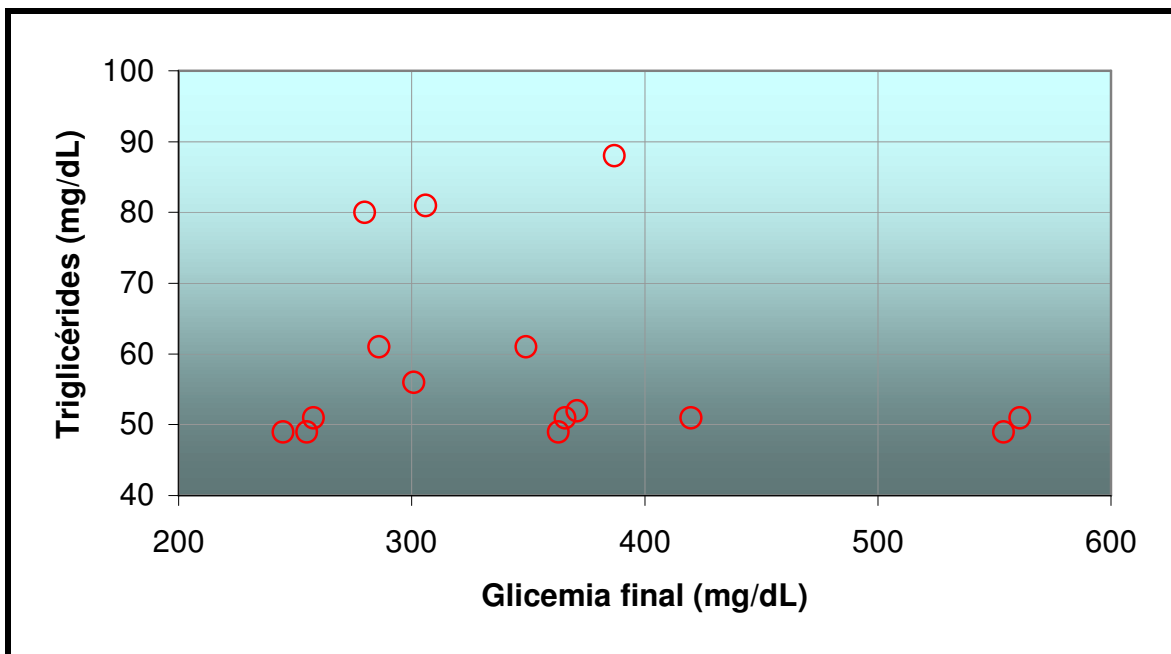


Figura 19– Diagrama de dispersão entre glicemia final e triglicérides no grupo diabetes ( $r = -0,18$ )

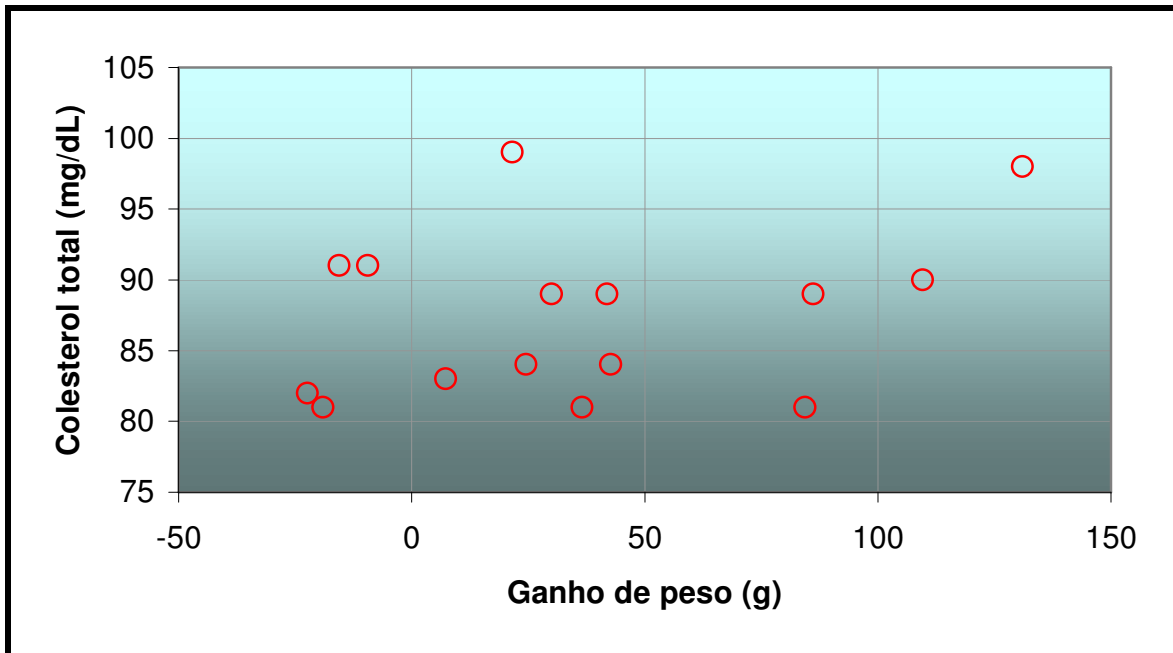


Figura 20– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e colesterol total no grupo diabetes (r=0,32)

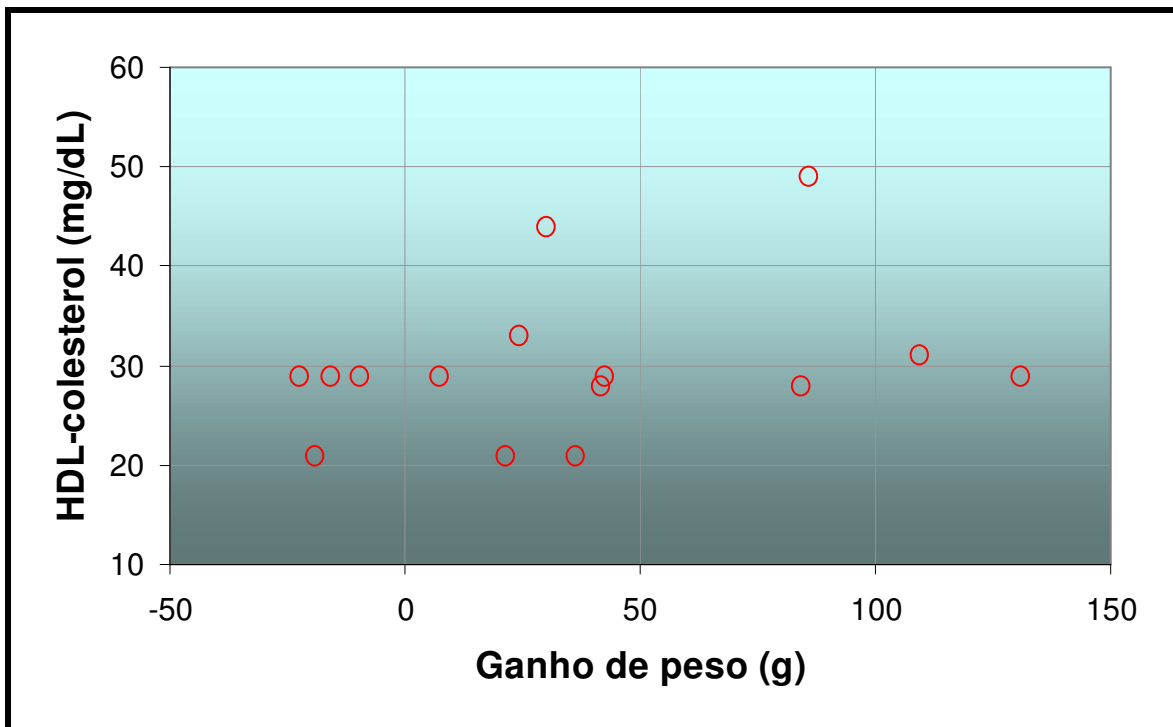


Figura 21– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e HDL-colesterol no grupo diabetes (r=0,29)



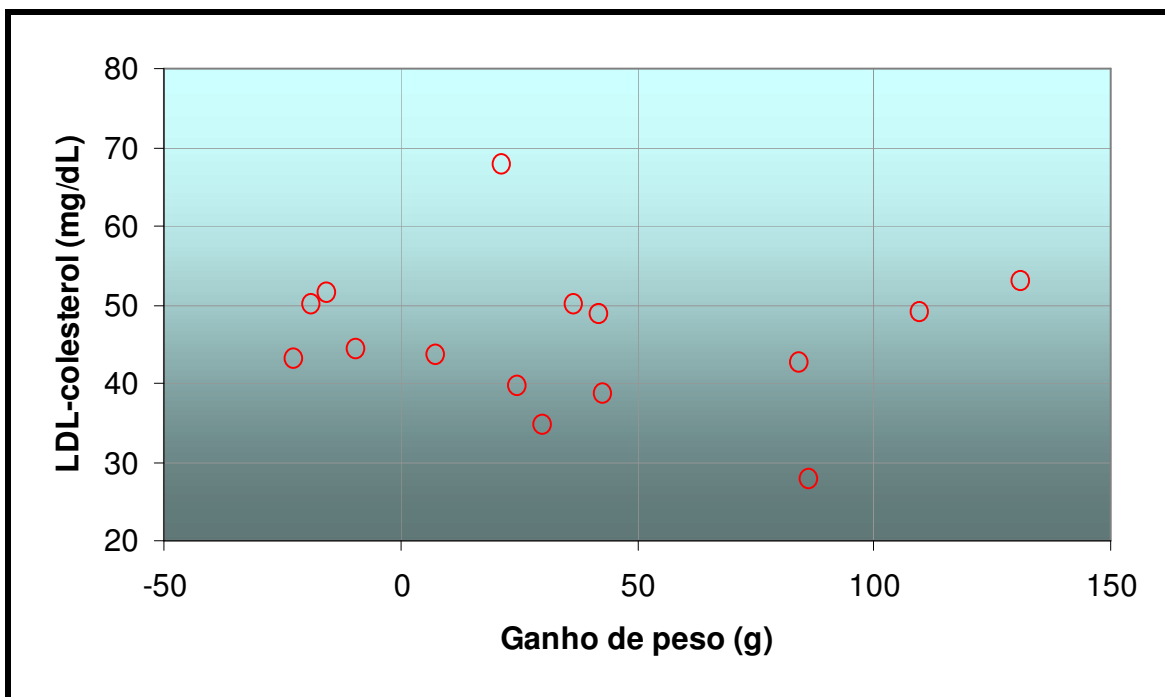


Figura 22– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e LDL-colesterol no grupo diabetes (r= -0,10)

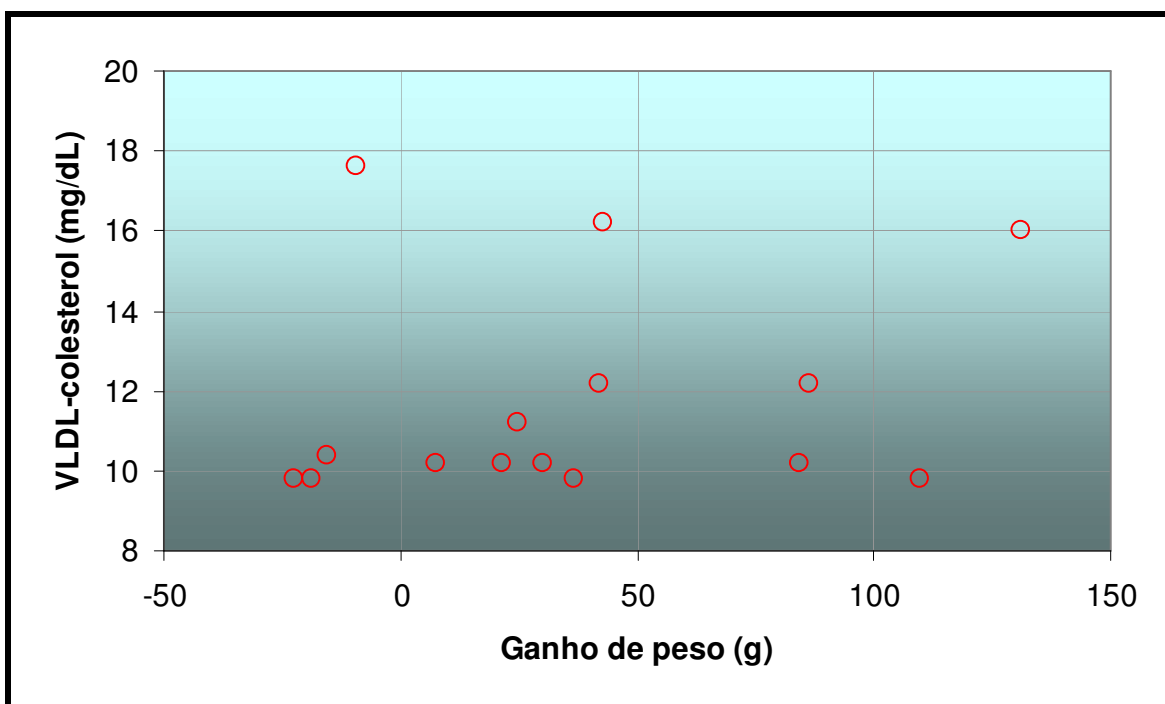


Figura 23– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e VLDL-colesterol no grupo diabetes (r=0,20)

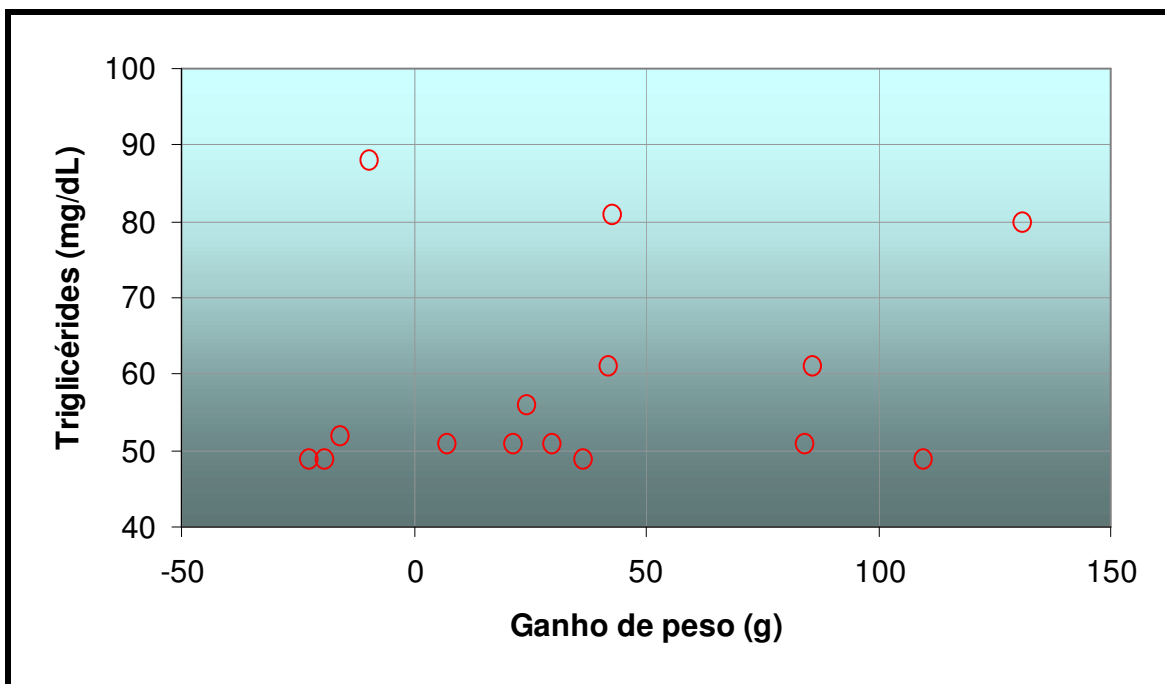


Figura 24– Diagrama de dispersão entre ganho de peso e triglicérides no grupo diabetes (r=0,20)

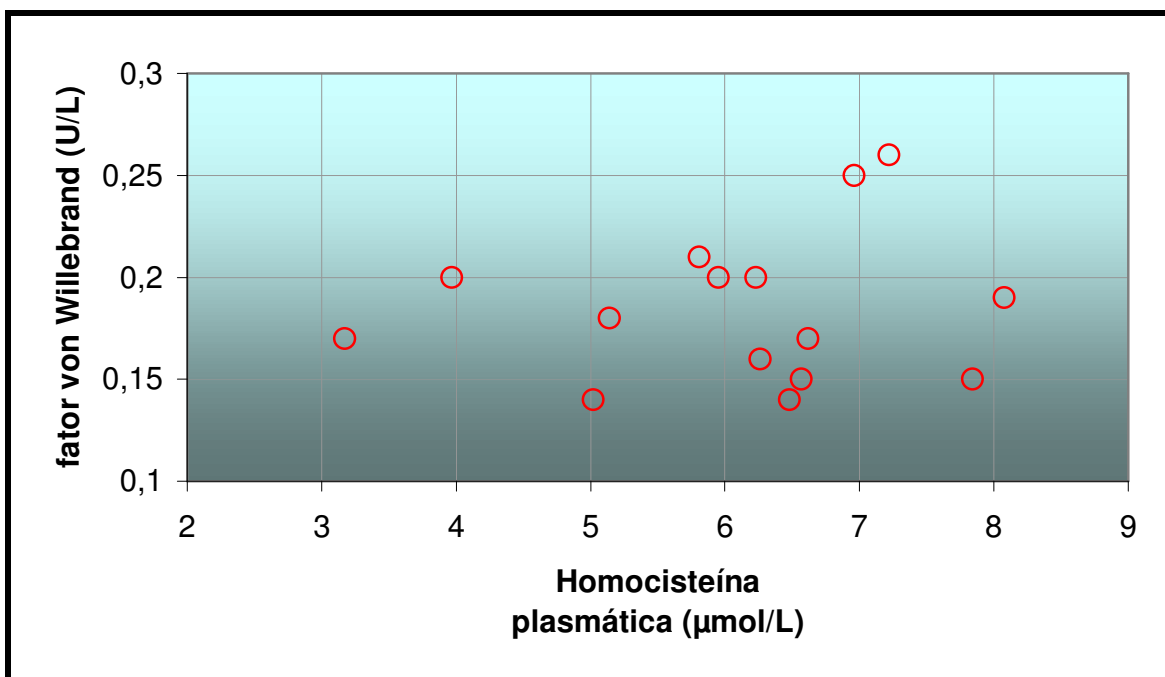


Figura 25– Diagrama de dispersão entre homocisteína e fator von Willebrand no grupo diabetes (r=0,13)

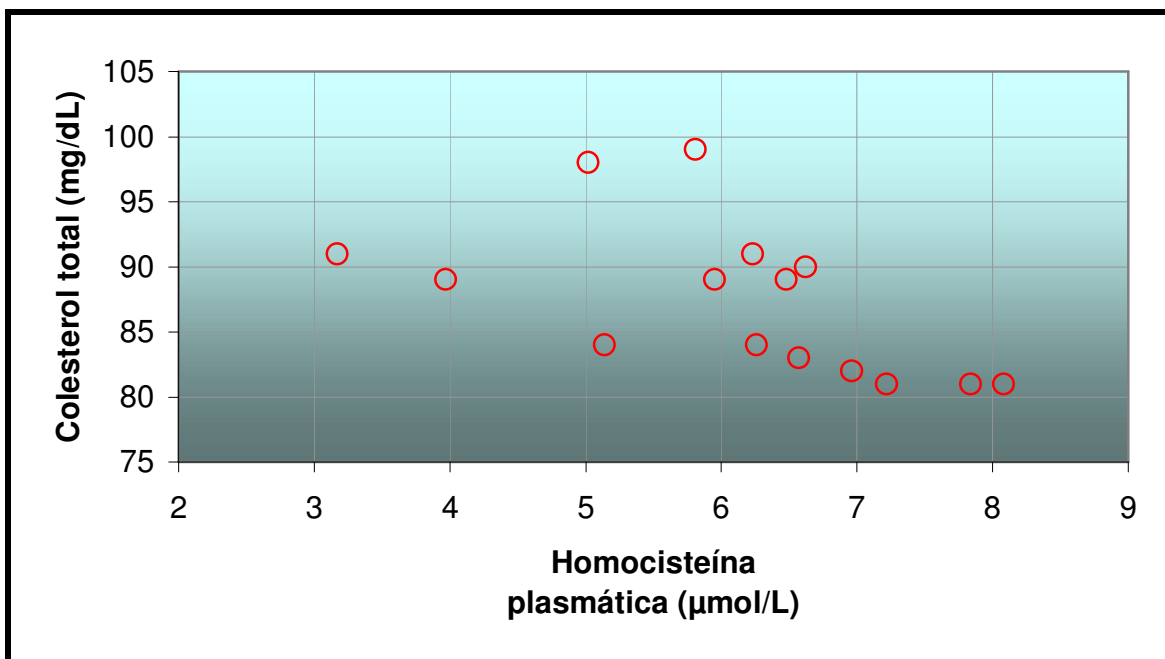


Figura 26– Diagrama de dispersão entre homocisteína e colesterol total no grupo diabetes (r= -0,56\*)

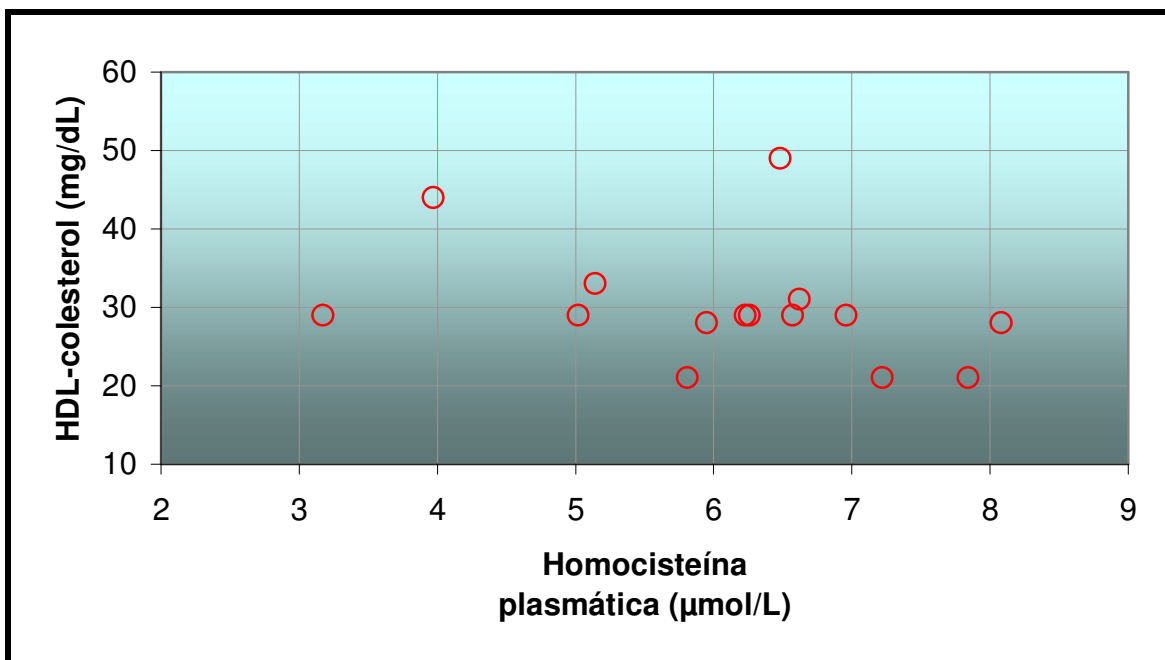


Figura 27– Diagrama de dispersão entre homocisteína e HDL-colesterol no grupo diabetes (r= -0,34)

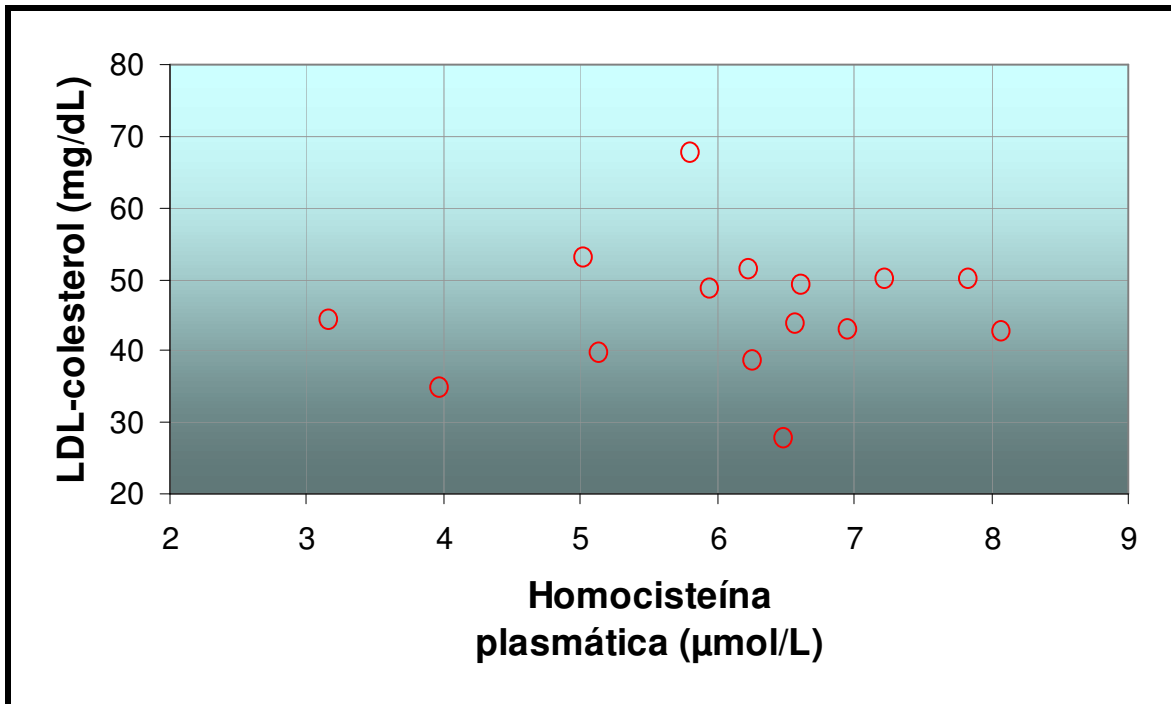


Figura 28– Diagrama de dispersão entre homocisteína e LDL-colesterol no grupo diabetes ( $r=0,10$ )

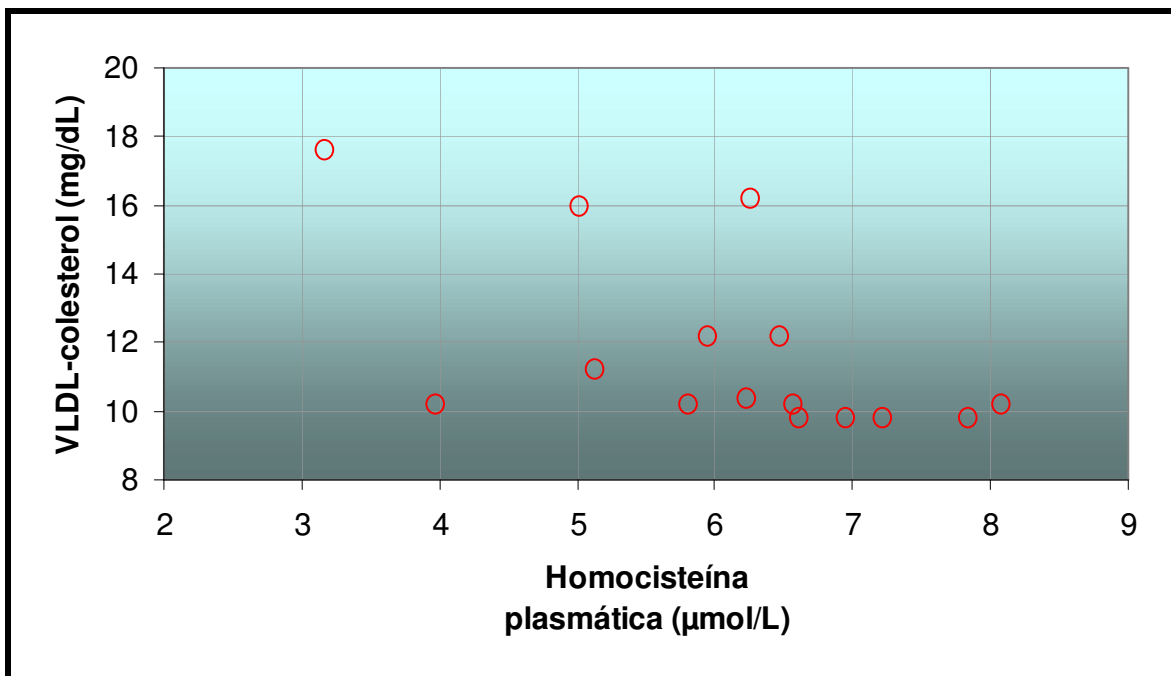


Figura 29– Diagrama de dispersão entre homocisteína e VLDL-colesterol no grupo diabetes ( $r= -0,58^*$ )

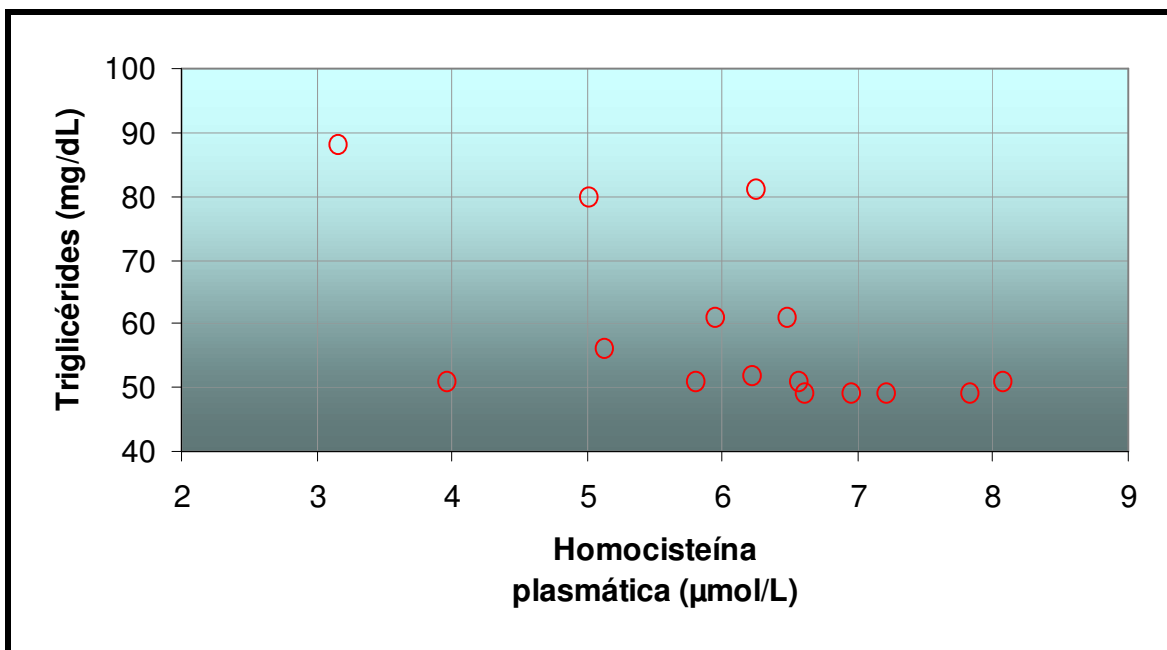


Figura 30– Diagrama de dispersão entre homocisteína e triglicérides no grupo diabetes (r= -0,58\*)

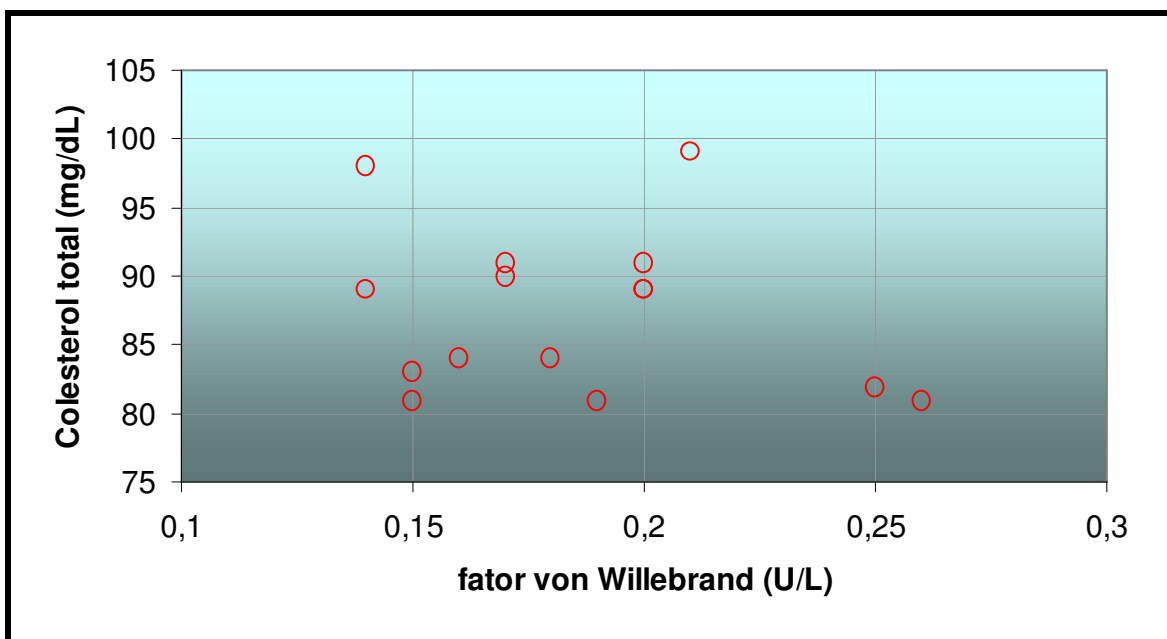


Figura 31– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e colesterol total no grupo diabetes (r= -0,20)

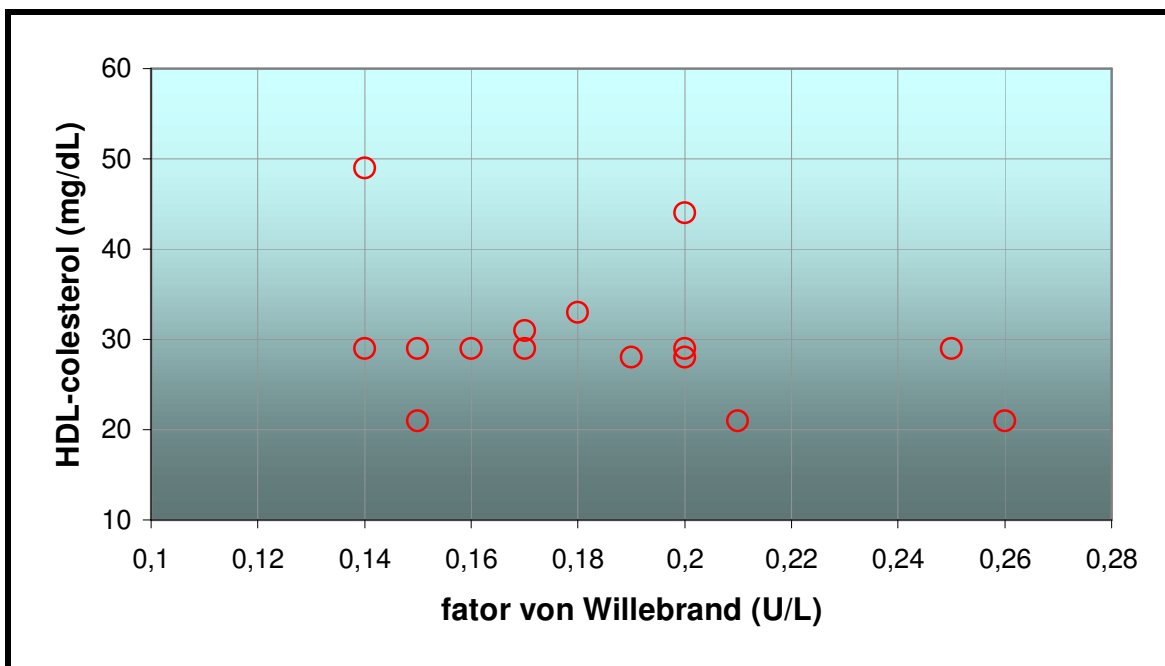


Figura 32– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e HDL-colesterol no grupo diabetes (r= -0,30)

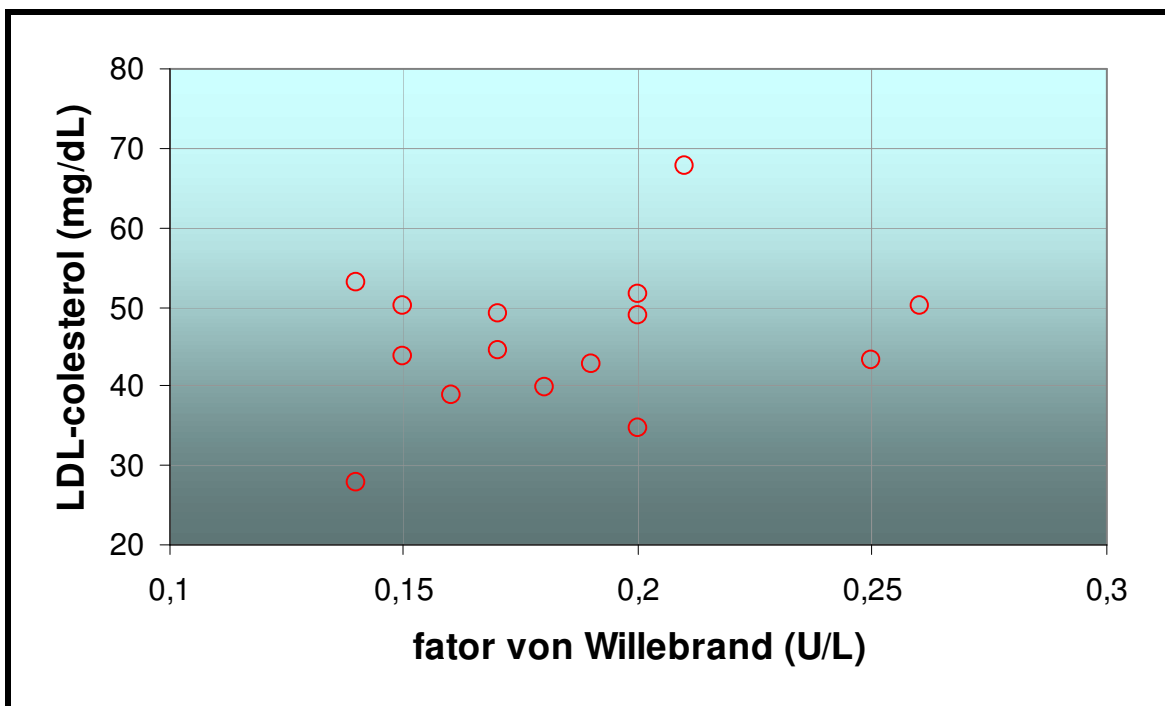


Figura 33– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e LDL-colesterol no grupo diabetes (r=0,26)

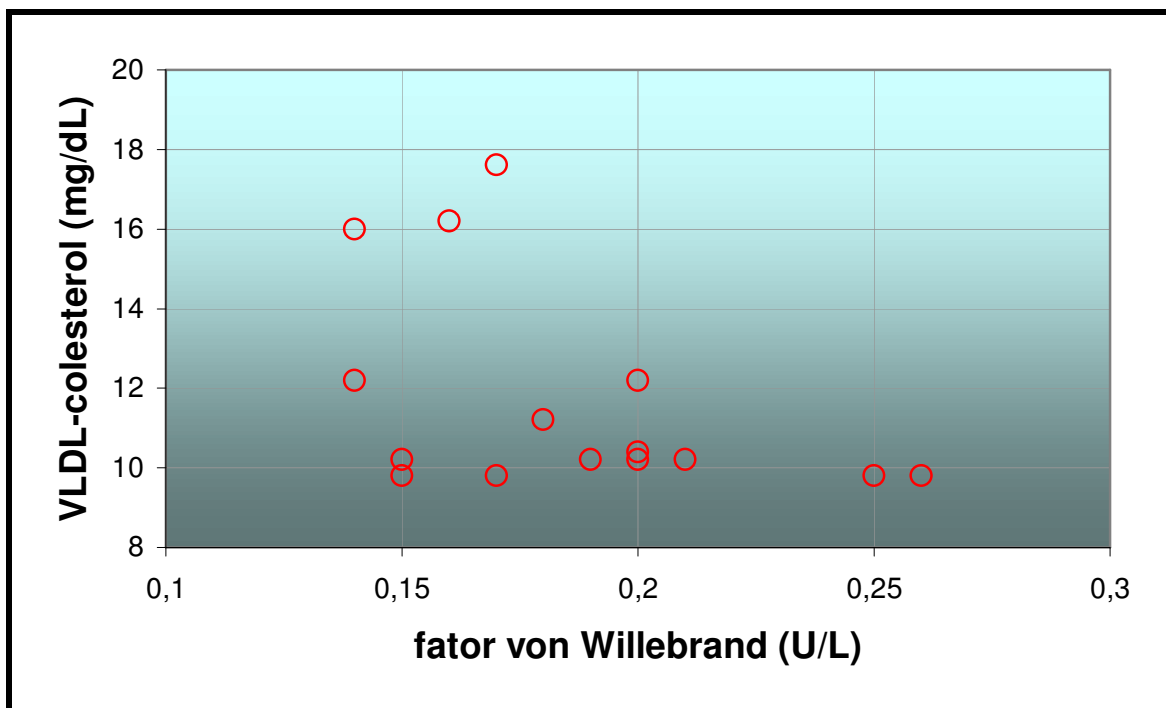


Figura 34– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e VLDL-colesterol no grupo diabetes ( $r = -0,47$ )

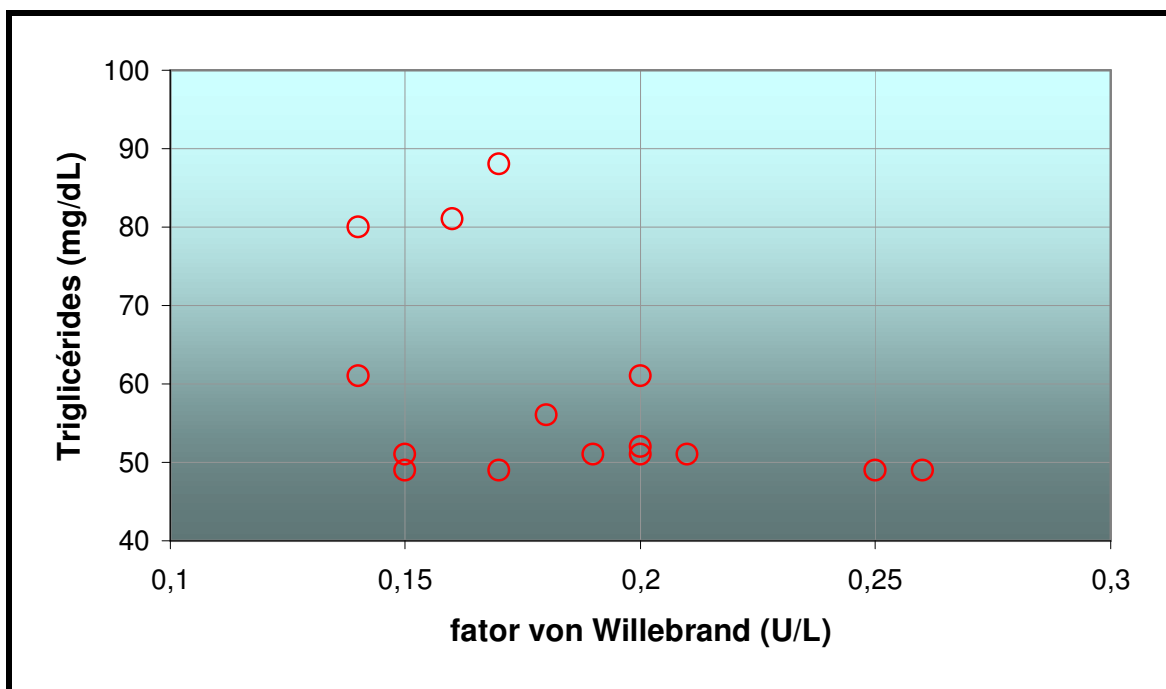


Figura 35– Diagrama de dispersão entre fator von Willebrand e triglicérides no grupo diabetes ( $r = -0,47$ )

## Discussão



O DM é uma doença endócrina complexa em cuja etiopatogenia estão envolvidos fatores genéticos e ambientais. Devido à distância filogenética entre seres humanos e roedores, houve a necessidade de se estudar diferentes modelos experimentais de DM para que os resultados pudessem ser comparados entre si permitindo a escolha do modelo que mais se aproxime da espécie humana (Ohno et al., 2000). Dentre eles, o mais referendado na literatura são os agentes químicos  $\beta$ -citotóxicos (aloxano e STZ), cuja supressão endócrina do pâncreas determina com mais fidedignidade as alterações bioquímicas, hormonais e morfológicas durante e após indução do estado diabetogênico (Lerco et al., 2003).

No presente trabalho, para indução do DM, utilizou-se a STZ por ser o modelo que representa melhor reprodutibilidade dos resultados obtidos em relação aos da literatura (Schein et al., 1973; Oberley, 1988; Steinberg et al., 1989; Stringer et al., 1989; Garg et al., 1996; Rang et al., 1997). Optou-se pela STZ ao invés do aloxano pela sua facilidade de aplicação, maior especificidade sobre as células beta pancreáticas, menor toxicidade e menores taxas de mortalidade, apesar de maior custo quando comparado ao do aloxano (Junod et al., 1969; Lerco et al., 2003). A metodologia empregada, então, está de acordo com modelos descritos na literatura para estudo de DM (Junod et al., 1967; Portha et al., 1974; 1989; Bell, Hye, 1983; Hemmings, Spafford, 2000; Weir et al., 2001; Wei et al., 2003).

Os efeitos da STZ são dose dependente, variando de baixas a altas doses (35 a 100mg/kg de peso corporal, respectivamente) (Junod et al., 1969), sendo que doses abaixo de 40mg/kg de peso podem ser ineficazes (Katsumata et

al., 1992) e doses maiores ou iguais a 100mg/kg de peso, letais (Szkudelski, 2001). Doses intermediárias (55 a 65mg/kg de peso) são as mais utilizadas para produzir DM objetivando estudos do sistema cardiovascular, por atingir-se níveis elevados de glicemia e os ratos sobreviverem sem suplementação de insulina, obtendo-se, assim, estado diabetogênico não controlado (Tomlinson et al., 1992).

A via de administração da STZ descrita na literatura pode ser tanto endovenosa quanto IP (Ganda et al., 1976; Szkudelski, 2001), sendo, nesta pesquisa, escolhida a via IP, pela facilidade de administração e excelente reprodutibilidade (Quadro 1; Tab. 3 e Fig. 3).

O DM, doença responsável por inúmeras complicações cardíacas e vasculares, apresenta como elemento importante na sua fisiopatologia a disfunção endotelial, sendo que várias alterações bioquímicas plasmáticas podem ser por ela responsáveis. Esta disfunção endotelial envolvendo também aspectos genéticos é precoce e determina o início e progressão da doença vascular, levando à micro e macroangiopatia.

Em estudo bem conduzido, Becker et al. (2000) objetivaram determinar a possível associação entre He e disfunção endotelial em ratos diabéticos e não diabéticos e se esta disfunção poderia ser quantificada pela concentração plasmática de fvW, concluindo que a He, importante na aterotrombose, não se correlacionou com o referido fator.

A presente pesquisa constatou-se que no DM, em decorrência dos distúrbios metabólicos, dentre os quais a hiperglicemia é o mais importante, há alteração nos valores plasmáticos de He e fvW (Tab. 3; Figs. 4 e 5).

Folsom et al. (1998) em estudo de coorte prospectivo coloca em dúvida a participação da HHe como fator de risco independente para DAC. Esses autores sugerem que a aterosclerose por si só pode elevar os níveis de He, resultando em associação entre HHe e DAC por mecanismo de causalidade reversa, ou seja, HHe como consequência e não causa de DAC. Contudo, seus resultados não encontram evidências epidemiológicas na literatura (Bostom, Selhub, 1999).

Em trabalho de revisão sobre HHe e DCV, foi demonstrado que estudos retrospectivos epidemiológicos sugerem forte associação entre HHe e risco cardiovascular aumentado. Contudo, ao se analisar estudos prospectivos conclui-se que essa associação é menos consistente e a observação epidemiológica entre HHe e risco cardiovascular não prova a existência de uma relação causal (Eikelboom et al., 1999).

A patogenia da lesão vascular determinada pela HHe inclui lesão da célula endotelial, crescimento da musculatura lisa vascular, maior adesividade plaquetária, aumento da oxidação do LDL-colesterol com deposição na parede vascular e ativação direta da cascata da coagulação (Durand et al., 2001). No entanto, ainda não está bem claro por qual mecanismo fisiopatológico a He pode promover aterotrombose (Becker et al., 2000).

À semelhança dos resultados do presente estudo (Tab. 3; Fig. 4), os trabalhos de Jacobs et al. (1998), House et al. (1999), Wollesen et al. (1999) e Veldman et al. (2004) demonstram níveis mais baixos de He no diabetes experimental em ratos, apresentando relação inversa entre valores de He e DM.

Admite-se que a He por lesar diretamente o endotélio, estimula a proliferação celular e a produção de colágeno, perpetua o processo inflamatório crônico vascular, altera o relaxamento arterial endotélio-dependente por meio do óxido nítrico, aumenta o estresse oxidativo, ativa fatores de coagulação e inibe a atividade da proteína C. Portanto, tendo-se em vista a fisiopatologia do DM, a lesão endotelial deveria estar associada à valores elevados de He. Contudo, na presença de hiperglicemia há aumento da filtração glomerular e conseqüentemente da He (Wollesen et al., 1999; Veldman et al., 2004), e as alterações metabólicas na sua via de formação (Jacobs et al., 1998) resultam em valores mais baixos, o que corrobora para a assertiva de que no DM a He seja apenas fator de risco para disfunção endotelial e não marcador específico de lesão do endotélio. Pode-se inferir, então, que valores normais ou elevados de He no DM estejam relacionados à lesão endotelial.

A atividade do tecido renal é responsável pela maior fração do clareamento renal de He e a perda da capacidade de degradar He explica sua elevação na fase final da doença renal (Bostom et al., 1995). Sendo assim, o rim é considerado o principal órgão envolvido na remoção da He plasmática (Hofmann et al., 1997). Na presente pesquisa, os níveis de creatinina plasmática não se alteraram nos ratos diabéticos (Tab. 3; Fig. 11), demonstrando, assim, que os animais diabéticos desse experimento não apresentaram doença renal avançada, o que explica a ausência de elevação da He plasmática (Tab. 3; Fig. 4). O mesmo achado foi observado por Jacobs et al. (1998) que encontraram resultados de creatinina até

menores no seu grupo diabético, mostrando evidências claras de que nesse grupo de animais não havia nefropatia avançada.

Vários fatores podem aumentar o fluxo sangüíneo renal, com conseqüente elevação da filtração glomerular (Ortola et al., 1987; Pedersen et al., 1992; Nair et al., 1994). Veldman et al. (2004) sugerem que a filtração glomerular renal é o principal responsável pelos valores de He plasmática total e que o aumento relativo desta filtração leva à diminuição dos seus valores plasmáticos em pacientes diabéticos. Para Wollesen et al. (1999) a taxa de filtração glomerular é um determinante independente das concentrações plasmáticas de He e cisteína. Estudando pacientes diabéticos observaram níveis plasmáticos mais baixos de He e cisteína, que podem ser explicados pela hiperfiltração glomerular renal, independente da idade, valores de creatinina e taxa de excreção de albumina. A microalbuminúria não interferiu na relação entre taxa de filtração glomerular e níveis de He, resultados esses também encontrados por Agardh et al. (1994) em pacientes diabéticos. Robillon et al. (1994) encontraram também níveis mais baixos de He em pacientes portadores de DM sem nefropatia.

Semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho, níveis de He plasmática em ratos diabéticos estreptozotocina induzidos foram menores do que aqueles do grupo controle (Jacobs et al., 1998). Para explicar a diminuição da He plasmática nos animais diabéticos, esses autores investigaram um possível aumento da sua excreção urinária através da determinação da He urinária em três grupos de animais e nenhuma diferença entre os grupos controle, diabéticos e diabéticos tratados com insulina foi observada. Para Jacobs et al. (1998) a

excreção urinária de He não representou a maior via de perda de He do organismo a qual não aumentou após tratamento do DM.

Entretanto, em estudos de populações diabéticas com nefropatia, Araki et al. (1993) e Munshi et al. (1996) encontraram valores normais de He e Hofmann et al. (1997) valores elevados. Para este autor, a HHe associada à hiperglicemia são sinérgicas em seu efeito patogênico no desenvolvimento da lesão endotelial no DM.

O fígado é extremamente importante na regulação dos valores plasmáticos de He (Stead et al., 2000). Considerado o maior órgão produtor de He plasmática e responsável pelo metabolismo da metionina, como evidenciado pela distribuição e atividade específica de enzimas envolvidas no seu metabolismo, assim como por sua relação com a síntese de creatina, a principal reação metil-requerida no organismo (Stipanuk, 1986).

Gursu et al. (2002) ao estudar ratos com DM induzido por STZ encontrou níveis mais baixos de He nesses animais e ao administrar insulina obteve normalização de seus níveis. Os autores acreditam que a insulina diminui a atividade das enzimas CBS e cistationina  $\gamma$ -liase, regulando a concentração de He plasmática via transulfuração hepática. Além disso, sugerem que o catabolismo insuficiente de He causado pela perda da função renal seja responsável pela elevação dos níveis plasmáticos de He no DM.

Jacobs et al. (1998) mediram a atividade de enzimas envolvidas na via da transulfuração e remetilação tanto no fígado como no rim e para eles, diferentemente do fígado, o rim não mostrou alteração na atividade das enzimas

da via da transulfuração. Portanto, demonstraram que a insulina regula a via da transulfuração hepática.

Na busca de um elemento que possa ser um marcador de comprometimento endotelial, o fvW passa a ter importante interesse clínico, podendo ser considerado um marcador dessa disfunção no DM.

A evidência de lesão endotelial nesta doença é conhecida e envolve alterações importantes como diminuição de fator relaxante derivado do endotélio, descrito em humanos portadores de DM insulino-dependente (Lambert et al., 1996), em coelhos com a mesma doença induzida por drogas (Teschfamiar, 1989; Cohen, 1993) e em ratos diabéticos induzidos por STZ (Cameron, 1992).

Winocour et al. (1985) encontraram níveis elevados de fvW em ratos com DM induzido por STZ. Desde então, muitos trabalhos vêm correlacionando fvW, como marcador de lesão endotelial, com DM (Lufkin et al., 1979; Galajda et al., 1997; Vischer et al., 1997; van Mourik et al., 1999).

Concentrações plasmáticas elevadas de fvW é considerado marcador específico da função da célula endotelial (Jaffe et al., 1974; Lip, Blann, 1997; Stehouwer et al., 1991; Vischer et al., 1998). No entanto, não é específico do endotélio, isto é, na ativação plaquetária que está intimamente ligada à lesão endotelial, os valores desse fator se encontram elevados (Ribau et al., 1998). O fvW tem baixa especificidade como marcador de lesão endotelial e seus valores plasmáticos podem não refletir necessariamente o seu grau de lesão e ativação plaquetária, mas sim a consequência do estímulo e ativação de células endoteliais viáveis (Mannucci, 1998).

Correa et al. (2003) demonstraram que a lesão endotelial no DM inicia antes da detecção clínica da lesão vascular. Ao comparar valores de fvW em pacientes com DM recentemente diagnosticado com aqueles portadores da doença há muitos anos, encontraram nestes, valores mais elevados, enquanto naqueles não foi encontrada diferença em relação ao grupo sem doença. Os autores sugerem, também, que o método mais apropriado para se avaliar lesão endotelial precoce é dosar os metabólitos do óxido nítrico, os quais se encontram diminuídos precocemente e que o fvW não seria um marcador de função endotelial, mas deveria ser encarado como marcador de situações agudas o qual se torna significativo e permanentemente elevado quando a lesão vascular encontra-se instalada. De fato, em culturas de células endoteliais submetidas a diferentes estímulos para sua ativação, observa-se como primeira alteração a liberação de fvW pré-formados e contidos nos grânulos intracitoplasmáticos, o que ocorre em até quatro horas após o estímulo e que não persiste por longo período de tempo (Loesberg et al., 1983; Reinders et al., 1984; Roarke et al., 1989).

Nesse trabalho os valores de fvW encontram-se significativamente mais elevados nos ratos diabéticos (Tab. 3; Fig. 5), confirmando, assim, a ativação endotelial e a lesão vascular instalada presentes no DM. Não foi observada, também, correlação entre He e fvW (Fig. 25), sugerindo que a relação entre He e aterotrombose em ratos diabéticos não pode ser explicada pela associação entre He e fvW.

Em relação aos lipídeos, importantes no processo de aterosclerose, representam risco cardiovascular principalmente na presença de DM. Essa



doença altera a composição de lipoproteínas, suas funções e os valores de triglicérides.

No que diz respeito ao colesterol e suas frações, Nakayama et al. (1977) demonstraram que em modelos experimentais de DM, a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase está diminuída e, portanto, a síntese hepática de colesterol encontra-se reduzida. No entanto, demonstraram, também, que a síntese intestinal de colesterol em rato diabético está aumentada. Jião et al. (1988) constataram aumento da atividade da enzima acyl-CoA transferase intestinal, sendo responsável pelo aumento do colesterol total e suas frações em ratos diabéticos.

Gupta, Dixit (1982) tentaram correlacionar a dose de STZ IP com grau de hiperglicemia e hiperlipidemia e verificaram que o DM é STZ-dose dependente e que a gravidade da doença pode ser avaliada pela elevação dos lipídeos. Wasan et al. (1998) também demonstrou que a gravidade do DM influenciava o metabolismo hepático dos lipídeos.

Os trabalhos (Bar-On et al., 1976a; 1976b; Van Tol, 1977; Smith, Novotny, 1980; Jião et al., 1988; Wasan et al., 1998; Ohno et al., 2000) que correlacionaram DM e colesterol apresentavam curto período de tempo entre indução do DM e sacrifício dos animais (3 a 21 dias). No entanto, Lerco et al. (2003) em estudo do perfil lipídico em ratos com DM por um período de 12 meses concluíram que os animais diabéticos não apresentaram alterações do perfil lipídico, considerando esse fato de grande importância na presença da macroangiopatia diabética experimental do rato.

Os triglicérides e a fração VLDL-colesterol são os que mais sofrem alterações no DM (Van Tol, 1977; Smith, Novotny, 1980; Wasan et al., 1998). Van Tol (1977) atribuiu esse achado à diminuição da remoção de triglicérides séricos em ratos diabéticos por provável diminuição da atividade de enzimas hepáticas e/ou do tecido adiposo no seu sítio de hidrólise.

No presente estudo, a média dos valores de colesterol total foram significativamente menores no grupo diabético em relação ao grupo controle e as frações do colesterol bem como os valores de triglicérides não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os três grupos de animais (Tab. 3; Figs. 6, 7, 8, 9 e 10). Tais resultados podem ser explicados por tratar-se de experimento com período de tempo maior (8 semanas), onde o ganho de peso dos animais diabéticos foi significativamente menor (Tabs. 1 e 2; Fig. 1), apresentando-se desnutridos ao final do experimento. Tais achados também foram observados por Lerco et al. (2003), que também em modelo experimental de DM por período de tempo mais prolongado (12 meses) não encontraram diferenças nas concentrações séricas de colesterol total e frações e triglicérides. Entretanto, Schnatz, et al. (1972) ao estudarem os triglicérides no DM induzido por STZ em ratos encontraram resultados diferentes, porém, no seu experimento os animais foram tratados com insulina e receberam dietas diferentes.

A desnutrição apresentada pelos animais ao término desse experimento pode ter levado à redução dos valores de colesterol total (Tab. 3; Fig. 6), ao contrário do que é descrito na literatura onde os experimentos são mais curtos e provavelmente incapazes de levar à desnutrição.

A análise de correlação entre as variáveis estudadas neste trabalho mostra uma relação linear entre a variável He e as variáveis CT, VLDL-colesterol e TG (Tab. 4; Figs 26, 29 e 30). Resultados semelhantes não foram encontrados na literatura consultada e não permitem estabelecer relação causal entre as variáveis, demonstrando que neste estudo quanto maiores os valores de He, menores foram os de CT, VLDL-colesterol e TG. É evidente que a variação do ganho de peso influencia nos valores de CT e, principalmente, de VLDL-colesterol e TG, o que não ocorre com a He.

Em resumo, no presente trabalho foi estudado em ratos albinos portadores de DM induzido por STZ fatores que comprometem a função endotelial favorecendo o processo de aterosclerose e um fator (fvW) marcador dessa disfunção. Abrem-se, portanto, portas para pesquisas futuras onde outros aspectos da disfunção endotelial no DM poderão ser estudados, trazendo contribuições relevantes ao melhor entendimento da fisiopatologia desta prevalente entidade nosológica para a prática da medicina.

---

## Conclusões

Neste estudo, utilizando como modelo biológico o DM induzido por STZ em ratos albinos, nas condições de experimento apresentadas, torna-se lícito concluir:

1. Os ratos diabéticos apresentaram valores reduzidos de homocisteína.
2. O grupo diabético apresentou valores elevados de fator von Willebrand.
3. Houve correlação entre homocisteína e colesterol total, homocisteína e fração VLDL-colesterol e homocisteína e triglicérides.
4. Não houve correlação entre glicemia final e homocisteína, glicemia final e fator von Willebrand e homocisteína e fator von Willebrand nos ratos diabéticos.
5. Houve correlação entre ganho de peso e glicemia final nos ratos diabéticos.

---

## Referências Bibliográficas

Agardh CD, Agardh E, Andersson A, Hultberg B. Lack of association between plasma homocysteine levels and microangiopathy in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest.* 1994;54(8):637-41.

Ahren B, Skoglund G. Insulin secretion in neonatally streptozotocin-injected mice. *Diabetes Res.* 1989;11(4):185-9.

Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal renin angiotensin system in diabetes functional, immunohistochemical and molecular biological correlation. *Am J Physiol.* 1993;265(4 Pt 2):F477-86.

Araki A, Sako Y, Ito H. Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis.* 1993;103(2):149-57.

Arison RN, Ciaccio EI, Glitzer MS, Cassaro JA, Pruss MP. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes.* 1967;16(1):51-6.

Bar-On H, Roheim PS, Eder HA. Hyperlipoproteinemia in streptozotocin-treated rats. *Diabetes.* 1976a;25(6):509-15.

Bar-On H, Roheim PS, Eder HA. Serum lipoproteins and apolipoproteins in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Clin Invest.* 1976b;57(3):714-21.

Becker A, Van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Jager A, Dekker JM, Nijpels G, et al. Serum homocysteine is weakly associated with von Willebrand factor and soluble vascular cell adhesion molecule 1, but not with C-reactive protein in type 2 diabetic and non-diabetic subjects – The Hoorn Study. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(9):763-70.

Belicova M, Kubisz P, Kicko V, Dvorsky J, Funiak S, Kvetensky J, et al. [Elevated levels of plasma von Willebrand factor: a new risk factor for atherosclerosis?]. *Vnitr Lek.* 1994;40(10):660-2.

Bell RH Jr, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res.* 1983;35(5):433-60.

Blann AD, Taberner DA. A reliable marker of endothelial cell dysfunction: does it exist? *Brit J Haematol.* 1995;90(2):244-8.

Boneu B, Abbal M, Plante J, Bierme R. Factor VIII complex and endothelial damage[Letter]. *Lancet.* 1975;1(7922):1430.

Bostom AG, Brosnan JT, Hall B, Nadeau MR, Selhub J. Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. *Atherosclerosis*. 1995;116(1):59-62.

Bostom AG, Selhub J. Homocysteine and arteriosclerosis: subclinical and clinical disease associations. *Circulation*. 1999;99(18):2361-3.

Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995;274(13):1049-57.

Cameron NE, Cotter MA. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia*. 1992;35(11):1011-9.

Carvalho ACA, Bellman SM, Saullo VJ, Quinn D, Zapol WM. Altered factor VIII in acute respiratory failure. *N Engl J Med*. 1982;307(18):1113-9.

Cohen RA. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;87:V67-76.

Colwell JA, Lopes-Virella MF, Halushka PV. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1981;4(1):121-33.

Correa RC, Alfieri AB. Plasmatic nitric oxide, but not von Willebrand factor, is an early marker of endothelial damage, in type 1 diabetes mellitus patients without microvascular complications. *J Diabetes Complications*. 2003;17(5):264-8.

Cruz EM, D'Almeida V, Cardien LC, Terzi CA, Diniz DC, Carvalho ACC, et al. Padronização da dosagem de homocisteína plasmática por cromatografia líquida de alta pressão e aplicação em pacientes com doença arterial coronariana. *J Bras Patol* 2000;36(3):166-73.

Cucuianu MP, Cristea A, Roman S, Rus H, Missits I, Pechet L. Comparative behaviour of the components of the factor VIII complex in acute myocardial infarction. *Thromb Res*. 1983;30(5):487-97.

Davidson MB. Complicações do diabete melito: implicações para os cuidados primários. In: Davidson MB. *Diabetes mellitus*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p.239-76.

Dhalla NS, Pierce GN, Innes IR, Beamish RE. Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can. J. Cardiol*. 1985;1(4):263-81.



Duncan HF, Mak KM. Alterations in susceptibility to carbon tetrachloride toxicity and hepatic antioxidant/detoxification system in streptozotocin-induced short-term diabetic rats: effects of insulin and Schisandrin B treatment. *Molecular and Cell. Biochem.* 1997;175:225-32.

Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blanche D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest.* 2001;81(5):645-72.

Eikelboom JW, Lonn E, Genest JrJ, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med.* 1999;131(5):363-75.

Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH. Homocyst(e)ine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(10):1947-53.

Faria Neto JR, Chagas, ACP. A homocisteína como fator de risco coronariano. *Atherosclerosis.* 2001;12(1):20-5.

Faria Neto JR, Chagas ACP, Luz PL. Hiper-homocisteinemia e doença aterosclerótica. In: Chagas ACP; SBCM. *Doença Coronária.* São Paulo: Atheneu; 2005. p.257-74.

Fein FS, Sonnenblick EH. Diabetic Cardiomyopathy. *Prog Cardiovasc Dis.* 1985;27(4):255-70.

Fiorini VCC, Scattolini M, Palumbo MN, Roizenblatt SS, Lopes AC. Hemostasia: fisiologia e farmacologia. *Bras J Clin Ther.* 2001;27(2):71-9.

Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms and B vitamins: the atherosclerosis risk in Communities (ARIC) study. *Circulation.* 1998;98(3):204-10.

Fonseca V, Guba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr Rev.* 1999;20(5):738-59.

Galajda P, Martinka E, Mokán M, Kubisz P. Endothelial markers in diabetes mellitus. *Thromb Res.* 1997;85(1):63-5.

Gambhir DS, Gambhir JK. Clinical spectrum and diagnosis of homocysteinemia. *Indian Heart J.* 2000;52(7 suppl):S27-30.

Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*. 1976;25(7):595-603.

Garg MC, Ojha S, Bansal DD. Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. *Indian J Exp Biol*. 1996;34(3):264-6.

Geiger H, Bahner U, Vaaben W, Dammrich J, Heidland A, Luft FC. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats with reduced renal function. *J Lab Clin Med*. 1992;120(6):861-8.

Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab*. 1988;14(1):25-30.

Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*. 1997;277(22):1775-81.

Gravina-Taddei CF, Batlouni M, Sarteschi C, Baltar VT, Salvarini NAC, Bertolami MC, et al. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. *Arq Bras Cardiol*. 2005;85(3):166-73.

Ghishan FK. Calcium transport by basolateral membranes of diabetic rats. *Am J Clin Nutr*. 1993;58(2):209-14.

Gupta RA, Dixit VP. Dose dependent alteration in lipid and carbohydrate metabolites in streptozotocin induced diabetic rats. *Endokrinologie*. 1982;80(3):332-40.

Gursu MF, Baydas G, Cikim G, Canatan H. Insulin increases homocysteine levels in a dose-dependent manner in diabetic rats. *Arch Med Res*. 2002;33(3):305-7.

Guyton AC, Hall JE. Hemostasia e coagulação sangüínea. In: Guyton AC, Hall JE (eds). *Tratado de Fisiologia Médica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.394-404.

Hemmings SJ, Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(8):905-19.

Hofmann MA, Kohl B, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkels M, et al. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care*. 1997;20(12):1880-6.

House JD, Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Regulation of homocysteine metabolism. *Adv Enzyme Regul.* 1999;39:69-91.

Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res.* 1987;28(6):613-28.

Jacobs RL, House JD, Brosnan ME, Brosnan JT. Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes.* 1998;47(12):1967-70.

Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974;71(5):1906-9.

Janson PA, Jubelirer SJ, Weinstein MJ, Deykin D. Treatment of the bleeding tendency in uremia with cryoprecipitate. *N Engl J Med.* 1980;303(23):1318-22.

Jensen T. Increased plasma concentration of von Willebrand factor in insulin dependent diabetics with incipient nephropathy. *BMJ.* 1989;298(6665):27-8.

Jiao S, Matsuzawa Y, Matsubara K, Kihara S, Nakamura T, Tokunaga K, et al. Increased activity of intestinal Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in rats with streptozotocin-induced diabetes and restoration by insulin supplementation. *Diabetes.* 1988;37(3):342-6.

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol.* 1967;126(1):201-5.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest.* 1969;48(11):2129-39.

Kahaleh MB, Osborn I, Le Roy EC. Increased factor VIII/von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor activity in scleroderma and in Raynaud's phenomenon. *Ann Intern Med.* 1981;94:482-4.

Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr.* 1992;12:279-98.

Kannel WB, McGee DL. Diabetes and glucose intolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. *Diabetes Care.* 1979;2(2):120-6.

Katsumata K, Katsumata K Jr, Katsumata Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm Metab Res.* 1992;24(11):508-10.

Kuller LH. Epidemiology of cardiovascular diseases: current perspectives. *Am J Epidemiol.* 1976;104(4):425-96.

Lambert J, Aarsen M, Donker AJM, Stehouver CDA. Endothelium-dependent and –independent vasodilatation of large arteries in microalbuminuric insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(5):705-11.

Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini SA, Padovani CR. Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cir Bras.* 2003;18:132-42.

Lip GYH, Blann A. Von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res.* 1997;34(2):255-65.

Loesberg C, Gonsalves MD, Zandbergen J, Willems C, van Aken WG, Stel HV, et al. The effect of calcium on the secretion of factor VIII-related antigen by cultured human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1983;763(2):160-8.

Lufkin EG, Fass DN, O'Fallon WM, Bowie EJW. Increased von Willebrand factor in diabetes mellitus. *Metabolism.* 1979;28(1):63-6.

Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, et al. Reduction of plasma homocyst(e)yne levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1998;338(15):1009-15.

Mannucci PM. Von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(9):1359-62.

Marasini B, Cugno M, Bassani C, Stanzani C, Bottasso B, Agostoni A. Tissue-type plasminogen activator and von Willebrand factor plasma levels as markers of endothelial involvement in patients with Raynaud's phenomenon. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1992;11(4):375-82.

McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med.* 1996;2(4):386-9.

McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969;56(1):111-28.

Mosher DF. Disorders of blood coagulation. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet, JC. *Cecil textbook of medicine.* 19<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Saunders Company; 1996. p.999 -1017.

Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism*. 1996;45(1):133-5.

Nair KS, Pabico RC, Truglia JA, McKenna BA, Statt M, Lockwood DH. Mechanism of glomerular hyperfiltration after a protein meal in humans. Role of hormones and amino acids. *Diabetes Care*. 1994;17(7):711-5.

Nakayama H, Nakagawa S. Influence of streptozotocin diabetes on intestinal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in the rat. *Diabetes*. 1977;26(5):439-44.

Neves LB. Contribuição ao estudo da esteatose hepática: avaliação clínica, laboratorial, histológica e ultrasonográfica em não alcoólicos e alcoólicos. [Tese de Mestrado]. São Paulo: IBEPEGE; 1994.

Neves LB. Estudo da laminina sérica e de sua deposição no fígado de ratos com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono. [Tese de Doutorado]. São Paulo: UNIFESP-EPM; 2000.

Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína: artigo de revisão. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(5):311-21.

Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1988;5(2):113-24.

Ohno T, Horio F, Tanaka S, Terada M, Namikawa T, Kitoh J. Fatty liver and hyperlipidemia in IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) of streptozotocin-treated shrews. *Life Sci*. 2000;66(2):125-31.

Oliveira SF. Importância do diabetes mellitus na aterosclerose coronária. In: Chagas ACP; SBCM. *Doença Coronária*. São Paulo: Atheneu; 2005. p.197-218.

Ortola FV, Ballermann BJ, Anderson S, Mendez RE, Brenner BM. Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. Potential mediator of hyperfiltration. *J Clin Invest*. 1987;80(3):670-4.

Pedersen MM, Christiansen JS, Pedersen EB, Mogensen CE. Determinants of intra-individual variation in kidney function in normoalbuminuric insulin-dependent diabetic patients: importance of atrial natriuretic peptide and glycaemic control. *Clin Sci*. 1992;83(4):445-51.

Pedrinelli R, Giampietro O, Carmassi F, Melillo E, Dell'Omo G, Catapano G, et al. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Lancet*. 1994;344(8914):14-8.

Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assai for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem*. 1999;45(2):290-2.

Portha B, Blondel O, Serradas P, McEvoy R, Giroix MH, Kergoat M, Bailbe D. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabete Metab*. 1989;15(2):61-75.

Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes*. 1974;23(11):889-95.

Powers AC. Diabetes melito. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds). *Harrison medicina interna*. 15ª ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana do Brasil Ltda; 2002. p.2240-71.

Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*. 1963;29:91-8.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*, 5.ed. Rio Janeiro: Elsevier; 2004. 920p.

Regan TJ. Congestive heart failure in the diabetic. *Annu Rev Med*. 1983;34:161-8.

Reinders JH, De Groot PG, Gonsalves MD, Zandbergen J, Loesberg C, Van Mourik JA. Isolation of a storage and secretory organelle containing von Willebrand protein from cultured human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1984; 804(3):361-9.

Ribau JCO, Hatton MWC, Richardson M. Changes in the aortic endothelium and plasma von Willebrand factor levels during the onset and progression of insulin-dependent diabetes in BB rats. *Atherosclerosis*. 1998;139(2):291-9.

Ribeiro MRF, Mory DB, Vendramini MF, Giuffrida F, Dib AS, Moises RS, et al. Diabetes melito. In: Lopes, AC. *Tratado de clínica médica*. São Paulo: Roca, 2006. p.3570-97.

Roarke MC, Wagner DD, Marder VJ, Sporn LA. Temperature-sensitive steps in the secretory pathway for von Willebrand factor in endothelial cells. *Eur J Cell Biol*. 1989; 48(2):337-43.

- Robillon JF, Canivet B, Candito M, Sadoul JL, Jullien D, Morand P, et al. Type 1 diabetes mellitus and homocyst(e)ine. *Diab Metab.* 1994;20(5):494-6.
- Ruggeri ZM. Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):576-84.
- Schein PS, Cooney DA, McMenamin MG, Anderson T. Streptozotocin diabetes-further studies on the mechanisms of nicotinamide adenine dinucleotide concentration in mouse pancreatic islets and liver. *Biochem Pharmacol.* 1973;22(20):2625-31.
- Schnatz JD, Formaniak JM, Chlouverakis C. The origin of hypertriglyceridemia in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia.* 1972;8(2):125-30.
- Smith SL, Novotny M. Studies of hyperlipidemia in drug-induced diabetic rats by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1980;221(1):19-26.
- Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA.* 1992;Aug,268(7):877-81.
- Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Characterization of homocysteine metabolism in the rat liver. *Biochem J.* 2000;350:685-92.
- Stehouwer CDA, Fischer HRA, van Kuijk AWR, Polak BCP, Donker AJM. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes.* 1995;44(5):561-4.
- Stehouwer CDA, Stroes ESG, Hackeng WHL, Mulder PGH, Den Ottolander GJH. Von Willebrand factor and development of diabetic nephropathy in IDDM. *Diabetes.* 1991;40(8):971-6.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989;320(14):915-24.
- Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr.* 1986;6:179-209.
- Stringer MD, Gorog PG, Freeman A, Kakkar VV. Lipid peroxides and atherosclerosis. *BMJ.* 1989;298(6669):281-4.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.

Tavares JR, D'Almeida V, Diniz DC, Terzi CA, Cruz EM, Stefanini E, et al. Analysis of plasma homocysteine levels in patients with unstable angina. *Arq Bras Cardiol.* 2002;79(2):167-72.

Tesfamariam B, Jakubowski JA, Cohen RA. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived  $\text{PGH}_2\text{-TxA}_2$ . *Am J Physiol.* 1989;257(5):H1327-33.

Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev.* 1992;44(1):103-50.

Trachtman H, Futterweit S, Maesaka J, Ma C, Valderrama E, Fuchs A, et al. Taurine ameliorates chronic streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Am Physiol Soc.* 1995;268(38):F429-38.

Tsai MY, Hanson NQ, Schwichtenberg K, Garg U. Amplification refractory mutation system to identify mutations in cystathionine beta-synthase deficiency. *Clin Chem.* 1995;41(12):1775-7.

Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med.* 1989;114(5):473-501.

van Mourik JA, Boertjes R, Huisveld IA, Fijnvandraat K, Pajkrt D, van Genderen PJJ, et al. Von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: a tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood.* 1999;94(1):179-85.

Van Tol A. Hypertriglyceridemia in the diabetic rat: defective removal of serum very low density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 1977;26(1):117-28.

Veldman BAJ, Vervoort G, Blom H, Smits P. Reduced plasma total homocysteine concentrations in type 1 diabetes mellitus is determined by increased renal clearance. *Diabetic medicine.* 2004;22:301-5.

Vischer UM, Ingerslev J, Wollheim CB, Mestries J-C, Tsakiris DA, Haefeli WE, et al. Acute von Willebrand factor secretion from the endothelium in vivo: assessment through plasma propeptide (vWf Ag II) levels. *Thromb Haemost.* 1997;77(2):387-93.

Vischer UM, Emeis JJ, Bilo HJ, Stehouwer CDA, Thomsen C, Rasmussen O, et al. Von Willebrand factor (vWf) as a plasma marker of endothelial activation in diabetes: improved reliability with parallel determination of the vWf propeptide (vWf Ag II). *Thromb Haemost.* 1998;80(6):1002-7.



Vukovich TC, Scherthaner G, Knobi PN, Hay U. The effect of near-normoglycemic control on plasma factor VIII/von Willebrand factor and fibrin degradation products in insulin-dependent diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;69(1):84-9.

Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med.* 1998;158(8):862-7.

Wasan KM, Ng SP, Wong W, Rodrigues BB. Streptozotocin- and alloxan-induced diabetes modifies total plasma and lipoprotein lipid concentration and composition without altering cholesteryl ester transfer activity. *Pharmacol Toxicol.* 1998;83(4):169-75.

Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung Circ.* 2003;12(1):44-50.

Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes.* 2001;50(Suppl.1):S154-9.

Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998;338(15):1042-50.

Winocour PD, Lopes-Virella MF, Laimins M, Colwell JA. Effect of insulin treatment in streptozotocin-induced diabetic rats on in vitro platelet function and plasma von Willebrand activity and factor VIII-related antigen. *J Lab Clin Med.* 1985;106(3):319-25.

Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of autooxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J.* 1987;245 (1):243-50.

Wollesen F, Brattstrom L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berne C. Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1999;55(3):1028-35.

Wongsurawat N, Armbrecht HJ. Calcitonin stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D production in diabetic rat kidney. *Metabolism.* 1991;40(1):22-5.

Yaqoob M, Patrick AW, McClelland P, Stevenson A, Mason H, White MC, et al. Relationship between markers of endothelial dysfunction, oxidant injury and tubular damage in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci.* 1993; 85(5):557-62.

Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J Clin Invest.* 1971;50(1):244-54.

**Abstract**

---

**Abstract**

## Abstract

---

**Purpose:** To determine plasma levels of homocysteine, von Willebrand factor, triglycerides and total cholesterol and fractions, in rats with diabetes induced by streptozotocin and evaluate possible correlations among these parameters.

**Methods:** Adult male norvegicus albino rats (n=35), weigh (180-200g) were randomized into three groups: treated group (n=15), with diabetes induced by streptozotocin; sham group (n=10), treated with saline solution and normal control group (n=10), no treated. Initial fasting glucose was determined before diabetes induction. Diabetes was induced by a single bolus intraperitoneal injection of streptozotocin, 60mg/kg/dose, diluted in citrate buffer (0.1M, pH4.5). Diabetes was confirmed by blood glucose levels  $\geq 250$ mg/dL. Eight weeks after diabetes induction, animals were weighted and blood samples were collected from abdominal aorta for plasma levels of total homocystein, von Willebrand factor, final fasting glucose, total cholesterol and fractions (HDL-, LDL- and VLDL-cholesterol), triglycerides and creatinin. The results were expressed as the mean $\pm$ SD. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test or Brown Forsythe test followed by Dunnett test. Pearson test was used to correlate the parameters. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . **Results:** Disease model reproducibility was observed in 100% of tested animals. Mean plasma levels of initial fasting glucose according to animal group were: 85.1 $\pm$ 5.2mg/dL for treated group, 88.9 $\pm$ 8.2mg/dL for sham and 88.7 $\pm$ 5.9mg/dL for control group. Statistical analysis (ANOVA) showed no significant difference among the three groups ( $p = 0.24$ ). Mean plasma levels of final fasting glucose, according to animal group were: 353.5 $\pm$ 98.2mg/dL for treated group, 80.9 $\pm$ 5.0mg/dL for sham and 85.0 $\pm$ 7.1mg/dL for normal control. Statistical analysis showed that the difference between the treated group and the two other groups was statistically significant ( $p < 0.01$ ). Mean plasma concentration of homocystein according to animal groups was: 6.1 $\pm$ 1.3 $\mu$ mol/L for treated group, 8.6 $\pm$ 2.2 $\mu$ mol/L for sham and 7.9 $\pm$ 2.3 $\mu$ mol/L for control group. Statistical analysis showed a significant difference in the three groups ( $p < 0.01$ ). Mean values for von Willebrand factor were: 0.18 $\pm$ 0.4U/L for treated group, 0.16 $\pm$ 0.2U/L for sham group and 0.15 $\pm$ 0.3U/L for control group.

## **Abstract**

---

Significant statistical difference was found among the three groups ( $p < 0.05$ ). Mean plasma levels of total cholesterol according to animal groups were:  $87.5 \pm 5.9$  mg/dL for treated group,  $107.0 \pm 38.6$  mg/dL for sham and  $123.9 \pm 40.8$  mg/dL for control group. Significant statistical difference was found among the three groups ( $p < 0.05$ ). There was no statistical significant difference in the mean values of cholesterol fraction (LDL, HDL, VLDL), triglycerides and creatinin among the three groups. A negative correlation between final plasma glucose and weight gain, homocystein and total cholesterol, homocystein and VLDL-cholesterol and homocystein and triglycerides was found in the treated (diabetes) group.

**Conclusions:** In this study, results from streptozotocin-induced diabetes rats showed: 1. Lower levels of homocystein; 2. Higher levels of von Willebrand factor; 3. Negative correlation between homocystein and total cholesterol; 4. No correlations between final fasting glucose and homocystein, final fasting glucose and von Willebrand factor and homocystein and von Willebrand factor; 5. Negative correlation between weight gain and final fasting glucose.

**Key words:** homocysteine; von Willebrand factor; lipids; experimental, diabetes mellitus; streptozotocin.

## **Abstract**

---

**Bibliografia Consultada**

---

**Bibliografia Consultada**

---

**Tese doutorado - 2006**

## **Bibliografia Consultada**

---

Dicionário Aurélio eletrônico 2000 [CD-ROM]. São Paulo: Nova Fronteira; 2000. Sumário.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª ed. rev. e ampl. São Paulo: BC Gráfica e Editora, 2005. 122p.

Siegel S. Estatística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. 2ª ed. México, Editorial Trillas, 1975. 346p.

SPSS 13.0 for Windows – Programa de estatística.

Uniform requeriments for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication. International Committee of Medical Journal Editors.





## Anexos

---

### Anexo A - Pesos (g) em três grupos de animais

Grupo Controle		Grupo "Sham"		Grupo Diabetes	
Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
210	465	185	401	195	363
195	450	200	428	186	264
190	400	194	414	190	439
195	373	185	413	185	225
195	388	200	409	185	264
180	414	199	403	203	184
177	340	178	387	232	180
211	392	190	420	227	184
210	410	195	362	233	250
176	327	190	361	231	195
				216	295
				186	343
				200	260
				165	346
				175	218

---

## Anexos

### Anexo B – Valores individuais das variáveis estudadas dos ratos nos grupos (continua...)

Ratos	Grupo	Glic Inicial	He	fvW	CT	HDL-CT	LDL-CT	VLDL-CT	TG	Cr	Glic Final	Peso Inicial	Peso Final	Ganho Peso
01	C	93	7,21	0,16	130	38	79	21	106	1,2	86	210	465	121
02	C	91	11,98	0,14	153	28	96	29	146	01	76	195	450	131
03	C	99	9,32	0,13	182	54	100	28	138	01	81	190	400	111
04	C	89	5,96	0,13	188	44	111	33	164	01	91	195	373	91
05	C	83	6,72	0,13	142	64	42	36	180	01	87	195	388	99
21	C	81	10,70	0,19	91	28	52	11	53	1,5	90	180	414	130
22	C	91	8,02	0,19	83	33	39	11	56	1,5	80	177	340	92
23	C	80	7,62	0,17	98	21	66	11	55	1,5	99	211	392	86
24	C	91	7,80	0,17	89	22	55	12	61	01	83	210	410	95
25	C	89	4,17	0,11	83	48	25	10	52	01	77	176	327	86
11	DM	91	6,48	0,14	89	49	28	12	61	01	286	195	363	86
12	DM	83	5,95	0,20	89	28	49	12	61	01	349	186	264	42
13	DM	89	5,02	0,14	98	29	53	16	80	01	280	190	439	131
14	DM	98	5,81	0,21	99	21	68	10	51	01	420	185	225	22
15	DM	81	6,26	0,16	84	29	39	16	81	01	306	185	264	43
16	DM	81	3,17	0,17	91	29	44	18	88	01	387	203	184	-09
17	DM	80	6,96	0,25	82	29	43	10	49	01	554	232	180	-22
18	DM	80	7,84	0,15	81	21	50	10	49	1,5	363	227	184	-19
19	DM	81	6,57	0,15	83	29	44	10	51	01	561	233	250	07
20	DM	87	6,23	0,20	91	29	52	10	52	01	371	231	195	-16
31	DM	83	7,22	0,26	81	21	50	10	49	1,5	245	216	295	37
32	DM	87	8,08	0,19	81	28	43	10	51	01	258	186	343	84

## Anexos

---

### Anexo B – Valores individuais das variáveis estudadas dos ratos nos grupos (...continuação)

Ratos	Grupo	Glic Inicial	He	fvW	CT	HDL-CT	LDL-CT	VLDL-CT	TG	Cr	Glic Final	Peso Inicial	Peso Final	Ganho Peso
33	DM	80	3,97	0,20	89	44	35	10	51	01	366	200	260	30
34	DM	87	6,62	0,17	90	31	49	10	49	01	255	165	346	110
35	DM	88	5,14	0,18	84	33	40	11	56	01	301	175	218	25
06	S	91	10,71	0,13	188	47	115	26	129	01	91	185	401	117
07	S	101	7,16	0,13	150	35	89	26	129	01	79	200	428	114
08	S	99	6,79	0,14	143	44	61	38	188	01	76	194	414	113
09	S	81	6,63	0,15	83	55	17	11	55	01	78	185	413	123
10	S	86	8,74	0,18	81	31	39	11	53	01	81	200	409	105
26	S	98	13,05	0,17	91	38	42	11	53	02	88	199	403	103
27	S	80	10,53	0,17	86	44	24	18	88	01	82	178	387	117
28	S	90	7,07	0,19	84	28	46	10	51	02	79	190	420	121
29	S	83	8,53	0,19	81	22	49	10	52	01	75	195	362	86
30	S	80	6,41	0,15	83	24	48	11	53	01	80	190	361	90

Glic - glicemia; He - homocisteína; fvW- fator von Willebrand; CT - colesterol total; HDL-CT - high density lipoprotein-colesterol; LDL-CT - low density lipoprotein-colesterol; VLDL-CT - very low density lipoprotein-colesterol; TG - triglicérides; Cr - creatinina