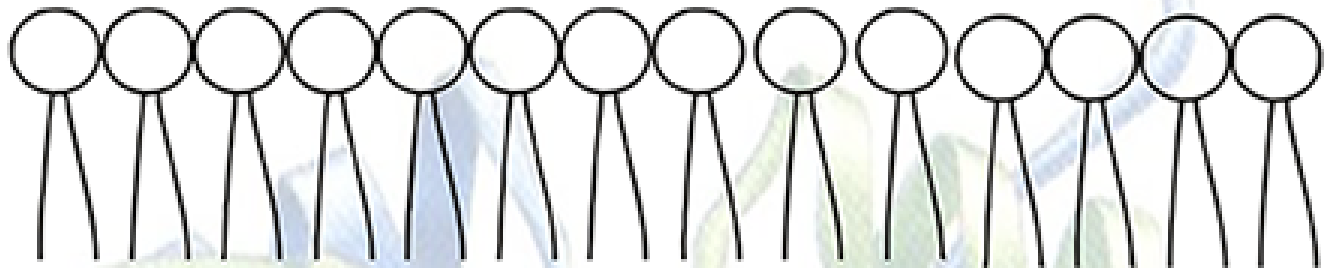
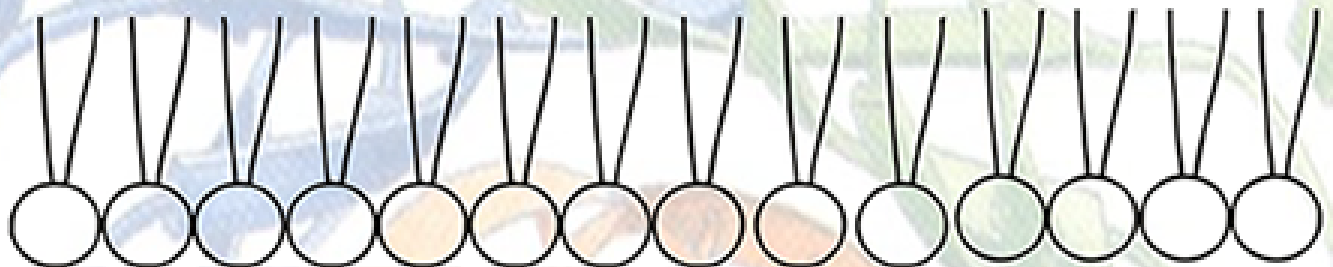




Universidade Estadual de Maringá
**Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas**



**III Curso de Inverno em
Biologia Celular e Molecular**



1 a 5 de Julho de 2013

MINICURSO

Técnica de monitoramento contínuo da
concentração intersticial de glicose em tempo
real (RT-CGMS) em animais de laboratório

Laboratório de Investigação em Diabetes e Obesidade

Professor Responsável:

Dr. Roberto Barbosa Bazotte

Ministrantes do Curso:

Any de Castro Ruiz Marques

Antonio Machado Felisberto Junior

Fabiana Percinoto Monteiro Schiavon

Marcia Aparecida Carrara

Marcio Guilhermetti

Vanessa Rodrigues Vilela

Sumário

1	INTRODUÇÃO	3
2	OBJETIVO	6
3	ROTEIRO DOS EXPERIMENTOS.....	6
3.1	Animais.....	6
3.2	Materiais.....	6
3.3	Metodologia.....	7
3.4	Avaliação da glicemia após administração de sacarose	7
3.5	Cronograma.....	8
4	BIBLIOGRAFIA	8

1 INTRODUÇÃO

Glicemia é um termo que se refere à concentração de glicose no sangue podendo ser expressa em mg/dl ou mM. Pode-se quantificar a glicemia através da avaliação da (I) glicemia capilar empregando glicosímetro ou por (II) técnicas laboratoriais (glicemia de jejum; teste de tolerância à glicose) ou também indiretamente avaliando-se a concentração de glicose intersticial (CGI) através do sistema de monitoramento contínuo de glicose em tempo real (RT-CGMS).

A avaliação da glicemia capilar empregando glicosímetro é usada na detecção e acompanhamento do diabetes. Neste caso, basta colocar uma gota de sangue na tira reagente e realizar a leitura no glicosímetro. O procedimento é altamente eficaz no acompanhamento domiciliar da glicemia, especialmente no diabético tipo 1, que necessita controle mais rigoroso da glicemia em função do uso obrigatório de insulina. Os resultados de glicemia capilar não servem para o diagnóstico de diabetes. Assim, sempre que os valores de glicemia forem sugestivos de diabetes, o paciente deverá ser orientado a procurar um médico e realizar o exame da glicemia em jejum no laboratório de análises clínicas.

O segundo teste está relacionado com a detecção, diagnóstico e acompanhamento do paciente diabético. Para avaliação laboratorial da glicemia de jejum, o paciente deve estar em jejum noturno, e a coleta de sangue é feita pela manhã. Glicemias de jejum maior ou igual a 126mg/dL direciona o clínico para o diagnóstico laboratorial do diabetes mellitus. Em caso de glicemia de jejum entre 100 e 125mg/dL, considerada anormalmente elevada e denominada intolerância ao jejum, pode ser interessante submeter o paciente ao teste de tolerância à glicose (GTT).

No caso do GTT, além da coleta de sangue em jejum (glicemia do tempo zero), o paciente recebe uma solução oral de glicose (75 g) e aguarda 120 minutos para a segunda coleta de sangue. Se aos 120 minutos a glicemia estiver abaixo de 140 mg/dL, o paciente será considerado não diabético; se estiver entre 140 e 199 mg/dL, o paciente será considerado como pré-diabético; e caso a glicemia seja maior ou igual a 200 mg/dL, o paciente será considerado diabético.

Considerando que a CGI reflete com boa aproximação a glicemia, o RT-CGMS, que permite a obtenção de 840 medidas ao longo de 3 dias em um intervalo de 40-400 mg/dL, tem sido cada vez mais empregado como um instrumento de avaliação da glicemia em diabéticos.

O dispositivo de RT-CGMS é composto por um sensor de glicose (Figura 1A) constituído por um eletrodo coberto por uma membrana que detecta a concentração de glicose no fluido intersticial, pelo método da glicose oxidase, e envia esta informação para um transmissor (Figura 1B). Este envia os dados para o monitor (Figura 2) através de ondas de rádio de alta frequência, o qual fornece leituras de glicose intersticial em tempo real (Medtronic Guardian® Real-Time CGMS). O sistema RT-CGMS avalia a concentração de glicose a cada 10 segundos, e os resultados serão obtidos a cada 5

minutos, representando a média da soma de 30 medições de concentração de glicose sendo os cerca de 280 valores diários armazenados no monitor.

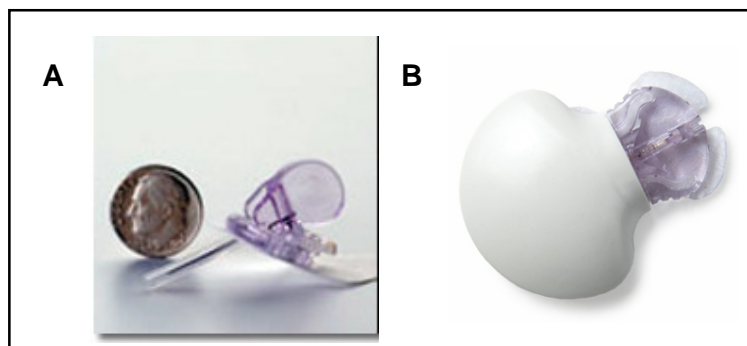


Figura 1. Sensor de glicose (A) foto ilustrativa demonstrando o tamanho em relação a uma moeda e transmissor (B) acoplado ao sensor.



Figura 2. Monitor – recebe dados por ondas de rádio de alta frequência (Medtronic Guardian® Real-Time CGMS).

Ao final da utilização do sensor, este é removido e os dados armazenados no monitor são transferidos para um receptor (Figura 3) permitindo que os dados (Figura 4) sejam transferidos para um computador pessoal ligado a um programa de análise on-line.



Figura 3. Receptor ComLink – capaz de transferir os dados do monitor para um computador pessoal.

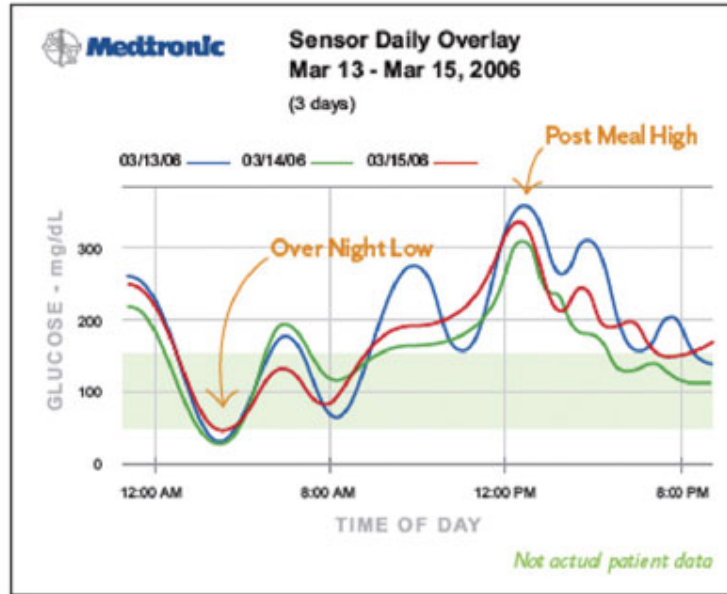


Figura 4. Gráfico representativo dos resultados dos valores obtidos pelo sistema RT-CGMS).

Assim, considerando a dificuldade de coleta de sangue em animais de laboratório, particularmente em ratos, a avaliação da CGI empregando o sistema RT-CGMS representaria um grande avanço em termos de redução do número de animais empregados em estudos de avaliação da glicemia (Figura 5).

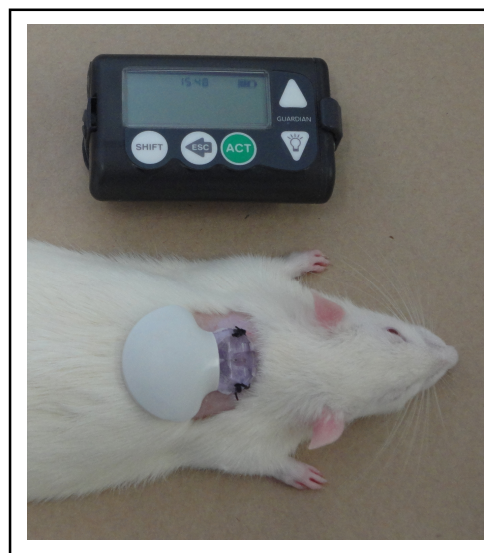


Figura 5. Implantação do CGMS em rato Wistar para avaliação da concentração de glicose intersticial.

Essa técnica, no momento, ainda se encontra limitada à dosagem de glicose, embora novos dispositivos que fazem leitura de outros parâmetros metabólicos (lactato, amônia etc), estejam chegando ao mercado. Além disso, a tendência de miniaturização destes dispositivos abre a perspectiva de estudos em animais de menor porte (ratos desmamados, camundongos etc).

2 OBJETIVO

Este mini-curso tem por objetivo oferecer aos alunos um conhecimento preliminar do sistema de monitoramento contínuo da CGI em tempo real (RT-CGMS).

3 ROTEIRO DOS EXPERIMENTOS

3.1 Animais

- Linhagem: Ratos Wistar
- Sexo: Macho.
- Peso: 300 a 350 gramas.

Condições ambientais: Temperatura constante (22°C +/- 1°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas.

*Aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá. **PARECER Nº 05/2013 - 05/03/2013.**

3.2 Materiais

- Balança.
- Papel kraft®.
- Fita adesiva.
- Anestésicos (Ketamina e Xilazina).
- Seringas (1 ml) e agulhas (13mm X 0,45mm).
- Eppendorf.
- Saco plástico.
- Algodão.
- Álcool 70%.
- Caneta tinta molhada.
- Agulha e linha de sutura.
- Tesoura.

- Pilhas.
- Sensores, monitores e transmissores Medtronic®.
- Gaze.
- Fita microporosa.
- Soro fisiológico.

3.3 Metodologia

Para inserir o sensor e a instalação do transmissor, os ratos são anestesiados com Ketamina (100 mg/Kg)/Xilazina (10 mg/Kg) via intraperitoneal. Após anestesia, a área a ser inserido o sensor, será tricotomizada e o sensor será inserido na região interescapular (subcutâneo). Este processo levará 15-20 min.

O monitor será mantido na parte superior da gaiola onde abrigará o animal após a cirurgia. Depois de ligar o transmissor com o monitor, um período de 2 h será necessário para a inicialização antes de realizar a calibração do RT-CGMS. A primeira e segunda calibração serão realizadas 2 h e 6 h após a instalação do RT-CGMS e repetidas a cada 12 h, medindo a glicemia com um glicosímetro. Para este fim, uma gota de sangue será obtida após uma pequena incisão feita na extremidade da cauda.

Durante o período de observação, o local da cirurgia para a inserção do sensor e transmissor não deverá mostrar qualquer sinal de infecção ou inflamação. Finalmente, o sensor será removido e os dados armazenados no monitor serão transferidos para um receptor permitindo que os dados sejam transferidos para um computador pessoal ligado a um programa de análise on-line.

3.4 Avaliação da glicemia após administração de sacarose

Os animais serão privados de alimento das 17:00 horas às 8:00 horas, totalizando 15 horas de jejum. Às 8:00 horas da manhã os animais receberão sacarose 0,8g/Kg via oral, através de técnica de gavagem.

3.5 Cronograma

Dia/Hora	07:30 min	08:00 h	10:00 h	13:30 min	16:30 h	17:00h	Até 22:00h
2ªfeira	-	<u>Recepção</u>	<u>Palestra</u>	Aula inaugural e Implantação sensor	Calibração	Jejum	Calibração
3ªfeira	Calibração e preparo solução	Administração solução (V.O.)	Fim jejum	-	-	-	Calibração
4ªfeira	Calibração	-	<u>Palestra</u>	-	-	Jejum	Calibração
5ªfeira	Calibração e preparo solução	Administração solução (V.O.)	Fim sensor	-	-	-	-
6ªfeira	Dowloading resultados	<u>Apresentação mini-cursos</u>	-	-	-	-	-

4 BIBLIOGRAFIAS

BAZOTTE, R. B. **Paciente Diabético – Cuidados Farmacêuticos**. Editora Medbook, 2010.

BOLAND, E. A.; TAMBORLANE, V. W. Continuous glucose monitoring in youth with type 2 diabetes: overcoming barriers to successful treatment. **Diabetes Technol. Ther.**, v.2, p. 53-59, 2000.

CARRARA, M. A., BATISTA, M. R.; SARUHASHI, T. R., FELISBERTO-JUNIOR, A. M.; GUILHERMETTI, M.; BAZOTTE, R. B. Coexistence of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: A physiological mechanism for glucose maintenance. **Life Sciences**, v.90, p.831–837, 2012.

DJAKOURE-PLATONOFF, C.; RADERMERCKER, R.; REACH, G.; SLAMA, G.; SELAM J. I. Accuracy of the continuous glucose monitoring system in inpatient and outpatient conditions. **Diabetes Metab.**, v.29, p.159-62, 2003.

KEPPLER, A.; FEGER, A.; HENNINGER, N.; KLOETZER, H. M.; KRAENZLIN, B.; GRETZ, N. et al. Continuous glucose monitoring in subcutaneous tissue of rats using glucose oxidase based sensors. **European Cells and Materials**, v.14, n.38, 2007.

WODERER, S.; HENNINGER, N.; GARTHE, C. D.; KLOETZER, H. M.; HAJNSEK, M.; KAMECKE, U. et al. Continuous glucose monitoring in interstitial fluid using glucose oxidase-based sensor compared to established blood glucose measurement in rats. **Anal Chim Acta**, v.581, p.7-12, 2007.