

A ESTREPTOZOOTOCINA COMO AGENTE DIABETOGENICO

Maria Montserrat Diaz Pedrosa Furlan*

FURLAN, Maria Montserrat Diaz Pedrosa. A Estreptozotocina como Agente Diabetogênico. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 5 (2): 197-201., 2001.

RESUMO: Os quadros experimentais de *diabetes mellitus* permitem observar as diversas variáveis envolvidas na fisiopatologia desta doença sob condições controladas. Entretanto, conhecer as características do agente químico usado na indução do *diabetes* é importante para uma análise coerente dos resultados obtidos. Esta revisão apresenta aspectos relacionados à estreptozotocina, um agente diabetogênico amplamente utilizado em pesquisas sobre o *diabetes* e seus efeitos nos diversos sistemas orgânicos.

PALAVRAS-CHAVE: estreptozotocina; diabetes mellitus; mecanismo de ação.

STREPTOZOTOCIN AS A DIABETOGENIC AGENT

FURLAN, Maria Montserrat Diaz Pedrosa. Streptozotocin as a Diabetogenic Agent. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 5 (2): 197-201., 2001.

ABSTRACT: The experimental protocols of *diabetes mellitus* allow the investigator to observe the many variables involved in the pathophysiology of this illness under controlled conditions. Nevertheless, the knowledge of the features of the chemical agent used in the *diabetes* induction is important for a coherent interpretation of the results obtained. This review presents some aspects related to streptozotocin, a diabetogenic agent widely used in the research of *diabetes* and its effects on the organic systems.

KEY WORDS: diabetes mellitus; mecanismo de ação; streptozotocin.

Introdução

O conhecimento sistematizado das alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas induzidas pelo *diabetes mellitus* nos diversos tecidos e órgãos do ser humano depende do uso de agentes químicos capazes de causar um quadro diabético de diferentes graus de severidade em animais de laboratório, especialmente roedores. Entre essas substâncias diabetogênicas, as duas mais conhecidas e empregadas são a aloxana (ALX) e a estreptozotocina (STZ).

Atualmente, o uso da STZ como indutora do diabetes é muito amplo, devido principalmente à constância fisiopatológica do quadro diabético produzido dentro de uma determinada espécie. Este trabalho agrupou algumas informações referentes à STZ como agente diabetogênico para servirem de orientação básica àqueles que fazem uso deste composto.

Desenvolvimento

A STZ é um agente anti-bacteriano de largo espectro que foi isolado de *Streptomyces achromogenes* em 1959 (HERR *et al.*, 1960). O gênero *Streptomyces* é a fonte de mais da metade dos antibióticos de valor clínico, incluindo os aminoglicosídeos, as tetraciclina e os macrolídeos (DORLAND, 1994). A STZ consiste de 1-metil-1-nitrosouréia ligada ao carbono 2 da D-glicose, sendo então um derivado N-nitroso da glicosamina. Além de apresentar atividade antimicrobiana, também apresenta atividade antitumoral em sistemas *in vitro* e *in vivo* (HERR *et al.*, 1967), e diabetogênica (RAKIETEN *et al.*, 1963). Os estudos mostraram que, apesar da sua simplicidade estrutural, a atividade anti-tumoral e a diabetogênica da STZ devem-se a sítios ativos diferentes da molécula. Há uma necessidade aparente do núcleo de glicose na molécula de STZ

* Professora Assistente do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá

Endereço: Av. Colombo, 5690 - bloco H79, sala 113 - Jd. Universitário - CEP 87020-900 - Maringá, Pr. - E-mail: mmdpurlan@uem.br

para a atividade diabetogênica, possivelmente por exercer uma função carreadora, promovendo o contato com membrana da célula β , produtora de insulina, ou o transporte através dessa membrana (RERUP, 1970), o que não é necessário para a atividade anti-tumoral. A esse respeito, o transportador de glicose das células β , GLUT2, parece ser uma molécula-alvo essencial da toxicidade da STZ sobre essas células, um evento que precede as reações imunes contra as células β (WANG & GLEICHMANN, 1998).

A aplicação da STZ em meio ácido e baixa temperatura é justificada pelo fato desta ser um composto instável em temperaturas ambientais e em pH neutro. Sua baixa estabilidade nos líquidos corporais é atestada por sua curta meia-vida, estimada em apenas 5 min em camundongos (RERUP, 1970). Por esta razão, a injeção intravenosa rápida parece ser a rota mais adequada para a sua administração, embora a via intraperitoneal também seja utilizada.

As doses diabetogênicas de STZ variam entre as espécies; uma mesma dose pode ser tóxica e causar um índice de mortalidade alto em uma espécie, e ser pouco diabetogênica em outra. De modo geral, a sensibilidade de cães é máxima (50% de mortalidade com dose de 50 mg/kg de peso corporal), enquanto é mínima em camundongos (dose diabetogênica efetiva de 200 mg/kg de peso corporal). Além disso, a STZ é diabetogênica em cobaias, as quais são extremamente resistentes à ação diabetogênica da ALX (JUNOD et al., 1969). As células b humanas são resistentes a doses de diabetógenos, incluindo a STZ (1-3 mM) e a ALX, que diminuem a sobrevivência e a função das células b de ratos e camundongos (EIZIRIK et al., 1994).

Em ratos, a especificidade da STZ sobre as células b parece ser acentuada e sugeriu-se que é maior que para a ALX, para a qual lesões renais e, em menor extensão, hepáticas, foram relatadas (Brunschwig & Allen e Lazarow & Palay, *apud* RERUP, 1970). Observou-se nas ilhotas pancreáticas ocasional picnose nuclear sem desgranulação celular após uma hora e necrose extensa com desgranulação das células β sete horas após a injeção de STZ em ratos em jejum, enquanto que as células endócrinas e o tecido acinar circundantes mantiveram uma aparência

normal. As melhores evidências de necrose foram obtidas 24 horas após a administração da droga. As anomalias observadas no fígado e nos rins foram aquelas esperadas na presença de hiperglicemia, mas sem evidências de lesão tóxica direta da STZ (JUNOD et al., 1967).

Posteriormente, o uso de metil-[14 C]-STZ permitiu evidenciar o acúmulo da STZ nas porções centrais das ilhotas pancreáticas, correspondendo à posição ocupada pelas células β . Outros tecidos, como fígado, mucosa gastrointestinal, medula óssea, glândulas salivares e rim, apresentaram níveis menores de radioatividade (TJÄLVE et al., 1976).

Mais recentemente, um estudo mostrou que a morte das células β segue padrões diferentes em função da dose da droga (SAINI et al., 1996). Taxas maiores de apoptose foram observadas quando as células foram expostas a doses mais baixas de STZ; doses maiores de STZ aumentaram a proporção de células perdidas por necrose.

Muitas investigações foram feitas, *in vivo* e *in vitro*, para tentar esclarecer o mecanismo de ação da toxicidade da STZ sobre as células β . A lesão das células β *in vitro* resulta na descarga transitória de glutamato descarboxilase, uma enzima da via de síntese de ácido gama-aminobutírico (GABA) no meio extracelular, e foi proposto que esta enzima serviria como marcador para os processos tóxicos e como um auto-antígeno potencial para a reatividade imune (SMISMANS et al., 1996). Em camundongos, o tratamento com STZ provoca um estágio inicial de pré-infiltração em que fagócitos mononucleares são consideravelmente mais numerosos nos vasos capilares das ilhotas pancreáticas; durante o estágio seguinte os fagócitos são observados migrando pelas paredes capilares e venulares, e mais tarde adquirem propriedades típicas de seu estado ativado (PAPACCIO & ESPOSITO, 1992).

A geração de radicais livres, as quebras do DNA, a ativação da enzima poli (ADP-ribose) polimerase, e a depleção do NAD das células b parecem ser fatores comuns na morte das ilhotas pancreáticas (GALE, 1996; TAKASU et al., 1991). Alterações do metabolismo do ácido araquidônico e da produção de endotelinas e aumento do óxido nítrico (NO) associados à lesão pancreática devida à STZ também foram

observados (GONZALEZ *et al.*, 1999).

In vitro, a STZ produz nitrito em relação direta com o pH da solução, havendo maior produção de nitrito em pH próximo de 4. O nitrito é resultante da oxidação do NO, identificado como o mais potente composto tóxico para as ilhotas pancreáticas produzido por macrófagos inflamatórios (TANAKA *et al.*, 1995). A superprodução de NO por células imuno-competentes ativadas com desenvolvimento subsequente de estresse oxidativo local parece ser uma parte importante da lesão à célula β durante o diabetes induzido por STZ (HALUZIK & NEDVIDKOVA, 2000). O DNA das ilhotas é alvo primário da ação do NO no processo inflamatório e poderia representar o 'componente ativo' da ação diabetogênica da STZ.

O possível papel do NO como mediador da ação diabetogênica da STZ é reforçado pelo fato de que a injeção de L-NMMA (L-NG-monometil-arginina, um inibidor da síntese de NO) em animais tratados com STZ, reduz a infiltração celular das ilhotas e reduz significativamente sua destruição (LUKIC *et al.*, 1991). Por outro lado, alguns autores afirmam, com base em seus experimentos, que *in vivo* a STZ não é capaz de gerar NO, e que lesa as células β por ativação de mecanismos imunes - quando aplicada em múltiplas doses baixas - ou por alquilação do DNA - quando aplicada em uma única dose alta (PAPACCIO *et al.*, 2000).

A deposição de zinco nas células β após o tratamento com STZ foi aventada como possível mecanismo envolvido na degeneração dessas células, e implicada no aparecimento de diabetes em pessoas de idade avançada (KIM *et al.*, 2000).

Apesar do grande número de alterações que aparecem após o tratamento com STZ em sistemas *in vivo* e *in vitro*, muitas delas são certamente decorrentes da lesão tóxica da STZ sobre as células β mas não estão primariamente envolvidas no mecanismo da sua toxicidade. Da mesma forma, é possível que a lesão da célula β envolva conjuntos de fatores cuja importância individual pode depender da dose da droga, das condições de exposição à STZ e também da suscetibilidade do organismo, determinada por variáveis como espécie e idade.

Recuperações espontâneas do quadro diabético foram raramente observadas em ratos,

com doses de 35 mg/kg de peso corporal (JUNOD *et al.*, 1969). Entretanto, relatou-se reversão do quadro diabético em ratos com doses de STZ entre 30 e 40 mg/kg de peso, com retorno à condição de normoglicemia em 10 dias e da secreção de insulina em resposta à glicose em três meses (AR'RAJAB & AHREN, 1993).

A injeção de STZ produz flutuações trifásicas do nível de glicose sanguínea semelhantes àquelas observadas com a ALX. Em ratos, a hiperglicemia inicial atinge no máximo cerca de duas horas após a injeção da droga, e é seguida por hipoglicemia acentuada com níveis glicêmicos mínimos cerca de 10 horas após a injeção. A terceira fase é representada pela hiperglicemia permanente (JUNOD *et al.*, 1969).

Algumas explicações foram propostas para justificar o padrão glicêmico trifásico. Inicialmente, a depleção de glicogênio hepático é relativamente concomitante com o aumento da glicose sanguínea.

Experimentos inconclusivos (Goldner & Gomori *apud* RERUP, 1970) mostraram um possível envolvimento da medula adrenal na resposta hiperglicêmica inicial. No período de hipoglicemia acentuada, os níveis de insulina plasmática são altos. Observou-se que, durante este período, o conteúdo pancreático de insulina e os grânulos das células β parecem normais e foi proposto que a insulina solúvel, agranular, seja liberada na primeira fase (JUNOD *et al.*, 1969). Quando o estado diabético se instala, a insulina plasmática retorna à faixa basal, embora o nível de insulina pancreática caia a 2-5% do normal em ratos.

Os efeitos do diabetes por STZ incluem um aumento progressivo da glicosúria e do volume urinário na primeira semana após a indução. O peso corporal dos animais tende a diminuir ou se estabiliza, enquanto animais controle de mesma idade e peso inicial apresentam aumento ponderal progressivo. A lipemia está presente no diabetes por STZ, mas a cetonúria é rara, sendo observada em ratos apenas com doses de 100 mg/kg de peso corporal (JUNOD *et al.*, 1969). Acredita-se que a taxa de mobilização de gordura é tal que pode ser manipulada sem a produção de cetose pronunciada, uma conseqüência previsível da deficiência incompleta de insulina. Por essa razão,

o diabetes por STZ no rato foi descrito como uma forma específica de hiperglicemia sem cetose ou elevação no conteúdo plasmático de ácidos graxos livres (RERUP, 1970).

Embora a maioria dos estudos de diabetes induzido por STZ utilize como parâmetro de severidade do diabetes a glicemia de jejum, os dados da literatura sobre as relações dose-resposta da STZ indicam que esse não é o melhor índice. Em primeiro lugar, o valor da glicemia de jejum para qualquer dose de STZ após sete dias é menor que o valor alcançado após 24 horas ou 28 dias em ratos. É provável que os valores mais altos após 24 horas resultem de fatores associados com a fase hiperglicêmica aguda, enquanto a hiperglicemia crônica deve se correlacionar com o decréscimo adicional do conteúdo pancreático de insulina. Além disso, a resposta da glicose plasmática parece estar menos diretamente relacionada à ação da STZ do que o efeito β -citotóxico (JUNOD *et al.*, 1969).

Por outro lado, segundo JUNOD *et al.* (1969), existe uma relação clara entre o conteúdo plasmático de insulina ou o conteúdo de insulina pancreática e a dose de STZ. Portanto, o melhor índice da atividade diabetogênica da STZ é o conteúdo pancreático da insulina avaliado por radioimunoensaio. O melhor período para esta avaliação, segundo esses mesmos autores, é 24 horas após a administração intravenosa da droga. Apesar disso, a glicemia de jejum ainda é um método mais prático e menos dispendioso de se avaliar o quadro diabético em animais injetados com STZ. Porém, é conveniente enfatizar que a glicemia de jejum não deve ser usada como indicador inquestionável do grau de severidade do quadro diabético.

Considerações Finais

As características da STZ permitem afirmar que esse composto químico é mais indicado do que a ALX nos estudos que requerem um quadro diabético experimental consistente e reproduzível. Além disso, relatou-se que a) a atividade diabetogênica da STZ não parece depender de jejum prévio à indução; b) a faixa de atividade diabetogênica de moderada a severa é mais ampla e consistente do que para a ALX; e c) uma dose sub-diabetogênica de STZ (25 mg/kg de peso corporal para ratos) é capaz de potencializar

uma segunda dose sub-diabetogênica, possivelmente por alteração do metabolismo da célula β , um efeito contrário aquele observado com a ALX, onde doses sub-diabetogênicas sucessivas levam a uma resposta diminuída das células secretoras de insulina (JUNOD *et al.*, 1969).

Referências

- AR'RAJAB, A.; AHREN, B. Long-term diabetogenic effect of streptozotocin in rats. *Pancreas*, 8(1): 50-7, 1993.
- DORLAND, W.A. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. 1940p.
- EIZIRIK, D. L. *et al.* Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(20): 9253-6, 1994.
- GALE, E. A. Molecular mechanisms of beta-cell destruction in IDDM: the role of nicotinamide. *Horm. Res.*, 45 Suppl 1: 39-43, 1996.
- GONZALEZ, E. *et al.* Evolution of streptozotocin-pancreatic damage in the rat: modulatory effect of endothelins on the nitridergic and prostanoid pathway. *Nitric Oxide*, 3(6): 459-66, 1999.
- HALUZIK, M.; NEDVIDKOVA, J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications. *Physiol. Res.*, 49 Suppl 1: S37-42, 2000.
- HERR, R. R. *et al.* Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot. Annu.*, 236, 1960.
- HERR R. R.; JAHNKE, H. K.; ARGOUDELIS, A. D. The structure of streptozotocin. *J. Am. Chem. Soc.*, 89(18): 4808-4809, 1967.
- JUNOD, A. *et al.* Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126: 201-205, 1967.
- JUNOD, A. *et al.* Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.*, 48: 2129-2139, 1969.
- KIM, B. J. *et al.* Zinc as a paracrine effector in pancreatic islet cell death. *Diabetes*, 49(3): 367-72, 2000.
- LASAROW, A.; PALAY, S. I. The production and course of alloxan diabetes in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 31: 1004-, 1946.
- LUKIC, M. L. *et al.* Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozotocin in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178(3): 913-20, 1991.
- PAPACCIO, G.; ESPOSITO, V. Ultrastructural observations on cytotoxic effector cells infiltrating pancreatic islets of low-dose streptozotocin treated mice. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, 420(1): 5-10, 1992.
- PAPACCIO, G. *et al.* Multiple low-dose and single high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric oxide. *J. Cell. Biochem.*, 77(1): 82-91, 2000.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep.*, 29:91-98, 1963.

RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.*, 22(4): 485-518, 1970.

SAINI, K. S. *et al.* Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 39(6): 1229-36, 1996.

SMISMANS, A.; LING, Z.; PIPELEERS, D. Damaged rat beta cells discharge glutamate decarboxylase in the extracellular medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 228(2): 293-297, 1996.

TAKASU, N. *et al.* Streptozotocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. *Diabetes*, 40: 1141-1145, 1991.

TANAKA, Y. *et al.* Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. *Pharmacology*, 50: 69-73, 1995.

TJÄLVE, H.; WILANDER, E.; JOHANSSON, E. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J. Endocr.*, 69: 455-456, 1976.

WANG, Z., GLEICHMANN, H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*, 47(1): 50-6, 1998.

Recebido em: 10/12/00

Aceito em: 20/06/01