



**CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM AQUICULTURA**

**Dérick dos Santos Noronha**

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE *DIABETES MELLITUS*  
TIPO 1 E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

**Uruguaiana, 2016**

**DÉRICK DOS SANTOS NORONHA**

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE *DIABETES MELLITUS*  
TIPO 1 E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do grau de Tecnólogo em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Folmer

Co-orientador: Andréia Fernandes Salgueiro

**URUGUAIANA, 2016**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

N852p Noronha, Dérick dos Santos  
PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES  
MELLITUS TIPO 1 E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM JUNDIÁ (Rhamdia quelen) / Dérick dos Santos  
Noronha.  
32 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade  
Federal do Pampa, AQUICULTURA, 2016.  
"Orientação: Vanderlei Folmer".

1. Diabetes mellitus. 2. modelo alternativo. 3. estresse  
oxidativo. 4. Rhamdia quelen. I. Título.

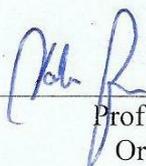
DÉRICK DOS SANTOS NORONHA

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE *DIABETES MELLITUS*  
TIPO 1 E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

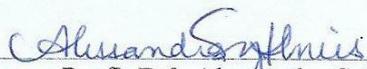
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura  
da Universidade Federal do Pampa como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Tecnólogo em Aquicultura.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: dia, mês e ano.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Vanderlei Folmer  
Orientador (Unipampa)



Prof.ª Dr.ª Alessandra S. K. Tamajusuku Neis  
(Unipampa)



Dr.ª Alexandra Pretto  
(Unipampa)

URUGUAIANA, 2016

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por este momento que estou vivendo.

Agradecer a minha mãe, que sempre se manteve ao meu lado, mesmo que meio pessimista, sempre me cobrou quanto a minhas obrigações, e sempre me ajudou.

Agradecer ao meu pai, que não me deixou trabalhar e me fez continuar estudando, possibilitando este momento.

Agradecer a toda minha família que sempre me motivou e também sempre me parabenizou por meus feitos, me motivando mais ainda.

Agradecer a meus amigos Daniel, que me mostrou o vício da pescaria, ao Hiago que aprendi a gostar e que muito me ajudou nesta caminhada, ao Danilo que hoje esta longe, no entanto me ajudou durante toda minha graduação.

Agradecer a Eugenia Carla Kuhn, minha namorada, que sempre me lembrou que eu deveria estudar para as provas.

Agradecer a meus companheiros do laboratório 403, que sempre me ajudaram seja com alguma explicação ou com a ajuda em algum experimento. Agradecer a Maiara Bastiani, Matheus Bianchini, Claudia Ortiz, Aline Goulart, Monica Navarro e Marianne Pires.

Agradecer ao Hemerson Rosa, trocamos muitos camundongos juntos.

Agradecer a Maria Eduarda de Lima, pelos camundongos que eu e o Hemerson trocamos.

Agradecer minha grande co-orientadora Andréia Fernandes Salgueiro, sua ajuda foi essencial nessa caminhada, muito obrigado por toda sua ajuda, mesmo eu não merecendo as vezes.

E finalmente, agradecer a meu orientador, que me proporcionou este momento, acreditando em mim desde o ensino médio e abrindo as portas do seu laboratório para eu realizar este trabalho.

E também agradecer a professora Alessandra, e a técnica Alexandra, presentes nesta banca.

## RESUMO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome causada por uma deficiência na produção de insulina, ou pela incapacidade desta em realizar suas funções. A hiperglicemia, característica do DM, causa diversos distúrbios metabólicos, como perda de peso, fadiga, dificuldade de cicatrização, vasculopatia e neuropatia. Para indução do DM tipo1, é utilizada a streptozotocina (STZ), uma glicosamina-nitrosureia que se liga a transportadores do tipo glut-2, destruindo as células produtoras de insulina. O estresse oxidativo (EO) está diretamente relacionado as vias que geram as complicações causadas pelo DM, portanto sua avaliação torna-se essencial para verificar possíveis tratamentos. Sendo assim, a utilização de animais é a melhor forma *in vivo* de estudar fármacos e outras formas alternativas de tratar esta síndrome. O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe endêmico da região sul do Brasil, e tem como características boa adaptação ao frio, fácil reprodução e manejo. Com base no exposto, este estudo objetivou a criação de um modelo experimental alternativo para o estudo das alterações bioquímicas induzidas pelo DM. Para isso, foram obtidos 60 animais de piscicultura licenciada. Foram utilizados 20 peixes para a realização de uma curva de dose-resposta à STZ. Com isso, estabeleceu-se a dose de 200 mg/kg como a mais efetiva. Na padronização do modelo de DM foram utilizados 30 animais, divididos em grupo controle e tratados com STZ (200 mg/kg), acompanhados por 30 dias. Foram realizadas biometrias quinzenalmente. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e foram removidos seus tecidos (cérebro, músculo, rim, fígado e sangue) para análise. Foram avaliados os níveis de glicose, triglicerídeos, de grupos sulfidrílicos (-SH), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D. Ao final do experimento, não foi observado estado hiperglicêmico significativo nos animais. No entanto, foram observados níveis elevados de peroxidação lipídica no músculo, de -SH total no fígado, da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D no cérebro, e uma diminuição nos níveis de GSH não proteicos no músculo, indicando que os animais tratados com a STZ passaram por um quadro de EO. Em conclusão, os bioindicadores de EO demonstram que houve dano oxidativo nos tecidos avaliados. Porém, mais estudos são necessários para avaliar se há relação com estado hiperglicêmico prévio ou se é um efeito isolado do agente estressor STZ.

**Palavras-chave:** *Diabetes mellitus*; Modelo alternativo; Estresse oxidativo, *Rhamdia quelen*.

## ABSTRACT

. *Diabetes mellitus* (DM) is a syndrome caused by insulin production deficiency, or by its incapacity to execute its functions. Hyperglycemia, a characteristic of DM, causes many metabolic disorders such as weight loss, fatigue, vasculopathy and neuropathy. For induction of type 1 DM, streptozotocin (STZ) is used in order to destroy the insulin productions pancreas beta cells. Oxidative stress (OS) is directly related to pathways that generate complications caused by DM. So, its evaluation is essential to check possible treatments. Thus, the use of animals *in vivo* is the best way to study drugs and other alternative ways to treating this syndrome. The jundiá (*Rhamdia quelen*) is an endemic fish from southern Brazil, and its main characteristics are good adaptation to cold weather, easy reproduction and handling. Based on the above, this study aimed to create an alternative experimental model for the study of biochemical changes induced by DM. For this, we obtained 60 animals. Was used 20 fish to conduct a dose-response curve to STZ. With this result, the dose of 200 mg/kg was selected as the most effective. In the standardization of the DM model, we used 30 animals, which were divided into control group and treated with STZ (200 mg/kg) group, followed by 30 days. Biometric analyses was done every two weeks. At the end of treatment, animals were euthanized their tissues was removed (brain, muscle, liver, kidney and blood) for analysis. We evaluated the glucose levels, triglycerides, the sulfhydryl groups (-SH), thiobarbituric acid reactive species (TBARS), and the  $\delta$ -ALA-D enzyme activity. At the end of the experiment, there was no significant hyperglycemic state in animals. However, elevated levels of lipid peroxidation were observed in muscle, -SH total in the liver,  $\delta$ -ALA-D enzyme activity in the brain, and a decrease in GSH levels in the muscle, indicating that animals treated with STZ undergone OS. In conclusion, OS bio-indicators show that oxidative damage was performed in tissues. However, more studies are needed to assess whether there is a relationship with prior hyperglycemic state or whether it is an isolated effect of stressor STZ.

Key-words: *Diabetes mellitus*; Alternative Model, Oxidative Stress; *Rhamdia quelen*.

**Lista de Figuras**

Figura 1. Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i> .....	10
Figura 2. Níveis de glicose da curva de dose-resposta, referentes a sete e quatorze dias de tratamento.....	18
Figura 3. Dados biométricos dos jundiás utilizados na padronização do modelo de DM, dados obtidos aos 0, 15 e 30 dias de experimento.....	19
Figura 4. Gráfico de glicose e triglicerídeos.....	19
Figura 5. Gráfico da análise de TBA-RS.....	20
Figura 6. Gráfico da análise dos níveis de -SH total.....	21
Figura 7. Gráfico dos níveis de -SH não proteico.....	22
Figura 8. Gráfico da atividade da enzima $\delta$ -ALA-D.....	23

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 <i>Diabetes mellitus</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Estresse oxidativo.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Obtenção e manutenção dos animais.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Administração da estreptozotocina.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Indução do modelo de <i>Diabetes mellitus</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4 Obtenção e preparo de tecidos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.5 Níveis de grupos sulfidrílicos (-SH).....</b>	<b>16</b>
<b>3.6 Ensaio de TBA-RS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.7 Atividade da enzima <math>\delta</math>-ALA-D.....</b>	<b>16</b>
<b>3.8 Determinação de proteínas.....</b>	<b>17</b>
<b>3.9 Análise estatística.....</b>	<b>17</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>27</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do  $O_2$  e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de  $O_2$  (Ross *et al.*, 1991).

Para proteger-se de agentes tóxicos e/ou oxidantes, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GPx) e vitamina E (Ferreira & Matsubara, 1997). A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico e pela glutathiona-redutase (GSH-Rd), entre outros. Com exceção da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (Ross *et al.*, 1991; Hebbel *et al.*, 1986).

Entre as diversas situações que causam um aumento da produção endógena de oxidantes e uma diminuição da ação dos sistemas de defesas antioxidantes está o *Diabetes mellitus* (DM). A avaliação do estresse oxidativo (EO) no DM torna-se de grande importância à medida que permite o reconhecimento de mecanismos que levam às complicações da síndrome, assim como a investigação de possíveis tratamentos para o distúrbio.

É crescente o interesse de pesquisadores por modelos experimentais alternativos aos já existentes, que permitam investigar diversos aspectos relacionados ao DM. Neste contexto então surge a possibilidade de utilizar alguns animais de fácil manuseio e obtenção, como o jundiá (*Rhamdia quelen*), já bastante utilizado para estudos de EO (PRETTO *et al.*, 2010).

Assim, considerando que o DM atinge milhares de pessoas em todo mundo e que o EO é um dos grandes causadores das complicações relacionadas com essa síndrome, este estudo teve como finalidade padronizar um modelo experimental alternativo de DM utilizando o jundiá, assim como avaliar biomarcadores EO no modelo acima citado.

### 1.1 Jundiá (*Rhamdia quelen*):



**Figura 1:** Exemplar de *Rhamdia quelen*. **Fonte:** Fonte própria.

O Brasil possui ampla diversidade de espécies nativas com alto potencial para piscicultura intensiva. Uma espécie promissora para criação no Sul do País é o jundiá, a qual tem demonstrado rusticidade no manejo criatório (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2005) e bons índices de crescimento, inclusive nos meses mais frios (FRACALOSSO et al., 2002). Estes fatores favorecem para que esta espécie entre nas preferências dos produtores de organismos aquáticos com fins de comercialização.

O jundiá (**Figura. 1**) é uma espécie pertencente ao gênero *Rhamdia*, que é formado por 11 espécies, dentre as quais se encontra o *Rhamdia quelen*. Segundo Luchini e Avendaño (1985) e Baldisserotto e Radünz Neto (2005), o jundiá é um peixe de rápido crescimento, apresenta fácil adaptação à criação intensiva, rusticidade, facilidade na indução à reprodução, alta taxa de fecundação, possuindo ainda carne saborosa com baixo teor de gordura e com poucas espinhas, além de apresentar boa aceitação no mercado consumidor. O jundiá faz parte da família Heptapteridae, e é uma espécie endêmica do sul da América do Sul, capaz de crescer e reproduzir-se em qualquer região de clima temperado ou subtropical (CERICATO et al., 2008).

Em peixes o metabolismo da glicose ocorre da mesma forma que nos mamíferos, onde a principal fonte energética das células é a glicose. Quando ingerida acima das necessidades, a glicose é polimerizada a glicogênio, e armazenada no fígado e no músculo, sendo sua mobilização controlada pela ação de hormônios e enzimas, ou convertida a gordura (SILVEIRA et al., 2009). Wilson e Poe (1987), em ensaios de tolerância a glicose, observaram hiperglicemia com caracterização semelhante ao sintoma de diabetes de animais mamíferos, em peixes alimentados com alto nível de carboidratos na dieta e sugeriram que a reduzida taxa de utilização de glicose da-se através de uma produção insuficiente de insulina pelos peixes.

Essa espécie já tem sido utilizada com sucesso na avaliação de EO (FERREIRA et al., 2010), porém a indução experimental de DM no jundiá é ainda pouco explorada. Em peixes, esta síndrome já foi realizada em peixe zebra, *Danio rerio* (OLSEN et al., 2010) e Goldfish, *Carassius auratus* (MINICK & CHAVIN, 1971), induzindo o DM através de Streptozotocina.

### **1.2 Diabetes mellitus:**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define o *Diabetes mellitus* (DM) como uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina exercer adequadamente suas ações. Especificamente no DM do tipo 1, a destruição autoimune das células beta pancreáticas resulta na falha da produção de insulina, levando à hiperglicemia crônica e alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas.

A hiperglicemia crônica em longo prazo está relacionada ao desenvolvimento das complicações relacionadas ao DM e acredita-se que o EO tem papel fundamental no desenvolvimento dessas complicações (CERIELLO, 2000; REIS et al., 2008). De fato, um aumento do EO relacionado com a hiperglicemia já foi relatado em modelos *in vitro* e *in vivo* (SALGUEIRO et al., 2013; SALGUEIRO et al., 2016; FOLMER et al., 2002).

Para a indução experimental do DM tipo 1 em modelos animais é utilizada comumente a estreptozotocina (STZ), a qual é uma glicosamina derivada da nitrosourea. A citotoxicidade da STZ está relacionada à ligação da fração glicídica da droga aos glicoreceptores das células beta, permitindo que o componente nitrosouréia realize a destruição das células beta. Esta ação acontece em três momentos, o primeiro é momento é caracterizado por um estado hiperglicêmico, devido à inibição na produção de insulina e ocorre entre duas e quatro horas após a injeção, no segundo momento há um quadro de hipoglicemia através da lesão causada às células beta com insulina estocada, ocorrendo entre sete a nove horas, e a última fase deste processo é caracterizada por um quadro irreversível de hiperglicemia, este, ocorrendo cerca de vinte e quatro horas após a administração (VIANNA, 2003). Por outro lado, evidências indicam que os radicais livres podem ter um papel essencial no efeito diabetogênico da STZ (TAKASU et al., 1991).

### **1.3 Estresse oxidativo:**

O estresse oxidativo (EO) pode ser definido como uma perturbação no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a neutralização destas pelos sistemas de defesa antioxidante, sendo que o excesso de EROS é conhecido por causar danos aos sistemas biológicos (HALLIWELL, 2012). Dessa forma, o EO pode ser medido através da avaliação de biomarcadores específicos, como a taxa de peroxidação lipídica e os níveis de grupamentos sulfidrílicos (HALLIWELL, 2012).

EROS são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) ou derivados dos produtos da redução. As principais EROS são o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^\cdot$ ). Estes

compostos podem reagir com biomoléculas e produzir peroxidação lipídica, danos ao DNA e oxidação de proteínas, resultando em lesão e morte celular (MONTEIRO et al., 2006). Os sistemas de defesa antioxidante naturais podem ser enzimáticos, que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST) e glutationa peroxidase (GPx), e não enzimáticos, representado pelos níveis de ácido ascórbico e glutationa reduzida (GSH) (AHMAD et al., 2000; ORUÇ et al., 2004). O sistema de defesa antioxidante não-enzimático atua impedindo reações de auto-oxidação e tem sido vinculado com a redução de radicais livres (SAYEED et al., 2003). Dentre estes, destaca-se a GSH, o mais abundante tiol não-protéico e um dos principais agentes redutores encontrados nas células e atua como co-fator para a GST e GPx (MONTEIRO et al., 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010).

A enzima citosólica  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -Ala-D), ou porfobilinogênio sintase, é uma enzima de natureza sulfídrica (BEVAN et al., 1980), a qual pode ser inibida na presença de metais pesados como chumbo e cobre (HASAN & SETH, 1981; PEROTTONI et al., 2004). Apesar de não ser considerada uma enzima antioxidante, a análise de sua atividade é amplamente realizada em estudos de estresse oxidativo devido a sua atividade ser inibida na presença de agentes estressores e também no DM, como observado por Salgueiro et al. (2016), em um modelo de DM induzido por STZ.

A ALA-D está diretamente envolvida na síntese de compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofila e hemes) (JAFFE, 1995), catalisando a condensação de duas moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico com a perda de duas moléculas de água. A principal importância destes compostos está na sua função de grupos prostéticos de proteínas. O grupo heme (ferroprotoporfirina) faz parte de estruturas de proteínas que participam do transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina, mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), reações de transformação de xenobióticos (citocromo P 450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalase e peroxidases) (Pivetta, 2005).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Padronizar um modelo de *Diabetes mellitus* utilizando o jundiá (*Rhamdia quelen*) como modelo experimental, e avaliar biomarcadores de estresse oxidativo nesse modelo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar características biométricas em jundiás tratados com STZ;
- Avaliar o desenvolvimento do estado hiperglicêmico em jundiás tratados com STZ;
- Avaliar os níveis de peroxidação lipídica;
- Avaliar o antioxidante não enzimático endógeno glutathiona reduzida (GSH);
- Avaliar a atividade da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção e Manutenção dos Animais

Para a realização do experimento foram obtidos 60 animais, oriundos de piscicultura licenciado, os quais foram aclimatados em uma caixa de 500 L, com temperatura controlada ( $\pm 25$  °C). Após aclimação, os peixes foram distribuídos primeiramente em 4 tanques de 200L para a realização da curva de dose-resposta, e, após definida a dose, foram postos em 2 tanques, relacionados aos dois grupos utilizados no experimento. A água foi renovada a cada 2 dias numa quantidade equivalente a 10% do volume total. A alimentação (ração comercial para juvenis, com 36% Pb) foi fornecida duas vezes ao dia.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unipampa (CEUA 032/2015).

#### 3.2 Administração da Estreptozotocina

A estreptozotocina (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) foi preparada em tampão citrato (0,01M), pH 6,0.

Para realização da curva de dose-resposta foram separados 20 animais de ambos os sexos, com tamanho aproximado de  $\pm 11,35$  cm. Os peixes foram separados em 4 grupos (Controle, 100 mg/kg, 200 mg/kg e 300 mg/kg; *i.p.*). A curva foi realizada com a finalidade de estabelecer uma dose padrão para a indução do DM. No grupo controle foi injetado apenas tampão citrato. A avaliação da glicemia foi realizada no sétimo e décimo quarto dia após a injeção. A administração da droga foi realizada intraperitoneal. A dose mais efetiva (200 mg/kg) foi utilizada para o experimento posterior.

#### 3.3 Indução do modelo de *Diabetes mellitus*

Para a obtenção do modelo, foram então avaliados os efeitos da STZ sobre a glicemia e os biomarcadores de estresse oxidativo. Para isso, 40 animais foram separados em dois grupos (Controle e STZ 200 mg/kg). Após a injeção, os animais permaneceram por 30 dias em observação, durante este período, foram realizadas biometrias quinzenais nos animais, verificando o comprimento total o peso. O comprimento total foi averiguado utilizando-se paquímetro digital e o peso aferido com uma balança digital.

Após o período de 30 dias os animais tiveram primeiramente seu sangue retirado e foram eutanasiados para a coleta de seus tecidos (Fígado, cérebro, rim e músculo).

A confirmação do estado hiperglicêmico foi realizada com uma amostra de sangue utilizando-se o Kit de glicose da marca Labtest.

### **3.4 Coleta e preparo dos tecidos**

O sangue foi coletado através da veia caudal, com o animal ainda vivo e então insensibilizados em gelo. Em seguida os animais foram eutanasiados através de um corte vertical na medula espinhal. Para as análises, foram utilizados sangue, cérebro, músculo, fígado e rim. Os tecidos foram homogeneizados em NaCl 0,9% na proporção de 1:5 para cérebro e músculo e 1:10 para fígado e rim. Após a homogeneização, os tecidos foram centrifugados (2000 rpm; 4°C) para obtenção do primeiro sobrenadante (S1). O sangue foi coletado em tubos contendo heparina para evitar coagulação. As análises de glicose e triglicerídeos foram realizadas utilizando-se Kit de marca comercial Labtest.

### **3.5 Níveis de grupos sulfidrílicos (-SH)**

O procedimento experimental foi desenvolvido de acordo com o método proposto por Ellman (1952), o qual se baseia na reação dos grupos -SH com o ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) utilizado como reagente de cor. A análise colorimétrica foi desenvolvida espectrofotometricamente a 412 nm após 10 minutos da adição do DTNB, e o conteúdo de grupos -SH foi calculado com relação aos valores encontrados em concentrações conhecidas de GSH utilizadas como padrão. Os resultados foram corrigidos pela quantidade de tecido e expressos em nmol de GSH por miligrama de tecido.

### **3.6 Ensaio de determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)**

Para determinação dos níveis de TBA-RS foi utilizado o método de análise colorimétrica proposto por Ohkawa et al. (1979). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram calculados em nmol de malondialdeído (MDA), calculados com base em uma curva padrão, e corrigidos pela quantidade de MDA.

### **3.7 Determinação da atividade da delta-aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D)**

A atividade da  $\delta$ -ALA-D foi determinada seguindo o método proposto por Sassa (1982). A atividade da enzima foi monitorada em diferentes tempos (de acordo com o tecido avaliado) e a partir da adição do ácido aminolevulínico. Os resultados foram expressos em nmol de porfobilinogênio (PBG) e corrigidos pela quantidade de proteínas ou mL de sangue.

### **3.8 Determinação de proteínas**

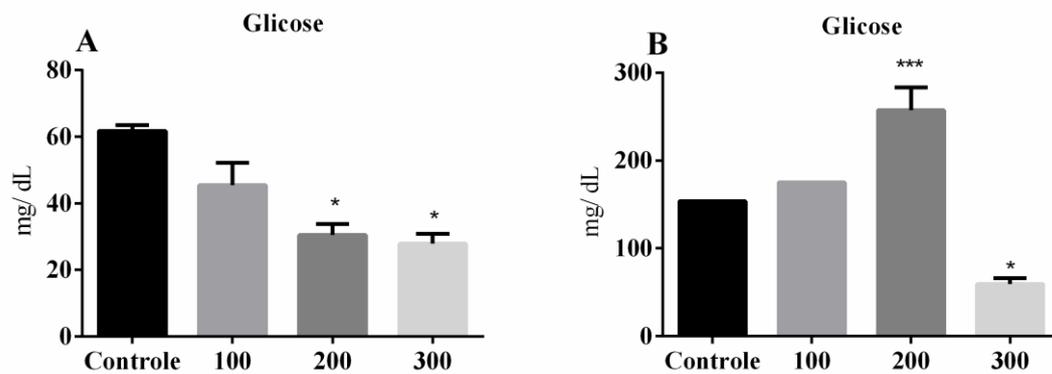
As proteínas foram quantificadas pelo método proposto por Bradford (1976). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595nm. Os resultados foram expressos em mg de proteínas, calculados com base em uma curva padrão de albumina.

### **3.9 Análise estatística**

Os dados obtidos na curva de resposta a STZ foram submetidos a análise de Variância com nível de significância de 95% ( $P < 0,05$ ). Os dados relacionados as biometrias e análises dos bioindicadores de estresse oxidativo foram submetidas ao teste *t*, com nível de significância de 95% ( $P < 0,05$ ).

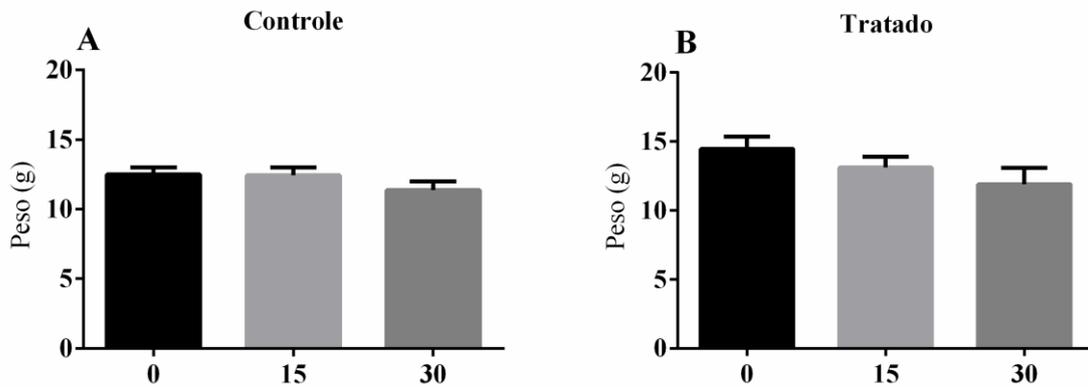
#### 4. RESULTADOS

Na **Figura 2** estão representados os níveis de glicose dos animais utilizados na curva de dose-resposta. Pode-se observar que nos primeiros 7 dias houve um quadro de hipoglicemia nos animais do grupo de 200 mg/kg e 300 mg/kg STZ. No entanto, aos 14 dias foi possível observar hiperglicemia no grupo de 200 mg/kg enquanto o grupo de 300 mg/kg manteve hipoglicemia.



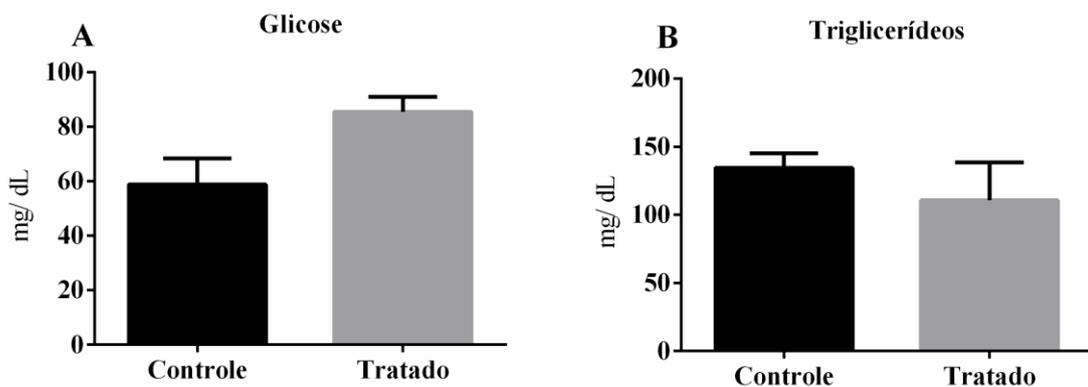
**Figura 2: Níveis de glicose apresentados pelos animais na curva de dose-resposta com estreptozotocina. Dados referentes a sete dias (A) e quatorze dias (B). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).**

Na **Figura 3** estão representados os valores obtidos nas biometrias relacionados peso dos animais, de ambos os grupos. Não foi observada alteração significativa no peso (Figura 2B) dos animais ao longo do tratamento.



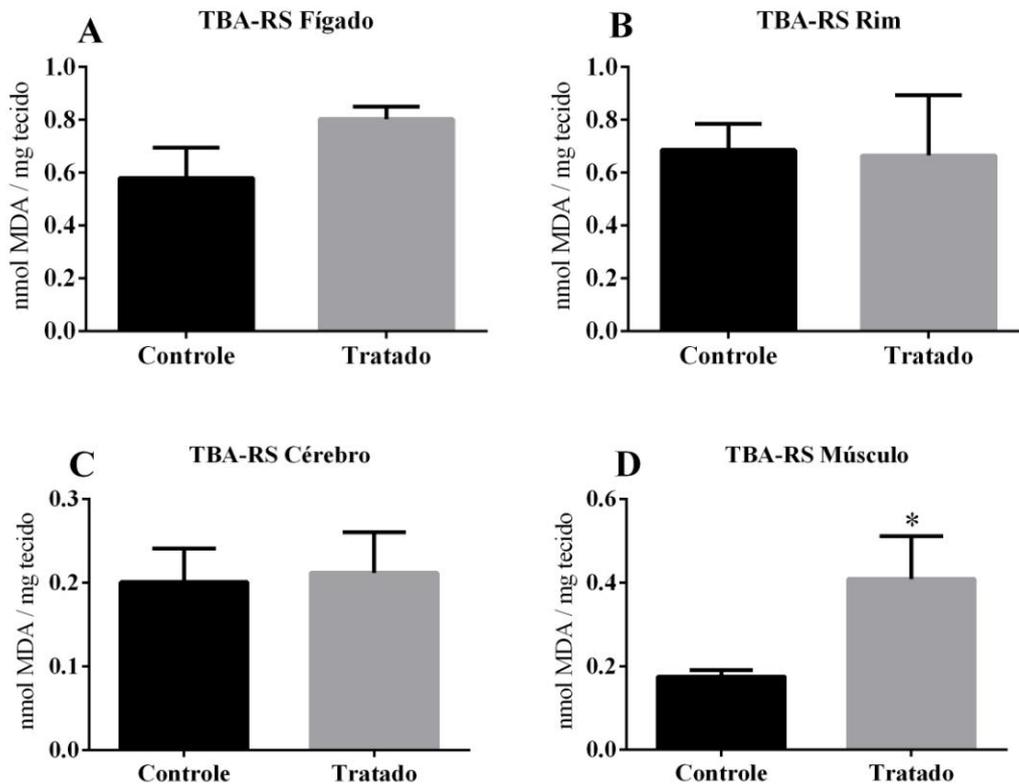
**Figura 3: Dados biométricos obtidos em 0, 15 e 30 dias de tratamento. Peso do grupo controle (A), peso do grupo tratado (B), comprimento do grupo controle (C), comprimento do grupo tratado (D).**

Na **Figura 4**, são apresentados os níveis de glicose e triglicerídeos nos animais após os 30 dias tratamento, utilizando a dose de 200 mg/kg, obtida na curva de resposta a STZ. O tratamento não demonstrou diferença significativo nos animais.



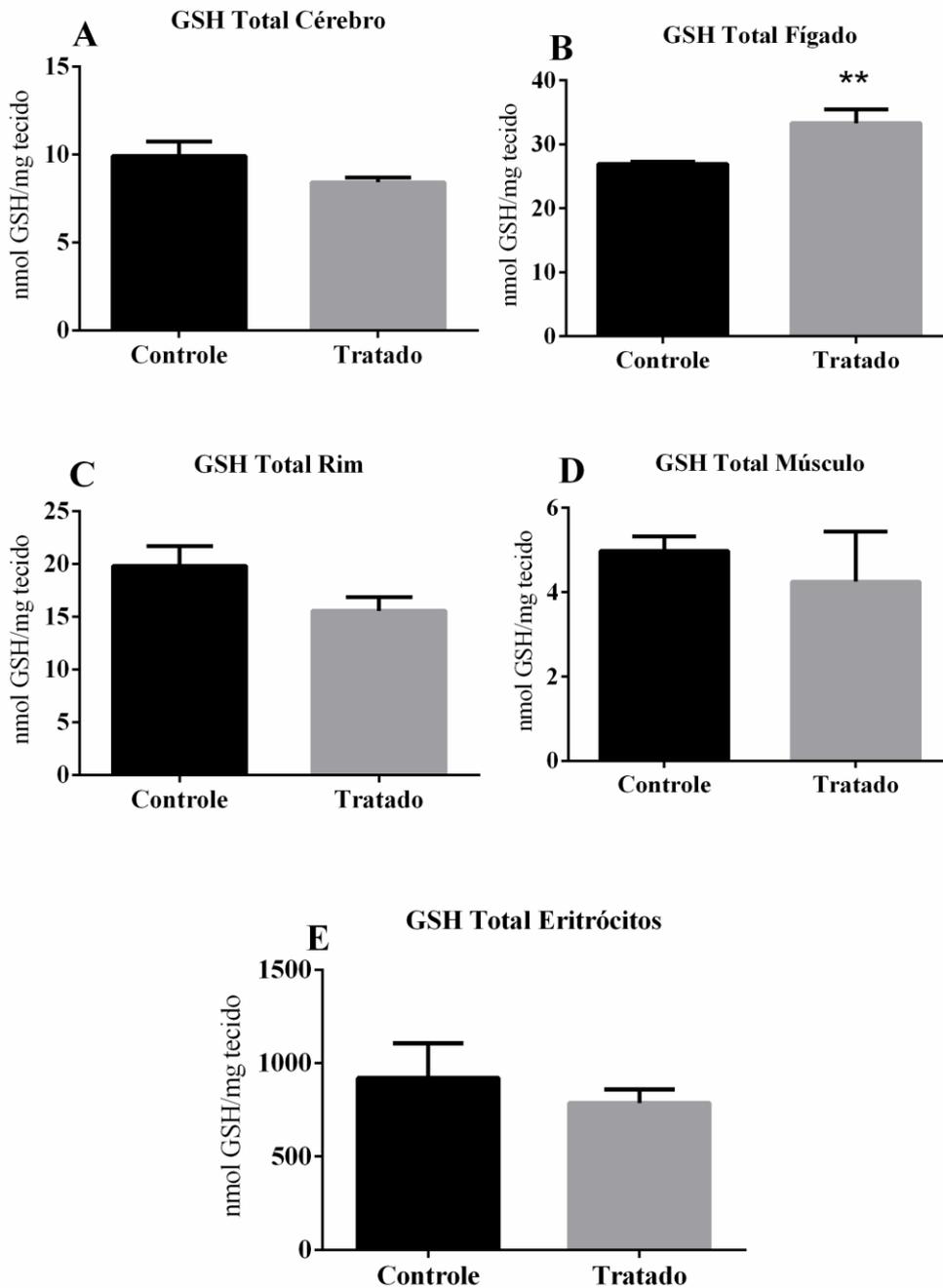
**Figura 4: Níveis de glicose (A) e triglicerídeos (B).**

Na **Figura 5** podemos observar os níveis de TBA-RS no fígado, rim, cérebro e músculo. Foi possível observar um aumento significativo destes níveis no músculo (Figura 5D), indicando então um dano causado através de lipoperoxidação neste tecido. Nos demais tecidos não foram observadas alterações estatisticamente significativas.



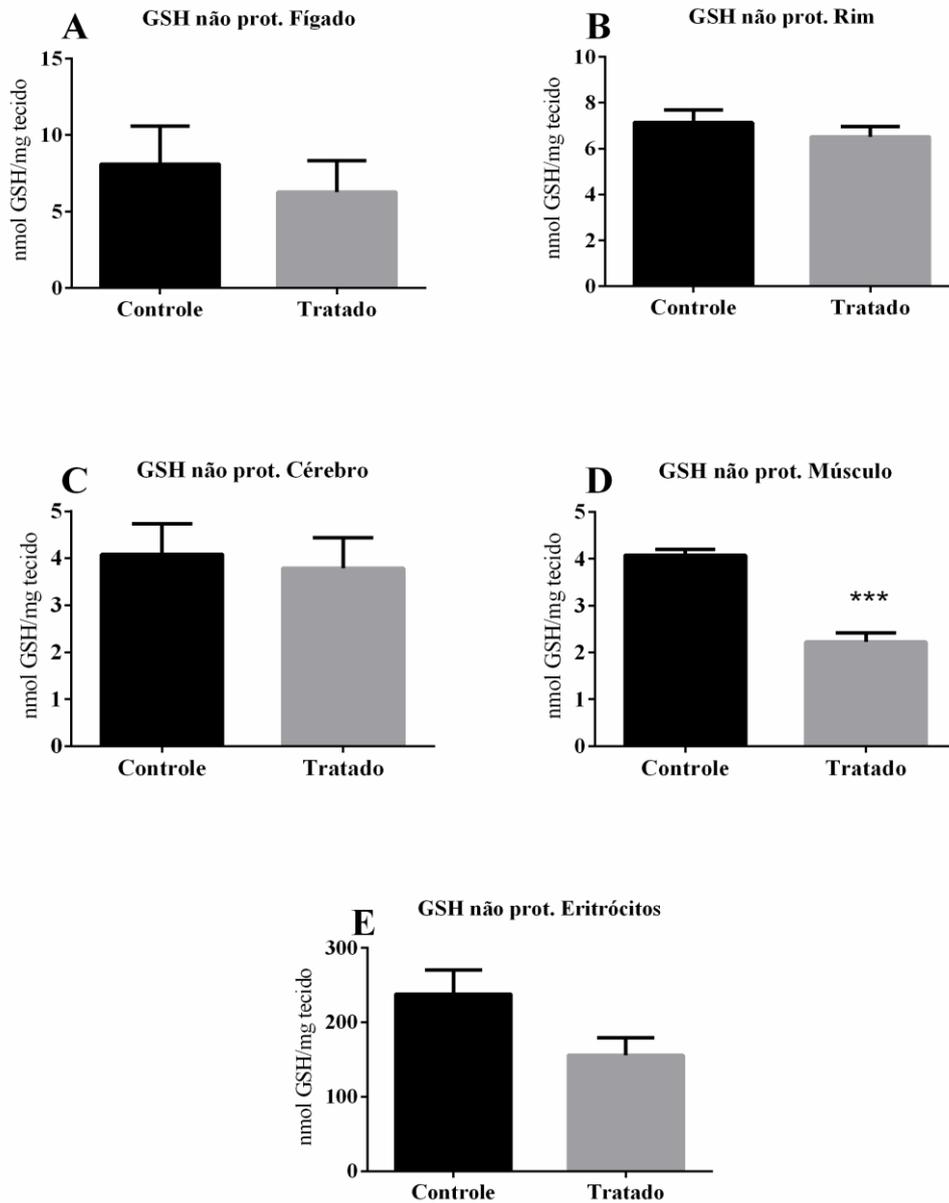
**Figura 5:** Análise dos níveis de TBA-RS no fígado (A), rim (B), cérebro (C) e Músculo (D). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

Na **Figura 6** estão representados os níveis de -SH total no cérebro, fígado, rim, músculo e eritrócitos. Foi possível observar um aumento significativo nos níveis de -SH no fígado (Figura 6B). Nos demais tecidos não foram observadas diferenças significativas.



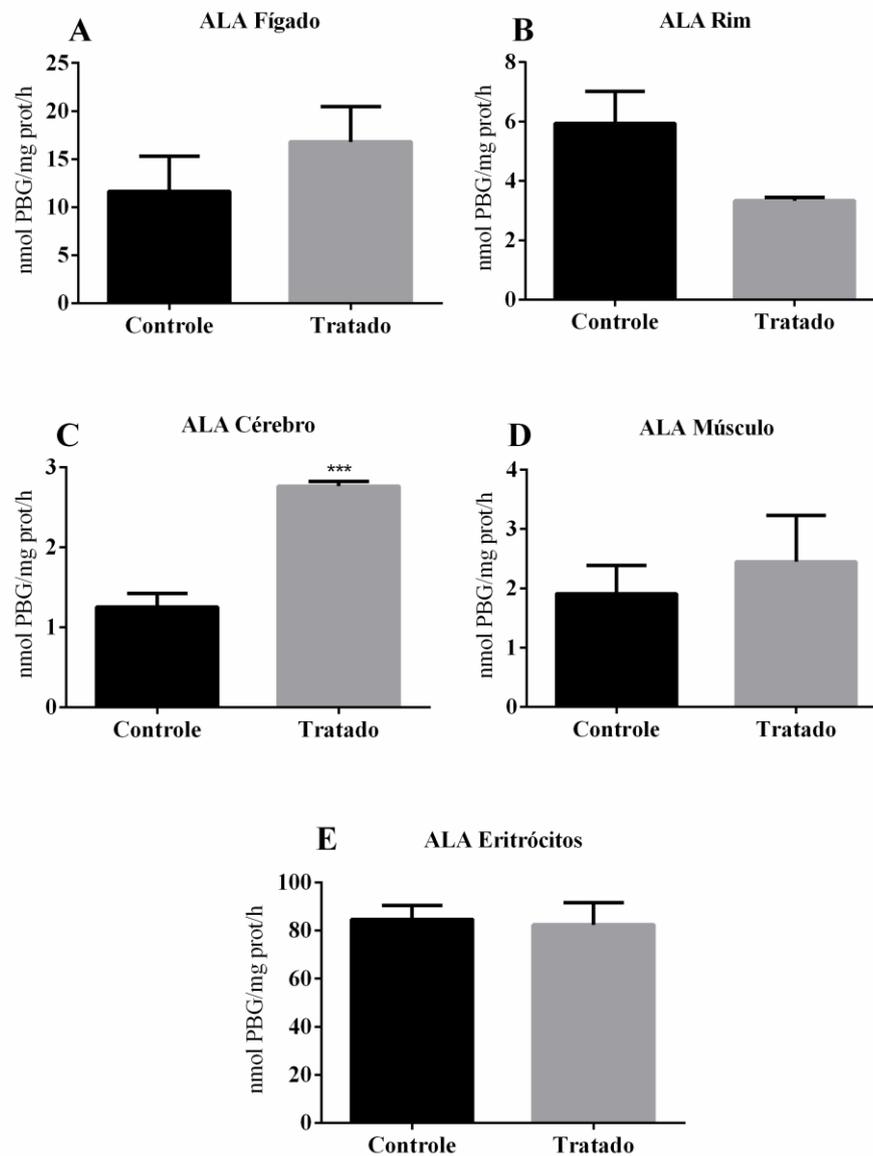
**Figura 6** Avaliação dos níveis de -SH total no cérebro (A), fígado (B), rim (C), músculo (D) e eritrócitos (E). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

Na **Figura 7** são demonstrados os níveis de -SH não-proteico no fígado (A), rim (B), cérebro (C), músculo (D) e eritrócitos (E). No Músculo houve uma diminuição significativa nos níveis -SH no grupo tratado, mas nos demais tecidos não houve diferença significativa.



**Figura 7:** Análise dos níveis de -SH não proteicos no fígado (A), rim (B), cérebro (C), músculo (D) e eritrócitos (E). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

A **Figura 8** é referente a atividade da enzima  $\delta$  ALA-D nos tecidos avaliados: fígado (A), rim (B), cérebro (C), músculo (D) e eritrócitos (E). Houve um grande aumento na atividade da enzima  $\delta$  ALA-D no cérebro (Figura 8C), mas nos outros tecidos não foram observadas diferenças significativas.



**Figura 8:** Análise da atividade da enzima  $\delta$  ALA-D no fígado (A), rim (B), músculo (C), cérebro (D) e eritrócitos (E). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar a possibilidade de utilizar uma espécie nativa da região sul do Brasil, o jundiá, na elaboração de um modelo experimental de *Diabetes mellitus* tipo I, induzido através da administração de estreptozotocina.

Os dados mostram que o peso (**Figura . 3**) dos animais não variou significativamente ao longo dos 30 dias de experimento. O DM é composto por um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia, sendo esta causada através de uma deficiência na secreção de insulina ou em sua ação. A hiperglicemia então se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, polifagia, visão turva e a perda de peso (GROSS et al, 2002).

Para a determinação da dose a ser utilizada na indução, pode-se observar que a dose de 200 mg/kg de STZ seria a mais significativa, devido a hiperglicemia apresentada pelos animais deste grupo após 14 dias (**Figura. 2B**).

No entanto, inesperadamente após a repetição do experimento, não foi observada hiperglicemia após 30 dias de acompanhamento (**Figura. 4A**). Moon (2001), observou que algumas espécies de peixes possuem uma intolerância natural a glicose. Este autor relatou que o Bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), após 6 horas do teste de tolerância à glicose tem a hiperglicemia corrigida. A não observação de hiperglicemia significativa em 30 dias, pode indicar uma possível reversão do dano causado pela STZ às células pancreáticas, levando os níveis de glicemia nos animais tratados a níveis do controle. Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que as células beta podem desencadear mecanismos eficientes de recuperação após injúrias não-letais (EIZIRIK et al, 1993; EIZIRIK, 1996). Foi observado por Bonnerweir e Smith (1994), que o crescimento das ilhotas se dá pela replicação das células beta pré-existentes e pela formação de novas ilhotas (neogênese) através da proliferação e diferenciação das células epiteliais do ducto pancreático.

O sistema de defesa antioxidante não-enzimático atua impedindo reações de auto-oxidação e tem sido vinculado com a redução de radicais livres (SAYEED et al, 2003). Dentre estes, destaca-se a glutathiona reduzida (GSH), o mais abundante tiol não-proteico e um dos principais agentes redutores encontrados nas células que atua como co-fator para a Glutathiona S-transferase (GST) e glutathiona peroxidase (GPx) (MONTEIRO et al, 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010). A GSH, além de ser o principal antioxidante não-enzimático encontrado nas células, atua em diversas outras funções importantes no organismo como a síntese de proteínas e de DNA. A proteção das células pela GSH é realizada através da conjugação dos metabólitos xenobióticos e da peroxidação lipídica, resultando em um

intermediário menos tóxico (MARAN et al, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010). Esta conjugação é catalisada pela GST, uma enzima capaz de detoxificar compostos prejudiciais como, por exemplo, herbicidas. Sendo assim seu aumento é considerado benéfico para combater o estresse ambiental (BALLESTEROS et al, 2009). Como observado no fígado (**Figura. 6B**) dos animais tratados e aumento significativo nos níveis de GSH, indica que houve um quadro de estresse a algum agente xenobiótico e, portanto, a necessidade de tentar reverter este estresse. Já a redução de GSH não proteico observada no músculo (**Figura. 7D**) pode estar ligada a este tiol ser a primeira linha de defesa contra agentes oxidantes e suas diversas funções já citadas. Concentrações baixas de GSH têm sido reportadas em algumas doenças, e estão associadas a maior risco de estresse oxidativo e da ocorrência de infecções oportunistas. Este decréscimo do GSH pode refletir, o aumento na produção de antioxidantes, num grau que excederia a capacidade de detoxificação do GSH (BRAY & TAYLOR, 1993; MEISTER, 1995). Dentre as funções do GSH, está a de proteção a lipoperoxidação, onde foi possível observar uma queda nos níveis de GSH no músculo, e uma elevação nos níveis de MDA neste tecido, indicando que, esta queda pode ter sido causada como uma tentativa de reverter este dano causado pelo estresse oxidativo. O GSH pode ser perdido de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzido.

Também deve-se citar a sua importância ao combate a peroxidação lipídica, que pode ocorrer de três formas, no primeiro caso a GSH é utilizada como substrato pela GPx na eliminação de peróxidos. No segundo caso, o GSH reduz a forma oxidada da vitamina C, que assim pode atuar, mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional. E por último, o GSH pode, através da GST, detoxificar aldeídos reativos (como o malondialdeído) que são gerados durante a peroxidação lipídica. O fígado sintetiza a GSH, mas o GSH ingerido pode ser absorvido intacto no intestino delgado, aumentando assim os níveis de GSH plasmático (JÚNIOR et al., 1998). Indicando então que o aumento deste no fígado (**Figura. 6B**) pode ser em resposta aos níveis elevados de MDA no músculo (**Figura. 5D**).

A atividade da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) (**Figura. 8**) tem sido observada em estudos relacionados a patologias decorrentes do estresse oxidativo, devido a esta atividade apresentar-se inibida na presença de um agente estressor (SALGUEIRO et al., 2016). Esta enzima está diretamente envolvida na biossíntese do grupo prostético heme, sendo essencial então para a produção de hemoglobina (BAIERLE et al., 2010).

O aumento na atividade desta enzima no cérebro (**Figura. 8C**) pode estar relacionado ao processo de detoxificação, através da transformação do agente xenobiótico STZ ou seus

metabólitos, como tentativa de evitar o estresse causado pelo mesmo, através da produção do grupamento heme utilizado na transformação de xenobióticos via citocromo P 450. Assim, em estudo realizado por Folmer *et al.* (2004), foi observado um aumento na atividade da ALA-D no sangue de camundongos expostos a uma dose de cádmio (5mg/kg/dia), relacionando então o aumento desta atividade a tentativa de proteção contra a intoxicação induzida pelo cádmio.

Em modelos de DM (CUARTETO *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2007), a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D apresenta-se geralmente inibida. No entanto, essa inibição apresenta uma correlação com os altos níveis na glicemia. Por outro lado, BRITO *et al.* (2011) ao induzir DM com aloxano em camundongos, não constatou uma inibição na atividade desta enzima, e assim como em nosso estudo, também não observou estado hiperglicêmico nos animais. Assim, a inibição desta enzima em modelos de DM pode estar relacionada a capacidade da glicose de ligar-se a enzimas, causando assim mudanças em sua conformação e consequente perda da atividade. Ou, em casos de intoxicação, de aumentar a atividade para suprir a demanda do citocromo P 450.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos dados apresentados nesse estudo, podemos concluir que a dose em um período de 14 dias foi suficiente para induzir o DM, no entanto este estado se reverteu em 30 dias, o que pode indicar uma regeneração nas células beta remanescentes no pâncreas. No entanto, foi possível observar que foi causado estresse através do agente xenobiótico administrado nos animais, através dos indicadores de estresse oxidativo avaliados neste estudo. Isso indica, que talvez uma dose intermediária entre a utilizada na padronização do DM (200 mg/kg) e a maior dose utilizada na curva de dose-resposta (300 mg/kg), poderia ter induzido o DM de forma irreversível nos animais, realização de uma nova curva entre estas duas dosas seria necessária para comprovar isso.

## 7. REFERÊNCIAS

- AHMAD, I; HAMID,T; FATIMA, M; CHAND, H.S; JAIN, S.K ; ATHAR, M; RASSUNDI, S. of **Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish ( *Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure.** Biochim. Biophys. Acta v. 1532, p. 37- 48. 2000
- BALDISSEROTO, B; RADÜNZ, J. **Criação de Jundiá.** Santa Maria:UFSM, 2004, p. 232.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Jundiá (*Rhamdia sp.*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, C. L. Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: UFSM, 2005. p. 303-319.
- BAIERLI, M; VALENTINI, J; PANIZ, C; MORO, A; JUNIOR, F, B; GARCIA, A, C. **Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas.** Bras Patol Med Lab , v. 46, n.6, p. 463-470, 2010.
- BRADFORD, M.M; **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.** Anal Biochem;72:248-54.1976
- BENNETT, R.A; PEGG, A.E. **Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. Cancer. Res.** 1981;41(7):2786-90.
- BEVAN, D. R; BODLAENDER, P; SHEMIN, D. **Mechanism of porphobilinogen synthase. Requeriment of Zn<sup>2+</sup> for enzyme activity.** Journal of Biological Chemistry, v. 225, p. 2030-2035, 1980.
- BONNERWEIR, S; SMITH, F. E. **Islet cell growth and the growth factors involved.** Trends in Endocrinology and Metabolism, v. 5, n. 2, p. 60-64, 1994.
- BOLZAN, A.D; BIANCHI, M.S. **Genotoxicity of streptozotocin. Mutat. Res.** 2002;512(2-3):121-34.
- BRITO, V; ROCHA, J; PUNTEL, G; DA LUZ, S; BARBOSA, N; DE CARVALHO, N; FOLMER, V. **Inhibition of d-aminolevulinatase is not closely related to the development of hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice.** Experimental and Toxicology Pathology, v. 63, p. 443-451, 2011.
- CERICATO, L; NETO, J.G.M; FAGUNDES, N; KREUTZ, L.C; QUEVEDO. R.M; FINCO, J; ROSA, J.G.S; KOAKOSKI, G; CENTENARO, L; POTTES, E; ANZILIERO, D; BARCELLOS, L.J.G. **Cortisol response to acute stress in jundiá *Ramdia quelen* acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals.** Comp. Biochem. Physiol. C. v. 148, p. 281-186. 2008.
- CERIELLO, A. **Oxidative stress and glycemic regulation.** Metabolism. 2000;49(2 Suppl 1): 27-9.
- CUARTETO, B. F; REBOLLAR, J. L; BATLLE, A; DE SALAMANCA, R. E. **Delta aminolevulinatase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 31, p. 479-488, 1999.

DUYDU, H. S; SÜZEN, A; AYDIN, O; CANDLER, H, UYSAL, A, VURAL, I, N. **Correlation Between Lead Exposure Indicators and Sister Chromatid Exchange (SCE) Frequencies in Lymphocytes from Inorganic Lead Exposed Workers.** Archives of Environmental Contamination and toxicology, v. 41, p. 241-246, 2001.

EIZIRIK, D. L; SANDLER, S; PALMER, J. P. **Repair of pancreatic  $\beta$ -cells: a relevant phenomenon in early IDDM?** Diabetes, v. 42, n. 10, p. 1383-1391, 1993.

EIZIRIK, D. L.  **$\beta$ -cell defence and repair mechanism in human pancreatic islets.** Hormone and Metabolic Research, v. 28, n. 6, p. 302-305, 1996.

ELLMAN, G.L. **Tissue sulfhydryl groups.** Arch. Biochem. Biophys. 82 (1952), 70-77

ELSNER M, GULDBAKKE B, TIEDGE M, MUNDAY R, LENZEN S. **Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin.** Diabetologia. 2000;43(12):1528-33.

FARANT, J. P; WIGFIELD, D. C; **Biomonitoring lead exposure with delta-aminolevulinatase (ALA-D) activity ratios.** International Archives of Occupational and Environmental Health, v. 51, p. 15-24, 1982.

FERREIRA, D; MOTTA, A.C; KREUTZ, L.C; TONI, C; LORO, V.L; BARCELLOS, L.J.G. **Assesment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals.** Chemos. V. 79, p. 914-921. 2010.

FERREIRA, A; MATSUBARA, L. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev Ass Med Brasil 1997; 43(1): 61-8.

FOLMER, V; SOARES, J.C.M; ROCHA, J.B.T. **Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet.** International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 34, p. 1279-1285, 2002.

FOLMER, V; SANTOS, F. W; SAVEGNAGO, L; BRITO, V. B; NOGUEIRA, C. W; ROCHA, J. B. T. **High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase but not on  $\delta$ -aminolevulinatase in mice.** Toxicology Letters, v. 153, p. 333-341, 2004.

FRACALOSSO, D. M. et al. **No rastro das espécies nativas. Panorama da Aqüicultura,** v. 12, p.43-49, 2002.

GOMES, L. C. et al. **Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae).** Ciência Rural, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

GROSS, J. L; SILVEIRO, S. P; CAMARGO, J. L; REICHEL, A. J; DE AZEVEDO, M. J. **Diabetes Mellito: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico.** Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. v. 46, n. 1, 2002.

HASAN, M. Z; SETH, T. D. **Effect of lead and zinc administration on liver, kidney and brain levels of copper, lead, manganese and zinc on erythrocyte ALA-D activity in rats.** Toxicology Letters, v. 7, p. 353-358, 1981.

HALLIWELL, B. **Free radicals and antioxidants: updating a personal view.** Nutr Rev 2012;70:257-65.

HEBBEL, R. P. **Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability.** J Lab Clin Med 1986; 107: 401-4.

HOFFMAN, D. J. **Developmental toxicity of lead-contaminated sediment to mallard ducklings.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 39, p. 221-232, 2000.

KOSTYUK, V.A; POTAPOVITCH. **A.L.Superoxide-driven Oxidation of Quercetin and a Simple Sensitive Assay for Determination of Superoxide Dismutase.** Biochem. Int. -1989.-Vol.19, -P.1117-1124.

JAFFE, E. K. **Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry.** Journal of Bioenergetic Biomenbranes, v. 27, p. 169-179, 1995.

JÚNIOR, A. A; CHIARELLO, P. G; BERNARDES, M. S; VANNUCCHI, H. **Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E.** Medicina, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, 1998.

LUCHINI, L.; AVENDAÑO, T. **Primeros resultados de cultivo de un pez de aguas calidas (Rhamdia sapo) con fines de producción y consumo humano.** Revista Argentina de Producción Animal, v. 4, n. 5, p. 621-629, 1985.

MCCORMICK, D.B; & GREENE, H.L. **Vitamins: ascorbic acid.** In: Burtis, C.A. & Ashwood, E.R. (eds.). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2. ed. Filadélfia: W.B. Saunders, 1994. p. 1311-6.

MODESTO, K.A; MARTINEZ, C.B.R. **Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish Prochilodus lineatus.** Chem. v. 78, p. 294-299. 2010.

MONTEIRO, D.A; ALMEIDA, J.A; RANTIN, F.T; KALININ, A.L. **oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorus insecticide folisuper 600 (methyl parathion).** Comp. Biochem. Physiol C, v. 143, p. 141-149, 2006.

MOON, T, W; **Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?** Comparative Biochemistry and Physiology Part B 129 Ž2001. 243-249.

MOOTER, G; **utilização de fontes de energia não protéica por alevinos de jundiá (Rhamdia quelen).** Universidade Federal de Santa Catarina, Trabalho de conclusão de curso. Defendido e aprovado dia 21 de novembro de 2007.

MINICK, M. C; CHAVIN, W. **Effects of alloxan, streptozotocin or d-mannoheptulose upon serum free fatty acid and serum glucose levels in Goldfish, Carassius auratus L.** Comp. Biochemi. Physiol, v. 42B, p. 367-376, 1972.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGY, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** Anal. Biochem. 95 (1979), 351-358.

ORUÇ, E; SEVGILER, T; ÜNER, N. **Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-d and azinphosmethyl.** Comp. Biochem. Physiol C, v. 137, p. 43-51. 2004.

OLSEN, A. S; SARRAS Jr, M. P; INTINE, R. V. **Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus.** Wound Repair and Regeneration, v. 18, p. 532-542, 2010.

PATRICK, L. **Lead toxicity part II: the role of free radical damage and use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicology.** Alternative Medicine Review, v. 11, p. 114-127, 2006.

PEROTTONI, J; LOBATO, L. P; SILVEIRA, A; ROCHA, J. B; EMANUELLI, T. **Effects of Mercury and selenite on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity and on selected oxidative stress parameters in rats.** Environmental Research, v. 95 (2), p. 166-173, 2004.

PIVETTA, J. A. **Efeitos tóxicos do etanol e sua relação com o estresse oxidativo.** Dissertação de mestrado, UFSM, Pós-graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica, 2005.

REIS, J.S; VELOSO, C.A; MATTOS, R.T; PURISH, S; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. **Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes.** Arq. Bras Endocrinol Metabol . 2008;52(7): 1096-105.

ROSS, D; MOLDEUS, P. **Antioxidant defense systems and oxidative stress.** In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation.** 1th ed. Boca Raton, 1991;151-70.

SALGUEIRO, A.C.F; LEAL, C.Q; BIANCHINI, M.C; PRADO, I.O; MENDEZ, A.S.L; PUNTEL, R.L; FOLMER, V; SOARES, F.A; ÁVILA, D.A; PUNTEL, G.O. **The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations.** Journal of Ethno pharmacology, June 2013, v. 148, p. 81-87.

SALGUEIRO, A. C. F; FOLMER, V; PIRES, M; MENDEZ, A. S. L; ZEMOLIN, A. P. P; POSSER, T; FRANCO, J; PUNTEL, R. L; PUNTEL, G. O. **Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Article ID 8902954, 2016.

SASSA, S. **Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay.** Enzyme 28(1982)133-145

SAYEED, I; PARVEZ, S; PANDEY, S; BIN-HAFEEZ, B; RIZWANUL, H; RAISSUDIN, S. **Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in fresh fish, *Channa punctatus* Blonch.** Ecotoxicol. Environ. Safety, v. 56, p. 295-301. 2003.

SILVEIRA, U. S; LOGATO, P. V.; PONTES, E. C. **Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes.** Revis. Eletro. Nutritime, v. 6, nº. 1, p. 817-836, 2009.

SOUZA, J. B; ROCHA, J. B .T; NOGUEIRA, C. W; BORGES, V. C; KAIZER, R. R; MORSCH, V . M; DRESSLER, V. L; MARTINS, A. F; FLORES, E. M. M; SCHETINGER, M. R. C. **Delta-aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism.** Clinical Biochemistry, v. 40, p. 321-325, 2007.

TAKASU, N; KOMIYA, I; ASAWA, T; NAGASAWA, Y; YAMADA, T. **Streptozotocin and alloxan-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a mediator for DNA fragmentation .** Diabetes. 1991, 40 (9), 1145-5.

UHLIG, S; WENDEL, A. **The physiological consequences of glutathione variations.** Life Sci, v. 51, p. 1083-1094, 1992.

VIANNA, R. M. J; **O papel dos receptores B<sub>1</sub> das cininas na diabete causada por estreptozotocina: uma abordagem funcional e autoradiográfica.** Tese apresentada para a obtenção do titulo de doutor em farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, 2003.

WILSON, R. P.; POE, W.E. **Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono and disaccharides as anergy sources.** J. Nutr. V. 117, p. 280-285, 1987.