

**INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO *Diabetes mellitus* EM RATOS *Wistar*  
SUBMETIDOS À INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ALOXANA EM  
DIFERENTES DOSES**

**VALTER DIAS DA SILVA**

**INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO *Diabetes mellitus* EM RATOS *Wistar*  
SUBMETIDOS À INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ALOXANA EM  
DIFERENTES DOSES**

**VALTER DIAS DA SILVA**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Barilli Nogueira.

636.089.714 Silva, Valter Dias da  
S586i Indução experimental do *Diabetes mellitus* em ratos *Wistar* submetidos à injeção intraperitoneal de aloxana em diferentes doses / Valter Dias da Silva. – Presidente Prudente, 2011.  
68 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2011.

Bibliografia.

Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira

1. Aloxana. 2. Intraperitoneal. 3. *Diabetes mellitus*.  
4. Rato *Wistar*. I. Título.

**VALTER DIAS DA SILVA**

**Indução experimental do *Diabetes mellitus* em ratos *Wistar* submetidos à injeção intraperitoneal de aloxana em diferentes doses**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 27 de junho de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Monteiro Seraphim  
Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Presidente Prudente - SP

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia M. C. Franco Andrade  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE  
Presidente Prudente - SP

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Barilli Nogueira  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE  
Presidente Prudente – SP

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho*

*A Jesus Cristo, meu porto seguro...*

*Amigo fiel, presença constante, meu grande conselheiro;  
que me permitiu a sabedoria e força pra vencer mais essa etapa.*

*Aos meus pais, Luíz Carlos e Marta Dias...*

*Alcançar essa conquista e viver esse momento fascinante só me foi permitido porque vocês se doaram, passaram a viver comigo este sonho e não mediram esforços pra que eu chegasse até aqui. Presentearam-me com a riqueza dos ensinamentos, me fizeram enxergar a essência e o valor da vida, e fizeram de mim o ser humano que sou hoje, determinado a lutar pelos meus ideais. Queridos pais, a emoção me cala, ficando a certeza de que hoje lhes dedico essa vitória e o meu sorriso estampado em minha face, fruto da esperança, da luta, da determinação e da coragem que vocês fizeram brotar em mim a partir de cada gesto de carinho e apoio.*

*A vocês, toda minha gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus em primeiro lugar, pelo dom da vida, pelas bênçãos concedidas e por me dar a oportunidade de realizar mais um sonho.*

*A minha professora, orientadora e amiga, Rosa Maria Barilli Nogueira, pela confiança em mim depositada, pela amizade, atenção, apoio, seriedade e dedicação, conduzindo de forma brilhante o trabalho, e sobre tudo pela oportunidade oferecida em realizar um trabalho enriquecedor à minha formação profissional e pelos conselhos e ensinamentos que levarei sempre como exemplo para minha vida científica.*

*Aos meus pais, irmão, cunhada e sobrinhos que sempre me incentivaram e principalmente me deram muito apoio em todos os momentos.*

*As amigas e também professoras Alessandra Melchert e Silvia Franco Andrade pela amizade, apoios irrestritos, e sugestões que enriqueceram este estudo, e principalmente por todo exemplo de profissionalismo e competência.*

*Ao prof. Rogério Giuffrida pelo auxílio prestado na análise estatística.*

*A amiga Gloriane, pelo companheirismo, pelo seu apoio, ajuda e participação durante o desenvolvimento do experimento.*

*A amiga Milena, pela agradável convivência, apoio e os muitos momentos alegres compartilhados nesse período.*

*Aos docentes e colegas do Curso de Pós-Graduação pelos momentos de convivência e pelos ensinamentos compartilhados.*

*Aos funcionários do Biotério Central pela disponibilidade, colaboração.*

*A Universidade do Oeste Paulista, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo apoio financeiro.*

*A todos que, de alguma maneira, colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse alcançar essa conquista.*

*Meu carinho e gratidão.*

*“Descobri como é bom chegar, quando se tem paciência.*

*E para se chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.*

*É preciso, antes de mais nada, querer”.*

*(Amyr Klink)*

## RESUMO

### **Indução experimental do *Diabetes mellitus* em ratos *Wistar* submetidos à injeção intraperitoneal de aloxana em diferentes doses**

Este estudo teve por objetivo comparar os efeitos da ação diabetogênica da aloxana em diferentes doses, por meio da sua administração intraperitoneal (ip) em ratos *Wistar*. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais: grupo controle (GC), constituído por 30 ratos submetidos à injeção (ip) de solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3) constituídos por 60 ratos cada, submetidos à injeção (ip) de aloxana 2% nas doses de 120, 150 e 200mg/kg, respectivamente. Foram avaliados durante 15 dias, quanto aos seguintes parâmetros: glicose sanguínea, peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, volume urinário, exame químico da urina (glicose, corpos cetônicos e outros parâmetros). Concluiu-se que, a dose de 120mg/kg de aloxana a 2% (ip), quando comparada às demais doses foi a mais eficiente, frente aos objetivos deste estudo, pois induziu o diabetes em um maior número de animais e promoveu um baixo percentual de óbitos.

Palavras-chave: Aloxana. Intraperitoneal. *Diabetes mellitus*. Rato *Wistar*.

## ABSTRACT

### **Experimental induction of *Diabetes mellitus* in *Wistar* rats submitted to intraperitoneally injection of aloxana in different doses**

This study was to compare the effects the action diabetogenic of alloxan in different doses, through its administration intraperitoneally (ip) in *Wistar* rats. The animals were distributed randomly four in experimental groups: experimental control group (GC), consisting of 30 rats subjected to injection (ip) of sodium chloride solution 0.9%; Group 1 (G1), 2 (G2) and 3 (G3) consisting of 60 rats each, subject to injection (ip) alloxan 2% at doses of 120, 150 and 200 mg/kg, respectively. Were evaluated during 15 days, on the following parameters: blood glucose, weight, water intake, dietary intake, urination chemical examination of urine (glucose, ketone bodies, and other parameters). It was concluded that the dose of 120 mg/kg alloxan at 2% (ip), when compared to the doses was most efficient, compared to the objectives of this study, it induced diabetes in a larger number of animals and promoted a low percentage of deaths.

Key-Words: Alloxan. Intraperitoneally. *Diabetes mellitus*. *Wistar* rat.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Números e percentuais de animais diabéticos sobreviventes e animais não diabéticos + óbitos dos grupos (G1), (G2) e (G3) no momento M7 após administração de aloxana 2%.....	54
TABELA 2 -	Números e percentuais de animais diabéticos sobreviventes e animais não diabéticos + óbitos dos grupos (G1), (G2) e (G3) no momento M14 após administração de aloxana 2%.....	54
TABELA 3 -	Números e percentuais de animais com diabetes moderado (DM) e diabetes grave (DG) entre os animais sobreviventes, dos grupos (G1), (G2) e (G3) no momento M7 após administração de aloxana 2%.....	54
TABELA 4 -	Números e percentuais de animais com diabetes moderado (DM) e diabetes grave (DG) entre os animais sobreviventes, dos grupos (G1), (G2) e (G3) no momento M14 após administração de aloxana 2%.....	54
TABELA 5 -	Números e percentuais de óbitos, observados nos grupos (G1), (G2) e (G3) nos momentos M7 e M14 após administração de aloxana 2%.....	54
TABELA 6 -	Médias e desvio-padrões da ingestão hídrica/24h (ml), ingestão alimentar/24h (g) e volume urinário/24 (ml), dos animais do grupo controle (GC), nos momentos M8 e M15.....	57
TABELA 7 -	Médias e desvios-padrões do consumo hídrico/24h (ml) e alimentar/24h (g) dos animais dos grupos (G1), (G2) e (G3) nos momentos M8 e M15 após administração de aloxana 2%.....	59
TABELA 8 -	Médias e desvios-padrões dos parâmetros do exame químico da urina realizada com a fita Combur <sup>10</sup> Test <sup>®</sup> UX dos animais dos grupos (G1), (G2) e (G3) nos momentos M8 e M15 após administração de aloxana 2%.....	59
TABELA 9 -	Alterações do exame químico da urina dos animais dos grupos (G1), (G2) e (G3) nos momentos M8 e M15 após administração de aloxana 2%.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$  - Alfa  
a.a - Aminoácidos  
A - Adenina  
ADP - Adenosina difosfato  
AGL - Ácidos graxos livres  
AL - Aloxana  
ATP - Adenosina trifosfato  
 $\beta$  - Beta  
CAD - Cetoacidose diabética  
 $\text{Ca}^{2+}$  - Cálcio  
 $^{\circ}\text{C}$  - Graus Celsius  
 $\delta$  - Delta  
DG - Diabetes grave  
DM - *Diabetes mellitus*  
DM - Diabetes moderado  
DNA - Ácido desoxiribonucléico  
g - Grama  
g.l. - Grau de liberdade  
G - Guanina  
GC - Grupo controle  
GLUT - Transportador de glicose  
GSH - Tripeptídeo glutationa  
G1 - Grupo submetido à dose de 120mg/kg de aloxana 2%  
G2 - Grupo submetido à dose de 150mg/kg de aloxana 2%  
G3 - Grupo submetido à dose de 200mg/kg de aloxana 2%  
G-6P - Glicose 6-fosfato  
h - Hora  
HbA1c - Hemoglobina glicosilada  
HDL - Lipoproteína de alta densidade (High Density Lipoprotein)  
 $\text{H}^{+}$  - Hidrogênio  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  - Peróxido de hidrogênio  
ip - Via intraperitoneal  
iv - Via intravenosa  
IDDM - *Diabetes mellitus* insulino dependente  
 $\text{K}^{+}$  - Potássio  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade (Low Density Lipoprotein)  
mg/dL - Miligrama por decilitro  
mg/kg - Miligrama por quilo  
MIDD - Maternal Inherited Diabetes and Deafness  
mL - Mililitros  
MODY - Maturity Onset Diabetes of the Young  
NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NIDDM - *Diabetes mellitus* não insulino dependente

OH - Radical hidroxila

OMS - Organização Mundial da Saúde

O<sub>2</sub> - Oxigênio

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA<sub>t</sub> - Ácido ribonucleico transportador

SH - Sulfidril

STZ - Estreptozotocina

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade (Very Low Density Lipoprotein)

% - Porcento

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 Insulina: Síntese, Estrutura e Função.....	18
1.2 Classificação do <i>Diabetes mellitus</i> .....	22
1.2.1 <i>Diabetes mellitus</i> tipo I ou insulino dependente.....	22
1.2.2 <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 ou não insulino dependente.....	25
1.2.3 Outros tipos específicos de diabetes.....	29
1.3 <i>Diabetes mellitus</i> Experimental por Aloxana.....	30
1.3.1 Ação diabetogênica da Aloxana.....	30
1.3.2 Fatores que influenciam a ação diabetogênica da Aloxana.....	36
1.3.2.1 Doses, concentração, vias de administração e velocidade de infusão...37	
1.3.2.2 Dieta e jejum.....	38
1.3.2.3 Espécies e peso do animal.....	39
1.3.2.4 Substâncias que interferem na ação diabetogênica da Aloxana.....	40
REFERÊNCIAS.....	42
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	50

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O *Diabetes mellitus* constitui um problema de saúde pública mundial devido ao seu potencial de morbidade e mortalidade (LERCO et al., 2003; CAVALLI et al., 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em todo o planeta, o diabetes acomete cerca de 194 milhões de pessoas, gerando consequências humanas, sociais e econômicas devastadoras: são quatro milhões de mortes por ano relacionadas ao diabetes e suas complicações, o que representa 9% da mortalidade mundial total (LEAL et al., 2009) e outros 140 milhões poderão desenvolver a doença nos próximos 20 anos (CAVALLI et al., 2007). As projeções da OMS para 2025 sugerem que o número de portadores do diabetes possa chegar a 300 milhões (LERCO et al., 2003). No Brasil, estima-se que esta doença atinge quase 12 milhões de indivíduos (CAVALLI et al., 2007).

*Diabetes mellitus* (DM) é uma desordem metabólica com hiperglicemia crônica, resultante da deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina (PAIVA, 2001; GROSS et al., 2002; NEGRI, 2005; OLIVEIRA et al., 2008), levando a distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas e a complicações microvasculares, predominando a retinopatia (principal causa de cegueira), nefropatia (que pode conduzir a falência renal), uma variedade de neuropatias debilitantes (SACKS et al., 2002; SCHEFFEL et al., 2004) com risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e aspectos de disfunção autonômica, incluindo sintomas gastrintestinais, geniturinários, cardiovasculares e disfunção sexual (PAIVA, 2001). Além das complicações micro, as macrovasculares também estão presentes, particularmente o acidente vascular cerebral e as doenças da artéria coronária, afetando artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores (SACKS et al., 2002; SCHEFFEL et al., 2004). Pacientes diabéticos apresentam elevadas chances de desenvolver trombose e infarto cerebral, bem como gangrena de membros inferiores, numa incidência duas vezes maior que a população não diabética, (KULLER, 1976; BORTOLOTTI, 2007), em decorrência de alterações quantitativas e qualitativas na elastina e no colágeno das paredes de artérias centrais, conseqüentemente afetando a estrutura e função das mesmas. Com relação às alterações estruturais, tem sido demonstrado que

pacientes diabéticos tipo I e/ou insulino-dependentes, apresentam maior espessura íntima medial de artéria carótida do que os indivíduos sem a doença da mesma faixa etária. Em alguns estudos houve uma correlação importante entre a espessura íntima medial de carótida e disfunção endotelial, sugerindo a participação das alterações do endotélio no desenvolvimento de aterosclerose destes pacientes. Além disso, a presença de alterações funcionais e estruturais de grandes artérias pode piorar o prognóstico de pacientes com diabetes e outras complicações, principalmente as renais, manifestas por microalbuminúria ou insuficiência renal. Pacientes com doença renal terminal e diabetes têm uma velocidade de onda de pulso aórtica mais elevada do que aqueles indivíduos sem diabetes, e essa condição contribui para a maior mortalidade e morbidade cardiovascular desses pacientes (BORTOLOTTI, 2007).

Existem quatro principais hipóteses sobre os mecanismos pelos quais a hiperglicemia causa as complicações no diabetes: fluxo aumentado na via poliol, aumento da formação de produtos finais de glicosilação avançada, ativação das isoformas da proteína quinase C, e aumento do fluxo na via das hexosaminas. Recentemente foi descoberto que, cada um dos quatro mecanismos patológicos diferentes, reflete um simples processo induzido pela hiperglicemia: a excessiva produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons (RIBEIRO et al., 2007).

O diabetes desencadeia importantes alterações no metabolismo protéico em função do hipoinsulinismo, levando a um estado catabólico. Uma discreta alteração no equilíbrio entre síntese e degradação de proteína pode exercer profundo efeito a longo prazo sobre a viabilidade e metabolismo das células (RIBEIRO et al., 2007). As ações da insulina sobre o metabolismo das proteínas e dos aminoácidos são orientadas no sentido do anabolismo. A insulina, após interação com o receptor de membrana, estimula os transportadores de glicose (GLUT4), facilitando a entrada do carboidrato na célula, e exerce ação anabólica sobre o metabolismo protéico através dos seguintes mecanismos: estimulando o transporte de aminoácidos para dentro da célula; aumentando, ao nível ribossômico, a eficiência do processo de transdução, atuando na etapa de iniciação da síntese protéica. Essas ações da insulina sobre o metabolismo protéico são especialmente importantes no músculo, mas estão também presentes, em maior ou menor grau, em

outros tecidos (LUCIANO; MELLO, 1998; ROGATTO; LUCIANO, 2001). A insulina é um importante regulador da síntese protéica e da proteólise no músculo esquelético, sendo que o balanço entre estes dois processos fisiológicos determinam a massa muscular. A redução ou atrofia muscular é uma característica frequentemente observada em indivíduos com deficiência insulínica severa, como no quadro de diabetes. Alguns estudos têm mostrado um comprometimento da evolução da massa corporal, além de retardo da estatura e do processo de maturação pela privação de insulina (ROGATTO; LUCIANO, 2001) Alterações na síntese e na degradação de proteínas podem, ainda, afetar negativamente o reparo de tecidos após lesões ou infecções (RIBEIRO et al., 2007).

A deficiência de insulina causa, ainda, outra alteração metabólica significativa: o aumento da degradação e oxidação de gordura, resultando em excessiva produção de cetonas. A cetoacidose diabética (CAD) é outro fator que pode levar a morte nessa patologia, se não tratada adequadamente (RIBEIRO et al., 2007). A hiperglicemia leva à glicosúria e a desidratação, enquanto que a produção excessiva de corpos cetônicos agrava a acidose metabólica decorrente da desidratação (COLLETT-SOLBERG, 2001).

Comum não só em humanos, o DM esta presente em animais de estimação como os cães e gatos, e pode ser fatal se não for diagnosticada e adequadamente tratada (FARIA, 2007). A maioria dos casos de diabetes espontâneo ocorre em cães adultos, idosos, obesos e sedentários (FELDMAN; NELSON, 1996). A incidência em fêmeas é aproximadamente o dobro da incidência em machos; e as raças caninas mais predispostas são: Poodle, Cocker, Beagle, Fox paulistinha, Pinscher, Rotweiller, Schnauzers, Dachshund e Terrier (FELDMAN; NELSON, 1996; FARIA, 2007; NOGUEIRA; MARCO, 2008).

Dentre os principais fatores responsáveis por desencadear o DM nos cães, a predisposição genética, obesidade, infecções, enfermidades antagônicas da insulina e drogas, ileíte imunomediada e pancreatite, foram identificadas como fatores iniciantes do desenvolvimento de *Diabetes mellitus* insulínica independente (SWENSON; REECE, 1996; FARIA, 2007); a forma mais comum de diabetes clinicamente identificada no cão (NELSON; COUTO, 2001). Os sinais clínicos mais comumente relatados incluem polidipsia, poliúria, polifagia, perda de peso e cegueira causada por catarata (NELSON; COUTO, 2001).

Frente a toda essa realidade, torna-se imprescindível que o empenho científico estabeleça modelos de estudo, e desenvolva técnicas para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes e de suas complicações, à procura de agentes terapêuticos capazes de contribuir para minimizar as alterações endócrino-metabólicas e, principalmente, as lesões crônicas sobre os diferentes órgãos causadas pela doença (BERTRAM et al., 2001; LERCO et al., 2003). Além de permitir o desenvolvimento de estudos detalhados dos eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabético (ZANOELLO et al., 2002).

Diversos modelos de indução do *Diabetes mellitus* estão disponíveis (DELFINO et al., 2002), os quais incluem: pancreatectomia total ou parcial (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003), injúria ao hipotálamo ventromedial, dietas ricas em açúcares, gorduras, má nutrição *in utero* ou altas doses de hormônios contra-regulatórios como os glicocorticóides (ISLAS-ANDRADE et al., 2000); porém o mais frequentemente utilizado é a indução do diabetes químico pela administração dos agentes tóxicos aloxana e estreptozotocina, ambos citotóxicos seletivos para células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas (ISLAS-ANDRADE et al., 2000; DELFINO et al., 2002; LENZEN, 2008).

A estreptozotocina (STZ), um glicosídeo nitrosouréia (N-metil-N nitrosouréia) natural, isolado do *Streptomyces achromogenes*, estimula a produção de radicais livres, o que leva à destruição e disjunção das células  $\beta$  (SCHEIN et al., 1973; NEGRI, 2005). Sua administração em ratos adultos produz diabetes severo que muitas vezes necessita da administração de insulina quando os ratos precisam sobreviver por longo período (RERUP, 1970). Entretanto, a STZ apresenta alguns problemas para experimentos crônicos, especialmente recuperação espontânea da hiperglicemia pelo desenvolvimento de insulinoma funcionante e alta incidência de tumores no fígado e nos rins, devido à sua forte ação oncogênica (LENZEN, 2008).

A aloxana (AL) é um dos agentes diabetogênicos mais estudado e comumente utilizado no meio científico para a indução do diabetes experimental (BLACK; ROSENBLUM; CAPEN, 1980; JANSSON; SANDLER, 1986), por apresentar características semelhantes às encontradas na síndrome diabética em humanos tais como, hiperglicemia, glicosúria, polifagia, polidipsia, perda de peso corporal, cetonúria e cetonemia; além de possuir pequena ação oncogênica e ter um

custo menor quando comparada a STZ (LENZEN; PANTEN, 1988; RIBEIRO et al., 2007).

Essa droga possui citotoxicidade específica para as células  $\beta$  do pâncreas, causando danos aos vasos sanguíneos das ilhotas pancreáticas, levando a morte das células e ao quadro clínico de *Diabetes mellitus* tipo I (JANSSON; SANDLER, 1986; LENZEN, 2008), por causar insuficiência insulínica primária, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subsequentes (LERCO et al., 2003), em decorrência da destruição de mais de 90% das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas (ZANOELLO et al., 2002). Alguns estudos demonstraram que a formação de radicais superóxido e hidroxila, induzidos pela aloxana, é responsável pela citotoxicidade desse composto (HEIKKILA et al., 1976; LIMA et al., 2001). Outros experimentos sugerem que a inibição da secreção de insulina por aloxana é causada por sua interferência com as proteínas citoplasmáticas que contêm sulfidril e dissulfeto. Atribuindo-se o decréscimo nos níveis plasmáticos de insulina, a de um declínio intracelular dos níveis de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) (LIMA et al., 2001; SZKUDELSKI, 2001).

Apesar de ser um bom modelo experimental para indução do DM, há muitas dúvidas quanto à utilização da aloxana. Alguns grupos de pesquisa relatam dificuldades em conseguir induzir o diabetes de maneira satisfatória, pois alguns animais apresentam-se mais resistentes aos efeitos da aloxana, e apenas uma pequena proporção de animais tratados realmente torna-se diabéticos (FEDERIUUK et al., 2004). Manter os animais em boas condições por longos períodos após a administração da droga também constitui uma das dificuldades (FEDERIUUK et al., 2004; RIBEIRO et al., 2007), devido aos problemas apresentados pela droga, decorrentes de sua instabilidade química, metabolismo rápido e fatores que tornam quase impossível estabelecer uma relação clara entre as doses de aloxana e sua concentração efetiva no pâncreas (NEGRI, 2005).

A ação diabetogênica da aloxana pode ser influenciada pela concentração da droga, velocidade de infusão, dose, via de administração, dieta, tempo de jejum, peso do animal, até a utilização de substâncias capazes de influenciar os seus mecanismos de ação, tais como os barbitúricos, o ácido nicotínico, o 1-2-dimetil-4 amino-5-benzeno (LERCO et al., 2003; FEDERIUUK et al.,

2004), picolinamida, benzamida, 3-aminobenzamida, teofilina, nicotinamida, entre outras (WILSON et al., 1984). Frente a estes fatores, justifica-se contribuir com estudos que venham aprimorar a indução experimental do *Diabetes mellitus* com o uso da aloxana e caracterizar um protocolo de indução mais satisfatório, baseando-se numa melhor compreensão da reatividade química deste composto, o que é fundamental para conhecer seus efeitos diabetogênicos sobre as células  $\beta$  pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001).

### 1.1 Insulina: Síntese, Estrutura e Função

O pâncreas é um órgão em forma de V, situado ao longo do duodeno (FARIA, 2007), abaixo e atrás do estômago, sendo uma glândula que pesa cerca de 250g no homem, representado por aglomerados de células microscópicas denominadas ilhotas de Langerhans e numerosas outras células distribuídas na porção exócrina e no epitélio de revestimento dos canais excretores (NEGRI, 2005).

Trata-se de um órgão que apresenta funções tanto endócrinas quanto exócrinas, sendo por isso considerado uma glândula mista (anfícrina) e/ou dupla, sendo composto por dois tipos de tecidos que são: os ácinos pancreáticos (porção exócrina) que secretam suco digestivo no duodeno e as ilhotas de Langerhans (porção endócrina), que secretam insulina e glucagon na corrente sanguínea, sendo essas ilhotas circundadas pelas células acinares secretoras exócrinas do pâncreas (GUYTON; HALL, 2011). Foram identificadas quatro tipos de células nas ilhotas pancreáticas, com base nas propriedades citoquímicas e na morfologia: células  $\alpha$  (alfa), que secretam glucagon; células  $\beta$  (beta), que secretam insulina; células  $\delta$  (delta), que secretam somatostatina; e células F, que secretam o polipeptídeo pancreático (FARIA, 2007; ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Hormônio anabólico mais conhecido, a insulina é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (CARVALHIERA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Apesar de a secreção insulínica basal ser constante, alguns estímulos provenientes

da metabolização de nutrientes, atuação de neurotransmissores e hormônios podem aumentar ou diminuir esses níveis (CISTERNAS, 2002); ainda fármacos e agentes tóxicos também podem afetar a secreção de insulina (FARIA, 2007). Dentre os nutrientes secretagogos, somente a glicose pode iniciar a secreção de insulina. Considera-se que a oxidação da glicose pelas células  $\beta$  pancreáticas seja o estímulo essencial para a secreção insulínica (LIANG; MATSCHINSKY, 1994). A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado, e nos adipócitos reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (CARVALHIERA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A insulina é um hormônio polipeptídico composto por 51 aminoácidos (a.a.) dispostos em duas cadeias (cadeia A, com 21 a.a.) e (cadeia B, com 30 a.a.), unidas entre si por duas pontes dissulfeto cruzadas (Figura 1) (SILVA et al., 2003). Inicialmente a insulina é sintetizada a partir de um precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-insulina, no retículo endoplasmático das células  $\beta$  que após a ação de uma peptidase é clivada a pró-insulina. A pró-insulina fica armazenada em grânulos no complexo de Golgi das células  $\beta$ , até que chegue o sinal para sua secreção (GILMAN et al., 1991). Através da ação de peptidases específicas, a pró-insulina é convertida em insulina por meio da clivagem de duas ligações peptídicas, as cadeias A e B, e remoção de um segmento médio, o peptídeo C. A estrutura da molécula é semelhante em determinadas posições de cada cadeia de insulina, mas existem diferenças mínimas na sequência de aminoácidos, principalmente nas posições 8, 9 e 10 da cadeia A e, em menor frequência, na posição 30 da cadeia B (FARIA, 2007).



glicose catalisada pela glicoquinase. Esta rápida capacidade funcional do GLUT2 resulta numa concentração intracelular da glicose similar à concentração extracelular (LIANG; MATSCHINSKY, 1994). Uma vez captada pela célula através de difusão facilitada pelo GLUT2, a glicose é fosforilada a glicose 6-fosfato (G-6P) pela glicoquinase, e então oxidada. Ocorre aumento da taxa de produção de ATP/ADP, resultando no fechamento dos canais de potássio ( $K^+$ ) sensíveis ao ATP, com consequente despolarização da membrana das células  $\beta$ , ocorrendo influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) extracelular. O resultado final desta elevação nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  é a liberação da insulina armazenada (GILMAN et al., 1991; LIANG; MATSCHINSKY, 1994). Em condições fisiológicas, qualquer mudança na concentração de glicose sanguínea, mesmo que pequena, poderá alterar a taxa de fosforilação da glicose, regulando desta forma, a taxa do metabolismo da glicose nas células  $\beta$  pancreáticas e, conseqüentemente, a secreção insulínica (LIANG; MATSCHINSKY, 1994).

O GLUT3 é encontrado em múltiplos tecidos, incluindo cérebro, placenta e rins. O GLUT5 é encontrado, predominantemente, no intestino delgado (MUECKLER, 1994). Os GLUT- 1, 2, 3, 4 e 5 são os principais transportadores envolvidos na captação basal de glicose (HABER, 2001). O GLUT4 parece ser o único transportador de glicose regulado por estímulo insulinêmico e por contração muscular, sendo encontrado, exclusivamente, nos músculos esqueléticos, cardíaco e no tecido adiposo. Já as isoformas de GLUT 6-14 ainda não têm um papel bem determinado para o transporte de glicose (MANOLESCU et al., 2007).

Dentre as ações e funções insulínicas, destacam-se o controle de importantes reações de síntese e degradação nos tecidos periféricos. Para tal, a insulina se liga a receptores específicos de alta afinidade na membrana plasmática da maioria dos tecidos, incluindo o músculo, fígado e tecido adiposo, desencadeando uma cascata de reações moleculares. No músculo, a insulina promove a captação de glicose e estoque de glicogênio. No fígado, inibe a produção e liberação de glicose, bem como promove o estoque de glicogênio. No tecido adiposo, a captação de glicose é estimulada e a liberação de ácidos graxos livres é inibida (HAVEL, 1996). Assim, a insulina afeta diretamente o metabolismo de lipídios, reduzindo a oxidação de gorduras, por inibir a ação da lipase hormônio-sensível, estimulando o depósito de gorduras por ativação da lipase lipoprotéica

(FRIEDMAN, 1998; BOSELLO; ZAMBONI, 2000). Em resumo, a principal função da insulina é o transporte da glicose da corrente sanguínea para o interior das células (efeito hipoglicemiante), e também o transporte transmembrana de aminoácidos, formação de glicogênio, produção de triglicerídeos, e síntese de ácidos nucleicos e proteínas (GUYTON; HALL, 2011; JONES; HUNT; KING, 2000).

Além de influenciar a utilização de glicose pelas células, a insulina é capaz de atuar no hipotálamo, interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome-saciedade, sendo que o neuropeptídeo Y é o principal deles. Além desta via neuro-hormonal, o hipotálamo também possui glicorreceptores sensíveis à glicemia plasmática, que induzem maior sensação de fome quando os níveis glicêmicos apresentam-se baixos (FRENCH; CASTIGLIONE, 2002).

Quando ocorre um distúrbio complexo, que resulta da incapacidade das ilhotas pancreáticas secretar insulina e/ou de ação deficiente da insulina nos tecidos, promovendo anormalidades como: hiperglicemia (acúmulo de glicose no sangue), glicosúria (glicose presente na urina) e sinais clínicos clássicos de poliúria (micção frequente), polidipsia (sede excessiva), polifagia (fome excessiva) e perda de peso, instala-se a patologia conhecida como *Diabetes mellitus* (GROSS et al., 2002; LIMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008).

## **1.2. Classificação do *Diabetes mellitus***

### **1.2.1 *Diabetes mellitus* tipo I ou insulino dependente**

O DM tipo I, ou *Diabetes mellitus* insulino dependente (IDDM) é uma doença autoimune multifatorial, cuja susceptibilidade é determinada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (RIBEIRO et al., 2007). Neste tipo de diabetes, ocorre destruição, mediada pelas células T, de mais de 90% das células secretoras de insulina das ilhotas pancreáticas (células  $\beta$  do pâncreas), usualmente por agressão química, viral (ZANOELLO et al., 2002) ou processo autoimune (forma

autoimune; tipo 1A) ou menos comumente de causa desconhecida (forma idiopática; tipo 1B) (GROSS et al., 2002; OLIVEIRA, 2008).

No diabetes tipo I, os pacientes apresentam sintomas agudos, hiperglicemia acentuada e tem tendência a cetoacidose, muitas vezes a primeira manifestação da doença (GROSS et al., 2002; OLIVEIRA, 2008). O quadro de cetoacidose é a expressão máxima da deficiência de insulina e pode também ocorrer na presença de estresse infeccioso, ou de qualquer etiologia ou ser decorrente do uso inadequado da insulina (GROSS et al., 2002).

A cetoacidose diabética (CAD) é uma complicação aguda do DM caracterizada por hiperglicemia, acidose metabólica, desidratação e cetose, na vigência de deficiência profunda de insulina. Acomete principalmente pacientes com DM tipo I e geralmente é precipitada por condições infecciosas ou omissão da administração de insulina (BARONE et al., 2007). Esse conjunto de distúrbios metabólicos se desenvolve em uma situação de deficiência insulínica grave ou absoluta, comumente associada a condições estressantes, que levam ao aumento dos hormônios contra-reguladores como glucagon, cortisol e catecolaminas (FOSS-FREITAS; FOSS, 2003; BARONE et al., 2007).

As principais causas para as alterações metabólicas encontradas na cetoacidose diabética são: 1) a perda do transporte de glicose para dentro dos tecidos periféricos, como músculos e gordura, já que este transporte depende de insulina, 2) aumento da gliconeogênese e glicogenólise hepáticas (COLLETT-SOLBERG, 2001), um componente fisiopatológico característico da situação, justificando vários dos sintomas e sinais típicos da CAD, como polidipsia, poliúria e graus variados de desidratação, que podem chegar à hipovolemia acentuada e choque circulatório (FOSS-FREITAS; FOSS, 2003) e 3) desinibição da quebra de gordura, proteínas e glicogênio. Com isso, a deficiência de insulina leva a uma hiperglicemia (devido a uma diminuição da utilização periférica e ao aumento da produção hepática de glicose) e à acidose devido à produção de corpos cetônicos pelo fígado. Agravando este quadro, a hiperglicemia causa glicosúria e consequente poliúria. Essa perda hídrica é acompanhada de uma perda de eletrólitos e desidratação. Na presença de uma desidratação importante, ocorre uma diminuição da circulação periférica e aumento da produção de ácido láctico, piorando a acidose metabólica já presente (COLLETT-SOLBERG, 2001).

O desenvolvimento da cetoacidose é progressivo, evoluindo de cetose inicial com acidose compensada até graus avançados de hipercetonemia e acidose metabólica, com manifestações típicas de hálito cetônico, taquicardia e alterações respiratórias compensatórias (respiração de Kussmaul – respiração ampla e acelerada) (COLLETT-SOLBERG, 2001; FOSS-FREITAS; FOSS, 2003; BARONE et al., 2007). Pode ainda haver hipotensão arterial, fator considerado como sugestivo de pior prognóstico, assim como a hipotermia, que também pode ocorrer (BARONE et al., 2007). São observados anorexia, náuseas e vômitos, que podem agravar a desidratação. Cefaléia, mal-estar, parestesia e dor abdominal também são comuns (BARONE et al., 2007). O conjunto das alterações metabólicas pode ter graus variados de repercussão sobre a função do sistema nervoso central, podendo determinar desde graus leves de sonolência, torpor e confusão mental até o estabelecimento de estado de coma profundo (FOSS-FREITAS; FOSS, 2003), embora só ocorra em cerca de 10% dos pacientes (BARONE et al., 2007). Assim o diagnóstico da cetoacidose, em paciente diabético, fundamenta-se no entendimento de toda a apresentada situação clínica, com sintomas e sinais característicos (FOSS-FREITAS; FOSS, 2003; BARONE et al., 2007). É importante lembrar que a existência de DM nem sempre é mencionada, pois a CAD pode ser a forma de apresentação inicial da doença (BARONE et al., 2007).

O DM tipo I é diagnosticado principalmente em crianças e jovens, mas pode ocorrer também em adultos (OLIVEIRA, 2008). O pico de incidência do diabetes tipo I ocorre dos 10 aos 14 anos de idade, havendo a seguir uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos, de tal maneira que casos de diabetes tipo I de início após esta idade são pouco frequentes. No entanto, indivíduos de qualquer idade podem desenvolver diabetes tipo I (GROSS et al., 2002). A taxa de destruição das células  $\beta$  é variável sendo em geral mais rápida entre as crianças (OLIVEIRA, 2008).

Na clínica de pequenos animais o *Diabetes mellitus* tipo I (IDDM), é a forma mais comum de diabetes clinicamente identificada no cão (NELSON; COUTO, 2001) e pode ser fatal se for incorretamente diagnosticada ou inadequadamente tratada (FARIA, 2007). Cães com diabetes comumente situam-se na faixa etária entre quatro e 14 anos, com pico de incidência nos sete a nove anos. As fêmeas são afetadas aproximadamente duas vezes mais que os machos (ETTINGER;

FELDMAN, 2004). A hiperglicemia é sempre uma característica do diabetes em cães, resultante da diminuição da captação da glicose pelos tecidos periféricos, tais como, músculo esquelético, tecido adiposo e taxas aumentadas de gliconeogênese no fígado (YOXALL; HIRD, 1996).

Em cães, as ilhotas pancreáticas são com frequência, destruídas secundariamente a uma lesão inflamatória do pâncreas exócrino. Uma pancreatite crônica recorrente com perda progressiva de células exócrinas e endócrinas e substituição por tecido conjuntivo fibroso é uma causa frequente do diabetes. O desenvolvimento do diabetes em animais jovens pode estar associado à atrofia idiopática do pâncreas, a pancreatite aguda com necrose e hemorragia, aplasia das células pancreáticas e até mesmo infecções virais (CARLTON; McGAVIN, 1998; FARIA, 2007).

Cães com *Diabetes mellitus* do tipo I podem apresentar-se com surgimento súbito dos sinais de poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso, letargia, vômito, depressão, hepatomegalia, desidratação, pelame em más condições, hipotermia, em decorrência da queda abrupta na secreção de insulina (TILLEY; SMITH JR., 2003).

No cão diabético cetoacidótico, os achados físicos são: desidratação, depressão, astenia, taquipnéia, vômito e algumas vezes hálito com intenso odor de acetona. Os sinais gastrintestinais de vômito, dor e distensão abdominal são comuns na cetoacidose diabética, devendo ser diferenciada dos sinais similares associados à pancreatite, peritonite, ou outros distúrbios intra-abdominais (NELSON; COUTO, 2001). Cães com diabetes necessitam de tratamento com insulina desde o momento do diagnóstico (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

### **1.2.2 *Diabetes mellitus* tipo II ou não insulino dependente**

O diabetes tipo II ocorre mais lenta e tardiamente do que o tipo I, e é considerado não insulino dependente (NIDDM) (RIBEIRO et al., 2007). Este tipo de diabetes é mais comum do que o tipo I, perfazendo cerca de 90 a 95% dos casos de diabetes (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006). É uma

entidade heterogênea, caracterizada por distúrbios da ação e secreção da insulina, com predomínio de um ou outro componente (GROSS et al., 2002). Pode ser desencadeado por vários fatores tais como a obesidade, dieta hipercalórica e falta de atividade física (RIBEIRO et al., 2007); porém a etiologia específica deste tipo de diabetes ainda não está claramente estabelecida como no diabetes tipo I. A destruição autoimune do pâncreas não está envolvida. Também ao contrário do diabetes tipo I, a maioria dos pacientes apresenta obesidade (GROSS et al., 2002).

A obesidade e/ou sobrepeso estão presentes na maioria dos pacientes diabéticos tipo II, e consiste em uma doença metabólica crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal (CORRÊA et al., 2003). Na obesidade a secreção de insulina está aumentada, enquanto que a captação hepática e a eficácia periférica da insulina diminuem. A elevada secreção de insulina está relacionada ao grau de obesidade, já a redução na depuração hepática e a resistência periférica ao hormônio estão relacionadas ao tipo de obesidade (obesidade visceral). Os ácidos graxos livres aumentados na circulação, pela elevada sensibilidade lipolítica da gordura abdominal e pelo menor efeito anti-lipolítico da insulina nesse tecido, inibem a depuração hepática de insulina, levando à hiperinsulinemia e à resistência periférica, além do direcionamento desses ácidos graxos para a síntese de triglicérides pelo fígado (McLELLAN et al., 2007).

A hiperinsulinemia é considerada um fator de risco independente para a doença cardiovascular, já que tem um papel importante no desenvolvimento de outros componentes da síndrome metabólica, como a dislipidemia, a hipertensão e a hiperuricemia (OLIVEIRA et al., 2004). A obesidade, principalmente a visceral, resulta em várias alterações fisiopatológicas como menor extração de insulina pelo fígado, com aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captação de glicose pelo tecido muscular. Estes eventos podem resultar em diferentes graus de intolerância à glicose e, nos indivíduos com DM tipo II, irão influenciar o controle glicêmico, refletido por maiores níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Este fato deve ser analisado no contexto dos recentes estudos que demonstraram que nestes pacientes o controle glicêmico é fundamental para a redução do risco de evolução para complicações microvasculares. Além disso, alguns estudos sugerem ainda que o controle de outros parâmetros como pressão arterial e níveis séricos de lipídios, como aumento do colesterol total, triglicérides e apolipoproteína B, e redução do

colesterol HDL, seriam de relevante importância para diminuir o risco de surgimento das complicações macrovasculares do diabetes, que representam 65% das causas de mortalidade nesta população (CORRÊA et al., 2003). Visto que em condições normais, a insulina tem várias ações na regulação do metabolismo lipídico; no entanto, nos indivíduos obesos o mesmo não é observado, devido às frequentes alterações que ocorrem na atuação de determinadas enzimas e no metabolismo lipídico, devido à resistência a insulina. As principais alterações do perfil lipídico são: níveis aumentados de VLDL, devido à maior produção de triglicérides pelo fígado e ao menor catabolismo; redução dos níveis e do tamanho de HDL, relacionada à diminuição da subfração HDL-C2 e ao maior catabolismo devido à maior concentração de triglicérides nestas partículas, e partículas de LDL menores e mais densas, mais ricas em apolipoproteína B (OLIVEIRA et al., 2004).

A hiperinsulinemia também tem um papel importante no desenvolvimento da hipertensão em indivíduos obesos, conforme demonstrou um estudo, no qual indivíduos obesos hipertensos tinham uma redução da sensibilidade à insulina. Os mecanismos que podem explicar a relação da hiperinsulinemia com o desenvolvimento da hipertensão são: a reabsorção renal de sódio e água aumentada; a ativação do sistema nervoso simpático; a diminuição da atividade enzima  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  e aumento do acúmulo de cálcio celular e o estímulo de fatores de crescimento. Por outro lado, a maior liberação de ácidos graxos livres (AGL) na veia porta, verificada em indivíduos com obesidade abdominal, parece ter uma relação com a fisiopatologia da hipertensão. Em indivíduos eutróficos o aumento de AGL, provocado artificialmente, aumenta a sensibilidade vascular por meio do estímulo alfa adrenérgico. Segundo estudos realizados em ratos, este efeito pode ser maior com o aumento do fluxo de AGL no sistema porta. Ao inibir a produção de óxido nítrico, os AGL podem aumentar a pressão arterial, não somente pelo aumento da vasoconstrição, mas também pela diminuição do reflexo de relaxamento vascular (OLIVEIRA et al., 2004).

Níveis elevados de ácido úrico no indivíduo obeso podem estar relacionados à resistência à insulina. Esta associação é explicada em parte pelo fato de a hiperinsulinemia, possivelmente, diminuir a excreção renal de ácido úrico. No entanto, alguns estudos têm mostrado que níveis elevados de triglicérides estão mais relacionados com a hiperuricemia, podendo ser devido a um aumento do

requerimento da coenzima NADPH para a síntese de novo de ácidos graxos nos indivíduos obesos, aumentando a produção de ácido úrico. De qualquer forma, segundo este último mecanismo, a insulina estaria participando de maneira indireta; já níveis elevados deste hormônio estão associados a níveis altos de triglicérides. Em crianças obesas, tem-se observado níveis mais altos de ácido úrico quando comparados às eutróficas, podendo esta alteração metabólica já estar presente em idades mais precoces (OLIVEIRA et al., 2004).

A idade de início do diabetes tipo II é variável, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade (OLIVEIRA, 2008), com pico de incidência ao redor dos 60 anos (GROSS et al., 2002). Muitos casos são diagnosticados apenas após as complicações aparecerem, e estima-se que 1/3 dos casos não chegam a ser diagnosticados. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, no entanto, podem necessitar de tratamento com insulina para obtenção de um controle metabólico adequado (OLIVEIRA, 2008).

A ocorrência de agregação familiar do diabetes é mais comum no diabetes tipo II do que no tipo I (GROSS et al., 2002; OLIVEIRA, 2008). No entanto, estudos recentes descrevem uma prevalência duas vezes maior de diabetes do tipo I em famílias com tipo II, sugerindo uma possível interação genética entre os dois tipos de diabetes (GROSS et al., 2002).

Deve ser levado em conta que, embora a ocorrência de cetoacidose seja característica do estado de deficiência insulínica do tipo I, o paciente tipo II pode apresentar este quadro na vigência de intercorrências graves como infecções ou episódios agudos de doença cerebrovascular (GROSS et al., 2002; OLIVEIRA, 2008).

O quadro clínico de *Diabetes mellitus* não insulino dependente (NIDDM), é de difícil identificação clínica no cão, sendo mais frequente no gato, portanto a terapêutica com hipoglicemiantes orais é substituída por insulinoterapia. Com relação aos gatos, 20% pertencem a este grupo, e respondem bem a terapia com hipoglicemiantes orais e dieta (NELSON; COUTO, 2001).

### 1.2.3 Outros tipos específicos de diabetes

Têm sido elucidados os processos de patogênese do diabetes, tanto em relação a marcadores genéticos como aos mecanismos de doença, com isso, tem crescido o número de tipos distintos de diabetes, permitindo uma classificação mais específica e definitiva (GROSS et al., 2002). Novas categorias têm sido acrescentadas à lista de tipos específicos de diabetes, incluindo defeitos genéticos da célula  $\beta$  e da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (pancreatite), endocrinopatias, indução pelo uso de medicamentos (corticoides, hormônios tireoidianos e outros) ou produtos químicos, infecções e formas incomuns de diabetes imunomediado (GROSS et al., 2002; OLIVEIRA, 2008).

Segundo Gross et al. (2002), recentemente, tem-se dado ênfase a duas categorias de tipos específicos de diabetes: diabetes do adulto de início no jovem (*Maturity Onset Diabetes of the Young* - MODY) e diabetes de origem mitocondrial. O tipo MODY engloba um grupo heterogêneo de diabetes sem predisposição para a cetoacidose e sem obesidade, com hiperglicemia leve, com início antes dos 25 anos de idade e com várias gerações de familiares com diabetes, configurando uma herança autossômica dominante. Usualmente, estes pacientes apresentam um defeito de secreção de insulina relacionado a mutações em genes específicos. Estima-se que este tipo de diabetes seja responsável por cerca de 1 a 5% dos casos de diabetes (GROSS et al., 2002).

O diabetes de origem mitocondrial ou diabetes com surdez e herança materna, caracteriza-se por ocorrer em indivíduos jovens e sem obesidade. Inicialmente a hiperglicemia é leve e pode progredir lentamente para graus mais avançados que necessitam emprego de insulina. Ocorre devido a uma mutação do DNA mitocondrial interferindo com a produção de energia (GROSS et al., 2002). As alterações no DNA mitocondrial têm sido implicadas com o desenvolvimento de DM, sendo a substituição de A por G na posição 3243 no gene do RNAt da leucina a mutação mais comumente associada. A segregação dessa mutação com diabetes foi inicialmente reportada por Vanden Ouweland em 1992, sendo posteriormente proposto o nome de MIDD (*Maternal Inherited Diabetes and Deafness*) para esse subtipo de diabetes (SALLES et al., 2007). Os pacientes usualmente apresentam

surdez neurosensorial e distrofia macular e menos frequentemente pode haver miopatia, cardiomiopatia e doença renal (GROSS et al., 2002) Os mesmos podem apresentar-se como não dependente de insulina com posterior necessidade de insulino terapia ou como dependente de insulina desde o início. A suspeita clínica é feita pela presença de perda auditiva neurosensorial, transmissão materna do diabetes, índice de massa corporal normal ou baixo e baixa estatura (SALLES et al., 2007).

### **1.3 *Diabetes mellitus* Experimental por Aloxana**

#### **1.3.1 Ação diabetogênica da Aloxana**

Aloxana (2,4,5,6-Tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) foi primeiramente descrita por Brugnatelli em 1818 (SZKUDELSKI, 2001). Em 1838, Wöhler e Liebig, sintetizaram um derivado da pirimidina, que mais tarde foi chamado de aloxana (NEGRI, 2005; LENZEN, 2008). Substância derivada do ácido úrico (RERUP 1970; SZKUDELSKI, 2001), a aloxana, uma toxina muito seletiva das células  $\beta$  pancreáticas por causar a inibição da glicoquinase (NEGRI, 2005), tornou-se muitos anos mais tarde, em 1943, uma substância de grande interesse por parte dos pesquisadores do *Diabetes mellitus*; quando Dunm, Sheehan e McLetchie, propuseram que a droga poderia induzir o diabetes quando administrada em coelhos, como resultado de necrose específica das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001). A insulinopenia resultante provocava um estado de *Diabetes mellitus* experimental chamado Diabetes aloxânico, comumente utilizado como modelo animal de *Diabetes mellitus* Insulinodependente (IDDM) (McLETCHIE, 1982; LENZEN, 2008).

O mecanismo de ação da aloxana foi intensamente estudado, predominantemente *in vitro*, sendo muito bem caracterizado. Alguns pesquisadores usando ilhotas isoladas (WEAVER; McDANIEL; LACY, 1978) e pâncreas perfundidos de ratos (KLIBER; SZKUDELSKI; CHICHLowska, 1996),

demonstraram que a droga provocava um aumento súbito na secreção de insulina, na presença ou ausência de glicose. Esse fenômeno aparecia logo após o tratamento com aloxana; e o mesmo não foi observado após a exposição repetitiva das ilhotas a este agente diabetogênico (WEAVER; Mc DANIEL; LACY, 1978). O súbito aumento na concentração sanguínea de insulina, também foi observado *in vivo*, logo após a injeção da droga em ratos (SZKUDELSKI, 2001). A aloxana promove uma liberação maciça de insulina, presumivelmente em virtude do influxo de íons cálcio ao citosol das células  $\beta$ ; no entanto, trata-se de uma liberação de curta duração, seguida por completa supressão da resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, em decorrência de necrose das células  $\beta$  (SZKUDELSKI; KANDULSKA; OKULICZ, 1998; SZKUDELSKI, 2001).

A ação da aloxana no pâncreas é precedida por sua rápida absorção pelas células  $\beta$ , uma das principais características determinantes da diabetogenicidade da mesma (WEAVER; Mc DANIEL; LACY, 1978). Possui comprovadamente, ação seletiva e destrutiva sobre as células  $\beta$  pancreáticas, o que induz ao *Diabetes mellitus* em animais experimentais (WAGURI et al., 1997). A citotoxicidade seletiva da aloxana é condicionada pela grande capacidade da célula  $\beta$  em acumular a droga, atribuída a uma elevada taxa de captação da droga por essa célula, através do transportador de glicose GLUT2 presente no plasma (MALAISSE et al., 1982; JANSSON; SANDLER, 1986; SZKUDELSKI, 2001). Portanto os efeitos patológicos da aloxana podem ser atribuídos as suas propriedades químicas, a absorção seletiva celular e ao acúmulo da mesma (LENZEN, 2008).

Estudo, utilizando o método imunoistoquímico, observou que os pâncreas dos animais com *Diabetes mellitus* induzido por aloxana, apresentaram redução de 70% da área da ilhota ocupada pelas células  $\beta$ , chegando até a ausência delas, enquanto houve aumento da área ocupada por células  $\delta$  e não houve alteração no conteúdo de células produtoras de glucagon nas ilhotas (RASTOGI et al., 1990). Outro estudo concluiu que, aparentemente, a aloxana causa não somente a destruição das células  $\beta$ , como também, de toda a ilhota, com aumento das células  $\alpha$  e  $\delta$  por hiperplasia (RASTOGI et al., 1993). Analisando a morfologia das ilhotas pancreáticas, havendo coloração por imunofluorescência e análise morfométrica, e levando-se em consideração a área total de células por ilhota, demonstrou-se que as células  $\alpha$  e  $\delta$  dos pâncreas dos ratos com *Diabetes mellitus* induzido por aloxana,

estavam dispersas e com forma distorcida, em contraste com sua localização periférica normal (PATEL et al., 1983).

Por se tratar de um composto químico muito instável, a aloxana, com estrutura molecular muito semelhante à glicose (Figura 2), ambas hidrofílicas, não penetra a bicamada lipídica da membrana plasmática; porém é aceita pelo transportador de glicose GLUT2 presente na membrana plasmática da célula  $\beta$ , que a transporta para o citosol, promovendo sua entrada para o interior da célula. A aloxana não inibe a função do transportador, e pode seletivamente entrar nas células  $\beta$  de forma irrestrita; portanto não é tóxica para as células produtoras de insulina que não expressam esse transportador (LENZEN, 2008). A meia-vida da aloxana em pH neutro e temperatura de 37°C, é de cerca de 1,5 minutos; se decompõe espontaneamente em ácido aloxânico não diabetogênico em minutos, quando diluída em solução aquosa. Devido a isso, ela deve-se acumular rapidamente nas células  $\beta$ ; e se apresenta ineficaz quando o fluxo de sangue para o pâncreas é interrompido durante os primeiros minutos após a injeção (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008). Alguns autores diluem a droga em solução aquosa (cloreto de sódio 0,9%) (BONGIOLO, 2008; CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003; LERCO et al., 2003; OLIVEIRA, 2008; OLIVEIRA et al., 2008), obtendo resultados satisfatórios na indução, enquanto outros autores relatam a diluição em solução tampão citrato 0,05M, pH 4,5 (CAVALLI et al., 2007; MAZZANTI et al., 2003; ZANOELLO et al., 2002), também obtendo satisfação na indução experimental.

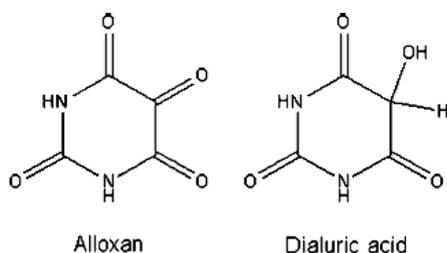


FIGURA 2 – Estrutura química da aloxana e seu produto de redução (ácido dialúrico)  
 Fonte: LENZEN, 2008.

Na presença de tióis intracelulares, especialmente Glutathiona, a aloxana produz espécies reativas de oxigênio por meio de uma reação redox cíclica

com seu produto de redução, o ácido dialúrico. A formação de espécies reativas de oxigênio é precedida pela redução da aloxana, que ocorre nas células  $\beta$ , na presença de diferentes agentes redutores (COHEN; HEIKKILA, 1974; WINTERBOURN; MUNDAY, 1989; LENZEN, 2008). A droga exibe alta afinidade por compostos celulares contendo sulfidril (SH), Glutathione reduzida (tripeptídeo glutathione-GSH), cisteína e grupos sulfidril contidos em proteínas (incluindo enzimas contendo SH); sendo estes compostos mais susceptíveis a sua ação (LENZEN; MUNDAY, 1991; LENZEN, 2008). No entanto, a redução de outros agentes como os ditíóis e o ácido ascórbico também são adequados agentes redutores e pode, portanto, contribuir para a redução da aloxana (LENZEN, 2008).

A redução da aloxana em ácido dialúrico na célula ocorre na presença de um tiol adequado, normalmente o tripeptídeo glutathione (GSH) para gerar a ciclagem redox, ácido dialúrico e glutathione oxidada (WINTERBOURN; MUNDAY, 1989; LENZEN, 2008). A estrutura tri-cetona da aloxana é de vital importância para esta reação em duas fases com glutathione, que gera o radical aloxana como produto intermediário (LENZEN, 2008). Quando mantida sob a forma oxidada, a aloxana não gera espécies reativas de oxigênio; assim, não é citotóxica na ausência de tióis como GSH ou quando restrita ao espaço extracelular. Tióis na membrana plasmática, com que aloxana poderia interagir e gerar espécies reativas em um ciclo redox, aparentemente não estão presentes ou não acessíveis em uma extensão suficiente, para permitir a geração dessas espécies reativas de oxigênio e danificar as células (ELSNER; GURGUL-CONVEY; LENZEN, 2006). O produto de redução do ácido dialúrico também não é tóxico quando mantido sob a forma reduzida (WINTERBOURN; MUNDAY, 1989; ELSNER; GURGUL-CONVEY; LENZEN, 2006), entretanto, em contraste com aloxana, o ácido dialúrico auto-oxida espontaneamente na presença de  $O_2$ , gerando espécies reativas de oxigênio citotóxicas na ausência de tióis (LENZEN, 2008).

Quando as concentrações de agentes redutores da aloxana são significativamente aumentadas na corrente sanguínea ou no espaço extracelular, através da injeção de um tiol, mais aloxana é reduzida extracelularmente de modo que, menos está disponível para a acumulação intracelular. No entanto, a capacidade de redução da aloxana, ciclo redox e a geração de espécies reativas

de oxigênio na circulação, normalmente não são suficientes para evitar que a molécula de aloxana entre na célula  $\beta$  (LENZEN, 2008).

Lenzen, Tiedge e Panten (1987), propuseram que um dos compostos contendo SH essencial para a secreção de insulina induzida pela glicose é a glicoquinase, enzima contendo grupo tiol mais sensível na célula  $\beta$ , sendo muito vulneráveis à ação da droga. A aloxana reage com dois grupos SH da glicoquinase, resultando na formação de uma ligação dissulfeto e inativação da enzima; entretanto a glicose pode proteger contra a inativação glicoquinase, dificultando o acesso da aloxana aos grupos SH da enzima (LENZEN; TIEDGE; PANTEN, 1987; SZKUDELSKI, 2001). A inibição da glicoquinase reduz a oxidação da glicose e geração de ATP, suprimindo assim o sinal de ATP que desencadeia a secreção de insulina. Essa inibição da glicoquinase é atingida dentro de um minuto de exposição à aloxana. Porém a inibição da secreção de insulina após a exposição à aloxana é restrita pela indução de glicose e seu epímero, manose, os quais induzem a secreção de insulina através da interação com a glicoquinase (LENZEN, 2008). Tem sido argumentado que a glicose neutraliza a citotoxicidade da aloxana *in vitro* e *in vivo*; no entanto, essa capacidade não resulta apenas da proteção da glicoquinase. O efeito protetor da glicose contra a necrose e morte das células  $\beta$  é dose dependente (glicose e aloxana), e pode ocorrer devido à interação do açúcar com o transportador de glicose GLUT2, resultando numa captação limitada de aloxana (RERUP, 1970; SZKUDELSKI, 2001). A biossíntese de insulina é também inibida pela aloxana, muito provavelmente através do mesmo mecanismo (LENZEN, 2008).

A ação tóxica da aloxana nas células  $\beta$  é iniciada pelos radicais livres formados na reação redox (LENZEN, 2008). O ácido dialúrico é formado como resultado da redução da aloxana, por ação dos agentes redutores; que em seguida é re-oxidado de volta para aloxana, estabelecendo um ciclo redox para a geração dos radicais superóxido (SZKUDELSKI, 2001). A auto-oxidação do ácido dialúrico gera radicais superóxido altamente reativos ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e radical hidroxila (OH) - o radical mais reativo sendo gerado na reação entre  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  catalisada pelo ferro (WINTERBOURN; MUNDAY, 1989; LENZEN, 2008). Esses radicais (radical hidroxila) afetam o metabolismo oxidativo da célula, com subsequente necrose seletiva das células  $\beta$ , e morte celular; o que provoca um estado de diabetes insulino dependente (JANSSON; SANDLER, 1986; ZANOELLO et

al., 2002). O fato da célula  $\beta$  demonstrar maior sensibilidade aos radicais peróxidos quando comparada a outros tecidos acontece devido à baixa atividade da enzima GSH-peroxidase, que catalisa a redução de peróxidos nessas células (MALAISSE et al., 1982; SZKUDELSKI; KANDULSKA; OKULICZ, 1998; LIMA et al., 2001). A captação similar de aloxana também ocorre no fígado; entretanto, o fígado e outros tecidos são mais resistentes às espécies reativas de oxigênio em comparação com as células  $\beta$  do pâncreas, e essa resistência protege contra a toxicidade da aloxana (MALAISSE et al, 1982; SZKUDELSKI, 2001). A possibilidade dos radicais peróxidos estarem envolvidos no efeito diabetogênico da aloxana é reforçado pelo fato de etanol, metanol, n-propanol e n-butanol, álcoois de cadeia curta e varredores desses radicais protegerem as células  $\beta$  contra ação dessa droga (FISCHER; HAMBURGER, 1980a).

Um dos alvos das espécies reativas de oxigênio é o DNA das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas. Esses radicais induzem quebras simples e duplas nas cadeias de DNA, resultando na ativação da enzima poli-ADP-ribose. O processo de ativação da enzima nuclear resulta em uma significativa depleção do conteúdo intracelular de NAD, que é consumido no processo de síntese de poli-ADP-ribose, afetando severamente as funções celulares, como a produção de ATP, síntese de proteínas, levando a célula à morte (YAMAMOTO; UCHIGATA; OKAMOTO, 1981; SZKUDELSKI, 2001). Segundo Sandler, Welsh e Andersson (1984), a aloxana age a nível da utilização mitocondrial de substratos exógenos, afetando as funções mitocondriais essenciais, danificando e desintegrando essas organelas celulares.

Foi proposto que distúrbios na homeostase do cálcio intracelular constituem um importante passo na ação diabetogênica da aloxana. Este conceito foi confirmado *in vitro* e *in vivo* demonstrando que a aloxana eleva a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico livre nas células  $\beta$  pancreáticas. A droga induz um influxo de cálcio do líquido extracelular, resultante de sua capacidade em despolarizar as células  $\beta$  do pâncreas. A despolarização da membrana celular abre os canais de cálcio dependentes de voltagem e aumenta a entrada de cálcio nas células. A concentração exagerada deste íon contribui para a liberação suprafisiológica de insulina, juntamente com espécies reativas de oxigênio, provocando conseqüentemente, danos às células  $\beta$  pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001).

Resultados de experimentos com antagonistas de canais de cálcio têm confirmado o importante papel do cálcio citosólico na ação citotóxica da aloxana. O pré-tratamento de ratos com verapamil impediu o aumento induzido pela aloxana na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  celular, e aboliu o efeito estimulante da droga sobre a liberação de insulina. Os antagonistas de canais de cálcio (verapamil e diltiazem) também suprimiram a hiperglicemia e o aparecimento de diabetes com aloxana em ratos (SZKUDELSKI, 2001).

Resumindo, a ação tóxica da aloxana em células  $\beta$  pancreáticas, descrito há muitos anos por Dunn, é a soma de vários processos, tais como oxidação de grupos SH essenciais, a inibição da glicoquinase, a geração de radicais livres e os distúrbios na homeostase do cálcio intracelular (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008).

### **1.3.2 Fatores que influenciam a ação diabetogênica da Aloxana**

Múltiplos fatores são capazes de influenciar os efeitos diabetogênicos da aloxana e a sensibilidade do hospedeiro, podendo não estabelecer o quadro de diabetes ou levar o mesmo à morte. Estar atento a estes fatores é de vital importância, para obtenção de indução do diabetes de maneira satisfatória, com maior número de animais diabéticos, menor índice de mortalidade e manutenção dos animais em boas condições.

Estão envolvidos nestes fatores, a dose, concentração da droga, via de administração, velocidade de infusão, dieta, tempo de jejum, espécie e peso do animal, até a utilização de substâncias capazes de influenciar os seus mecanismos de ação, tais como barbitúricos, ácido nicotínico, 1-2-dimetil-4 amino-5-benzeno, (LERCO et al., 2003; FEDERIUK et al., 2004), picolinamida, benzamida, 3-aminobenzamida, teofilina, nicotinamida, entre outras (WILSON et al., 1984).

### 1.3.2.1 Doses, concentração, vias de administração e velocidade de infusão

Sugere-se que para cada grupo de ratos a ser estudado, seja determinada a dose diabetogênica antes do início dos experimentos propriamente ditos. A dose diabetogênica da droga é definida como a quantidade do agente indutor que promove necrose das células  $\beta$  e hiperglicemia mantida em pelo menos 80% dos animais, mas não causa danos a outros órgãos. Sugestão essa, importante, para que se evite o uso excessivo e desnecessário de animais, estando de acordo com as orientações éticas para uso de animais de experimentação (DELFINO et al., 2002).

A aloxana exerce sua ação diabetogênica quando é administrada por via parentérica: via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose de aloxana necessária para induzir o diabetes depende da espécie animal, via de administração e estado nutricional. (SZKUDELSKI, 2001). Quando administrada por via intravenosa (iv), a dose mais frequentemente utilizada em ratos é de 40 a 65mg/kg, por meio da veia peniana ou veia da cauda e na concentração de 2% (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003; LERCO et al., 2003; SZKUDELSKI, 2001). Alguns pesquisadores utilizam doses mais elevadas de 120mg/kg (iv) (FEDERIUK et al., 2004). A velocidade de infusão é importante, quando a via intravenosa é utilizada; doses efetivas de aloxana não produzem diabetes se as mesmas são injetadas lentamente (LERCO et al., 2003). Por via intraperitoneal ou subcutânea, a dose eficaz deve ser duas a três vezes maior que a dose para via intravenosa. A dose intraperitoneal abaixo de 150mg/kg, pode ser insuficiente para induzir o diabetes em ratos, necessitando de uma segunda dose (SZKUDELSKI, 2001).

Embora maior parte dos pesquisadores utilizarem a via intravenosa na maioria das espécies animais, onde os efeitos da aloxana são mais evidentes, Federiuk et al. (2004) em seu experimento utiliza vários protocolos para indução do diabetes, e observa que 70% dos ratos que receberam uma dose de 120mg/kg de aloxana (intravenosa) morreram nos primeiros dois dias após a indução, apesar de adotar as medidas destinadas a prevenir a desidratação e hipoglicemia. Devido ao alto índice de mortalidade, provavelmente decorrente da liberação maciça de insulina pelas células  $\beta$  lesadas, seguida de morte encefálica; o autor abandonou

esta dose por esta via de administração e não a recomenda. Por outro lado, o mesmo relata uma satisfação na indução do diabetes, quando utiliza uma dose de 200mg/kg de aloxana por via intraperitoneal em um grupo de 10 animais, visto que apenas um animal (10%) morreu durante a primeira semana, e o restante dos animais permaneceram vivos por mais de 200 dias, utilizando-se das medidas de prevenção a desnutrição, desidratação e hipoglicemia. É importante observar que a dose foi ajustada de 120 para 200mg/kg, com a troca da via intravenosa pela intraperitoneal.

Com a preferência pela via intraperitoneal, uma atenção meticulosa deve ser dada aos valores de glicose no sangue, o que pode aumentar ou diminuir precipitadamente (FEDERIUK et al., 2004).

### **1.3.2.2 Dieta e jejum**

A alimentação prévia dos animais tem importância significativa, quanto à sensibilidade do hospedeiro a ação da droga. Uma dieta com alto teor de gordura torna os ratos mais sensíveis a uma dose constante de aloxana, com taxa de mortalidade, nesses casos, de 90% a 100%. Por outro lado, uma dieta com alto teor de proteínas e carboidratos, é capaz de diminuir esses índices para 33% a 40% (LERCO et al., 2003), visto que, o aumento de glicose no sangue proveniente dos carboidratos, fornece uma proteção parcial à ação da droga; devido à interação das moléculas de açúcar com o transportador de glicose GLUT2, resultando em uma captação limitada de aloxana (RERUP, 1970; SZKUDELSKI, 2001).

O jejum promove maior sensibilidade à ação diabetogênica da droga, e tem importância significativa na resposta dos animais à aloxana. Segundo Lukens (1948), 95% dos ratos tratados com aloxana, administrada com o animal em jejum prolongado de 48 a 60 horas, tornam-se diabéticos, enquanto que uma dose similar administrada em animais onde o jejum não foi observado diminui essa resposta em 25%. Alguns animais apresentam-se refratários a doses posteriores a primeira injeção de aloxana, e esse comportamento é observado em animais cujo jejum não foi convenientemente observado. Entretanto, estes mesmos animais, refratários a

doses subsequentes, tornam-se diabéticos após 60 horas de jejum, com uma dose padrão de aloxana (LUKENS, 1948). O tempo de jejum pode variar de 12, 24, 48 a 60 horas, como apontam alguns pesquisadores, sendo que a sensibilidade do animal a ação da droga aumenta respectivamente com o aumento do tempo de jejum (ZANOELLO et al., 2002; LERCO et al., 2003; FEDERIUK et al., 2004; CAVALLI et al., 2007).

### 1.3.2.3 Espécies e peso do animal

A aloxana pode ser utilizada para indução do *Diabetes mellitus* em ratos, cães, coelhos, hamster, cobaias e até ovinos (BLACK; ROSENBLUM; CAPEN, 1980; FEDERIUK et al., 2004). Porém os ratos têm sido amplamente utilizados por pesquisadores em todo o mundo, por apresentarem inúmeras vantagens em relação ao cão e a outros animais de maior porte: fácil manuseio (alimentação, higiene, acomodação); possibilidade de trabalhar simultaneamente com vários grupos experimentais, sem a ocupação de grandes espaços; elevada resistência à infecção; e facilidade para remoção dos diversos órgãos estudados (retina, rins, coração, aorta e ilíacas). Além desses fatos, por apresentarem semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o diabetes humano (LERCO et al., 2003). Uma grande desvantagem em utilizar o cão, segundo Black, Rosenblum e Capen (1980) é o grande índice de mortalidade desses animais após a administração da droga. A utilização de coelhos, segundo Federiuk et al. (2004), também é desvantajosa, já que, esses animais apresentam alto índice de mortalidade, hipoglicemia frequente, e conseqüentemente déficits neurológicos frequentes atribuíveis a hipoglicemia; além de serem mais difíceis de lidar.

Lukens (1948) revelou a importância do peso, em relação à susceptibilidade do animal aos efeitos tóxicos da aloxana. Em um estudo detalhado em ratos, esse pesquisador revelou que a toxicidade da aloxana altera-se numa relação linear com o peso do animal, aumentando 0,73 poderes de toxicidade para cada unidade de peso. Os pesos dos ratos podem ser os mais variados entre 123-

160g (ZANOELLO et al., 2002), 200-300g (LERCO et al., 2003), 250-330g (CAVALLI et al., 2007), 250-350g (MAZZANTI et al., 2003), 350-675g (FEDERIUUK et al., 2004).

#### **1.3.2.4 Substâncias que interferem na ação diabetogênica da Aloxana**

Algumas substâncias agem direta ou indiretamente sobre os mecanismos de ação da aloxana. Os barbitúricos tornam os animais mais sensíveis aos efeitos da droga. Por outro lado, algumas substâncias, tais como o ácido nicotínico, o 1-2-dimetil-4 amino-5-benzeno e o ácido dicarboxílico piridínico, podem proteger o animal desses danos, se administrados simultaneamente com a droga (LERCO et al., 2003). A nível celular, o etanol, metanol, n-propanol e n-butanol, (álcoois de cadeia curta), protegem as células  $\beta$  contra ação dessa droga (FISCHER; HAMBURGER, 1980a). O pré-tratamento das ilhotas com alguns inibidores da enzima poli-ADP-ribose, como picolinamida, benzamida, 3-aminobenzamida, teofilina e nicotinamida, podem parcialmente restringir a toxicidade da aloxana, protegendo as ilhotas contra a diminuição da biossíntese de pró-insulina provocada pela mesma (WILSON et al., 1984; SZKUDELSKI, 2001). Ainda o tratamento prévio das ilhotas com a superóxido dismutase e catalase, promove uma ação profilática contra a citotoxicidade da aloxana sobre as células  $\beta$ , *in vivo* e *in vitro* (FISCHER; HAMBURGER, 1980a; ZANOELLO et al., 2002; MAZZANTI et al., 2003). A hiperglicemia induzida pela aloxana em ratos pode ser suprimida por antagonistas dos canais de cálcio (verapamil e diltiazem), assim como o cloreto de níquel que previne a hiperglicemia, devido a sua capacidade de aumentar a atividade da superóxido dismutase no pâncreas desses animais. Por fim alguns estudos demonstram que o grau de destruição das células  $\beta$  pancreáticas provocada pela aloxana *in vitro*, é reduzido em 80% pela adição de glicose ao meio, antes ou durante a exposição à droga (ZANOELLO et al., 2002).

O estudo em questão teve como objetivo, estudar a indução experimental do diabetes em ratos *Wistar*, pela administração intraperitoneal de aloxana em diferentes doses; verificando qual a dose mais eficiente, ou seja, que

estabelece o quadro de diabetes num maior número de animais, com menor percentual de óbitos.

## REFERÊNCIAS

BARONE, B. Cetoacidose diabética em adultos – Atualização de uma complicação antiga. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 9, p. 1434-1447, 2007.

BERTRAM, C. et al. The Maternal Diet during Pregnancy Programs Altered Expression of the Glucocorticoid Receptor and Type 2 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase: Potential Molecular Mechanisms Underlying the Programming of Hypertension *in Utero*. **Endocrinology**, v. 142, n. 7, p. 2841-2853, 2001.

BLACK, H. E.; ROSENBLUM, I. Y.; CAPEN, C. C. Chemically Induced (Streptozotocin-Alloxan) Diabetes Mellitus in the Dog: Biochemical and Ultrastructural Studies. **Am. J. Pathol.**, v. 98, n. 2, p. 295-310, 1980.

BONGIOLO, A. M. **Efeito do extrato hidroalcólico de *Eugenia uniflora L.* (Myrtaceae) sobre a hiperglicemia e dislipidemia de ratos diabéticos induzidos por aloxana.** 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina.

BORTOLOTTO, L. A. Alterações das propriedades funcionais e estruturais de grandes artérias no diabetes mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 2, p. 176-184, 2007.

BOSELLO, O.; ZAMBONI, M. Visceral obesity and metabolic syndrome. **Obes. Rev.**, 2000; v. 1, n. 1, p. 47-56, 2000.

CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 295-298.

CARVALHEIRA, J. B.C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 2002, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of *diabetes mellitus* in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. spe, p. 60-64, 2003.

CAVALLI, V. L. L. O. et al. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill). Bernh. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 64-70, 2007.

CISTERNAS, J. R. Fisiologia das Ilhotas de Langerhans. In: DOUGLAS, C. R. **Tratado de fisiologia aplicado à nutrição**. São Paulo: Robe Editorial, 2002. p. 791-804.

COHEN, G; HEIKKILA, R. E. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n. 8, p. 2447-2452, 1974.

COLLETT-SOLBERG, P. F. Cetoacidose diabética em crianças: revisão da fisiopatologia e tratamento com o uso do “método de duas soluções salinas”. **J. Pediatr.**, v. 77, n. 1, p. 9-16, 2001.

CORRÊA, F. H. S. et al. Influência da gordura corporal no controle clínico e metabólico de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, n.1, p. 62-68, 2003.

DELFINO, V. D. A. et al. *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J. Bras. Nefrol.**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus. **Sociedade Brasileira de Diabetes** 2006. 154p.

ELSNER, M.; GURGUL-CONVEY, E; LENZEN, S. Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 41, n. 5, p. 825-834, 2006.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5. ed. São Paulo: Manole, 2004, 2156p.

FARIA, P. F. Diabetes Mellitus em cães. **Acta Veterinaria Brasília**. v. 1, n. 1, p. 8-22, 2007.

FEDERIUK, I. F. et al. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. **Comp. Med.**, v. 54, n. 3, p. 252-257, 2004.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996.

FISCHER, L. J.; HAMBURGER, S. A. Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and metal chelator. **Diabetes**, v. 29, n. 3, p. 213-216, 1980a.

FISCHER, L. J.; HAMBURGER, S. A. Dimethylurea: a radical scavenger that protects isolated pancreatic islets from the effects of alloxan and dihydroxyfumarate exposure. **Life Sci.**, v. 26, n. 17, p. 1405-1409, 1980b.

FOSS-FREITAS, M. C.; FOSS, M. C. Cetoacidose diabética e estado hiperglicêmico hiperosmolar. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 36, n. 2/4, p. 389-393, 2003.

FRENCH, S.; CASTIGLIONE K. Recent advances in the physiology of eating. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 61, n. 4, p. 489-496, 2002.

FRIEDMAN, M. I. Fuel partitioning and food intake. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67, n. (3 Suppl), p. 513-518, 1998.

GILMAN, A. G. et al. **GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

GROSS, J. L. et al. Diabetes melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2011.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HAVEL, P. J. Relationship of plasma insulin and adiposity in normal weight and over-weight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, n. 12, p. 4406-4413, 1996.

HEIKKILA, R. E. et al. Alloxan-induced-diabetes-evidence for hydroxyl radical as cytotoxic intermediate. **Biochem. Pharmacol.**, v. 25, n. 9, p. 1085-1892, 1976.

ISLAS-ANDRADE, S. et al. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of the Two Models in Rats. **Acta Histochem. Citochem.**, v. 33, n. 3, p. 201-208, 2000.

JANSSON, L.; SANDLER, S. Alloxan-induced diabetes in the mouse: Time course of pancreatic B-cell destruction as reflected in an increased islet vascular permeability. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 410, n. 1, p. 17-21, 1986.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000, p. 1275.

KLIBER, A.; SZKUDELSKI, T.; CHICHOWSKA, J. Alloxan stimulation and subsequent inhibition of insulin release from in situ perfused rat pancreas. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 47, n. 2, p. 321-328, 1996.

KULLER, L. H. Epidemiology of cardiovascular diseases: current perspectives. **Am. J. Epidemiol.**, v. 104, n. 4, p. 425-456, 1976.

LEAL, D. T. et al. Diabetes na infância e adolescência: o enfrentamento da doença no cotidiano da família. **HU Rev.**, v. 35, n. 4, p. 288-295, 2009.

LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, n. 7, p. 1385-1391, 1991.

LENZEN, S.; TIEDGE, M.; PANTEN, U. Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, v. 115, n. 1, p. 21-29, 1987.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, v. 31, n. 6, p. 337-342, 1988.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido por Aloxana em ratos. Estudo clínico e Laboratorial. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LIANG, Y.; MATSCHINSKY, F. M. Mechanisms of action of nonglucose insulin secretagogues. **Annu. Rev. Nutr.**, v.14, p. 59-81, 1994.

LIMA, M. A. et al. Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 34, n 3/4, p. 308-314, 2001.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. Paul. Educ. Fís.**, v. 12, n. 2, p. 202-209, 1998.

LUKENS, F. D. W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 304-330, 1948.

MALAISSSE, W. J. et al. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, n. 3, p. 927-930, 1982.

MAZZANTI, C. M. et al. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Cienc. Rural**, v. 33, n. 6, p. 1061-1065, 2003.

McLELLAN, K. C. P. et al. *Diabetes mellitus* do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Rev. Nutr.**, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2007.

McLETCHIE, N. G. B. Alloxan diabetes: the sorcerer and his apprentice. **Diabetologia**, v. 23, n. 1, p. 72-75, 1982.

MANOLESCU, A.R. et al. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. **Physiology (Bethesda)**, v. 22, n. 4, p. 234-240, 2007.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters - Review. **Eur. J. Biochem.**, v. 219, n. 3, p. 713-725, 1994.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1084 p.

NOGUEIRA, R. M. B.; MARCO, V. Terapêutica das principais endocrinopatias em cães e gatos. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 397-431.

OLIVEIRA, C. L. et al. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 237-245, 2004.

OLIVEIRA, D. M. **Influência da ingestão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos Wistar**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, T. V. et al. Análise Morfométrica da Placenta de Ratas Wistar Prenhes Induzidas ao Diabetes Mellitus por Aloxana. **Rev. Eletr. Bio.**, v. 1, n. 2, p. 28-41, 2008.

PAIVA, C. Novos critérios de diagnóstico e classificação da diabetes mellitus. **Medicina Interna**, v. 7, n. 4, p. 234-238, 2001.

PATEL, Y. C. et al. Alterations in somatostatin and other islet cell functions in the spontaneously diabetic BB Wistar rat: Biochemical and morphological characterization. **Metabolism.**, v. 32, n. 7, p. 18-25, 1983.

RASTOGI, K.S. et al. Paradoxical reduction in pancreatic glucagon with normalization of Somatostatin and decrease in insulin in normoglycemic alloxan-diabetic dogs: a putative mechanism of glucagon irresponsiveness to hypoglycemia. **Endocrinology.**, v. 126, n. 2, p. 1096-1104, 1990.

RASTOGI, K. S. et al. Increase in somatostatin to glucagon ratio in islets of alloxan-diabetic dogs: effect of insulin-induced euglycemia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 71, n. 7, p. 512-517, 1993.

RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacol. Rev.**, v. 22, n. 4, p. 485-518, 1970.

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELLO, M. A. R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. **Motriz Rev. Educ. Fís.**, v. 13, n. 1, p. 72-77, 2007.

ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Influência do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de proteínas. **Motriz Rev. Educ. Fís.**, v. 7, n. 2, p. 75-82, 2001.

SACKS, D. B. et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes mellitus. **Clin. Chem.**, v. 48, n. 3, p. 436-472, 2002.

SALLES, J. E. N. et al. Diabetes mellitus associado à mutação mitocondrial A3243G: frequência e caracterização clínica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 4, p. 559-565, 2007.

SANDLER, S.; WELSH, M.; ANDERSSON, A. Nicotinamide does not protect islet B-cell metabolism against alloxan toxicity. **Diabetes**, v. 33, n. 10, p. 937-943, 1984.

SCHEFFEL, R. S. et al. Prevalências de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito tipo 2 em atendimento ambulatorial. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 50, n. 3, p. 263-267, 2004.

SCHEIN, P. S. et al. Streptozotocin-diabetes. Further studies on the mechanism of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mouse pancreatic islets and liver. **Biochem. Pharmacol.**, v. 22, n. 20, p. 2625-2631, 1973.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídios e proteínas: III. Aplicação à insulina. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 39, n. 1, p. 21-40, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso Brasileiro sobre diabetes: Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e Tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2.** Rio de Janeiro: 2003.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 454.

SZKUDELSKI, T.; KANDULSKA, K.; OKULICZ, M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiol. Res.**, v. 47, n. 5, p. 343-346, 1998.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, n. 6, p. 536-546, 2001.

TILLEY, L. P.; SMITH JR., F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos**: espécies canina e felina. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 618-623.

WAGURI, M. et al. Demonstration of two different processes of b-cell regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan. **Diabetes**, v. 46, n. 8, p. 1281-1290, 1997.

WEAVER, D. C.; MCDANIEL, M.; LACY, P. E. Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans. **Endocrinology**, v. 102, n. 6, p. 1847-1855, 1978.

WILSON, G. L. et al. Mechanisms of streptozotocin and alloxan induced damage in rat  $\beta$  cells. **Diabetologia**, v. 27, n. 6, p. 587-591, 1984.

WINTERBOURN, C. C.; MUNDAY, R. Glutathione-mediated redox cycling of alloxan: Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH formation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, n. 2, p. 271-277, 1989.

YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 103, n. 3, p. 1014-1020, 1981.

YOXALL, A T.; HIRD, J. F. R. Bases fisiológicas da medicina do pequeno animal. São Paulo: Andrei, 1996. p. 13-15.

ZANOELLO, A. M. et al. Efeito Protetor do *Syzygium cumini* contra *Diabetes Mellitus* induzido por Aloxano em Ratos. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2002.

ZIB, I.; RASKIN, P. Novel insulin analogues and its mitogenic potential. **Diabetics, Obesity and Metabolism.**, v. 8, n. 6, p. 611-620, 2006.

# Indução Experimental do *Diabetes mellitus* em Ratos Wistar submetidos à Injeção Intraperitoneal de Aloxana em Diferentes Doses

Valter Dias da Silva<sup>1\*</sup>; Rosa Maria Barilli Nogueira<sup>1</sup>; Gloriane Izabel Wojciechovski de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Mestrado em Ciência Animal; Universidade do Oeste Paulista; Rodovia Raposo Tavares, km 572; 19067-175; Presidente Prudente - SP - Brasil

## ABSTRACT

*This study was to compare the effects of the action diabetogenic of alloxan in different doses, through its administration intraperitoneally (ip) in Wistar rats. The animals were distributed randomly four in experimental groups: experimental control group (GC), consisting of 30 rats subjected to injection (ip) of sodium chloride solution 0.9%; Group 1 (G1), 2 (G2) and 3 (G3) consisting of 60 rats each, subject to injection (ip) alloxan 2% at doses of 120, 150 and 200 mg/Kg, respectively. Were evaluated during 15 days, on the following parameters: blood glucose, weight, water intake, dietary intake, urination chemical examination of urine (glucose, ketone bodies, and other parameters). It was concluded that, the dose of 120 mg/Kg alloxan at 2% (ip), when compared to other doses was the most efficient, compared to the objectives of this study, it induced diabetes in a larger number of animals and promoted a low percentage of deaths.*

**Key words:** alloxan, intraperitoneally, *Diabetes mellitus*, Wistar rat.

## INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus*, desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, resultante da deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina, (Paiva, 2001; Gross et al., 2002; Oliveira et al., 2008); gera consequências sociais e econômicas devastadoras: são quatro milhões de mortes por ano relacionadas ao diabetes e suas complicações, o que representa 9% da mortalidade mundial total (Leal et al., 2009).

Entre suas complicações microvasculares, predominam a retinopatia, nefropatia, neuropatia e uma variedade de neuropatias debilitantes; entre as macrovasculares, destacam-se particularmente o acidente vascular cerebral e as doenças da artéria coronária, afetando artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores (Scheffel et al., 2004; Cavalli et al., 2007). Juntas, essas doenças fazem do diabetes a sétima causa de óbitos no mundo desenvolvido (Reis et al., 2008), sendo a doença cardiovascular a principal causa de morte

no *Diabetes mellitus* Insulinodependente (IDDM) (Ribeiro et al., 2007), uma vez que, essa endocrinopatia está associada ao aumento da aterosclerose, observada em autópsias de infarto agudo do miocárdio, decorrente de alterações funcionais e estruturais de grandes artérias, principalmente aumento da rigidez arterial em diabéticos (Kuller, 1976; Bortolotto, 2007).

Comum não só em humanos, o *Diabetes mellitus*, esta presente em animais de estimação como os cães, e pode ser fatal se não for diagnosticada e adequadamente tratada (Faria, 2007). A maioria dos casos de diabetes espontâneo ocorre em cães adultos, idosos, obesos e sedentários (Feldman & Nelson, 1996). A incidência em fêmeas é aproximadamente o dobro da incidência em machos; e as raças caninas mais predispostas são: Poodle, Cocker, Beagle, Fox paulistinha, Pinscher, Rotweiler, Schnauzers, Dachshund e Terrier (Feldman & Nelson, 1996; Faria, 2007; Nogueira, 2008).

Frente a essa realidade, torna-se imprescindível que o empenho científico estabeleça modelos de estudo, e desenvolva técnicas para uma melhor

\* Autor para correspondência: vrdiass-farm@uol.com.br

compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes e de suas complicações, à procura de agentes terapêuticos capazes de contribuir para minimizar as alterações endócrino-metabólicas e, principalmente, as lesões crônicas sobre os diferentes órgãos causadas pela doença (Bertram et al., 2001; Lerco et al., 2003). Além de permitir o desenvolvimento de estudos detalhados dos eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabético (Zanoello et al., 2002).

Entre os diversos modelos de indução experimental do *Diabetes mellitus*, a destruição química das células  $\beta$  pancreáticas, pela administração dos agentes tóxicos aloxana (AL) e estreptozotocina (STZ), ambos citotóxicos seletivos para estas células (Delfino et al., 2002; Negri, 2005; Lenzen, 2008), é o mais utilizado atualmente.

A aloxana, derivada do ácido úrico (Machado et al., 2000), é um dos agentes diabetogênicos mais estudado e comumente utilizado no meio científico para a indução do diabetes experimental (Black et al., 1980; Jansson & Sandler, 1986; Cavalli et al., 2007), por apresentar características semelhantes às encontradas na síndrome diabética em humanos tais como, perda de peso corporal, glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, cetonúria e cetonemia; além de possuir pequena ação oncogênica e ter um custo menor quando comparada a STZ (Cavalli et al., 2007; Ribeiro et al., 2007). Essa droga possui citotoxicidade específica para as células  $\beta$  do pâncreas, causa danos aos vasos sanguíneos das ilhotas pancreáticas, levando a morte das células e ao quadro clínico de *Diabetes mellitus* tipo 1 (Jansson & Sandler, 1986; Ribeiro et al., 2007; Lenzen, 2008). Alguns estudos demonstraram que a formação de radicais superóxido e hidroxila, induzidos pela aloxana, é responsável pela citotoxicidade desse composto (Heikkila et al., 1976; Lima et al., 2001). Outros experimentos sugerem que o efeito da aloxana sobre a secreção de insulina ocorre em dois estágios; inicialmente, há uma ação estimulante com liberação rápida do hormônio, presumivelmente em virtude do influxo de íons de cálcio ao citosol das células  $\beta$ , no entanto, trata-se de uma liberação de curta duração, seguida por completa supressão na secreção de insulina, causada por interferência da aloxana com as proteínas citoplasmáticas que contêm sulfidril e dissulfeto, levando as células  $\beta$  a

necrose (Szkudelski et al., 1998; Szkudelski, 2001).

Diversos fatores podem influenciar na ação diabetogênica da aloxana: concentração da droga, velocidade de infusão, dose, via de administração, dieta, tempo de jejum, peso do animal, até a utilização de substâncias capazes de influenciar os seus mecanismos de ação, tais como os barbitúricos, o ácido nicotínico, o 1-2-dimetil-4-amino-5-benzeno (Lerco et al., 2003; Federiuk et al., 2004), picolinamida, benzamida, 3-aminobenzamida, teofilina, nicotinamida, entre outras (Wilson et al., 1984). Frente a estes fatores, justifica-se contribuir com estudos que venham aprimorar a indução experimental do *Diabetes mellitus* com o uso da aloxana e caracterizar um protocolo de indução mais satisfatório. O estudo em questão teve como objetivo, estudar a indução experimental do diabetes em ratos *Wistar*, pela administração intraperitoneal de aloxana em diferentes doses; verificando qual a dose mais eficiente, ou seja, que estabelece o quadro de diabetes num maior número de animais, com menor percentual de óbitos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Biotério Central da Universidade de origem após ser protocolado com o número 43/09, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da mesma instituição.

Para realização deste estudo foram utilizados 210 ratos da linhagem *Wistar*, fêmeas, adultos, sadios ao exame clínico, com idade de 60 dias e peso médio de 180g, provenientes do Biotério Central da instituição. Os animais foram mantidos em caixas individuais de polietileno, em local com temperatura ambiente controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodos controlados (12h claro/12h escuro) durante dois dias antes da indução do diabetes, com ração (Supra<sup>®</sup>) e água *ad libitum*.

### Indução do Diabetes Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em quatro grupos experimentais: grupo controle (GC), constituído por 30 ratos, grupo 1 (G1), grupo 2 (G2) e grupo 3 (G3) constituídos por 60 ratos cada grupo. Após jejum alimentar de 24 horas, com fornecimento de água "*ad libitum*", os animais do grupo (GC) foram submetidos a uma única injeção intraperitoneal de solução de cloreto de sódio 0,9%, enquanto os animais dos grupos (G1), (G2)

e (G3) foram submetidos a uma única injeção intraperitoneal de aloxana (Alloxan monohydrate, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), diluída a 2% em solução de cloreto de sódio 0,9% (Carvalho et al., 2003; Lerco et al., 2003; Bongioiolo, 2008; Oliveira, 2008; Oliveira et al., 2008), nas doses de 120mg/kg (Federiuk et al., 2004; Oliveira et al., 2007), 150mg/kg (Mazzanti et al., 2003; Federiuk et al., 2004) e 200mg/kg (Wimhurst & Manchester, 1970; Kodama et al., 1993; Federiuk et al., 2004; Bongioiolo, 2008) de peso corporal, respectivamente.

Decorridos 30 minutos após a injeção, os animais foram alimentados normalmente e receberam uma solução de glicose a 10% via oral, como única fonte hídrica, durante 24 horas, e água sem glicose após este período. Segundo Zanoello et al. (2002) e Mazzanti et al. (2003), o fornecimento de solução glicose a 10%, é fundamental para evitar uma hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina que ocorre após a destruição das células  $\beta$ .

#### **Avaliação clínica e laboratorial**

O período de avaliação dos animais ao longo do seguimento, após a administração da droga foi de 15 dias.

A glicemia dos animais foi avaliada nos momentos M7 (7 dias) (Lerco et al., 2003; Cavalli et al., 2007) e M14 (14 dias) (Lerco et al., 2003), por meio de glicosímetro para análise de glicose sanguínea (Breeze<sup>®</sup>2-Bayer), após jejum de 12 horas. Os animais foram contidos em cone acrílico de contenção para ratos, com exposição da cauda, onde foi feita uma pequena incisão, utilizando-se lâmina de bisturi, para a coleta de uma gota de sangue que era depositada diretamente na tira de leitura de glicose do glicosímetro. Foram considerados animais diabéticos, os animais que apresentaram glicemia de jejum em dois níveis de intensidade, ao qual se classificou o estado diabético: diabetes moderado (DM) (glicemia de jejum de 120 a 200mg/dL), diabetes grave (DG) (glicemia de jejum acima de 200mg/dL) (Rudge et al., 1998; Calderon et al., 1999).

Após a avaliação da glicemia, 12 animais de cada grupo (os que apresentaram os maiores valores glicêmicos), foram selecionados e transferidos para gaiolas metabólicas individuais, com alimentação e água “*ad libitum*”, onde foram mantidos por 24 horas, para um diagnóstico mais preciso do diabetes, com inclusão da análise de parâmetros clínicos.

Nos momentos M8 (8 dias) e M15 (15 dias) (Zanoello et al., 2002), tanto os animais mantidos nas caixas individuais de polietileno, quanto os mantidos nas gaiolas metabólicas, foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros clínicos: peso corporal em gramas (g) utilizando balança digital marca ELC-10; ingestão hídrica em mililitros (mL) e ingestão alimentar em gramas (g), ambas em 24 horas. Nestes momentos, a análise de diurese (volume urinário) em mililitros (mL), e exame químico da urina (densidade, pH, leucócitos, nitrito, proteína, glicose, corpos cetônicos, urobilinogênio, bilirrubina, sangue) por meio de fitas reagentes (Combur-Test<sup>®</sup>UX, Roche), foi inclusa apenas para os animais mantidos nas gaiolas metabólicas. Ao final do experimento todos os animais foram sacrificados por meio de injeção intraperitoneal de tiopental na dose de 100mg/kg (Rhoden et al., 2006).

#### **Análise Estatística**

Previamente à análise estatística, os grupos de dados compostos por variáveis paramétricas foram avaliados quanto ao pressuposto de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para avaliar os efeitos das doses de aloxana sobre os parâmetros clínicos e laboratoriais avaliados empregou-se ao teste de Análise de Variância para o esquema fatorial 2x3 (três grupos em dois momentos), com delineamento inteiramente casualizado. Os contrastes foram realizados pelo método de Tukey. Para comparar os efeitos observados nos momentos (M7 e M14), (M8 e M15) pós-medicação, dentro de cada grupo, empregou-se o teste t-pareado e teste de Wilcoxon (Pagano & Gauvreau, 2004).

As variáveis mensuradas na forma de escores foram previamente consideradas como não paramétricas e os efeitos das doses sobre os parâmetros clínico e laboratorial foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis (Pagano & Gauvreau, 2004).

O teste de Qui-quadrado foi utilizado em uma tabela de contingência 2x3 para provar se os percentuais de óbitos se distribuíam de forma homogênea em relação às três doses de medicamentos testadas, aos 7 e aos 14 dias. Para a realização dos contrastes utilizou-se o método de partição do Qui-quadrado (Everitt, 1977), para o qual o nível de significância de 5% foi ajustado para 2,5% ( $p < 0,025$ ) em razão das múltiplas comparações. A comparação entre os percentuais de óbitos observados aos 7 e 14 dias foram

comparados pelo teste de qui-quadrado para tabelas 2x2, adotando-se nível de significância de 5% (Pagano & Gauvreau, 2004).

Para confrontar os percentuais de animais diabéticos x percentual de animais não diabéticos + animais que vieram a óbito aos 7 e 14 dias após a aplicação de aloxana a 2%, foi utilizado o teste exato de Fisher ou Qui-quadrado com contrastes pelo método de partição (Ayres et al., 2007). O mesmo teste foi empregado para confrontar os percentuais de animais sobreviventes com diabetes moderado (DM) e diabetes grave (DG), 7 e 14 dias após a aplicação da aloxana a 2%. Na partição do Qui-quadrado o nível de significância de 5% foi ajustado para 2,5% em razão das múltiplas comparações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como modelo experimental escolheu-se o rato *Wistar*, por apresentar inúmeras vantagens em relação a outros animais de maior porte e, principalmente, por apresentar semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o diabetes humano (Lerco et al., 2003; Cavalli et al., 2007).

Com base nos resultados da glicemia de jejum nos momentos M7 (médias dos grupos: (G1) 145,5mg/dL, (G2) 176,6mg/dL, (G3) 177,5mg/dL) e M14 (médias dos grupos: (G1) 117,1mg/dL, (G2) 122,3mg/dL, (G3) 84,1mg/dL), obtidos por meio do glicosímetro (Breeze<sup>®</sup>2-Bayer); observaram-se os números e porcentagens de animais diabéticos sobreviventes e animais não diabéticos + óbitos, nos momentos M7 e M14 (Tabelas 1 e 2), animais com diabetes moderado (DM) e diabetes grave (DG) entre os animais sobreviventes, nos momentos M7 e M14 (Tabelas 3 e 4), números e percentuais de óbitos, nos mesmos momentos (Tabela 5), de cada grupo experimental (G1), (G2) e (G3). Entre os 30 animais do grupo (GC), nenhum animal apresentou-se diabético, com valores glicêmicos menores que 120mg/dL.

O baixo percentual de animais diabéticos encontrado no grupo (G1) de 25% no M7 e 17,7% no M14 (Tabelas 1 e 2), é explicado por dois, dos diversos fatores que podem influenciar os efeitos diabetogênicos da droga; dose e via de administração. Ainda, segundo Federiuk et al. (2004), uma atenção meticulosa deve ser dada aos valores de glicose no sangue, quando a via

intraperitoneal é a de escolha para administração da droga, pois estes valores podem aumentar ou diminuir precipitadamente. Esse fato enfatiza a importância de incluir na avaliação desses animais, parâmetros clínicos representados pelo peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese; realizado neste estudo, com a intenção de obter um diagnóstico mais preciso do diabetes.

A aloxana exerce sua ação diabetogênica quando é administrada por via parentérica: via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose de aloxana necessária para induzir o diabetes depende da espécie animal, via de administração e estado nutricional (Szkudelski, 2001). Quando administrada por via intravenosa (iv), a dose mais frequentemente utilizada em ratos é de 40 a 65mg/kg, por meio da veia peniana ou veia da cauda (Carvalho et al., 2003; Lerco et al., 2003; Szkudelski, 2001; Cavalli et al., 2007). Federiuk et al. (2004) utilizaram doses mais elevadas de 120mg/kg (iv).

Segundo Szkudelski (2001), quando administrada por via intraperitoneal ou subcutânea, a dose eficaz deve ser duas a três vezes maior, que a dose pra via intravenosa. O número de 15 ratos (25%) (Tabela 1) diabéticos encontrado no grupo (G1) no momento M7 concorda com Szkudelski, (2001); pois ao comparar os achados deste grupo, com outros estudos, como o de Lerco et al., (2003), observa-se que o autor obteve numa população de 64 animais, um número de 25 ratos (39%) diabéticos, utilizando uma dose menor (42mg/kg via intravenosa), em relação à dose (ip) usada neste estudo para o grupo (G1). Szkudelski (2001) relata ainda, que a dose intraperitoneal abaixo de 150mg/kg, pode ser insuficiente para induzir o diabetes em ratos, necessitando de uma segunda dose. Entretanto os achados deste estudo com relação ao grupo (G1) discordam do autor, pois foi possível induzir o diabetes nos animais, quando utilizada a dose de 120mg/kg de aloxana via intraperitoneal.

Estudos demonstram ampla variação na dosagem de aloxana na indução do diabetes experimental em ratos; Soares et al. (2000) utilizaram em seu experimento a dose de 40mg/kg via intraperitoneal e observaram hiperglicemia moderada. No entanto, relatam que outros autores utilizaram a mesma dose por via intravenosa, e obtiveram como resultados em seus experimentos severa hiperglicemia. Este fato sugere que outras vias, que não a via (iv) atenuam a resposta hiperglicêmica no diabetes induzido com aloxana.

**Tabela 1** - Números e percentuais de animais diabéticos sobreviventes e animais não diabéticos + óbitos dos grupos (G1), (G2) e (G3) no momento M7 após administração de aloxana 2%.

Grupo	Diabéticos	Não diabéticos + óbitos	Total
<b>G1 (120 mg/Kg)</b> <sup>A</sup>	15 (25%)	36 + 9 = 45 (75%)	60 (100%)
<b>G2 (150 mg/Kg)</b> <sup>B</sup>	13 (21,7%)	22 + 25 = 47 (78,3%)	60 (100%)
<b>G3 (200 mg/Kg)</b> <sup>C</sup>	7 (20%)	11 + 42 = 53 (88,3%)	60 (100%)
<b>Total</b>	35 (66,7%)	145 (241,7%)	180 (300%)

Tabela 2x3 -  $X^2 = 3,68$ , 2 g.l.,  $p = 0,1581$ 

Partição do Qui-quadrado

B versus A:  $X^2 = 0,21$ , 1 g.l.,  $p = 0,6446$ B versus C:  $X^2 = 3,47$ , 1 g.l.,  $p < 0,0623$ **Tabela 2** - Números e percentuais de animais diabéticos sobreviventes e animais não diabéticos + óbitos dos grupos (G1), (G2) e (G3) no momento M14 após administração de aloxana 2%.

Grupo	Diabéticos	Não diabéticos + óbitos	Total
<b>G1 (120 mg/Kg)</b> <sup>A</sup>	9 (17,7%)	35 + 7 = 42 (70%)	51 (87,7%)
<b>G2 (150 mg/Kg)</b> <sup>B</sup>	7 (13,7%)	25 + 3 = 28 (46,7%)	35 (60,4%)
<b>G3 (200 mg/Kg)</b> <sup>C</sup>	0 (0%)	13 + 5 = 18 (30%)	18 (30%)
<b>Total</b>	16 (31,4%)	88 (146,6%)	104 (178,1%)

Tabela 2x3 -  $X^2 = 2,26$ , 2 g.l.,  $p = 0,3223$ 

Partição do Qui-quadrado

B versus A:  $X^2 = 0,42$ , 1 g.l.,  $p = 0,5165$ B versus C:  $X^2 = 1,84$ , 1 g.l.,  $p = 0,1746$ **Tabela 3** - Números e percentuais de animais com diabetes moderado (DM) e diabetes grave (DG) entre os animais sobreviventes, dos grupos (G1), (G2) e (G3) no momento M7 após administração de aloxana 2%.

Grupo	DM	DG	Total
<b>G1 (120 mg/Kg)</b> <sup>A</sup>	4 (6,7%)	11 (18,3%)	15 (25%)
<b>G2 (150 mg/Kg)</b> <sup>B</sup>	5 (8,3%)	8 (13,4%)	13 (21,7%)
<b>G3 (200 mg/Kg)</b> <sup>C</sup>	3 (5%)	4 (6,7%)	7 (11,7%)
<b>Total</b>	12 (20%)	23 (38,4%)	35 (58,4%)

Tabela 2x3 -  $X^2 = 0,71$ , 2 g.l.,  $p = 0,6993$ 

Partição do Qui-quadrado

B versus A:  $X^2 = 0,43$ , 1 g.l.,  $p = 0,5120$ B versus C:  $X^2 = 0,28$ , 1 g.l.,  $p = 0,5932$ **Tabela 4** - Números e percentuais de animais com diabetes moderado (DM) e diabetes grave (DG) entre os animais sobreviventes, dos grupos (G1), (G2) e (G3) no momento M14 após administração de aloxana 2%.

Grupo	DM	DG	Total
<b>G1 (120 mg/Kg)</b> <sup>A</sup>	6 (11,8%)	3 (5%)	9 (16,8%)
<b>G2 (150 mg/Kg)</b> <sup>B</sup>	4 (11,4%)	3 (5%)	7 (16,4%)
<b>G3 (200 mg/Kg)</b> <sup>*</sup>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Total</b>	10 (23,2%)	6 (10%)	16 (33,2%)

\*- Excluído da análise

Tabela 2x2 - teste exato de Fisher,  $p = 1,000$ **Tabela 5** - Números e percentuais de óbitos, observados nos grupos (G1), (G2) e (G3) nos momentos M7 e M14 após administração de aloxana 2%.

Dados	Momentos	Grupos		
		G1 (120mg/Kg)	G2 (150mg/Kg)	G3 (200mg/Kg)
Óbitos	M7	9 (15%)Aa	25 (41,6%)Ba	42 (70%)Ca
	M14	7 (13,7%)Aa	3 (8,6%)Ab	5 (27,8%)Ab

Valores seguidos de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente.

Embora maior parte dos pesquisadores utilizarem a via intravenosa na maioria das espécies animais, onde os efeitos da aloxana são mais evidentes, Federiuk et al. (2004) utilizaram vários protocolos para indução do diabetes, e observam que 70% dos ratos que receberam uma dose de 120mg/kg de aloxana (intravenosa) morreram nos primeiros dois dias após a indução, mesmo tendo sido usadas medidas destinadas a prevenir a desnutrição, desidratação e hipoglicemia. Devido ao alto índice de mortalidade, provavelmente decorrente da liberação maciça de insulina pelas células  $\beta$  lesadas, seguida de morte encefálica; o autor abandonou esta via de administração e não a recomenda (Federiuk et al., 2004). Além disso, é importante estar atento à velocidade de infusão da droga, quando a via intravenosa é utilizada; doses efetivas de aloxana não produzem diabetes se as mesmas são injetadas lentamente (Lerco et al., 2003); por estas razões, optamos pela via intraperitoneal para realização deste estudo.

No grupo (G2) observou-se um aumento no número de animais não diabéticos no M14 (25 animais), quando comparado ao momento M7 (22 animais) (Tabelas 1 e 2). Este aumento pode ter ocorrido devido ao fato, de alguns animais que se apresentavam hiperglicêmicos no 7º dia, voltarem ao estado normoglicêmico no 14º dia. Foram sugeridas duas hipóteses para explicar este acontecimento. A primeira hipótese descreve que a toxicidade inicial da droga foi maior e no decorrer do período experimental foi sendo metabolizada e eliminada do organismo, bem como o efeito tóxico da droga pode ter se restringido apenas à inibição da liberação de insulina pelas células  $\beta$ , por redução dos níveis intracelulares de NAD (Black et al., 1980; Soares et al., 2000). A segunda hipótese sugere que a droga poderia não ter atingido todas as células  $\beta$ , ficando uma população de células sem degenerar e estas, por sua vez, poderiam ter sofrido uma hipertrofia compensatória (Soares et al., 2000). No entanto, uma análise histopatológica deveria ser realizada, para verificar se realmente houve ou não, uma degeneração e/ou hipertrofia visíveis. Evidências que se acumularam na última década, a partir de dados experimentais obtidos em estudos “*in vivo*” e “*in vitro*”, descrevem a capacidade das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em se recuperar após danos (Ribeiro et al., 2007), especialmente quando provenientes de organismos jovens.

Estudo desenvolvido por Waguri et al. (1997), utilizando o método imunoistoquímico, dividiu o

pâncreas de ratos em áreas onde houve e onde não houve perfusão por aloxana através do clampeamento da artéria mesentérica superior. Esse estudo demonstrou que há duas formas de regeneração das células  $\beta$ : proliferação e diferenciação. No segmento onde houve perfusão por aloxana, observou-se que a longo prazo, houve um aumento no número de células  $\beta$ , principalmente próximo aos ductos; sugerindo que elas poderiam ter se diferenciado das células do ducto. No segmento onde não houve perfusão por aloxana, sugeriu-se que as células  $\beta$  se regenerariam por proliferação das células pré-existentes. Esse estudo demonstrou que, após um ano de seu início, a tolerância à glicose estava completamente normal com um aumento concomitante do conteúdo de insulina do pâncreas.

Algumas células  $\beta$  podem não ser destruídas pela aloxana; visto que se trata de um composto químico muito instável, com uma estrutura molecular semelhante à glicose; ambas hidrofílicas que não penetram na bicamada lipídica da membrana plasmática; e é transportada para o citosol da célula  $\beta$  por meio do transportador de glicose GLUT2 presente na membrana plasmática (Malaisse et al., 1982; Jansson & Sandler, 1986; Cavalli et al., 2007; Lenzen, 2008). A aloxana não inibe a função do transportador, e pode seletivamente entrar nas células  $\beta$  de forma irrestrita; portanto não é tóxica para as células produtoras de insulina que não expressam esse transportador (Lenzen, 2008).

Além dessas hipóteses, o tempo de jejum que estes animais foram submetidos, também pode explicar o fato de alguns animais hiperglicêmicos, voltarem a ser normoglicêmicos. O jejum prévio à administração da aloxana promove maior sensibilidade à ação diabetogênica da droga, e tem importância significativa na resposta dos animais à aloxana. Segundo Lukens (1948), 95% dos ratos tratados com aloxana, administrada com o animal em jejum prolongado de 48 a 60 horas, tornam-se diabéticos, enquanto que uma dose similar administrada em animais onde o jejum não foi observado diminui essa resposta em 25%.

O tempo de jejum pode variar de 12, 24, 48 a 60 horas, como apontam alguns pesquisadores, sendo que a sensibilidade do animal a ação da droga aumenta respectivamente com o aumento do tempo de jejum (Zanoello et al., 2002; Lerco et al., 2003; Federiuk et al., 2004; Cavalli et al., 2007). Neste experimento submetemos os animais ao

período de jejum de 24 horas antes da administração da droga por questões éticas; e para alguns animais, esse tempo pode ter sido insuficiente para que ocorresse a degeneração de todas as células  $\beta$ , fazendo com que os mesmos voltassem ao estado normoglicêmico.

Quando comparados, os grupos (G2) e (G3) apresentaram no momento M7 um percentual de óbitos maior em relação ao grupo (G1), com diferença estatística significativa, observados na tabela 5. Entre si, os grupos (G2) e (G3) também apresentaram no momento M7 diferenças significativas nos seus percentuais de óbitos (Tabela 5). O aumento nos percentuais de óbito nos grupos (G2) e (G3), pode ser explicado pelo aumento na dose da droga em relação à dose utilizada para o grupo (G1), o que torna os efeitos da droga mais evidentes, levando os animais à morte, devido à desidratação e desnutrição, consequência de descontrolada hiperglicemia; e/ou morte por hipoglicemia (Federiuk et al., 2004).

A aloxana é conhecida por causar hiperglicemia, entretanto Federiuk et al. (2004), relataram que nas primeiras 48 horas após a sua administração, a mesma pode levar a uma acentuada hipoglicemia, devido a liberação maciça de insulina pelas células  $\beta$  danificadas, seguida de morte encefálica, consequentemente levando a morbidade e mortalidade. Assim, o aumento do número de mortos nos grupos (G2) e (G3), pode ser explicado também, pela falta da gestão de um tratamento mais intensivo nas primeiras 48 horas após a indução da doença, o que é de extrema importância, quando há a necessidade de manter os animais em boas condições durante um período significativo. Ainda segundo Sebbag et al. (1994), além da hiperglicemia, a hipercolesterolemia diabética constitui um processo responsável pela elevada morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos.

Apesar da administração de doses maiores de aloxana, o número de animais diabéticos entre os grupos (G2) e (G3) não foi maior que o (G1), por terem sido avaliados no primeiro momento, somente sete dias após a indução da doença; visto que, após sua administração, a droga pode levar a morte em 48 horas (Federiuk et al., 2004). Ainda Lerco et al. (2003) e Cavalli et al. (2007) relatam, uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração da droga, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subsequentes. Desta forma, considerando os relatos dos autores,

podemos sugerir, porém com a necessidade de outros estudos, que as doses de aloxana administradas nos grupos (G2) e (G3), poderiam mostrar um maior índice de animais diabéticos, se fossem utilizadas medidas de prevenção à desnutrição, desidratação e hipoglicemia; visto que, Kodoma et al. (1993), relataram um novo modelo de indução de *Diabetes mellitus* experimental, utilizando aloxana 2% na dosagem de 200mg/kg via intraperitoneal, durante o período neonatal; e observaram valores glicêmicos superiores a 250mg/dL, classificando-os como severa hiperglicemia. Federiuk et al. (2004), relataram uma satisfação na indução do diabetes em 90% da população de ratos submetidos a indução experimental do diabetes; quando utilizaram das medidas preventivas, após a indução do diabetes. Em seu experimento o mesmo utilizou uma dose de 200mg/kg de aloxana por via intraperitoneal em um grupo de 10 animais, e apenas um animal (10%) morreu durante a primeira semana, já o restante dos animais permaneceram vivos por mais de 200 dias.

Entre os momentos M7 e M14, o grupo (G1) não apresentou diferença estatística nos percentuais de óbito; enquanto os grupos (G2) e (G3) apresentaram diferenças marcantes no percentual de óbitos entre esses momentos. Alguns animais do (G2) e (G3) resistiram por mais tempo aos efeitos de desnutrição e desidratação gerados pela droga e morreram apenas durante a segunda semana, gerando um percentual de óbitos menor no momento M14, com relação ao momento M7, o que explica a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) no percentual de óbitos desses grupos entre esses momentos.

### **Evolução Clínica**

Os parâmetros clínicos representados pela evolução do peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese entre os animais diabéticos dos três grupos, evoluíram de forma característica, com a presença de perda de peso, polidipsia, polifagia e poliúria, evidentes; sinais clínicos compatíveis com o *Diabetes mellitus* humano, concordando com os achados de outros trabalhos (Cavalli et al., 2007; Ribeiro et al., 2007). Também observamos pelagem eriçada e sem brilho, aumento da circunferência abdominal, odor forte na urina e catarata bilateral em animais que se apresentaram totalmente debilitados concordando com outros estudos (Lerco et al.

2003) (Figura 1). Já os 30 animais pertencentes ao grupo controle (GC) evoluíram sem quaisquer alterações clínicas durante todo o experimento (Tabela 6).

Na avaliação da média do peso dos animais diabéticos nos momentos M8 e M15, nos três grupos (G1), (G2) e (G3), houve perda significativa de peso em relação ao peso inicial. Os animais diabéticos do grupo (G1) apresentaram uma perda média de  $39,7 \pm 18,9\text{g}$  e  $48,6 \pm 26,1\text{g}$  nos momentos M8 e M15, respectivamente. A perda média de peso dos animais diabéticos do grupo (G2) foi de  $55,5 \pm 11,8\text{g}$  no momento M8 e de  $55,1 \pm 16,9\text{g}$  no momento M15; enquanto os animais diabéticos do grupo (G3) apresentaram perda média de  $51,8 \pm 15,9\text{g}$  no momento M8. No momento M15 nenhum dos animais sobreviventes deste grupo se apresentava diabético.

Os valores do consumo médio de água em 24 horas entre os animais diabéticos dos três grupos, nos momentos M8 e M15, foram significativamente

elevados, quando comparados aos valores do consumo de 24 horas, dos ratos do grupo (GC) (Tabela 6), caracterizando a presença de polidipsia entre os animais diabéticos.



**Figura 1** - Rato lado esquerdo (animal normal), Rato lado direito (animal diabético apresenta-se debilitado, caquético, pelagem eriçada e sem brilho).

**Tabela 6** - Médias e desvio-padrões da ingestão hídrica/24h (ml), ingestão alimentar/24h (g) e volume urinário/24h (ml) dos animais do grupo controle (GC), nos momentos M8 e M15.

<i>Grupo Controle (GC)</i>			
	<i>Parâmetros Clínicos</i>		
	<i>Ingestão hídrica</i>	<i>Ingestão alimentar</i>	<i>Volume urinário</i>
<b>M8</b>	$32,8 \pm 9,5\text{ml}$	$13,5 \pm 1,8\text{g}$	$3,9 \pm 0,4\text{ml}$
<b>M15</b>	$39,9 \pm 2,9\text{ml}$	$16,7 \pm 5,2\text{g}$	$4,2 \pm 0,2\text{ml}$

Os animais diabéticos do (G1) apresentaram consumo médio de  $93,3 \pm 25,3\text{ml}/\text{dia}$  e  $94,3 \pm 25,9\text{ml}/\text{dia}$ , nos momentos M8 e M15, respectivamente. O grupo (G2) apresentou um consumo médio de  $82,1 \pm 34,6\text{ml}/\text{dia}$  no M8 e  $86,1 \pm 14,3\text{ml}/\text{dia}$  no M15; enquanto o (G3) apresentou no momento M8, consumo de  $91,6 \pm 17,1\text{ml}/\text{dia}$  e ausência de animais diabéticos no momento M15.

A polidipsia presente nos animais diabéticos pode ter ocorrido devido à hiper-osmolaridade sanguínea, em razão de altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular, a fim de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é percebida pelos osmorreceptores cerebrais, desencadeando sede intensa (Lerco et al., 2003). Na comparação da ingestão hídrica entre os grupos (G1), (G2) e (G3), todos os animais foram incluídos, não só os diabéticos, mas também os que não desenvolveram a doença. Nesta avaliação foi

observado no momento M8, que os animais do grupo (G2) apresentaram um consumo hídrico mais elevado ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao consumo médio do grupo (G1), observado na tabela 7.

Quanto ao consumo médio de ração em 24 horas, avaliado entre os animais diabéticos dos três grupos estudados nos momentos M8 e M15, observamos que houve um consumo mais elevado, em relação aos valores do consumo médio (24 horas) dos ratos do grupo (GC) (tabela 6). Os animais diabéticos do grupo (G1) apresentaram consumo médio de  $24,3 \pm 6,2\text{g}/\text{dia}$  no momento M8, e  $25,7 \pm 5,0\text{g}/\text{dia}$  no momento M15. O grupo (G2) apresentou consumo de  $18,0 \pm 7,2\text{g}/\text{dia}$  e  $18,9 \pm 9,4\text{g}/\text{dia}$ ; nos momentos M8 e M15, respectivamente. Já o grupo (G3) apresentou no momento M8, consumo próximo ao valor limite consumido ao dia pelos ratos do grupo (GC); o consumo foi de  $16,0 \pm 7,1\text{g}/\text{dia}$ ; no momento M15

nenhum dos animais sobreviventes deste grupo se apresentava diabético.

A diminuição da entrada de glicose no centro da saciedade, na região ventromedial do hipotálamo, ocorre devido à hipoinsulinemia, afetando diretamente a sensação de fome e causando polifagia, sinal clínico observado nos animais diabéticos deste estudo (Nogueira; Marco, 2008).

Na comparação da ingestão alimentar entre os grupos (G1), (G2) e (G3), todos os animais foram incluídos, diabéticos e não diabéticos. Observou-se que os animais do grupo (G1) no momento M8, apresentaram um consumo de ração mais elevado ( $p < 0,05$ ) em relação ao consumo médio dos animais dos grupos (G2) e (G3) (Tabela 7).

No momento M15, o grupo (G1) apresentou novamente um consumo mais elevado ( $p < 0,001$ ), quando comparado ao grupo (G2). Neste mesmo momento, observou-se que os animais do grupo (G3) apresentaram um consumo mais elevado ( $p < 0,01$ ) em relação ao consumo médio dos animais do grupo (G2) (Tabela 7).

Na comparação entre os momentos M8 e M15 para os grupos (G1), (G2) e (G3), não observamos diferença significativa ( $p < 0,05$ ) tanto no consumo de ração, como no consumo de água (Tabela 7).

Na análise de diurese de 24 horas, realizada com 12 animais de cada grupo, mantidos nas gaiolas metabólicas individuais, observamos que os animais do grupo (G2) apresentaram um volume urinário mais elevado no momento M8 ( $8,3 \pm 3,6$ ml) e no momento M15 ( $5,4 \pm 2,6$ ml) (Tabela 8), em relação aos valores do volume urinário dos ratos do grupo (GC) (Tabela 6). O grupo (G1) apresentou volume médio de urina de  $4,5 \pm 1,9$ ml no momento M8 e  $4,1 \pm 1,8$ ml no momento M15 (Tabela 8), valores próximos do grupo (GC). O

volume médio apresentado pelo grupo (G3) foi de  $2,7 \pm 1,7$ ml e  $1,6 \pm 1,3$ ml; nos momentos M8 e M15, respectivamente (Tabela 8). A diminuição do volume urinário do grupo (G3), pode ter ocorrido em consequência do óbito de alguns animais mantidos na gaiola metabólica neste período de 24 horas, antes do momento da coleta, gerando uma média do volume total reduzido.

A poliúria, uma das características do estado hiperglicêmico, esteve presente no grupo (G2), (M8), devido o aumento elevado da concentração de glicose no filtrado glomerular, excedendo a capacidade das células tubulares em reabsorvê-la e dando origem à diurese osmótica. Esse mecanismo tem sido o responsável pela produção de grande volume de urina com elevada osmolaridade (Lerco et al., 2003; Sales et al., 2010). A associação entre a perda de água e eletrólitos, e ausência de ingestão hídrica adequada pode resultar em desidratação e, conseqüentemente gerar insuficiência circulatória periférica (Sales et al., 2010)

Quando comparados os grupos, observou-se no momento M8, um volume médio de urina mais elevado ( $p < 0,01$ ) dos animais do grupo (G2), em relação ao grupo (G1), observado na tabela 8. Quando comparado ao grupo (G3), o grupo (G2) também apresentou um volume urinário significativamente mais elevado ( $p < 0,001$ ) (Tabela 8). No momento M15, o grupo (G2) apresentou novamente um volume de urina mais elevado ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo (G3) (Tabela 8).

Para cada grupo (G1), (G2) e (G3), a comparação entre os momentos M8 e M15, não gerou nenhuma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no volume médio de urina dos animais (Tabela 8).

**Tabela 7** – Médias e desvios-padrões do consumo hídrico/24h (ml) e alimentar/24h (g) dos animais dos grupos (G1), (G2) e (G3) nos momentos M8 e M15 após administração de aloxana 2%.

Parâmetros avaliados	Momentos	Grupos		
		G1 (120 mg/Kg)	G2 (150 mg/Kg)	G3 (200 mg/Kg)
Consumo de água (ml)	M8	77,6 ± 21,4Aa	92,7 ± 30,9Ba	86,5 ± 21,6ABa
	M15	93,2 ± 19,1Aa	97,2 ± 24,4Aa	92,6 ± 21,4Aa
Consumo de ração (g)	M8	22,4 ± 4,6Aa	19,3 ± 5,9Ba	19,0 ± 5,1Ba
	M15	23,8 ± 4,6Aa	18,1 ± 5,3Ba	23,5 ± 5,3Aa

Com relação às médias: Valores seguidos de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente.

**Tabela 8** – Médias e desvios-padrões dos parâmetros do exame químico da urina realizada com a fita Combur<sup>10</sup> Test<sup>®</sup>UX dos animais dos grupos (G1), (G2) e (G3) nos momentos M8 e M15 após administração de aloxana 2%.

Parâmetros avaliados	Momentos	Grupos		
		G1 (120 mg/Kg)	G2 (150 mg/Kg)	G3 (200 mg/Kg)
Volume (ml) (24 horas)	M8	4,5 ± 1,9Aa	8,3 ± 3,6Ba	2,7 ± 1,6Aa
	M15	4,1 ± 1,8ABa	5,4 ± 2,5Aa	1,6 ± 1,3Ba
Densidade	M8	1013,2 ± 6,8Aa	1010,8 ± 7,9Aa	1011,7 ± 7,9Aa
	M15	1008,9 ± 8,9Aa	1000,0 ± 0,0Ba	1008,6 ± 8,0Aa
pH	M8	6,9 ± 0,9Aa	7,2 ± 1,2Aa	7,2 ± 0,9Aa
	M15	7,7 ± 1,3Aa	9,0 ± 0,0Ba	7,8 ± 1,2ABa

Com relação às médias: Valores seguidos de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente.

### Evolução Laboratorial

No exame químico da urina realizado por meio de fitas reagentes, além da análise de glicosúria e corpos cetônicos; outros parâmetros como, densidade, pH da urina, leucócitos, nitrito, proteína, urobilinogênio, bilirrubina e sangue; foram analisados nos momentos M8 e M15. Tomando como referência o exame químico da urina realizado com animais do grupo (GC), que apresentam densidade (1013 ± 5,2) e (1012 ± 4,8) nos momentos M8 e M15, respectivamente; pH

(6,7 ± 2,1) no momento M8 e pH (6,5 ± 2,0) no momento M15; normalidade para glicosúria e urobilinogênio, e negatividade para cetonúria, leucócitos, nitrito, proteína, bilirrubina e sangue nos dois momentos (M8 e M15); observamos algumas alterações na urina dos ratos dos grupos (G1), (G2) e (G3), mantidos nas gaiolas metabólicas; alterações estas, compatíveis com as alterações na urina de pacientes diabéticos (Tabelas 8 e 9).

**Tabela 9** – Alterações do exame químico da urina dos animais dos grupos (G1), (G2) e (G3) nos momentos M8 e M15 após administração de aloxana 2%.

Dados	Momentos	G1 (120mg/Kg)	G2 (150mg/Kg)	G3 (200mg/Kg)
Nitrito	M8	0,0 (0,0-0,0)A	1,0 (1,0-1,0)B	0,0 (0,0-0,0)A
	M15	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
Sangue	M8	3,0 (1,0-4,0)A	1,0 (0,0-2,0)B	2,0 (0,0-4,0)AB
	M15	3,0 (0,0-4,0)A	0,0 (0,0-4,0)B	0,0 (0,0-3,0)B
Glicose	M8	4,0 (2,0-4,0)A	4,0 (2,0-4,0)A	0,0 (0,0-4,0)B
	M15	4,0 (1,0-4,0)A	0,0 (0,0-1,0)B	0,0 (0,0-1,0)B

Valores seguidos de letras maiúsculas comparam grupos dentro do mesmo momento (Letras iguais não diferem estatisticamente); A comparação dos momentos dentro do mesmo grupo, não gerou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) para nenhum dos grupos. Nitrito (0-negativo; 1-positivo); Sangue: (0-negativo 1+, 2-+, 3-+, 4-+); Glicose: (0-normal; 1-+; 2-+, 3-+, 4-+).

Na comparação entre os grupos (G1), (G2) e (G3) quanto à densidade da urina, foi observado no momento M15 que o grupo (G2), apresentou um valor médio de densidade baixo ( $p < 0,05$ ), quando comparado aos grupos (G1) e (G3), que apresentaram valores médios de densidade mais elevados (Tabela 8). A densidade baixa encontrada no grupo (G2) pode ter ocorrido devido a um maior consumo de água pelos animais deste grupo, visto que, a densidade urinária tem relação direta com a quantidade de água ingerida (Hennemann et al., 1996); confirmando assim, a presença de polidipsia nesses animais, sinal clínico característico de diabetes. Além disso, a densidade baixa, assim como a glicosúria e cetonúria, caracteriza o diabetes por meio do exame químico da urina (Veiga, 2005). Quanto maior é a ingestão de água, maior será a diluição da urina e consequentemente menores serão os valores da densidade, mostrando a incapacidade do rim em concentrar a urina, uma vez que a densidade é definida como a taxa de concentração da solução comparada com a concentração de igual volume de água, e a determinação da mesma é utilizada para estimar o número de partículas por unidade de solvente e monitorar a capacidade renal em concentrar e diluir a urina (Hennemann et al., 1996).

Quanto ao pH urinário, o grupo (G2) apresentou pH médio mais elevado (pH alcalino) ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo (G1) no momento M15 (Tabela 8). O pH alcalino encontrado no grupo (G2), é resultante de uma possível alcalose metabólica, onde os rins respondem diminuindo a excreção de  $H^+$ , aumentando a concentração de bicarbonato de sódio por excesso de retenção do mesmo, resultando em um maior valor de pH urinário (Patience, 1991). Assim, ocorre à excreção urinária de bicarbonato, e uma urina

alcalina é excretada para manter a eletroneutralidade (Correa et al., 2009); gerando um aumento no volume urinário (poliúria), pois a excreção renal de sódio é acompanhada pela excreção de água, tornando o animal desidratado, desencadeando consequentemente a polidipsia no mesmo (Évora et al., 1999).

Com relação ao nitrito, foi observado no momento M8, que apenas o grupo (G2) apresentou positividade para nitrito ( $p < 0,001$ ), em relação aos demais grupos (G1) e (G3) (Tabela 9); possivelmente por ocorrência de infecção urinária nos animais deste grupo, pois de acordo com Sialelli (2005), a presença de nitrito na urina está sistematicamente associada à ocorrência de infecção urinária, uma das complicações do diabetes. As bactérias normalmente envolvidas nos casos de infecção urinária apresentam a capacidade de reduzir o nitrato da urina em nitrito (Almond & Stevens, 1995).

A presença de sangue na urina foi observada para os três grupos estudados (G1, G2 e G3) no momento M8, entretanto o grupo (G1) apresentou hematúria mais intensa ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo (G2) que apresentou hematúria com menor intensidade (Tabela 9). No momento M15, apenas o grupo (G1) apresentou hematúria, ( $p < 0,05$ ), quando comparado aos demais grupos (G2 e G3), que não apresentaram hematúria neste momento (Tabela 9), possivelmente por se tratar de uma hematúria microscópica transitória (achado por meio do exame de urina) (Abreu et al., 2007). A presença de sangue na urina está associada ao *Diabetes mellitus* (Faria, 2007), e pode indicar a presença de infecção do trato urinário e/ou glomerulonefrite, que muitas vezes pode evoluir para quadros de insuficiência renal (Grassiotto et al., 2001), necessitando de um diagnóstico mais preciso.

Quanto à glicosúria, característica marcante do diabetes grave, os grupos (G1) e (G2) apresentaram positividade (++++) para a mesma no momento M8, concordando com os achados de outros autores (Lerco et al., 2003); gerando uma diferença estatística muito significativa ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo (G3), onde negatividade para glicose foi observada (Tabela 9). No momento M15, o grupo (G1) foi o único a apresentar glicosúria ( $p < 0,001$ ), quando comparado aos grupos (G2) e (G3) (Tabela 9). Para cada grupo (G1, G2 e G3), a comparação entre os momentos M8 e M15, não gerou nenhuma diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) em todos os parâmetros analisados no exame químico da urina (Tabela 9).

Quando se estuda a ação diabetogênica da aloxana, é importante considerar o período de avaliação dos animais, ao longo do seguimento após a administração da droga. Pois como visto anteriormente, nos achados deste estudo, alguns animais que se apresentavam hiperglicêmicos, voltaram a apresentar níveis glicêmicos, dentro dos parâmetros de normalidade, após dias da indução. Entretanto, observamos também que, durante todo o experimento, alguns animais que não se apresentavam diabéticos no momento M7, estavam diabéticos no momento M14, com base nos valores glicêmicos. Federiuk et al. (2004), chamam atenção, quanto aos valores de glicose no sangue, quando a via intraperitoneal é a de escolha para administração da droga, pois estes valores podem aumentar ou diminuir precipitadamente.

O fato de alguns animais deste estudo, desenvolver o diabetes, depois de duas semanas pode ser explicado, partindo da hipótese, que sugere que a ação química da droga poderia não ter afetado todas as células  $\beta$ , ficando uma população de células sem degenerar. Estas, por sua vez, poderiam ter sofrido, ao invés de uma hipertrofia, uma exaustão ao longo de duas semanas, devido ao excesso de atividade, ou seja, devido a uma hipersecreção de insulina, na tentativa de suprir a falta de insulina circulante, levando as células a morte e consequente hiperglicemia persistente, estabelecendo o quadro de diabetes.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais deste estudo, pode-se concluir que a aloxana a 2% induz experimentalmente o *Diabetes*

*mellitus* no rato *Wistar* de maneira satisfatória, demonstrado por alterações clínicas e laboratoriais bem caracterizadas. A dose de 120mg/kg via intraperitoneal comparada às doses de 150mg/kg e 200mg/kg foi mais eficiente, frente ao objetivo deste estudo; pois induziu o diabetes em um maior número de animais e promoveu um baixo percentual de óbitos. É importante ressaltar que, dependendo do enfoque do estudo, ou seja, quando se pretende induzir o diabetes com alterações laboratoriais presentes e bem caracterizadas, onde a investigação tem por objetivo, verificar principalmente alterações no exame químico da urina como densidade, pH, nitrito, entre outras, este estudo mostra que principalmente a dose de 150mg/kg pode ser mais indicada e mais satisfatória na indução experimental do diabetes. A dose de 200mg/kg, também pode ser mais satisfatória quando se quer obter estas alterações urinárias, porém o percentual de óbitos gerado pela mesma é muito elevado, devendo estar atento à inclusão de medidas preventivas as diversas complicações que levam os animais a morte, quando se utiliza esta dose.

## AGRADECIMENTOS

A Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade do Oeste Paulista pelo apoio financeiro.

## RESUMO

*Este estudo teve por objetivo comparar os efeitos da ação diabetogênica da aloxana em diferentes doses, por meio da sua administração intraperitoneal (ip) em ratos Wistar. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais: grupo controle (GC), constituído por 30 ratos submetidos à injeção (ip) de solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo 1 (G1), 2 (G2) e 3 (G3) constituídos por 60 ratos cada, submetidos à injeção (ip) de aloxana 2% nas doses de 120, 150 e 200mg/Kg, respectivamente. Foram avaliados durante 15 dias, quanto aos seguintes parâmetros: glicose sanguínea, peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, volume urinário, exame químico da urina (glicose, corpos cetônicos e outros parâmetros). Concluiu-se que, a dose de 120mg/kg de aloxana a 2% (ip), quando*

comparada às demais doses foi a mais eficiente, frente aos objetivos deste estudo, pois induziu o diabetes em um maior número de animais e promoveu um baixo percentual de óbitos.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, P. F.; Moura, L. R. R.; Sesso, R. (2007), Avaliação Diagnóstica de Hematúria. *J Bras Nefrol.*, **29**, 158-163.
- Almond, G. W. and Stevens J. B. (1995), Urinalysis techniques for swine practitioners. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, **17**, 121-129.
- Ayres, M.; Ayres, J. R. M.; Ayres, D. L.; Santos, A. S. (2007), Biostat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. *Sociedade Civil Mamirauá, Belém, MCT-CNPq*, 364p.
- Black, H. E.; Rosenblum, I. Y.; Capen, C. C. (1980), Chemically Induced (Streptozotocin-Alloxan) Diabetes Mellitus in the Dog. *Am J Pathol.*, **98**, 295-310.
- Bertram, C.; Trowern, A. R.; Copin, N.; Jackson, A. A.; Whorwood, C. B. (2001), The Maternal Diet during Pregnancy Programs Altered Expression of the Glucocorticoid Receptor and Type 2 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase: Potential Molecular Mechanisms Underlying the Programming of Hypertension in utero. *Endocrinology.*, **142**, 2841-2853.
- Bongiolo, A. M. (2008), Efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora L.* (Myrtaceae) sobre a hiperglicemia e dislipidemia de ratos diabéticos induzidos por aloxana. Dissertação de mestrado, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brasil.
- Bortolotto L. A. (2007), Alterações das propriedades funcionais e estruturais de grandes artérias no Diabetes Mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, **51**, 176-184.
- Calderon, I. M. P.; Rudge, M. V. C.; Ramos, M. D.; Peracoli, J. C. (1999), Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabéticas: relação com a macrossomia e o retardo de crescimento intra-uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, **21**, 91-98.
- Carvalho, E. N.; Carvalho, N. A. S.; Ferreira, L. M. (2003), Experimental model of induction of *diabetes mellitus* in rats. *Acta Cir Bras.*, **18**, 60-64.
- Cavalli, V. L. L. O.; Sordi, C.; Tonini, K.; Grando, A.; Muneron, T.; Guigi, A.; Roman Júnior, W. A. (2007), Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill). *Rev Bras Farmacogn.*, **17**, 64-70.
- Correa, L. B.; Zanetti, M. A.; Del Claro, G. R.; Paiva, F. A. (2009), Resposta em parâmetros sanguíneos e urinários de vacas leiteiras ao aumento no balanço cátion-aniônico da dieta. *Arq Bras Med Vet Zootec.*, **61**, 655-661.
- Delfino, V. D. A.; Figueiredo, J. F.; Matsuo, T.; Favero, M. E.; Matni, A. M.; Mocelin, A. (2002), *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. *J Bras Nefrol.*, **24**, 31-36.
- Everitt, B. S. (1977), The analysis of contingency tables. London: Chapman and Hall Ltd.
- Évora, P. R. B.; Reis, C. L. R.; Ferez M. A.; Conte, D. A.; Garcia, L. V. (1999), Distúrbios do Equilíbrio Hidroeletrólítico e do Equilíbrio Ácido-básico. Uma Revisão Prática. *Medicina (Ribeirão Preto)*, **32**, 451-469.
- Faria, P. F. (2007), Diabetes mellitus em cães. *Acta Veterinaria Brasílica*, **1**, 8-22.
- Federiuk, I. F.; Casey, H. M.; Quinn, M. J.; Wood, M. D.; Ward, W. K. (2004), Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med.*, **54**, 252-257.
- Feldman, E. C. and Nelson, R. W. (1996), Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. WB Saunders Company, Toronto, 785p.
- Grassiotto, C. Q.; Brito, M. G. S.; Mori, E.; Campos, L. S.; Vargas, N. S. O.; Bourroul, M. L. M.; Koch, V. H. K. (2001), Hematuria na criança e a importância de um protocolo estruturado de investigação etiológica: relato de caso. *Pediatrics (São Paulo)*, **23**, 88-94.
- Gross, J. L.; Silveiro, S. P.; Camargo, J. L.; Reichelt, A. J.; Azevedo, M. J. (2002), Diabetes melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, **46**, 16-26.
- Heikkila, R. E.; Winston, B.; Cohen, G.; Barden, H. (1976), Alloxan-induced-diabetes. Evidence for hydroxyl radical as cititixic intermediate. *Biochem Pharmacol.*, **25**, 1085-1092.
- Hennemann, C. R. A.; Cunha, C. M. S.; Lopes, S. T. A.; Amaral, A. S.; Polydoro, A. S. (1996), Avaliação da função renal através da densidade urinária e dosagem sérica de uréia e creatinina na aflatoxíose experimental em cães. *Cienc Rural*, **26**, 97-102.
- Jansson, L. and Sandler, S. (1986), Alloxan-induced diabetes in the mouse: Time course of pancreatic B-cell destruction as reflected in an increased islet vascular permeability. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.*, **410**, 17-21.
- Kodoma, T.; Iwase, M.; Nuno, K. (1993), A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. *J Diabetes Res Clin Pract.*, **20**, 183-189.
- Kuller, L. H. (1976), Epidemiology of cardiovascular diseases: current perspectives. *Am J Epidemiol.*, **104**, 425-456.
- Leal, D. T.; Fialho, F. A.; Dias I. M. A. V.; Nascimento, L.; Arruda, W. C. (2009), Diabetes na infância e adolescência: o enfrentamento da doença no cotidiano da família. *HU Rev.*, **35**, 288-295.

- Lenzen, S. (2008), The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, **51**, 216-226.
- Lerco, M. M.; Spadella, C. T.; Machado, J. L. M.; Schellini, S. A.; Padovani, C. R. (2003), Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido por Aloxana em ratos. Estudo clínico e Laboratorial. *Acta Cir Bras.*, **18**, 132-142.
- Lima, M. A.; Lima, L. M. B.; Rita, D. P. C.; Navarro, F. C.; Tatsukawa, R. S.; Pereira, G. A.; Reis, L. C.; Abreu, M. E. A.; Borges, M. F. (2001), Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. *Medicina (Ribeirão Preto)*, **34**, 308-314.
- Lukens, F. D. W. (1948), Alloxan diabetes. *Physiol Rev.*, **28**, 304-330.
- Machado, J. L. M.; Macedo, A. R.; Silva, M. D.; Spadella, C. T.; Montenegro, M. R. G. (2000), Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzidos pela aloxana. *Art. Acta Cir. Bras.*, **15**, 86-93.
- Malaisse, W. J.; Malaisse-Lagae, F.; Sener, A.; Pipeleers, D. G. (1982), Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **79**, 927-930.
- Mazzanti, C. M.; Schosler, D. R.; Filappi, A.; Prestes, D.; Balz, D.; Miron, V.; Morsch, A.; Schetinger, M. R. C.; Morsch, V. M.; Cecim, M. (2003), Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. *Cienc Rural*, **33**, 1061-1065.
- Negri, G. (2005), Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Rev Bras Cienc Farm.*, **41**, 121-142.
- Nogueira, R. M. B.; Marco, V. (2008), Terapêutica das principais endocrinopatias em cães e gatos. In- *Andrade, S.F. Manual de Terapêutica Veterinária*, ed. 3., pp. 397-431.
- Oliveira, D. M.; Santos, D.; Silva, L. A. G. L.; Neiva, C. M. (2007), Modulação do perfil lipídico e da glicemia de ratos diabéticos submetidos a treinamento anaeróbio de alta intensidade. *Rev Cien. Universidade de Franca*, **7**, 53-60.
- Oliveira, D. M. (2008), Influência da ingestão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos Wistar. Dissertação de mestrado, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Oliveira, T. V.; Moreira, G. V.; Zampieri, M.; Toledo, M. T. (2008), Análise Morfométrica da Placenta de Ratas Wistar Prenhes Induzidas ao Diabetes Mellitus por Aloxana. *Rev Eletr Bio.*, **1**, 28-41.
- Paiva, C. (2001), Novos critérios de diagnóstico e classificação da diabetes mellitus. *Medicina Interna*, **7**, 234-238.
- Pagano, M.; Gauvreau, K. (2004), Princípios de bioestatística. ed. Pioneira Thomson Learning, São Paulo.
- Patience, J. F. (1991), Acid-base balance in animal nutrition. In: Continuing Education Conference, Harris Ranch, Arpas, p. 1-41
- Reis, J. S.; Veloso, C. A.; Mattos, R. T.; Purish, S.; Machado, J. A. N. (2008), Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo I. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, **52**, 1096-1105.
- Rhoden, C. R.; Maslinkiewicz, A.; Pereira, M. S. M.; Rhoden, E. L. (2006), Eutanásia em animais de laboratório. In- *Rhoden, E. L.; Rhoden, C. R. Princípios e Técnicas em Experimentação Animal*, ed 1., Editora UFRGS, Porto Alegre, pp. 55-58.
- Ribeiro, C.; Oliveira, C. A. M.; Mello, M. A. R. (2007), Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. *Motriz Rev Educ Fís.*, **13**, 72-77.
- Rudge, M. V. C.; Calderon, I. M. P.; Maestá, I.; Ramos, M. D.; Peraçoli, J. C.; Curi, P. (1998), Insulinoterapia na Prenhez de Ratas Diabéticas: Repercussões Fetais e Placentárias. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, **20**, 19-24.
- Sales, A. L. C. C.; Teixeira, J. M. R.; Soares, L. F. M.; Damasceno, D. C. F.; Almeida, I. P.; Nunes, P. H. M.; Martins, M. C. C. (2010), Dieta Rica em Fibras e Ácidos Graxos Poli-insaturados: Efeitos no Controle Glicêmico e Perfil Lipídico de Ratos Diabéticos. *Ars Veterinária*, **26**, 138-146.
- Scheffel, R. S.; Bortolanza, D.; Weber, C. S.; Costa, L. A.; Canani, L. H.; Santos, K. G.; Crispim, D.; Roisenberg, I.; Lisbôa, H. R. K.; Tres, G. S.; Tschiedel, B.; Gross, J. L. (2004), Prevalências de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito tipo 2 em atendimento ambulatorial. *Rev Ass Med Bras.*, **50**, 263-267.
- Sebbag, L.; Forrat, R.; Canet, E.; Wiernsperger, N.; Delaye, J.; Renaud, S.; Lorgeril, M. (1994), Effect of experimental non-insulin requiring diabetes on myocardial microcirculation ischaemia in dogs. *European J Clin Invest.*, **24**, 686-690.
- Sialelli, J. N. (2005), Patología urinaria de la cerda en gestación. *Avances en tecnología porcina*, **2**, 6-12.
- Soares, J. C. M.; Costa, S. T.; Cecim, M. (2000) Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com *Diabetes Mellitus* aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium Jambolanum*. *Cienc Rural*, **30**, 113-118
- Szkudelski, T.; Kandulska, K.; Okulicz, M. (1998), Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol Res.*, **47**, 343-346.
- Szkudelski, T. (2001), The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, **50**, 536-546.
- Veiga, A. P. M. (2005), Obesidade e Diabetes mellitus em pequenos animais. In: González, F. H. D.; Santos,

- A. P. (eds.): Anais do II Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 82-91.
- Waguri, M.; Yamamoto, K.; Miyagawa, J. I.; Tochino, Y.; Yamamori, K.; Kajimoto, Y.; Nakajima, H.; Watada, H.; Yamasaki, Y.; Hanafusa, T.; Matsuzawa, Y. (1997), Demonstration of two different processes of b-cell regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan. *Diabetes*, **46**, 1281-1290.
- Wilson, G. L.; Patton, N. J.; McCord, J. M.; Mullins DW, Mossman BT. (1984), Mechanisms of streptozotocin and alloxan induced damage in rat  $\beta$  cells. *Diabetologia.*, **27**, 587-591.
- Wimhurst, J. M. and Manchester, K. L. (1970), A Comparison of the Effects of Diabetes Induced with either Alloxan or Streptozotocin and of Starvation on the Activities in Rat Liver of the Key Enzymes of Gluconeogenesis. *Biochem J.*, **120**, 95-103.
- Zanoello, A. M.; Mazzanti, C. M.; Gindri, J. K.; Filappi A.; Prestes, D.; Cecim, M. (2002), Efeito Protetor do *Syzygium cumini* contra *Diabetes Mellitus* induzido por Alozano em Ratos. *Acta Farm Bonaer.*, **21**, 31-36.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Objetivo
- Preparação de manuscritos

### Objetivo

**Brazilian Archives of Biology and Technology - BAPT** publica em Inglês, artigos originais de pesquisa, notas curtas e artigos de revisão nas áreas interdisciplinares das ciências biológicas e de engenharia/tecnologia.

### Preparação de manuscritos

A submissão do manuscrito implica que não tenha sido publicado ou submetido para publicação em outra revista. O manuscrito deverá ser apresentado de forma precisa, o que ajudará os revisores na avaliação. Todos os manuscritos estão sujeitos à avaliação dos revisores.

### MANUSCRITO

Devendo ser enviadas três cópias do manuscrito digitado com espaço simples (máximo de 12 páginas), em papel tamanho A-4 (210x297mm), com margens (2,5 mm esquerda, direita 2,0 mm, superiores e inferior 3,0 mm), sendo preparados com a seguinte disposição de cabeçalhos: **ABSTRACT (SUMÁRIO), INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO, AGRADECIMENTO, RESUMO, REFERÊNCIAS**. Estes cabeçalhos devem ser digitados com letras maiúsculas e em negrito (fonte 12). Para artigos de revisão, os autores devem fazer seus próprios cabeçalhos juntamente com o Resumo e Introdução.

### TÍTULO

O título (fonte 18, negrito e iniciais em maiúscula), do manuscrito deve refletir claramente seu conteúdo. Devendo ser seguido pelo nome completo do autor com as iniciais em maiúsculas (fonte 12, negrito) e o endereço (fonte 10, itálico) da instituição onde a pesquisa foi executada.

### ABSTRACT

O manuscrito deve apresentar um abstract (itálico) de 100-150 palavras, descrevendo brevemente o propósito e os resultados da pesquisa.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Os autores devem fornecer três a seis palavras-chave que serão usadas na indexação do trabalho.

## **INTRODUÇÃO**

Deve descrever a base, o objetivo da pesquisa e demais informações relevantes sobre o manuscrito.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os autores devem tomar cuidado quanto ao fornecimento de detalhes suficientes para que outros possam repetir o trabalho. Procedimentos padronizados não precisam ser descritos em detalhes.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussões podem ser apresentados separadamente ou de forma conjunta (autores podem optar pela forma mais fácil). Trabalhos preliminares ou resultados menos relevantes não devem ser descritos. A reprodução dos resultados, incluindo o número de vezes que o experimento foi conduzido e o número de amostras replicadas devem ser expressados claramente.

## **RESUMO**

Todo artigo deve possuir um resumo do em Português e posicionado antes da lista de Referências. Autores de outros países da América Latina podem procurar por ajuda na Editoração da revista, para preparar o resumo em Português de seus artigos.

## **REFERÊNCIAS**

Referências no texto devem ser citadas no local apropriado pelo(s) nome(s) do(s) autor(es) e ano (p. ex.: Rimbault & Roussos, 1996; Rimbault et al., 1997). Uma lista de referências, em ordem alfabética (fonte 10), deve aparecer no final do manuscrito. Todas as referências na lista devem ser indicadas em algum ponto no texto e vice versa. Resultados não publicados não devem ser incluídos na lista. Exemplos de referências são fornecidas abaixo:

### **Jornais:**

Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, **27**, 109-117

### **Teses:**

Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India

### **Livros:**

Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In-*Advances in Biotechnology*, ed. A. Pandey. Educational

Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16

Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi

### **Conferências:**

Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6<sup>th</sup> International Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah

## **TABELAS E FIGURAS**

Tabelas e figuras devem ser numeradas consecutivamente com números arábicos e inseridas em local apropriado no corpo do texto, devendo ser utilizados somente para apresentar dados que não possam ser descritos no texto.

## **UNIDADES E ABREVIATURAS**

O sistema SI deve ser usado para todos dados experimentais. No caso de outras unidades serem usadas, estas devem ser adicionadas em parênteses. Somente as abreviaturas padrões para as unidades devem ser usadas. Pontos não devem ser incluídos nas abreviaturas (por exemplo: m, e não m. ou rpm, e não r.p.m.), também devem ser usados '%' e '/' no lugar de 'porcento' e 'per'.

## **LAY-OUT DO MANUSCRITO**

Sugere-se que os autores sempre consultem a última edição do periódico para ver o layout. Com exceção do título, abstract e palavras-chave, todo o texto deve ser disposto em duas colunas em todas as páginas. No rodapé da primeira página (fonte 8) deve estar sendo indicado o autor para correspondência. Todo o manuscrito deve ser preparado na fonte "Times New Roman", tamanho 11 (exceto na lista de referências, que deve ser em tamanho 10).

## **ESPAÇAMENTO**

Deve ser deixado um espaço entre o título do artigo e o nome dos autores, e entre o cabeçalho e o texto. Entre as colunas deixar espaçamento de 0,6 cm. Não deixar espaços entre os parágrafos do texto.

## **ENVIO DE MANUSCRITO**

O manuscrito deve ser enviado por correio, acompanhado de arquivo eletrônico (cd, disquete, dvd). Utilizar editor de texto MS Word ou compatível.

## **REVISORES**

Ao submeter o manuscrito, o autor deve indicar no mínimo três revisores, fornecendo: nome completo, endereço e quando possível e-mail. Os autores podem solicitar que revisores sejam excluídos da avaliação de seus manuscritos, caso estes revisores possam ser tendencialmente desfavoráveis. Contudo, a escolha final dos referes permanecerá com o Editor.

**TARIFAS POR PÁGINAS E SEPARATAS**

Não existe custo para publicação de artigos. As separatas deverão ser solicitadas por e-mail ([babt@tecpar.br](mailto:babt@tecpar.br)).

Os manuscritos e toda correspondência deve ser enviada ao Editor, Prof. Dr. Carlos R. Soccol, no endereço abaixo.

[niet@tecpar.br](mailto:niet@tecpar.br)