

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de Especialização em Biotérios

Tamiris de Souza Bezerra

**Caracterização da colônia de ratos Goto-Kakizaki (GK) do Instituto
Butantan: avaliação biométrica e glicêmica**

São Paulo
2023

Tamiris de Souza Bezerra

**Caracterização da colônia de ratos Goto-Kakizaki (GK) do Instituto Butantan:
avaliação biométrica e glicêmica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotérios do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotérios.

Orientador (a): Dra. Mariana Cruz Lazzarin

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Bezerra, Tamiris de Souza

Caracterização da colônia de ratos Goto-Kakizaki (GK) do Instituto Butantan: avaliação biométrica e glicêmica / Tamiris de Souza Bezerra ; orientador(a) Mariana Cruz Lazzarin - São Paulo, 2023.

35 p.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios.

1. Diabetes mellitus tipo 2 2. Ratos Goto-Kakizaki. 3. Biometria. 4. Glicemia I. Lazzarin, Mariana Cruz . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação Lato Sensu - Especialização em biotérios. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Tamiris de Souza Bezerra, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotérios, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

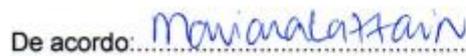
Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 06 de fevereiro de 2023.



.....
aluno(a): Tamiris de Souza Bezerra



De acordo:
Orientador(a): Dra. Mariana Cruz Lazzarin

RESUMO

BEZERRA, Tamiris de Souza. **Caracterização da colônia de ratos Goto-Kakizaki (GK) do Instituto Butantan**: avaliação biométrica e glicêmica. 2023. 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotérios) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Introdução: Os modelos experimentais para *diabetes mellitus* (DM) são instrumentos relevantes para a compreensão da doença, sendo fundamentais na exploração, caracterização de sua fisiopatologia e avaliação de novos agentes terapêuticos. O rato Goto-Kakizaki (GK) é um importante modelo experimental para investigar complicações relacionadas ao DM tipo 2 sem obesidade e suas consequências fisiológicas. Ele apresenta hiperglicemia moderada, secreção de insulina induzida por glicose prejudicada, intolerância à glicose, resistência insulínica, aumento dos triglicerídeos plasmáticos, glicotoxicidade hepática e inflamação crônica. **Objetivo:** Caracterizar aspectos biométricos, clínicos e metabólicos da colônia de ratos GK criados no Biotério Central do Instituto Butantan, ao longo dos 3 primeiros meses de vida dos animais. **Métodos:** Foram utilizados 24 ratos GK e 24 ratos Wistar, sendo 12 machos e 12 fêmeas de cada linhagem, com 28 dias de idade. Durante o período experimental, os animais foram pesados e mensurados semanalmente, bem como o consumo de água e alimento. Quinzenalmente, até os 84 dias idade, foi feito exame de glicemia. **Conclusão:** os ratos Goto-Kakizaki possuem peso e tamanho corporal inferior ao dos ratos Wistar, tanto machos quanto fêmeas. Os Wistar tiveram um consumo hídrico e alimentar por peso vivo inferior ao dos GK, assim como valores glicêmicos, porém tiveram valores de IMC superiores, o que confirma a característica dos ratos GK de animais diabéticos não obesos, no entanto não deve ser desconsiderado o tecido adiposo visceral. Importante a caracterização dos animais realizada e publicada internamente por cada biotério

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 2. Ratos Goto-Kakizaki. Biometria. Glicemia.

ABSTRACT

BEZERRA, Tamiris de Souza. **Characterization of the Goto-Kakizaki (GK) rat colony at Instituto Butantan**: biometric and glycemie. 2023. 35 p. Monograph (Specialist in bioterium) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Introduction: Experimental models for diabetes mellitus (DM) are relevant instruments for understanding the disease, being fundamental in the exploration, characterization of its pathophysiology and evaluation of new therapeutic agents. The Goto-Kakizaki (GK) rat is an important experimental model to investigate complications related to type 2 DM without obesity and its physiological consequences. He presents with moderate hyperglycemia, impaired glucose-induced insulin secretion, glucose intolerance, insulin resistance, increased plasma triglycerides, hepatic glucotoxicity, and chronic inflammation. **Objective:** To characterize biometric, clinical and metabolic aspects of the colony of GK rats reared in the Central Animal Facility of the Butantan Institute, during the first 3 months of the animals' lives. **Methods:** 24 GK rats and 24 Wistar rats, 12 males and 12 females of each strain, aged 28 days, were used. During the experimental period, the animals were weighed and measured weekly, as well as the consumption of water and food. Every two weeks, up to 84 days of age, a blood glucose test was performed. **Conclusion:** Goto-Kakizaki rats have lower body weight and size than Wistar rats, both male and female. The Wistar had a lower water and food intake per live weight than the GK, as well as glycemie values, but had higher BMI values, which confirms the characteristic of GK rats from non-obese diabetic animals, however the tissue should not be disregarded visceral adipose. It is important to characterize the animals carried out and published internally by each vivarium

Keywords: Type 2 diabetes mellitus. Goto-Kakizaki rats. Biometrics. Glycemia.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de peso	18
Gráfico 2 – Média de comprimento naso-anal	19
Gráfico 3 – Média de comprimento caudal	20
Gráfico 4 – Média de circunferência torácica	21
Gráfico 5 – Média de circunferência Abdominal	22
Gráfico 6 – Índice de Massa Corporal	23
Gráfico 7 – Índice de Lee	24
Gráfico 8 – Consumo hídrico médio por gaiola.....	25
Gráfico 9 – Consumo hídrico médio por peso vivo	25
Gráfico 10 – Consumo alimentar médio por gaiola.....	26
Gráfico 11 – Consumo alimentar médio por peso vivo	27
Gráfico 12 - Glicemia	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Diabetes Mellitus tipo 2	9
1.2 Ratos Goto-Kakizaki	10
1.3 Biometria	11
1.4 Consumo hídrico e alimentar	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 Animais e formação dos grupos experimentais	14
3.2 Curva de Crescimento	14
3.3 Consumo hídrico e alimentar	15
3.4 Coleta de sangue	15
4 RESULTADOS	17
4.1 Curva de Crescimento	17
4.2 Índice de Massa Corporal	22
4.3 Índice de Lee	23
4.4 Consumo Hídrico e Alimentar	24
4.5 Glicemia	27
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus tipo 2

O *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) é um problema de saúde pública que atinge o mundo inteiro, cuja incidência aumenta a cada ano. No ano 2000, a estimativa era de 151 milhões de adultos vivendo com diabetes. Em 2020, esse número chegou a 463 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos e em 2040, estima-se que existam 642 milhões de diabéticos no mundo (CHO *et al.*, 2018). Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil é o 5º país em incidência mundial de diabetes, atrás de da China, Índia, Estados Unidos e Paquistão.

Esse aumento contínuo deve-se principalmente ao sedentarismo e aos hábitos alimentares baseados em alimentos industrializados, açúcar e gorduras saturadas (KUWABARA *et al.*, 2017), além de fatores genéticos (KUBOTA *et al.*, 2013). O DM2 é caracterizado pelo estado de hiperglicemia em jejum, pela resistência à insulina no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado e pela secreção insuficiente de insulina pelas células β do pâncreas (KUBOTA, 2013; KUWABARA, 2017; ROMANCIUC, 2017). A inflamação crônica e a ativação do sistema imunológico estão relacionadas com o desenvolvimento da resistência insulínica e da morte das células β pancreáticas, fazendo com que o DM2 seja considerado uma doença de caráter inflamatório (ROMANCIUC, 2017).

No ocidente, a obesidade está fortemente associada ao desenvolvimento de complicações metabólicas que levam ao DM2 (KUWABARA *et al.*, 2017). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, o excesso de peso acomete um em cada dois adultos brasileiros e as doenças crônicas são a principal causa de morte entre adultos. Já na Ásia, 70% das pessoas com DM2 são consideradas magras (SERDAN *et al.*, 2021). Com isso, faz-se necessário o desenvolvimento e a caracterização de modelos experimentais para DM2 associados ou não a obesidade, para que seja possível a compreensão do DM2 e suas implicações tanto em pessoas obesas como magras.

Os modelos experimentais para *diabetes mellitus* são ferramentas indispensáveis para a compreensão da doença, sendo fundamentais na exploração, caracterização de sua fisiopatologia e avaliação de novos agentes terapêuticos (MIGUEL, 2017; AL-AWAR *et al.*, 2016). Há diferentes modelos para diabetes que

podem ser caracterizados como modelo espontâneo, transgênico e induzido através de administração de fármacos ou dieta. (MIGUEL, 2017)

Alguns exemplos de modelos genéticos são: o rato *BioBreeding Diabetes-Prone* (BB), um modelo de diabetes autoimune espontânea derivado de ratos *Wistar outbred*; o rato LEW 1AR1 que corresponde a um modelo de diabetes tipo 1 autoimune espontânea; camundongo *non obese diabetic* (NOD), modelo comumente utilizado para estudos de doenças autoimunes, como a DM1; camundongo AKITA, modelo derivado do C57BL/6NSlc através de mutação espontânea no gene de insulina, resultando em DM1; e os ratos Goto-Kakizaki (GK), que desenvolvem hiperglicemia leve e são considerados um modelo não obeso de DM2 (AL-AWAR *et al.*, 2016; PANDEY *et al.*, 2020). Nos modelos de diabetes quimicamente induzidos ocorre a destruição seletiva das células β pancreáticas, através de administração de substâncias como a aloxana e a estreptozotocina (STZ) (MIGUEL, 2017; PANDEY *et al.*, 2020)

1.2 Ratos Goto-Kakizaki

Os ratos Goto-Kakizaki (GK) são modelos experimentais obtidos através da reprodução seletiva de ratos Wistar não diabéticos com leve intolerância à glicose (PEREIRA *et al.*, 2021). Com início em 1973, a obtenção da linhagem baseou-se na hipótese de que casais de ratos Wistar com leve intolerância à glicose podem gerar descendentes com graus mais elevados de intolerância. A seleção e o acasalamento dos ratos com elevados valores de glicemia foram repetidos por 10 gerações até o desenvolvimento da linhagem de ratos GK com diabetes espontânea a partir de ratos Wistar (GOTO *et al.*, 1981).

Esses animais são caracterizados pelo desenvolvimento do DM2 sem se tornarem obesos, além de apresentarem hiperglicemia moderada, secreção de insulina induzida por glicose prejudicada, intolerância à glicose, resistência insulínica, aumento dos triglicerídeos plasmáticos, glicotoxicidade hepática e inflamação crônica (SERDAN *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2021).

Segundo Seïça (2003), a hiperglicemia dos ratos GK surge após quatro semanas de vida e mantém-se estável ao longo da vida. Já a intolerância à glicose ocorre desde a primeira semana de vida

No GK, o DM2 também está associado à outras complicações como neuropatia diabética, retinopatia diabética e nefropatia diabética (KUBOTA *et al.*, 2013). Sendo assim, o GK é um importante modelo para investigar complicações relacionadas ao DM2 sem obesidade e suas consequências fisiológicas (SERDAN *et al.*, 2021).

Diversas colônias de ratos GK vêm sendo mantidas em diferentes laboratórios pelo mundo e embora os ratos das diversas colônias mantenham a característica de hiperglicemia, outros aspectos têm se mostrado diferentes, como a degeneração das células β do pâncreas, a secreção de insulina e seu metabolismo, além de aspectos genéticos (PORTHA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015). Diante disso, esse projeto visa realizar uma caracterização inicial da colônia de ratos GK do Instituto Butantan através do acompanhamento da curva de crescimento, do consumo hídrico e alimentar e dos valores glicêmicos

1.3 Biometria

A curva de crescimento é uma ferramenta comumente utilizada nos biotérios de produção com o intuito de se estabelecer uma relação real do peso x idade ao longo do desenvolvimento físico dos animais (MOREIRA, 2012). Consiste em acompanhar semanalmente o peso de uma amostra de animais da colônia desde o nascimento até a idade reprodutiva. Alterações significativas nesta relação (peso x idade) ao longo do tempo devem ser avaliadas, pois indicam mudanças no perfil fenotípico da colônia que podem impactar os estudos desenvolvidos com os animais. (MOREIRA, 2012)

O desenvolvimento de uma linhagem específica muda conforme o laboratório, vários fatores podem influenciar nessa diferença, como a nutrição do animal, a temperatura, sistema claro/escuro e até mesmo o bioterista pode influenciar selecionando os animais pelo biotipo no momento do acasalamento desses animais. No Taconic, por exemplo, a média de peso dos ratos GK com 4 semanas de idade é de 70g para fêmea e 80g para macho e de 260g e 350g, fêmeas e machos respectivamente, com 16 semanas de idade. Enquanto no CLEA Japan, a média é de aproximadamente 50 a 70g com 4 semanas de idade e com 16 semanas os machos não chegaram a 350g e as fêmeas ficaram próximas de 200g.

1.4 Consumo hídrico e alimentar

Outro aspecto que deve ser avaliado no dia a dia de um biotério de criação é consumo hídrico e alimentar. Em um biotério a ração pode ser ofertada à vontade ou com uma dieta específica dependendo do objetivo. Já a água é disposta em bebedouros e trocada duas vezes por semana. O controle desses fatores é importante para o bem-estar do animal e de seu completo desenvolvimento.

A avaliação do consumo hídrico e alimentar nos permite compreender as especificidades de cada linhagem ou espécie. Estudos mostram que o consumo do GK é maior comparado ao grupo controle (UETA *et al.*, 2005; ALAMEDDINE *et al.*, 2015) chegando a 15-20% maior (Alameddine *et al.*, 2015), confirmando alguns dos sinais clínicos do diabetes que é a polidipsia e polifagia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar aspectos biométricos, glicêmicos e de consumo alimentar e hídrico da colônia de ratos Goto-Kakizaki mantida no Biotério Central do Instituto Butantan, ao longo dos 3 primeiros meses de vida dos animais.

2.2 Específicos

- a) Mensurar a curva de crescimento, a evolução ponderal, o índice de Massa Corporal (IMC) e a circunferência torácica e abdominal de ratos machos e fêmeas das linhagens Goto-Kakizaki e Wistar ao longo dos 3 primeiros meses de vida;
- b) Avaliar o consumo hídrico e alimentar semanal de ratos machos e fêmeas das linhagens Goto-Kakizaki e Wistar no 1º, 2º e 3º mês de vida;
- c) Analisar quinzenalmente os parâmetros da glicemia de ratos machos e fêmeas das linhagens Goto-Kakizaki e Wistar nos 3 primeiros meses de vida.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e formação dos grupos experimentais

Aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolado sob o número 4072050822), foram utilizados 24 ratos da linhagem Goto-Kakizaki e 24 da linhagem Wistar, sendo 12 machos e 12 fêmeas. As matrizes de GK foram importadas de Taconic Biosciences para reprodução no Biotério Central do Instituto Butantan.

Durante o período experimental, os animais ficaram alojados em microisoladores dentro das dependências do Biotério Central. Os animais foram mantidos em temperatura controlada a 22/24°C, ciclo claro-escuro de 12 horas e acesso livre à comida e água. Após o desmame (28 dias de idade), os ratos foram alojados em trios, por sexo e linhagem.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: Controle macho, Controle fêmea, Goto-Kakizaki macho e Goto-Kakizaki fêmea (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Descrição dos grupos experimentais que foram utilizados no projeto

Linhagem	Nome do grupo	“N” amostral
Ratos Wistar	Wistar fêmea	12
	Wistar macho	12
Ratos Goto-Kakizaki	Goto-Kakizaki fêmea	12
	Goto-Kakizaki macho	12

Fonte: próprio autor, 2022.

3.2 Curva de Crescimento

Para o acompanhamento da curva de crescimento, todos os ratos foram pesados e medidos semanalmente, do desmame (28 dias) até 84 dias de idade.

A pesagem foi realizada utilizando balança digital eletrônica. A mensuração dos animais foi feita com fita métrica inextensível e foram realizadas medidas do comprimento naso-anal, comprimento da cauda, circunferência torácica e circunferência abdominal.

Ao final do experimento, foram calculados o índice de massa corporal (IMC), a partir da razão do peso corporal sobre o comprimento naso-anal, aplicando a seguinte fórmula: $IMC = \text{Peso (g)} / \text{comprimento naso-anal (cm)}$ (NOVELLI *et al.*, 2007) e o índice de Lee, calculado pela razão entre a raiz cúbica do peso corporal (g) e o comprimento naso-anal (cm) do animal (STEPHENS, 1980).

3.3 Consumo hídrico e alimentar

A oferta de ração peletizada irradiada para ratos e água esterilizada será *ad libitum*. A ração foi pesada e ofertada uma vez por semana.

A partir dos 28 dias até 84 dias de idade dos ratos, o consumo hídrico e alimentar foi avaliado através do cálculo da diferença semanal entre a quantidade de água e comida ofertadas e a quantidade não consumida. Para isso, a cada abastecimento de água e ração, as quantidades utilizadas para reposição e as quantidades não consumidas pelos ratos foram pesadas para avaliação do consumo semanal.

3.4 Coleta de sangue

Para melhor avaliação do comportamento glicêmico, as coletas de sangue foram feitas a cada 15 dias a partir do 1º mês de idade até o 3º mês de idade. Os ratos se desenvolvem em um curto espaço de tempo, a puberdade se dá aos 30 dias de idade e a maturidade sexual entre 50 e 60 dias. As coletas foram planejadas para a identificação de alterações entre os períodos do desmame e a maturação sexual e outras alterações que podem acontecer durante a vida adulta. O volume de sangue coletado foi inferior a 1% do peso corporal do animal (NOVELLI *et al.*, 2007), para que o mesmo recuperasse sua volemia antes da próxima coleta, que foi feita através de punção venosa da veia safena, sempre intercalando as coletas entre a veia do membro inferior direito e membro inferior esquerdo. Os animais foram previamente anestesiados com isoflurano (4% indução e 2,5% manutenção). Foram utilizados agulhas (30G – 0,30mm), seringas de 1 ml, frascos plásticos contendo 1 µL de Na₂-EDTA e micropipeta.

Para a coleta da veia safena, o animal foi colocado em decúbito lateral e foi feita a tricotomia da região onde fica localizada a veia no membro inferior do rato e sua

assepsia com álcool 70° INPM. Logo após a aplicação do garrote, a veia foi perfurada com a agulha, as gotas de sangue formadas foram coletadas com micropipetas e transferidas para uma tira teste de glicose, para que a concentração glicêmica fosse determinada pelo Medidor de glicose Accu-Chek® Active

4 RESULTADOS

4.1 Curva de Crescimento

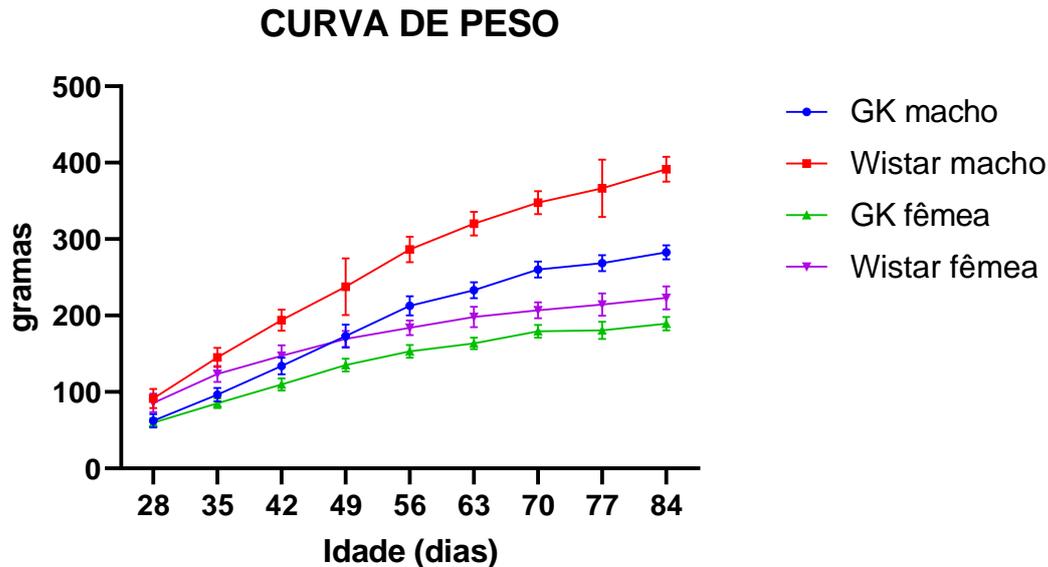
A evolução do peso corporal dos animais dos diferentes grupos ao longo do período experimental está expressa do gráfico 1.

A avaliação da curva de crescimento mostrou diferença das médias de peso corporal tanto entre as duas linhagens como entre os sexos, permanecendo com o avanço da idade.

Os machos de Goto-Kakizaki iniciaram a curva de peso com uma média de 62 gramas aos 28 dias de vida, diferentemente dos Wistar machos que aos 28 dias possuíam 91 gramas, representando uma diferença de 32% de massa corporal. Com 84 dias de vida, os ratos machos Goto-Kakizaki tiveram uma média de peso corporal de 283 gramas, enquanto os ratos Wistar machos apresentaram uma média de 391 gramas, representando 28% a mais. Ao longo do experimento, os ratos machos Goto-kakizaki tiveram média de peso corporal 29% menor do que os ratos Wistar machos.

Já as fêmeas de Goto-Kakizaki possuem uma curva de peso mais atenuada, com uma média de peso aos 28 dias de vida de 60 gramas e aos 84 dias de vida de 189 gramas. As fêmeas de Wistar aos 28 tiveram média de peso de 86 gramas e aos 84 dias de vida de 223 gramas. A diferença de massa corporal entre as ratas das linhagens Goto-Kakizaki e Wistar variou ao longo do experimento. No início do período experimental, a diferença foi de 31%, já no final do período experimental essa diferença foi de apenas 15%.

Gráfico 1 – Curva de peso



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação da curva de peso entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade.

A média de comprimento naso-anal dos ratos de ambas as linhagens e sexo ao longo do experimento está expresso no gráfico 2.

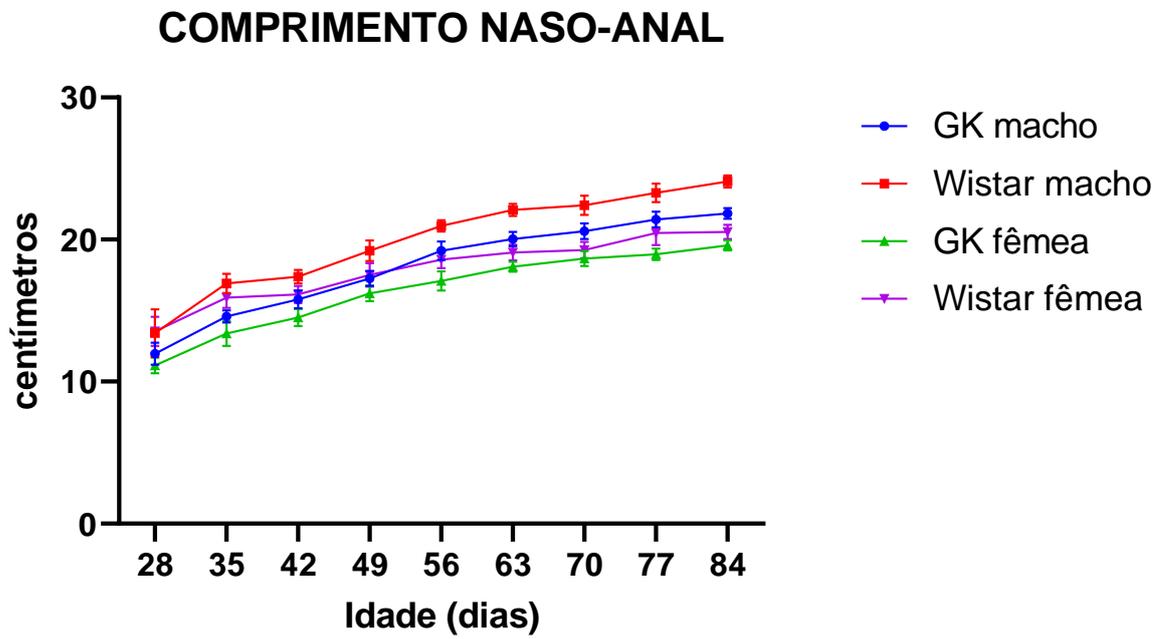
Inicialmente os ratos GK machos apresentaram comprimento naso-anal de 12 centímetros e os Wistar machos 13,4 centímetros. Já aos 84 dias de idade, a média de comprimento naso-anal dos ratos GK e Wistar foi respectivamente 21,8 e 24,1 centímetros. As fêmeas de GK aos 28 dias de vida tiveram uma média de 11,1 centímetros e aos 84 dias de vida 19,6 centímetros. Enquanto as fêmeas Wistar apresentaram comprimento naso-anal inicial de 13,5 centímetros e final de 20,5 centímetros.

Comparando as linhagens GK e Wistar foi possível observar uma diferença de 15% entre o comprimento naso-anal das fêmeas de GK e Wistar nos três primeiros períodos, já nos períodos de 49 a 84 dias de idade, essa diferença vai para 6%. Entre os machos a diferença é de 11% entre 28 e 49 dias de idade e de 9% entre 56 e 84 dias.

Entre machos e fêmeas da linhagem Wistar, a diferença média observada no período experimental foi de 15%, porém aos 28 dias as fêmeas de Wistar apresentaram um comprimento igual ao dos machos, e após os 35 dias os machos

tiveram uma média maior. Já entre os machos e fêmeas da linhagem GK, a diferença foi em média de 9%, sendo os machos maiores do que as fêmeas em todas as idades.

Gráfico 2 – Média de comprimento naso-anal



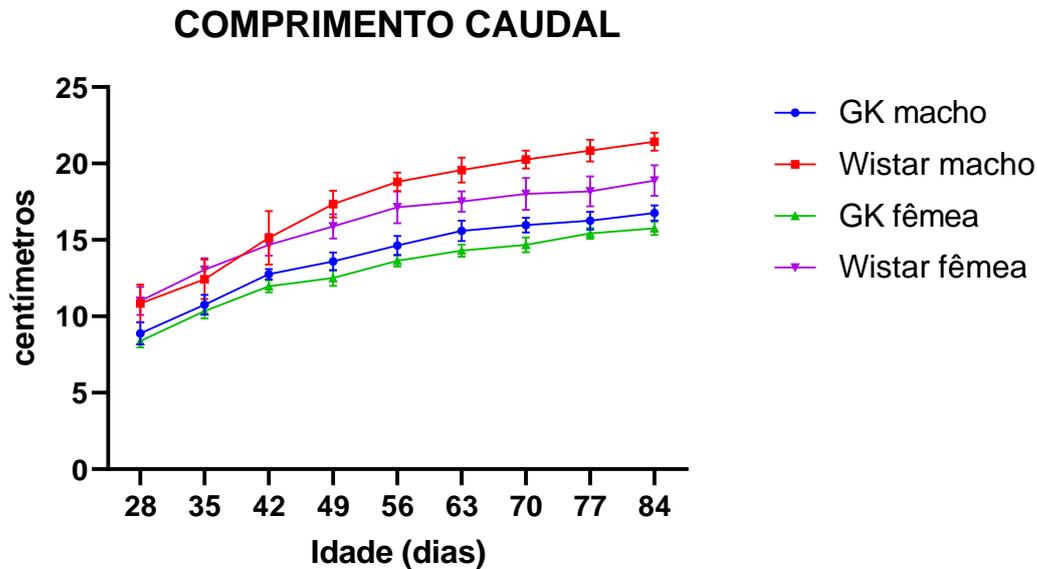
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação da média do comprimento naso-anal entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade.

O gráfico 3 corresponde aos valores referentes ao comprimento caudal.

Nesse parâmetro observou-se nos ratos Wistar machos maiores comprimentos de cauda quando comparado aos ratos machos da linhagem GK, e essa diferença foi observada ao longo do período experimental. Aos 28 dias de vida, os ratos Wistar machos apresentaram média de comprimento caudal de 10,9 centímetros, enquanto os ratos GK machos apenas 8,9 centímetros, e aos 84 dias de vida, os ratos Wistar machos tinham 21,4 centímetros e os GK machos 16,7 centímetros, sendo assim uma média 20% menor do que o comprimento caudal dos ratos Wistar.

Quanto as ratas fêmeas de ambas as linhagens, também houve diferença em relação à média do comprimento caudal ao longo do experimento. Aos 28 dias de vida, as fêmeas da linhagem Wistar tinham em média 11,0 centímetros enquanto as fêmeas da linhagem GK apenas 8,4 centímetros, e aos 84 dias de idade, as fêmeas Wistar apresentaram 18,9 centímetros e as fêmeas GK 15,8 centímetros, uma média 19% menor.

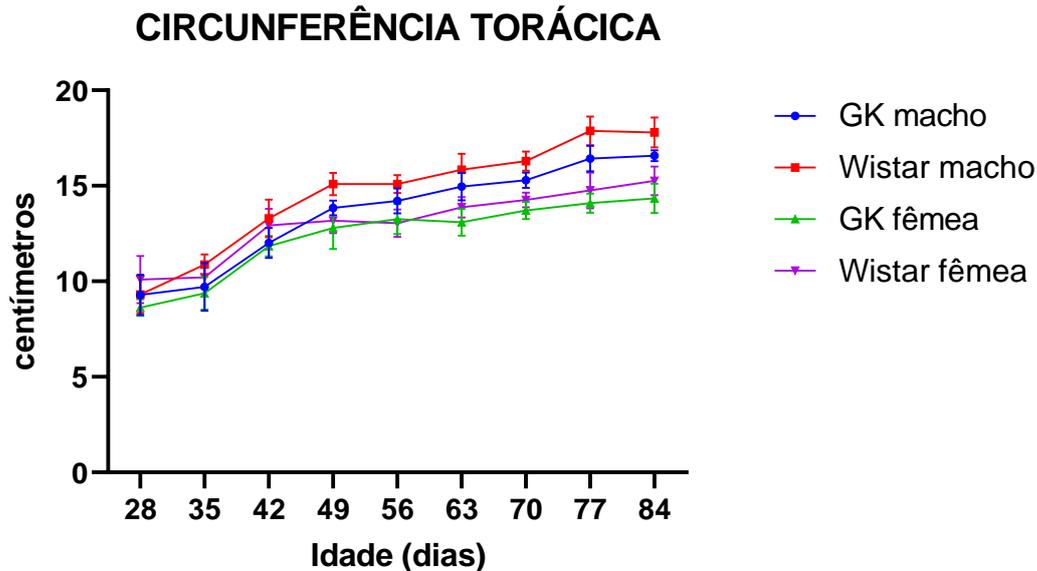
Gráfico 3 – Média de comprimento caudal

Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação da média do comprimento caudal entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade.

No que se refere a circunferência torácica, o gráfico 4 mostra que a média dos machos de Wistar nos períodos de 28 e 84 dias de idade foi de 9,3 e 17,8 centímetros. Já os machos da linhagem GK, aos 28 dias de idade apresentaram circunferência de 9,3 centímetros e aos 84 dias de vida, 16,6 centímetros. Observou-se que com 28 dias de vida, ambos possuíam o mesmo valor de circunferência torácica, nos 35 e 42 dias houve uma diferença de 11% e 10%, nos demais períodos o Wistar teve um valor de 6 a 8% maior do que os GK.

No caso das fêmeas, a maior diferença foi observada as ratas com 28 dias de idade. Nessa idade, as ratas Wistar apresentaram circunferência de 10,1 centímetros, enquanto as ratas GK 8,6 centímetros, uma diferença de 14%. Ao final do período experimental, as ratas Wistar possuíam circunferência torácica de 15,3 centímetros e as ratas GK 14,3 centímetros. Com exceção do período de 56 dias de idade, onde as GK tiveram um valor 2% maior do que as de Wistar, nos outros períodos as Wistar tiveram valores maiores entre 3 e 8%.

Gráfico 4 – Média de circunferência torácica

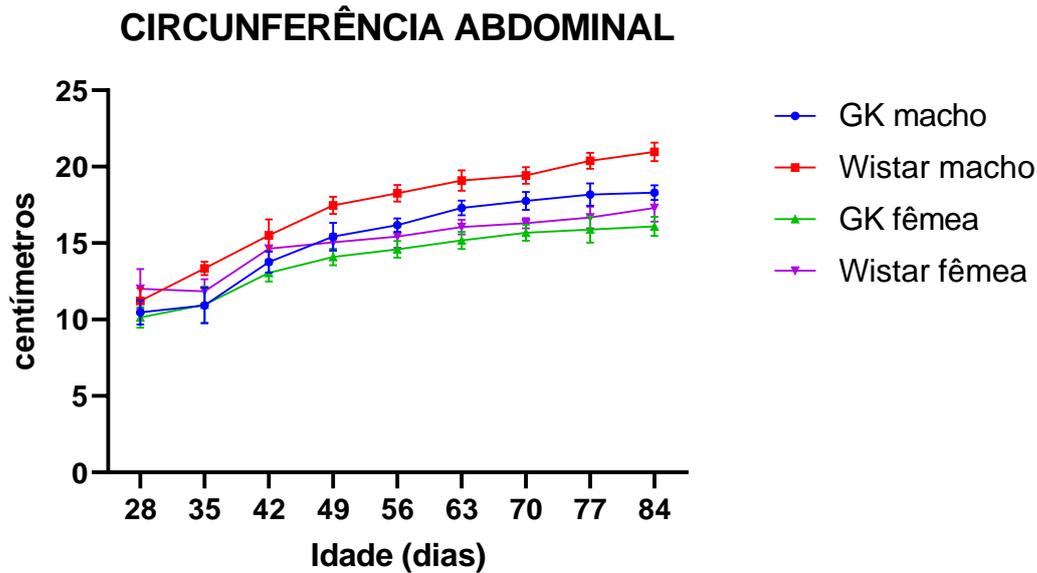
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação da média da circunferência torácica entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade.

O gráfico 5 mostra a média das medidas de circunferência abdominal avaliadas durante o experimento de cada linhagem e sexo. Os machos da linhagem GK apresentaram média de 10,5 e 18,3, aos 28 e 84 dias de idade, respectivamente, e os machos Wistar, 11,2 e 21,0 cm, respectivamente. A maior diferença observada ocorreu aos 35 dias de vida e, a menor aos 28 dias, com o Wistar apresentando uma circunferência abdominal 18% e 7% maior, respectivamente. O maior crescimento da circunferência dos machos GK foi aos 42 e 49 dias da vida, com aumento de 21 e 11% respectivamente. Nos ratos machos Wistar, o maior crescimento foi aos 35, 42 e 49 dias de idade, com 16, 14 e 11%, respectivamente, nos outros períodos o crescimento foi de 2 a 5%.

Quanto as fêmeas, aos 28 e 84 dias de idade, as ratas da linhagem GK tiveram uma média de 10,1 e 16,1 cm e as da linhagem Wistar de 12,0 e de 17,3 cm, respectivamente. As fêmeas de Wistar apresentaram circunferência 16% maior do que as GK aos 28 dias e 11% aos 42 dias de idade. Nos outros períodos houve uma diferença entre 4 e 7%, e as fêmeas da linhagem Wistar apresentaram maiores valores de circunferência abdominal em todas as idades.

Gráfico 5 – Média de circunferência Abdominal



Fonte: próprio autor, 2022.

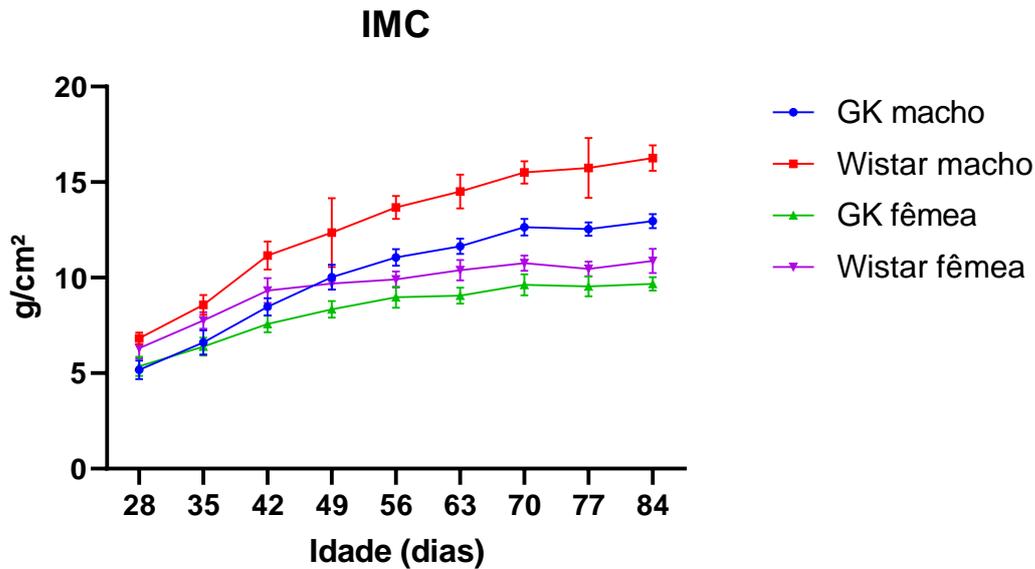
Legenda: Comparação da média a circunferência abdominal entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade.

4.2 Índice de Massa Corporal

O gráfico 6 mostra os índices de massa corporal (IMC) e percebe-se um aumento dos valores ao longo do experimento nas duas linhagens. Aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade, os GK machos tiveram um IMC de 5,2; 6,6; 8,5; 10,0; 11,1; 12,6; 12,5 e 13,0 g/cm³, e os Wistar machos de 6,8; 8,6; 11,2; 12,4; 13,7; 14,5; 15,5; 15,7 e 16,3 g/cm³. Sendo os Wistar com um IMC, em média, 21% maior do que os GK.

Já as fêmeas de GK tiveram um IMC de 5,4; 6,4; 7,6; 8,3; 9,0; 9,1; 9,6; 9,5 e 9,7 g/cm³ e as de Wistar, 6,3; 7,8; 9,3; 9,7; 9,9; 10,4; 10,8; 10,5 e 10,9 g/cm³, aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade, respectivamente, dando uma média de 13% maior do que as fêmeas de Goto-Kakizaki ao longo do experimento.

Gráfico 6 – Índice de Massa Corporal



Fonte: próprio autor, 2022.

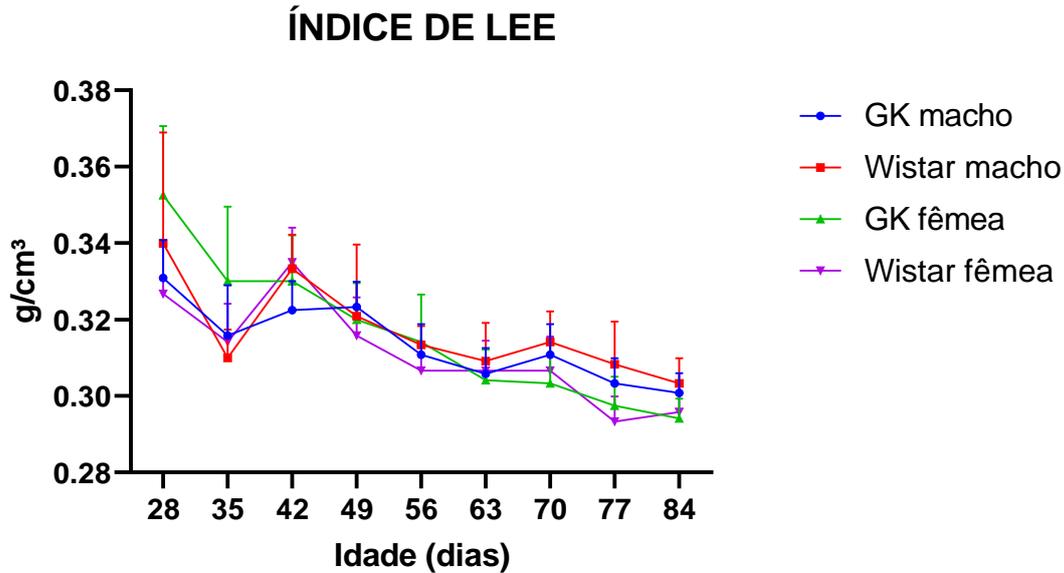
Legenda: Comparação do Índice de Massa Corporal entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade.

4.3 Índice de Lee

O índice de Lee (Gráfico 7) de todas as linhagens e sexo foi superior a 0,30 g/cm³ até os 56 dias de vida. A partir dos 63 dias as fêmeas da linhagem GK mantiveram o valor de 0,30 até os 77 dias de vida e aos 84 reduziu para 0,29 g/cm³. As fêmeas da linhagem Wistar apresentaram redução aos 77 e 84 dias, com valores de 0,29 e 0,30 g/cm³, respectivamente.

Os GK machos tiveram o índice de 0,30 g/cm³ aos 77 e 84 dias de vidas, enquanto os Wistar machos tiveram apenas aos 84 dias.

Gráfico 7 – Índice de Lee



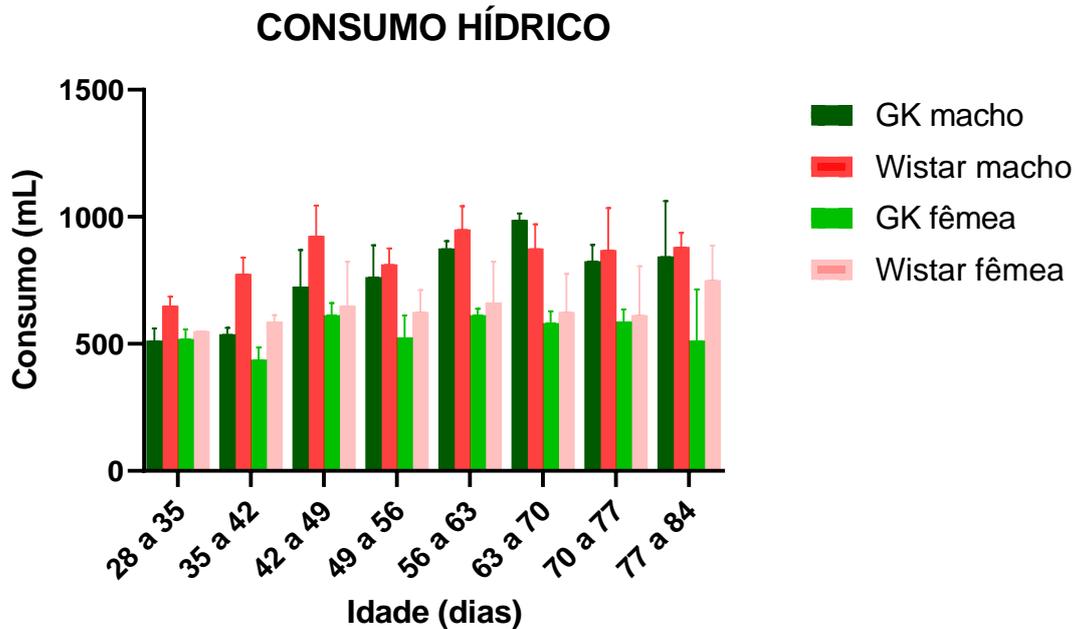
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação do Índice de Lee entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) aos 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias de idade.

4.4 Consumo Hídrico e Alimentar

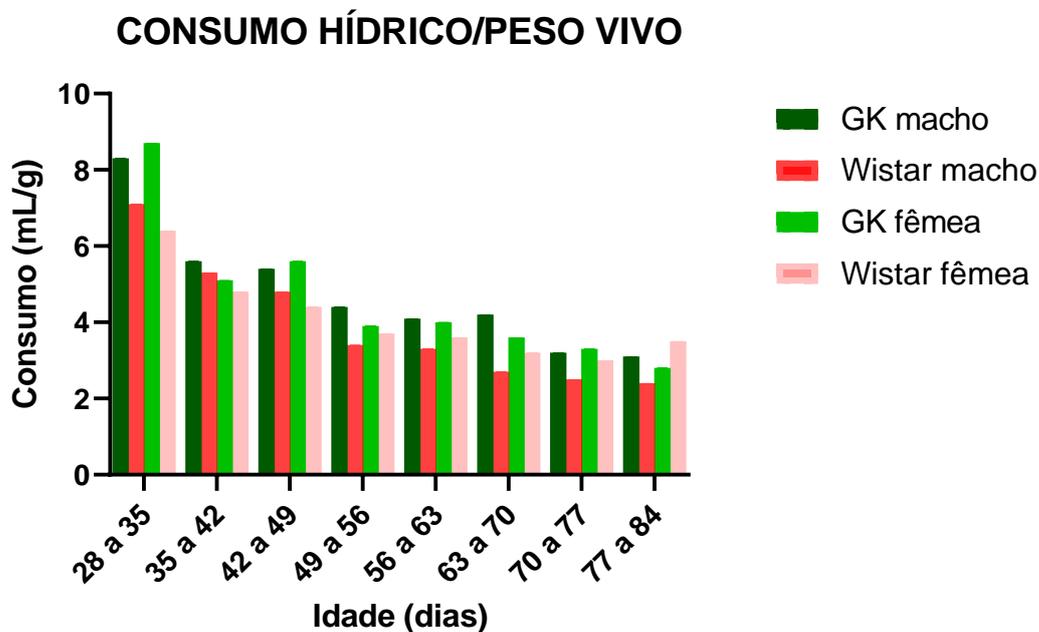
A média do consumo hídrico total expresso no gráfico 8 mostra que os ratos Wistar machos apresentaram maior consumo quando comparado aos ratos da linhagem Goto-Kakizaki. Esse padrão não se repetiu entre os dias 63 e 70, no qual ratos GK apresentaram maior consumo hídrico. As fêmeas de GK tiveram menor consumo por gaiola ao longo do experimento (Gráfico 8). Porém se for calcular o consumo por peso vivo (Gráfico 9), a média das fêmeas de Goto-Kakizaki são maiores na primeira semana, entre 28 a 35 dias de idade, com um consumo de 8,7 mL por grama de peso vivo (PV), entre os machos da mesma linhagem o consumo foi de 8,3 mL/g PV. Já os machos e fêmeas de Wistar tiveram uma média de consumo de 7,1 e 6,4 mL/g PV, respectivamente, entre 28 e 35 dias de idade.

A média de consumo por peso vivo foi maior entre os machos e fêmeas da linhagem GK em comparação com a média dos machos e fêmeas da linhagem Wistar, sendo superados apenas na semana de 77 a 84 dias pelas fêmeas de Wistar que consumiram 3,5 mL/ g PV.

Gráfico 8 – Consumo hídrico médio por gaiola

Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação do consumo hídrico médio por gaiola entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) nos períodos de 28 a 35, 35 a 42, 42 a 49, 49 a 56, 56 a 63, 63 a 70, 70 a 77 e 77 a 84 dias de idade.

Gráfico 9 – Consumo hídrico médio por peso vivo

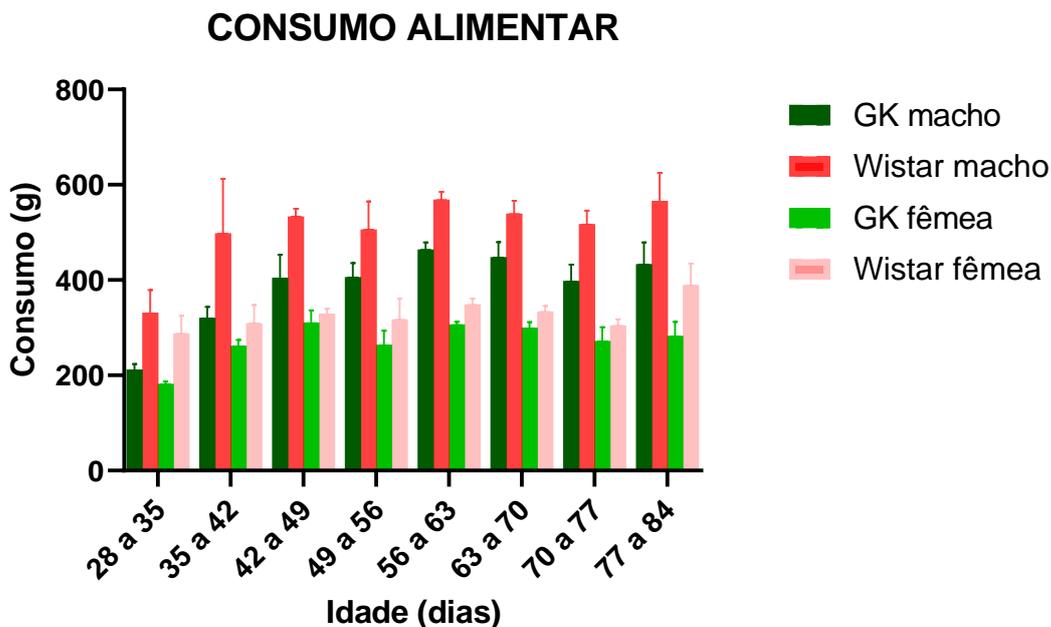
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação do consumo hídrico médio por peso vivo entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) nos períodos de 28 a 35, 35 a 42, 42 a 49, 49 a 56, 56 a 63, 63 a 70, 70 a 77 e 77 a 84 dias de idade.

Percebe-se também que o consumo hídrico por peso vivo reduziu ao longo da vida dos ratos analisados (Gráfico 9). Na semana de 28 a 35 dias de idade os machos e fêmeas de GK consumiram uma média de 8,3 e 8,7 mL/g PV, respectivamente, e os machos e fêmeas de Wistar consumiram 7,1 e 6,4 mL/g PV. Ao final do experimento, na semana de 77 a 84 dias, os machos e fêmeas de GK consumiram 3,1 e 2,8 mL/g PV e os machos e fêmeas de Wistar, 2,4 e 3,5 mL/g PV.

Com relação à média de consumo alimentar por gaiola (Gráfico 10) foi possível observar maior consumo nas gaiolas de ratos Wistar, enquanto as fêmeas de GK foram as que apresentaram menores valores em todas as idades analisadas. Na primeira semana, as fêmeas de Wistar tiveram uma média de consumo maior do que os machos da linhagem GK, porém na segunda semana superaram com uma média de 321g de ração por gaiola contra 310g de ração por gaiola de fêmeas da linhagem Wistar, permanecendo maior até o final do experimento.

Gráfico 10 – Consumo alimentar médio por gaiola



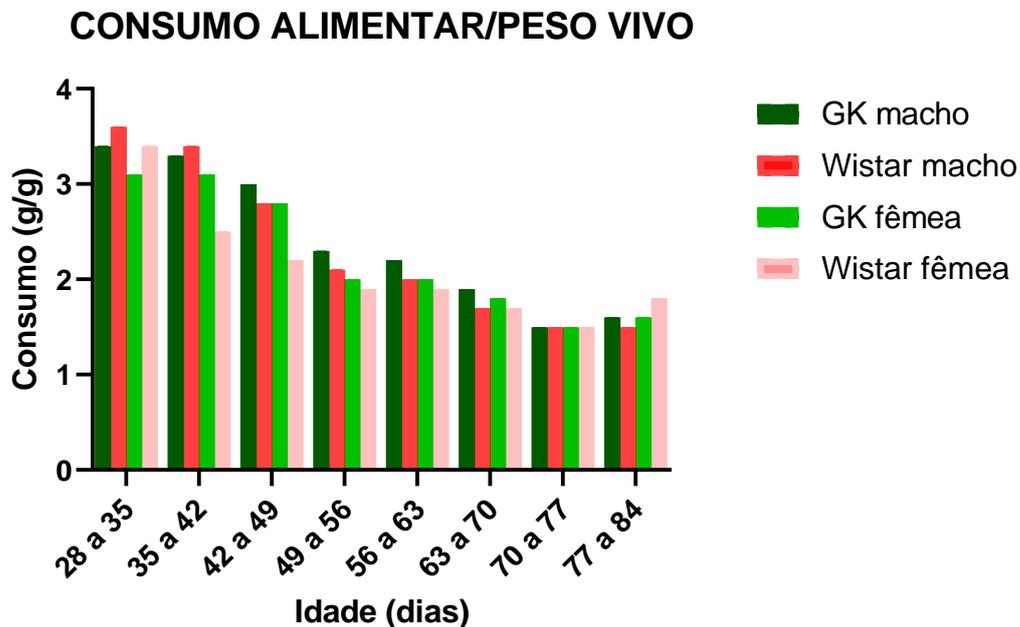
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação do consumo alimentar médio por gaiola entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) nos períodos de 28 a 35, 35 a 42, 42 a 49, 49 a 56, 56 a 63, 63 a 70, 70 a 77 e 77 a 84 dias de idade.

Já a análise da média de consumo alimentar por peso vivo (Gráfico 11) mostrou que os machos da linhagem Wistar foi maior apenas na primeira e segunda semana, com 3,6 e 3,4 g/g PV, com redução ao longo do experimento e consumo de 1,5 g/g PV na última semana de 77 a 84 dias de idade.

Na terceira semana, as fêmeas e machos de GK superaram os machos de Wistar com uma média de consumo de 2,8; 3,0 e 2,7 g/g PV, respectivamente. Na primeira semana, as fêmeas de Wistar apresentaram uma média de 3,4 g/g PV, igual ao dos machos da linhagem GK e maior do que a das fêmeas de GK (3,1 g/g PV). A partir da segunda semana, as fêmeas de rato Wistar tiveram um consumo inferior quando comparado aos outros grupos, porém houve um aumento na última semana do experimento com uma média de 1,8 g/g PV comparado a 1,5 g/g PV dos machos de Wistar e 1,6 g/g pv dos machos e fêmeas de GK.

Gráfico 11 – Consumo alimentar médio por peso vivo



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação do consumo alimentar médio por peso vivo entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) nos períodos de 28 a 35, 35 a 42, 42 a 49, 49 a 56, 56 a 63, 63 a 70, 70 a 77 e 77 a 84 dias de idade.

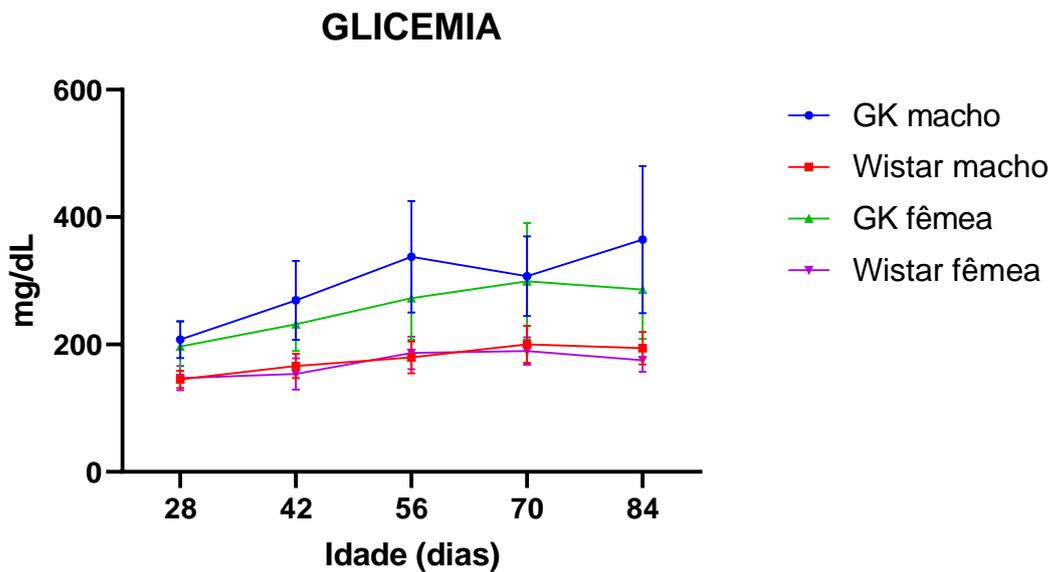
4.5 Glicemia

O gráfico 12 corresponde aos valores médios de glicemia de cada sexo e linhagem aos 28, 42, 56, 70 e 84 dias de idade. Os GK machos tiveram uma média

de 207, 269, 337, 307 e 364 mg/dL e as fêmeas 196, 231, 272, 299 e 286 mg/dL, respectivamente.

Já a glicemia dos Wistar machos foi de 145, 166, 180, 200 e 194 mg/dL, aos 28, 42, 56, 70 e 84 dias de idade, respectivamente e das fêmeas de 147, 154, 187, 190 e 175 mg/dL, no mesmo período.

Gráfico 12 - Glicemia



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Comparação da média glicêmica entre ratos Goto-Kakizaki machos e fêmeas e ratos Wistar machos e fêmeas (n=12) aos 28, 42, 56, 70, e 84 dias de idade.

Entre machos e fêmeas de GK, os machos tiveram uma média glicêmica maior do que as fêmeas ao longo dos períodos coletados. E entre os Wistar, houve uma diferença média de 6% entre machos e fêmeas, as fêmeas superaram os machos apenas aos 28 e 56 dias de idade.

5 DISCUSSÃO

A curva de peso mostrou que os ratos Goto-Kakizaki tanto machos (25-34%) quanto fêmeas (13-31%) tiveram menor massa corporal do que os ratos Wistar, semelhante ao trabalho de Seiça (2003), onde foi constatado um peso inferior de 15-35% nos machos e de 13-22% nas fêmeas comparado ao Wistar. Percebe-se também que houve uma diferença de peso comparado a outros trabalhos publicados, Friske (2017), por exemplo, publicou que as fêmeas Wistar com 60 dias de idade provenientes do Biotério da UNIJUÍ apresentaram uma média de peso corpóreo de 155g, enquanto as fêmeas Wistar do Biotério Central apresentaram um média de 198g aos 63 dias de idade. Dados do *Animal Resources Centre* (2017) mostram fêmeas de Wistar entre 56 a 84 dias de vida com peso corpóreo entre 131 a 248g, enquanto no presente trabalho os valores de peso corpóreo das fêmeas nesse mesmo período foi de 184 a 223g. Isso demonstra a diferença que pode haver entre diferentes biotérios, independente da linhagem do animal.

Observou-se também que as fêmeas e machos da mesma linhagem tiveram pesos e medidas semelhantes aos 28 dias e foram se distanciando ao longo da vida, caracterizando o dimorfismo sexual. Apesar do peso ser maior, as fêmeas de Wistar superaram os machos no comprimento naso-anal e caudal e na circunferência torácica e abdominal. Enquanto os machos de GK superaram os valores das fêmeas da mesma linhagem tanto no peso quanto nas medidas.

Em dados públicos do laboratório Taconic (TACONIC, 2012-2014), a média de peso dos GK com 4 semanas de idade é de 70g para fêmeas e 80g para machos, já no CLEA Japan (CLEA JAPAN, s.d.), a média foi semelhante ao do Biotério Central do Instituto Butantan aproximadamente 50 a 70g no CLEAN Japan e de 60g no Instituto Butantan.

Com relação ao Índice de Massa Corporal (IMC), os GK demonstraram valores entre 5,2 a 13,0 g/cm² e os Wistar entre 6,3 a 16,3 g/cm². Apesar dos valores menores dos GK comparados aos do Wistar, muitos indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2 não obesa apresentam obesidade abdominal e aumento da massa gorda total, ou seja, pode haver mais tecido adiposo visceral e menos tecido adiposo subcutâneo (MENDES, 2013). Segundo Rodrigues (2011), a ultrassonografia pode ser utilizada para monitorar, indiretamente, locais de depósitos de gordura, o distanciamento entre o transdutor e o órgão a ser examinado aumenta devido os depósitos de gordura

subcutânea e intra-abdominal. Por ser um método não invasivo, é possível monitorar o tecido adiposo visceral ao longo do crescimento do animal em trabalhos futuros.

Considerando a definição de Bernardis e Patterson (1968) de que o Índice de Lee maior que 0,3 pode ser usado como indicador de excesso de gordura corporal, todos os animais deste trabalho possuem excesso de gordura corporal no início da vida. Pelos dados apresentados das linhagens Wistar e Goto-Kakizaki, os valores foram diminuindo ao longo da vida.

Os valores de glicemia dos Goto-Kakizaki foram 58% superiores aos do Wistar em média. Porém os ratos Wistar do Biotério Central mostraram valores maiores comparado a de outros locais. Friske (2017) cita que as fêmeas de Wistar do biotério da UNIJUÍ tiveram uma média de 73 mg/dL e outros biotérios apresentaram uma média de 108 mg/dL (DANTAS, 2006) e 85 mg/dL (SANTOS, 2010), no biotério do Instituto Butantan a média foi de 170 mg/dL entre as fêmeas e de 177mg/dL entre os machos. Lima *et al.* (2014) observa que a glicemia do Wistar pode variar entre 72 a 193 mg/dL em machos e entre 53 a 172 mg/dL em fêmeas. Os GK apresentaram uma média de 297 mg/dL (machos) e de 257 mg/dL (fêmeas), os valores aumentaram ao longo da idade. Pérez *et al.*(2011) observou fêmeas GK de 385g com glicemia de 195 mg/dL e Seiça (1999) cita que a hiperglicemia em jejum surgiu apenas na 6ª semana de vida e manteve estável desde então.

O consumo hídrico dos GK foi, em média, 17% maior do que os ratos Wistar e consumo alimentar foi de, em média, 5% maior. Confirmando outros estudos que mostram que o consumo do GK é maior comparado ao grupo controle (UETA *et al.*, 2005; ALAMEDDINE *et al.*, 2015) chegando a 15-20% maior (ALAMEDDINE *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que os ratos Goto-Kakizaki possuem peso e tamanho corporal inferior ao dos ratos Wistar, tanto machos quanto fêmeas. Os Wistar tiveram um consumo hídrico e alimentar por peso vivo inferior ao dos GK, assim como valores glicêmicos, porém tiveram valores de IMC superiores, o que confirma a característica dos ratos GK de animais diabéticos não obesos, no entanto não deve ser desconsiderado o tecido adiposo visceral.

Com os resultados concluímos também que as diferenças entre biotérios existem, independente da linhagem e origem do animal, confirmando a importância da caracterização dos animais realizada e publicada internamente por cada biotério.

REFERÊNCIAS¹

- ALAMEDDINE, A., FAJLOUN, Z., *et al.* The cardiovascular effects of salidroside in the goto-kakizaki diabetic rat model. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 249-257, 2015.
- AL-AWAR A, KUPAI K, VESZELKA M, *et al.* Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. **J Diabetes Res.**, v. 2016, ID 9051426, 2016.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE – Ministério da Saúde. 26/6 – Dia Nacional do Diabetes. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/26-6-dia-nacional-do-diabetes-4/>. Acesso em: 18 junho 2022.
- BRANCO, A.C.S.C., *et al.* Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, vol 15, n 2, p. 209-214, 2011.
- CHO, N. H. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271–281, 2018.
- DANTAS, J.A, *et al.* Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.
- FLORÊNCIO, R.S., CORATO, G. F., *et al.* Comparação de tiras reagentes para urinálise veterinária. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 79, 2016.
- FRISKE, Paula Taís, *et al.* Caracterização Do Perfil Biométrico E Glicêmico De Ratas Wistar Do Biotério Da UNIJUÍ. *In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 25, 2017, Ijuí. **Anais [...]**. Ijuí: UNIJUÍ, 2017
- TACONIC. Goto-Kakizaki. c2022 . Disponível em: <https://www.taconic.com/rat-model/goto-kakizaki>. Acesso em: 18 junho 2022.
- GOTO Y., KAKIZAKI M. The Spontaneous-Diabetes Rat: A Model of Noninsulin Dependent Diabetes Mellitus, **Proceedings of the Japan Academy**, v. 57, n. 10, p. 381-384, Series B, 1981.
- CLEA JAPAN. **GK/Jcl**, s.d. Disponível em: https://www.clea-japan.com/en/products/diabetes/item_a0130. Acesso em: 18 junho 2022.
- KUBOTA, M., *et al.* Rice protein ameliorates the progression of diabetic nephropathy in Goto–Kakizaki rats with high-sucrose feeding. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 7, p. 1211-1219, 2013.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

KUWABARA W.M.T., PANVELOSKI-COSTA A.C., *et al.* (2017) Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus? **PLoS One**, v. 12, n. 12: e0189622, 2017.

LIMA, C.M., *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia plena**. v. 10, n 03, 2014.

LIU T, LI H, *et al.* Comparative Genome of GK and Wistar Rats Reveals Genetic Basis of Type 2 Diabetes. **PLoS One**, v. 10, n. 11: e0141859, 2015.

MALAFAIA, AB, *et al.* Indução de obesidade com sacarose em ratos. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 17-21, 2013.

MENDES, CCM. **Insulino-resistência e inflamação: efeitos da restrição calórica em ratos idosos diabéticos tipo 2**. 2013. Tese (mestrado integrado em Medicina área científica de Fisiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

MIGUEL, B.S. **Diabetes Mellitus e seus modelos experimentais**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (especialista em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

MOREIRA, V.B. Manejo reprodutivo de camundongos. In: MATTARAIA, V. G. M.; OLIVEIRA, G.M. (Ed.). **Comportamento de Camundongos em Biotério**. São Paulo: SBCAL, 2012. p. 94-122.

NOVELLI, EL., DINIZ, YS., *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**, v. 41, n. 1, p. 111-9, 2007.

PANDEY S, DVORAKOVA MC. Future Perspective of Diabetic Animal Models. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 20, n. 1, p. 25-38, 2020.

PEREIRA, J.N.B., *et al.* Small intestine remodeling in male Goto–Kakizaki rats. **Physiological Reports**, v. 9, n. 3, p. 1-16, 2021.

PÉREZ CASTRILLÓN, JL, *et al.* Estudio estructural mediante micro-CT en fémur de ratas Goto-Kakizaki, modelo experimental de diabetes tipo 2 sin sobrepeso. **Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral**, v. 3, n. 2, p. 95-100, 2011.

PORTHA B, *et al.* The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. **Methods Mol Biol.**, v. 933, p. 125-59, 2012.

PORTHA, B., GIROIX, M.H., *et al.* The GK Rat: A Prototype for the Study of Non-overweight Type 2 Diabetes. In: Joost H.G. *et al.* **Animal Models in Diabetes Research**, **Methods in Molecular Biology**, v. 933. Springer Science+Business Media, p. 125-159, 2012.

RESTEL, T.I., PORFIRIO, L.C., SOUZA, A.S., SILVA, I.S. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 306-312, 2014.

RODRIGUES, L.F. **Métodos de Avaliação da Condição Corporal em Cães**. Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

ROMANCIUC, M. **Diabetes Mellitus Tipo 2 como Doença Inflamatória: anatomia, fisiopatologia e terapêutica**. 2017. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, 2017.

SACHETTO ATA, ROSA JG, SANTORO ML. Rutin (quercetin-3-rutinoside) modulates the hemostatic disturbances and redox imbalance induced by Bothrops jararaca snake venom in mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 10, 2018.

SANTOS, E. W., OLIVEIRA, D., HASTREITER, A., *et al.* Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

SANTOS, M.R.V.; SOUZA, V.H.; MENEZES, A.C.I., *et al.* Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**. v. 6, n. 10, 2010.

SCHMIDT, J., FAM, A.L.D., *et al.* Diagnóstico Laboratorial de Doença Renal – Revisão. **Biociências, Biotecnologia e Saúde**, v. 15, p. 190-192, 2016.

SEIÇA, RM, *et al.* Alterações Da Morfologia Do Ilhéu De Langerhans na Evolução Da Síndrome Diabética num Modelo Animal De Diabetes Tipo 2. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 381-388, 2003.

SEIÇA, RM, *et al.* Deficiência Primária Da Secreção De Insulina De Ilhéus Isolados De Ratos Goto-Kakizaki, Um Modelo Animal De Diabetes Tipo 2 Não Obesa. **Acta Médica Portuguesa**, v. 17, p. 42-48, 2003.

SEIÇA, RM. **Bases Fisiológicas da Diabetes Mellitus tipo 2 num modelo animal: aspectos clínicos e estudos morfológicos e de secreção de insulina de ilhéus da Langerhans**. Tese (doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, 1998.

SERDAN T.D.A., *et al.* Impaired brown adipose tissue is differentially modulated in insulin-resistant obese wistar and type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142: 112019, 2021.

SPINELLI, M.O., *et al.* Reference intervals for hematological parameters of animals bred and kept at the vivarium of the Faculty of Medicine of the State University of São Paulo. **Acta Scientiarum**, v. 36, n. 1, p. 1-4, 2014.

STEPHENS, DN. Does the Lee obesity index measure general obesity? **Physiology & Behavior**, v. 25, n. 2, p. 313-315, 1980.

UETA, K., ISHIHARA, T., *et al.* Long-term treatment with the Na⁺-glucose cotransporter inhibitor T-1095 causes sustained improvement in hyperglycemia and prevents diabetic neuropathy in Goto-Kakizaki Rats. **Life Sciences**, v. 76, n. 23, p. 2655-2668, 2005.