



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MONITORAMENTO DA INDUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS* EM RATOS
WISTAR COM ALOXANA EM DIFERENTES DOSES**

GLORIANE IZABEL VOJCIECHOVSKI DE OLIVEIRA

Presidente Prudente – SP

2012



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MONITORAMENTO DA INDUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS* EM RATOS
WISTAR COM ALOXANA EM DIFERENTES DOSES**

GLORIANE IZABEL VOJCIECHOVSKI DE OLIVEIRA

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^a Dr^a Rosa Maria Barilli Nogueira.

Presidente Prudente – SP

2012

636.089 646 Oliveira, Gloriane Izabel Wojciechovski de
O48M Monitoramento da indução do *diabetes mellitus* em ratos
wistar com aloxana em diferentes doses / Gloriane Izabel
Wojciechovski de Oliveira. – Presidente Prudente, 2012.
47 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste: Presidente
Prudente – SP, 2012.

Bibliografia.

Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira

1. Aloxano. 2. *Diabetes mellitus*. 3. Monitoramento. 4.
Ratos *Wistar*. I. Título.

GLORIANE IZABEL VOJCIECHOVSKI DE OLIVEIRA

**MONITORAMENTO DA INDUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS* EM RATOS
WISTAR COM 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, 26 de setembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista –
Unoeste Presidente Prudente – SP

Prof^a. Dr^a Patrícia Monteiro Seraphim
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho-UNESP
Presidente Prudente – SP

Prof^a Dr^a Cecília Braga Laposy
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

A Deus presença constante em minha vida.

Aos meus pais pela vida, pelo estudo e pelo amor.

*Ao meu marido Ricardo, pela inesgotável paciência e sabedoria que redimem e orientam a
minha vida.*

Aos meus filhos Giulia e João Vitor, maravilhosos presentes de Deus.

A vocês dedico todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dada força para resistir e perseverar nos meus estudos e a minha fé que sempre me fez acreditar que Deus me capacitou para cumprir esta tarefa.

A minha professora, orientadora e amiga, Rosa Maria Barilli Nogueira, pela orientação sensível, compromissada e competente. Não haveria outra no jardim da vida diante de tantas “Rosas”, com tamanha dedicação e persistência. Levarei teu exemplo e dedicação por toda minha vida.

Aos meus pais Gerson e Glória, a vida nos separou por quilômetros de distância, mas seus corações e pensamentos sempre estiveram comigo.

Aos Doutores, professores e amigos, Alessandra Melchert, Vamilton Alvares Santarém, Paulo Eduardo Pardo por todo exemplo de profissionalismo e competência.

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

A Patrícia Monteiro Seraphim pela disponibilidade e atenção.

Ao querido amigo Valter Dias da Silva, que não mediu esforços para sempre me ajudar, sua amizade foi um presente de Deus.

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

Aos amigos do Biotério Central, Willian Ramos da Costa, Gracielle, Vieira Gonçalves, Sidmar de Lima Martins, Aparecido (Xuxu), Lucas Batista dos Santos e Rogério de Oliveira Batista pelo carinho, disponibilidade e colaboração.

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

A coordenação em nome do Dr. Luís do Nascimento Ortega, colegas professores e alunos da Faculdade de Farmácia que colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse alcançar essa conquista.

A Jakeline Ortega, pela amizade, pelo auxílio e carinho.

Aos alunos, Micael Diniz, Alan Mastrinelli e Luciana Fidelis pela dedicação na realização do experimento, meu muito obrigado.

Aos amigos, Marcelo Balbino, Rosilene Martins, Rosângela Cristovão Ferreira, Adriano Falvo, Edilaine Franco, Décio Gomes de Oliveira, Ricardo Alexandre Hakime Silva, Sérgio Silva, Marcos Zocoler, Claudia Isabel G. Delfim, quando temos amigos nunca estamos sós.

À minha família, pelo apoio constante em todos os momentos de meus estudos.

Ao amigo Luís Eduardo Lobato Sartori pela paciência, atenção, amizade, companheirismo e disponibilidade que demonstrou durante o desenvolvimento do trabalho, sempre com muita alegria.

A professora Cecília Braga Laposy e Silvia Maria Caldeira Franco Andrade, pelo estímulo e apoio em todos os momentos. Obrigado pelo carinho e dedicação.

A Dra. Margarida M. Silveira pelo enriquecimento prestado para a realização deste trabalho.

A amiga Dra. Telma R. Neves, pela preocupação e disponibilidade.

Aos amigos do Laboratório de Domissaneantes, Carlos Marcos e Fábio pelos momentos de alegria.

Com carinho agradeço minha amiga Afife por me incentivar nessa caminhada.

Meu carinho e gratidão.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

Monitoramento da indução do *diabetes mellitus* em ratos *wistar* com aloxana em diferentes doses

O objetivo deste trabalho foi monitorar a indução experimental do *diabetes mellitus* em ratos *Wistar fêmeas*, pela administração intraperitoneal de aloxana em diferentes doses e avaliar qual dose estabelece a maior incidência de diabetes com menor índice de óbitos. Quatro grupos experimentais com 30 animais em cada um sendo: grupo controle (GC) recebeu via intraperitoneal (ip) solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo G80, G120 e G200, receberam via (ip) aloxana 2% diluída em solução fisiológica nas doses de 80, 120 e 200mg/Kg respectivamente. Avaliou-se glicemia, temperatura, peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e percentual de óbitos em diferentes momentos. Conclui-se que todas as doses de aloxana administrada pela via intraperitoneal após 24 horas de jejum foram capazes de induzir o *diabetes mellitus* e o monitoramento da temperatura, glicemia e desidratação dos animais na primeira semana, foi de suma importância para o sucesso da indução, sendo a dose de 120mg/Kg a mais eficaz para obtenção de maior número de animais diabéticos e menor incidência de óbitos.

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

ABSTRACT

Monitoring the induction of *diabetes mellitus* in wistar rats with alloxan in different doses

The aim of this study was to monitor the induction of experimental diabetes mellitus in female Wistar rats by intraperitoneal administration of alloxan in different doses and dose to assess which provides the highest incidence of diabetes with lower death rates. Four experimental groups of 30 animals each as follows: control group (CG) received intraperitoneal (ip) solution of sodium chloride 0.9% and group G80, G120 and G200, received via (ip) diluted in 2% alloxan solution physiological doses of 80, 120 and 200mg/kg respectively. We evaluated blood glucose, temperature, weight, water intake, food intake and percentage of deaths at different times. It is concluded that all doses of alloxan administered intraperitoneally after 24 hours of fasting were able to induce diabetes mellitus and monitoring of temperature, glucose and dehydration of the animals during the first week, was paramount to the success of induction, and 120mg/kg dose of the most effective in achieving greater number of diabetic animals and lower incidence of deaths.

Keywords: Alloxan. *Diabetes mellitus*. Monitoring. *Wistar* rat.

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a	- Aminoácidos
A1C	- hemoglobiana glicada
ADA	- American Diabetes Association
AL	- Aloxana
DCCT	- Diabetes Control and Complication Trial Research Group
Dg	- Diabetes grave
DM	- <i>Diabetes mellitus</i>
Dm	- Diabetes moderado
DM1	- <i>Diabetes mellitus tipo 1</i>
DM1A	- <i>Diabetes mellitus tipo1 autoimune</i>
DM1B	- <i>Diabetes mellitus tipo1 idiopático</i>
DM2	- <i>Diabetes mellitus tipo 2</i>
FPG	- glicemia pré-prandial
g	- Grama
G120	- Grupo submetido à dose de 120mg/Kg de aloxana 2%
G200	- Grupo submetido à dose de 200mg/Kg de aloxana 2%
G80	- Grupo submetido à dose de 80mg/Kg de aloxana 2%
GAD65	- anti-dexcarboxilase do ácido glutâmico
GC	- Grupo controle
h	- Hora
HLA	- antígeno leucocitário humano
IA1 e IA2B	- anti-tirosina fosfatase
IDF	- International Diabetes Federation
ip	- Via intraperitoneal
iv	- Via intravenosa
LADA	- latente auto-imune diabete in adulto
mg/dL	- Miligrama por decilitro
mg/Kg	- Miligrama por quilo
mL	- Mililitros
NAD	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
NPH	- Neutral Protamine Hagedorn
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PD	- Polidipsia
PF	- Polifagia
PP	- perda de peso
PPG	- glicemia pós-prandial
PU	- Poliúria
PZI	- Protamine Zinc Insulin
SBD	- Sociedade Brasileira Diabetes
STZ	- Estreptozotocina
UKPDS	- United Kingdom Prospective Diabetes Study
α	- Alfa
β	- Beta
δ	- Delta
%	- Percentual
<	- Menor
>	- Maior
μL	- Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 Fisiopatologia do <i>Diabetes Mellitus</i>	14
1.1.1 <i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 1 (DM1).....	15
1.1.2 <i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 2 (DM2).....	16
1.2 Tratamento do <i>Diabetes Mellitus</i>	17
1.2.1 Insulinas	17
1.2.1.1 Análogos de insulina de longa duração (basal) - Glargina	19
1.2.2 Monitoramento do <i>Diabetes Mellitus</i>	21
1.3. Aloxana na Indução do <i>Diabetes Mellitus</i>	22
REFERÊNCIAS.....	26
2 ARTIGO CIENTÍFICO.....	33

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A Diabetes *Mellitus* (*DM*) é uma doença endócrina crônica, com uma elevada prevalência, um alto custo social, com redução da expectativa e qualidade de vida, além de ter um grande impacto na morbidade e mortalidade da população humana, assim como nos animais de companhia (SANTOS, 2012; OLIVEIRA; MILECH, 2004).

Esta doença está fortemente relacionada a complicações microvasculares como retinopatia, nefropatia e neuropatia e complicações macrovasculares como doença cardíaca isquêmica, infarto e doenças vasculares periféricas (INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION, 2011). Estima-se que o número de pessoas que vivem com diabetes deverá aumentar de 366 milhões em 2011 para 552 milhões em 2030, caso nenhuma medida urgente seja tomada. A cada ano aumenta 7 milhões de pessoas com *DM* (INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION, 2011). O *DM* tem sido considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. Neste mesmo período no Brasil, estima-se que esta doença atingirá quase 12 milhões de indivíduos (CAVALLI et al., 2007).

DM é uma doença de etiologia multifatorial, resultante de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina, que pode estar envolvida por defeitos genéticos funcionais das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução por fármacos ou agentes químicos e outras síndromes genéticas (BRASIL. Ministério da Saúde, 2006; BAZOTTE, 2010).

Em animais, o tratamento desta doença é um permanente desafio, por ser complexo, multidisciplinar e dependente da implementação efetiva de diferentes estratégias terapêuticas, farmacológicas e não farmacológicas, bem como da total dedicação por parte dos proprietários dos animais (SANTOS, 2012).

Conforme o relatório anual do Banfield Pet Hospital (2011), houve um aumento de 32% da doença em cães e um aumento de 16% em gatos, desde 2006, atingindo cerca de 0,18% e 0,64% das espécies, respectivamente (SANTOS, 2012).

1.1 Fisiopatologia do *Diabetes Mellitus*

A alteração da secreção ou da ação da insulina é responsável pela manifestação clínica do *DM*. A insulina é normalmente secretada pelas células beta (β) do pâncreas (aproximadamente 70% das células endócrinas) em resposta a um aumento da concentração de glicose no sangue. A molécula de insulina é composta 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 (SILVA et al., 2003), em todas as espécies, embora ocorram diferenças nos aminoácidos constituintes da molécula de espécie para espécie. A insulina humana difere da canina num aminoácido e da insulina felina em quatro aminoácidos. A alteração da secreção ou da ação da insulina causa diminuição da utilização da glicose, dos aminoácidos e dos ácidos graxos pelos tecidos, aumento da gliconeogênese e da glicogenólise hepática, assim como acúmulo da glicose na circulação, causando hiperglicemia (NELSON, 2004).

Os efeitos da hiperglicemia podem ser divididos em três fases, a fase de dessensibilização dos receptores da insulina, a fase da exaustão das células β e a fase da toxicidade da glicose. Inicialmente, a exposição a níveis elevados de glicose conduz a uma dessensibilização ou a um estado potencialmente reversível de baixa produção de insulina. Desta forma, uma prolongada exposição a níveis elevados de glicose leva à exaustão das células β e, conseqüentemente, a um esgotamento das reservas de insulina. A exaustão das células β é considerada como potencialmente reversível porque não há defeitos na síntese de insulina. No entanto, a toxicidade da glicose é um estado irreversível, pois provoca alterações nessas células. Vários estudos demonstram que a gravidade da toxicidade da glicose depende do grau de hiperglicemia e que a secreção da insulina pode começar a ser suprimida no prazo de dois dias de hiperglicemia persistente. As alterações histológicas associadas com a toxicidade da glicose incluem deposição de glicogênio e morte celular (RIOS; WARD, 2008). Além disso, com o aumento da concentração de glicose no sangue, é excedida a capacidade das células tubulares renais reabsorverem a glicose do ultrafiltrado glomerular, resultando em glicosúria (AMADOR, 2009).

Os quatro sinais clássicos da *DM* são: PU (poliúria), PD (polidipsia), PF (polifagia) e PP (perda de peso) (NELSON, 2004).

A glicosúria cria uma diurese osmótica, causando poliúria e polidipsia como forma compensatória de prevenir a desidratação. A diminuição da utilização da glicose pelos tecidos periféricos resulta no catabolismo proteico e no metabolismo da gordura para a produção hepática de glicose, como forma de compensação por parte do organismo, esta condição provoca perda de peso no animal. A polifagia resulta de uma incapacidade de inibição do centro de saciedade no hipotálamo devido à falta de glicose (NELSON, 2004; RIOS; WARD, 2008).

Nos gatos diabéticos, os fatores como a resistência à insulina, a deposição de substância amilóide nas ilhotas de Langerhans e a toxicidade da glicose, contribuem para a lesão de células β pancreáticas (HERRTAGE, 2009).

DM transitória ocorre em cerca de 20% dos gatos diabéticos, esses animais apresentam sinais clínicos e laboratoriais compatíveis com *DM*, mas estes voltam ao normal cerca de 4 a 6 semanas depois de se iniciar o tratamento, podendo deixar de necessitar de terapêutica com insulina, enquanto outros podem voltar a desenvolver sinais clínicos e a requerer novo tratamento (RIOS; WARD, 2008).

A remissão diabética ocorre em cerca de 90% dos gatos recém-diagnosticados, desde que estes sejam tratados apropriadamente, ocorre mais frequentemente depois de 1 a 4 meses de insulino-terapia e é mais provável se o controle glicêmico for adequado, para que as células β possam recuperar da toxicidade da glicose (RAND, 2007). A remissão do diabetes em cães é um evento raro, possível após resolução de quadros de resistência à insulina, especialmente os relacionados ao ciclo estral (POPPL et al., 2007).

1.1.1 Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)

A Associação Americana de Diabetes e a Organização Mundial de Saúde propuseram que o *diabetes mellitus* do tipo 1 fosse dividido em auto-imune (*DM1A*) ou idiopático (*DM1B*) (ALBERTI; ZIMMET, 1998; CHACRA; MOISÉS, 2001).

Diabetes mellitus tipo 1 (*DM1*) é caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, com consequente deficiência absoluta de insulina. Essa

destruição na maioria dos casos é mediada por autoimunidade, mas há casos em que não existem evidências de processo autoimune (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011). Este processo autoimune é detectado por autoanticorpos circulantes (marcadores de autoimunidade) tais como anti-descarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65), anti-tirosina fosfatase (IA1 e IA2B) e anti-insulina, que podem estar presentes meses ou anos antes do diagnóstico, na fase pré-clínica da doença e em até 90% dos indivíduos quando se detecta a hiperglicemia. O *DM1* pode estar associado a determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), alelos estes que podem suscitar o desenvolvimento ou proteger contra a doença (BAZOTTE, 2010; BRASIL. Ministério da Saúde, 2006).

O desenvolvimento da doença pode ocorrer principalmente em crianças e jovens (pico de incidência entre 10 e 14 anos); ou de forma progressiva e lenta, mais comum em adultos conhecido como LADA (latente auto-imune diabetes in adults), classificado erroneamente como *DM2* devido ao seu aparecimento tardio. Estima-se que 5% a 10% dos pacientes humanos com diagnóstico de *DM2* podem ter LADA (BRASIL. Ministério da Saúde, 2006).

1.2 Diabetes Mellitus Tipo 2 (*DM2*)

O *diabetes mellitus* tipo 2 (*DM2*) apresenta alterações etiopatogênicas e fisiopatológicas heterogêneas caracterizadas pela combinação de resistência à insulina e pela disfunção da células β pancreáticas e aumento da produção endógena de glicose, induzidas por anormalidades genéticas e adquiridas (FERRANNINI, 1998).

Caracterizada por defeitos na ação (resistência à ação da insulina) e na secreção da insulina, em geral ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, podendo existir predomínio de um deles (SBD, 2011). O *DM2* ocorre de forma mais lenta e tardiamente em relação ao *DM1* (RIBEIRO; OLIVEIRA; MELLO, 2007). Este tipo de diabetes é mais comum do que *DM1*, perfazendo cerca de 90 a 95% dos casos de diabetes e ocorre geralmente em adultos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2007). Vários fatores podem desencadear o diabetes tais como a obesidade, dieta hipercalórica e falta de

atividade física (RIBEIRO; OLIVEIRA; MELLO, 2007); mas a etiologia específica deste tipo de diabetes ainda não está claramente estabelecida como no *DM1*. Ao contrário do *DM1*, a maioria dos pacientes apresenta obesidade (GROSS et al., 2002), e a destruição autoimune do pâncreas não está envolvida. O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos (OLIVEIRA et al., 2008), com pico de incidência ao redor dos 60 anos (GROSS et al., 2002), embora sendo cada vez mais frequente em jovens (LYRA; CAVALCANTI, 2006).

Vários casos são diagnosticados somente depois que as complicações aparecem, e estima-se que mais da metade dos casos não são diagnosticados. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém, podem necessitar de tratamento com insulina para obtenção de um controle metabólico adequado (LYRA; CAVALCANTI, 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

Em relação a agregação familiar do diabetes é mais comum o *DM2* do que *DM1* (GROSS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, alguns estudos descrevem uma prevalência duas vezes maior de *DM1* em famílias com tipo 2, sugerindo dessa forma 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 *DM1*, o paciente *DM2* pode apresentar este quadro na vigência de intercorrências graves como infecções ou episódios agudos de doença cerebrovascular (GROSS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008).

1.2 Tratamento do *Diabetes Mellitus*

1.2.1 Insulinas

Sua descoberta foi um marco para o tratamento do *DM* Frederick Banting, um jovem cirurgião; Jonh MacLeod, professor de fisiologia; Charles Best, estudante graduado; e JB. Collip, químico experiente, obtiveram sucesso nos anos 1921 e 1922 quando obtiveram uma insulina terapeuticamente ativa que atendia todos aos critérios e produziram a primeira preparação de insulina para tratamento do *DM* em seres humanos (BARNETT; KRALL, 2009).

A insulina já é usada há mais de 85 anos, e nos últimos trinta anos ocorreram os maiores avanços na produção e na forma em que ela é utilizada, diferem entre si com relação a quatro características, de acordo com sua origem, concentração, grau de purificação e tempo de ação. A insulina é categorizada pela origem da espécie (suína, bovina e recombinante humana) e pela duração da sua ação (curta, intermediária, longa e ultra-longa). Para a escolha de uma insulina deve-se considerar a espécie doadora e a espécie receptora. A insulina felina é similar à bovina, enquanto que a insulina canina é idêntica à suína e similar à humana (COOK, 2007).

O pâncreas é um órgão glandular essencial, com importantes funções endócrinas e exócrinas. Está localizado ao nível dos segmentos epigástrico e mesogástrico da cavidade abdominal, é constituído por dois lobos, fracamente unido: um lobo direito duodenal (fino e delgado) e um lobo esquerdo esplénico (menor e grosso), ambos com origem no revestimento endodérmico do duodeno primitivo (SADLER, 2005). Esses dois lobos, unidos no corpo pancreático, formam um V, cujo ápice encontra-se localizado caudo-medial ao piloro (FARIA, 2007).

A atividade pancreática exócrina encontra-se associada à função gastrointestinal, com a secreção de enzimas digestivas no lúmen intestinal, indispensáveis para a digestão de nutrientes complexos (proteínas, amido e triglicérides), bem como, de outras substâncias (coenzimas, fatores inibitórios, água e eletrólitos) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A porção endócrina do pâncreas está organizada na forma de dispersos grupos de células, as ilhotas de *Langerhans*, cujo nome foi atribuído em homenagem a *Paul Langerhans*, o qual as identificou pela primeira vez, em 1869. As ilhotas de *Langerhans* encontram-se no tecido pancreático exócrino, constituindo apenas cerca de 1 a 2% da massa total pancreática (BONNER-WEIR, 2005; REUSCH, 2002). Mesmo com pequena dimensão e aparente simplicidade, as ilhotas de *Langerhans* são micro-órgãos notavelmente sofisticados, constituídos por quatro tipos principais de células, as quais têm diferentes propriedades, morfologia e produção hormonal (BONNER-WEIR, 2005; NELSON; COX, 2005).

As células β são as mais numerosas (60-80%), e produzem insulina e amilina; as células- α (20-30%) estão dispersas e secretam glucagon; as células- δ ou D (5-10%) produzem somatostatina; e as células F (raras ou ausentes) secretam o

polipeptídeo pancreático (BONNER-WEIR, 2005; MARTIN; CRUMP, 2003; FARIA, 2007; ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Atualmente, verifica-se no Brasil um baixo consumo de insulinas em humanos ultra-rápidas, sendo o esquema de insulina NPH (Neutral Protamine Hagedorn), 2 vezes ao dia, o mais comumente utilizado. Apesar do aparecimento de novas drogas e melhor conhecimento da fisiopatologia do *DM*, o controle metabólico permanece insatisfatório na maioria da população diabética. Dados americanos mostram que menos da metade (< 50%) dos diabéticos mantêm sua doença bem controlada (KORO et al., 2004).

A American Diabetes Association (ADA) recomenda uma glicohemoglobina (A1c) < 6,5%, glicemia pré-prandial (FPG) < 110 mg/dL e glicemia pós-prandial (PPG) < 140 mg/dL, tolerável até 180 mg/dl, como alvos de controle satisfatório (ADA, 2003 ; MALERBI; DAMIANI; RASSI, 2006), e ainda preconizam que estes testes devem ser realizados pelo menos duas vezes ao ano em pacientes com controle estável e quatro vezes ao ano em pacientes com alterações na terapêutica ou que estejam atingindo as metas glicêmicas recomendadas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Os grandes estudos, Diabetes Control and Complication Trial Research Group, 1993 (DCCT) e United Kingdom Prospective Diabetes Study, 1999 (UKPDS), mostraram que a redução de 1% na A1c influi significativamente na proteção à micro angiopatia e à neuropatia. No entanto, estima-se que mesmo pacientes com níveis adequados de A1c experimentem episódios frequentes de hipoglicemia noturna e hiperglicemia pós-prandial, possíveis complicadores da adesão ao tratamento intensivo e rígido.

1.2.1.2 Análogos de insulina de longa duração (basal) - Glargina

A insulina Glargina representa o grupo determinado de análogos de ação prolongada ou basal. Essa insulina é sintetizada a partir de modificações na cadeia de aminoácidos da insulina humana, efetuando-se uma substituição da

asparagina por glicina na posição 21 da cadeia α e adição de duas argininas na posição 30 da cadeia β , apresentam zinco também em sua formulação. Essas modificações resultam em um padrão único de liberação a partir do local de injeção. Ou seja, esse análogo forma microprecipitados no tecido subcutâneo, permitindo uma absorção gradual para a corrente sanguínea (CHENG; ZINMAN, 2009; TSCHIEDEL; PUNÁLES, 2010). Essas características explicam as diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmica da insulina glargina em comparação à insulina NPH e ultralenta (LEPORE et al., 2000).

Estudos recentes têm demonstrado a eficácia da insulina glargina, um análogo com ação de 24 horas que permite um melhor perfil de insulina basal, sem picos e, conseqüentemente, com menor risco de hipoglicemias graves (TSCHIEDEL; PUNÁLES, 2010) e hipoglicemia noturna, além de não ocasionar ganho de peso significativo. Assim, a glargina permite uma ação aproximada de 24 horas, sem picos e com variação interindividual semelhante à observada no tratamento com bomba de infusão contínua de insulina subcutânea e significativamente menor do que a da NPH e ultralenta (GERICH et al., 2006; LEPORE et al., 2000; MOHN et al., 2000), no controle glicêmico de pacientes com *DM1* e *DM2* tratados previamente com insulina NPH (COATES et al., 1995).

Vários estudos demonstraram os benefícios do uso da insulina glargina quando comparada à NPH, tanto na melhora do controle glicêmico como na redução dos episódios de hipoglicemia, principalmente os episódios noturnos (CHASE et al., 2003; SCHOBER et al., 2002), sendo bastante frequentes em crianças menores de oito anos de idade.

Adicionalmente, esse perfil mais estável da glargina permite uma administração mais flexível em relação aos locais e horários. E, ainda, por ser uma solução, não precisa ser homogeneizada como a NPH, o que facilita ainda mais o seu manuseio pelo paciente. Os efeitos do tratamento com a insulina glargina no controle glicêmico e na ocorrência de hipoglicemia já estão bem documentados tanto para o *DM2* quanto para o *DM1* (ROLLIN et al., 2009).

O guia de tratamento de felinos diabéticos da American Animal Hospital Association (AAHA) recomenda a utilização de insulinas de longa ação, como a glargina e a PZI (Protamine Zinc Insulin) (RUCINSKY et al., 2010). Os primeiros relatos da utilização da glargina em gatos foram publicados em 2004 e

2005 (MARSHALL; RAND, 2004; MARSHALL; RAND, 2005), no entanto, após quatro anos, a glargina se tornou amplamente utilizada em gatos diabéticos, especialmente nos Estados Unidos (APTEKMANN, et al., 2009). Este fato ocorreu, pois apesar de ser uma insulina lenta de uso humano, sua longa ação está associada com maiores taxas de remissão do diabetes em gatos do que outros tipos de insulina utilizados (MARSHALL; RAND; MORTON, 2009; ROOMP; RAND, 2009).

1.2.2 Monitoramento do *Diabetes Mellitus*

Para uma medida clínico-laboratorial é de suma importância um bom monitoramento do controle metabólico. As medidas diretas de eficácia dos medicamentos antidiabéticos e da insulina são a glicemia de jejum e pós-prandial e a dosagem de hemoglobina glicada (A1C). Este controle adequado da glicemia é fundamental para que se possa reduzir as complicações do *DM*. Em pacientes com *DM* já instalados, além desses parâmetros é necessário que se haja um monitoramento mais rigoroso de outros parâmetros como: pressão arterial, índice de massa corpórea e medida da cintura (BAZOTTE, 2010). O monitoramento das glicemias pode ser realizado através de glicemia capilar, que consiste em colocar uma gota de sangue na fita reagente e realizar a leitura através de um glicosímetro (aparelho de leitura com sensores eletroquímicos para glicose), que tem como vantagem um procedimento rápido, sendo possível a detecção de variações glicêmicas a qualquer momento e o ajuste rápido no tratamento medicamentoso (REUSCH, 2002; THOMPSON et al., 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011; BAZOTTE, 2010).

Contudo, os resultados obtidos com vários medidores podem diferir entre si e os resultados são normalmente inferiores aos valores reais da glicose determinada pelos métodos de referência. Isto pode resultar num diagnóstico incorreto de hipoglicemia ou em um equívoco no controle glicêmico (COHN et al., 2000; WESS; REUSCH, 2000; NELSON, 2009).

Devido ao pequeno volume de amostra de sangue necessário e os resultados imediatos, os glicosímetros oferecem uma importante vantagem relativa ao método laboratorial (JOHNSON et al., 2009). Os glicosímetros necessitam no

mínimo de 3 a 5 μ L de sangue, dependendo do modelo (WESS ; REUSCH, 2000; JOHNSON et al., 2009).

Embora estudos realizados utilizando glicosímetros para medir as concentrações de glicose no sangue no homem demonstrem que a precisão pode variar muito, existem outros fatores que podem influenciar os valores obtidos pelos glicosímetros, tais como, um baixo hematócrito, um pequeno volume de amostra de sangue, erro do operador ou do aparelho, fatores ambientais como a temperatura e a umidade ou a administração de fármacos (WESS; REUSCH, 2000; STEIN; GRECO, 2002).

1.3 Aloxana na Indução do *Diabetes Mellitus*

A aloxana é um dos agentes diabetogênicos mais estudado e comumente utilizado no meio científico para a indução de diabetes experimental, devido às características apresentadas serem semelhantes às encontradas na síndrome diabética em humanos: glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, entre outras (CARVALHO, 2002).

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). Essa droga possui citotoxicidade específica para as células β do pâncreas, causa 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 subseqüentes (LERCO et al., 2003).

A citotoxicidade seletiva da aloxana é condicionada pela grande capacidade da célula β em acumular a droga, aliada ao fato desta demonstrar maior sensibilidade aos radicais peróxidos quando comparada a outros tecidos (ZANOELLO et al., 2002).

A insulinopenia resultante provocava um estado de *Diabetes mellitus* experimental que foi chamado de diabetes aloxânico e tornou-se comumente utilizado como modelo de indução de *DM1* (McLETCHIE, 1982; LENZEN, 2008).

A toxicidade das drogas diabetogênicas, segue duas fases sequenciais antes do estado diabético, a primeira fase ocorre logo após a administração da droga, onde se observa uma hiperglicemia inicial por resposta adrenérgica, com diminuição dos níveis plasmáticos de insulina, consequência de um declínio intracelular dos níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), e aumento nos níveis plasmáticos de glucagon e cortisol, a segunda fase é caracterizada por uma hipoglicemia associada a um aumento nos níveis plasmáticos de insulina, atribuída à liberação de insulina por degeneração das células β (BLACK; ROSENBLUM; CAPEN, 1980).

Em relação à indução experimental do diabetes a aloxana pode ser administrada em ratos, cães, coelhos, hamster, cobaias e ovinos (BLACK; ROSENBLUM; CAPEN, 1980; FEDERIUK et al., 2004).

Os efeitos diabetogênicos da aloxana e a sensibilidade do hospedeiro podem estar relacionados a vários fatores, podendo não estabelecer o quadro de diabetes e levar até a morte. Precisa-se estar atento a estes fatores, para obtenção de indução do diabetes de maneira satisfatória, para que o diabetes seja induzido em um maior número de animais com menor índice de mortalidade (SILVA, 2011).

Fatores estes como, 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).

Existe a necessidade de determinar a dose da droga diabetogênica antes do início dos experimentos para que se evite o uso excessivo e desnecessário de animais, estando de acordo com as orientações éticas. Esta dose é determinada através da quantidade do agente indutor que promove necrose das células β e hiperglicemia mantida em pelo menos 80% dos animais, mas que não cause danos a outros órgãos (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 35 a 65mg/Kg, por meio da veia peniana ou veia da cauda e na concentração de 2% (SZKUDELSKI, 2001; MENTE; CENEVIVA; NETTO, 2001; CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003; LERCO et al., 2003; CAVALLI et al., 2007; LEME et al., 2010). 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. Segundo SZKUDELSKI, (2001) a dose intraperitoneal (ip) abaixo de 150mg/Kg, pode ser insuficiente para induzir o diabetes em ratos, necessitando de uma segunda dose. De acordo com SILVA (2011) uma dose igual ou inferior a 120mg/Kg (ip) é suficiente para induzir o diabetes em ratos. A maior parte dos pesquisadores utilizam 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 (iv) 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 β lesadas, seguida de morte encefálica; esta dose foi abandonada pelo autor por esta via de administração e não a recomendada. 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).

De acordo com Lerco et al., (2003), em relação a alimentação prévia dos animais, observou-se uma 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%, porém, 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).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi monitorar a indução experimental do *diabetes mellitus* em ratos *Wistar*, pela administração intraperitoneal de aloxana em diferentes doses e avaliar qual dose estabelece a maior incidência de diabetes com menor índice de óbitos.

REFERÊNCIAS

AMADOR, S. M. S. **Doença renal crónica idiopática felina**. 2009. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, PT. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.5/1381>>. Acesso em: 14 mar. 2012.

ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complication. **Diabete Med.**, v. 15, p. 539-553, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 26, suppl. 1, p. S33-50, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Standards of medical care in diabetes**. 2011. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/content/34/Supplement_1/S11.full>. Acesso em: 21 abr.12.

APTEKMANN, K. P. et al. Owner experience and satisfaction in treating a pet diagnosed with diabetes mellitus. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 2009, São Paulo, Brasil. **Proceedings...** São Paulo: ANCLIVEPA, 2009. 1 CD-ROM.

BANFIELD PET HOSPITAL. **State of pet health: 2011 report**. v.1. Disponível em: <<http://www.banfield.com/Banfield/files/bd/bd826667-067d-41e4-994d-5ea0bd7db86d.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2012.

BARNETT, D.M.; KRALL, L. P. A história do diabetes. In: KAHN, C.R. et al. **Diabetes melito**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. cap. 1, p. 15-31.

BAZOTTE, R. B. **Paciente diabético: cuidados farmacêuticos**. Rio de Janeiro: Medbook, 2010.

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.

BONNER-WEIR, S. Islets of Langerhans: morphology and postnatal growth. In: JOSLIN E. P.; KAHN C. R. (Ed.). **Joslin's diabetes mellitus**. 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 41-50.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Prevenção clínica de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 56.

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. esp., p. 60-64, 2003.

CARVALHO, P. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria**: estudo experimental em ratos diabéticos. 2002. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2002.

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.

CHACRA, A. R.; MOISÉS, R. C. M. S. Diabetes melito: classificação e diagnóstico . In: CORONHO, V. et al. (Ed.). **Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 924-927.

CHASE, H. P. et al. Reduced hypoglycemic episodes and improved glycemic control in children with type 1 diabetes using insulin glargine and neutral protamine Hagedorn insulin. **J. Pediatr.**, v. 143, n. 6, p. 737-40. 2003.

CHENG, A. Y. Y.; ZINMAN, B. Princípios da insulinoterapia. In: KAHN, C.R. et al. **Diabetes melito**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 671-680.

COATES, P.A. et al. Pharmacokinetics of a long-acting human insulin analogue (HOE901) in healthy subjects. **Diabetes**, v. 44, suppl. 1, p.130A, 1995.

COHN, L. A. et al. Assessment of five portable blood glucose meters, a point-of-care analyzer, and color test strips for the measuring blood glucose concentration in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, p. 198 – 202, 2000.

COOK, A. K. The latest management recommendations for cats and dogs with nonketotic diabetes mellitus. **Veterinary Medicine**, v. 102, p. 600-614. 2007.

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.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin - dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 977-86. 1993.

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

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.

FERRANNINI, E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. **Endocrine Reviews.**, v. 19 n. 4, p. 477-490, 1998.

GERICH, J. et al. Fluctuation of serum basal insulin levels following single and multiple dosing of insulin glargine. **Diabetes Technol. Ther.**, v. 8, n. 2, p. 237-43, 2006.

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.

HERRTAGE, M. E. New strategies in the management of feline diabetes mellitus. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 34., 2009, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: WSAVA, 2009. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2009/lecture12/8.pdf?LA=1>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF diabetes atlas**: fifth edition. 2011. Disponível em: <<http://idf.org/diabetesatlas/news/fifth-edition-release>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

JOHNSON, B. M. et al. Comparison of a human portable blood glucose meter, veterinary portable blood glucose meter, and automated chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentrations in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, p. 1309–1313, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 321-324.

KORO C. E. et al. Glycemic control from 1988 to 2000 among US adults diagnosed with type 2 diabetes: a preliminary report. **Diabetes Care**, v. 27, p. 17-20, 2004.

LEME, J. A. C. A. et al. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos wistar. **Bioscience Journal**, v. 26, p. 451-456, 2010.

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

LEPORE M. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous injection of long-acting human insulin analog glargine, NPH insulin, and ultralente human insulin and continuous subcutaneous infusion of lispro. **Diabetes**, v. 49, n. 12, p. 2142-2148, 2000.

- 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.
- LUKENS, F. D. W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 304-330, 1948.
- LYRA, R.; CAVALCANTI, N. **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006.
- MALERBI, D.; DAMIANI, D.; RASSI, N. Posição de consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes: insulino terapia intensiva e terapêutica com bombas de insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 1, p. 125-35. 2006.
- MARSHALL, R. D.; RAND, J. S. Insulin glargine and the treatment of feline diabetes mellitus (abstract). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, p. 443, 2004.
- MARSHALL, R. D.; RAND, J. S. Treatment with insulin glargine results in higher remission rates than lente or protamine zinc insulins in newly diagnosed diabetic cats (abstract). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 425, 2005.
- MARSHALL, R. D.; RAND, J. S.; MORTON, J. M. Treatment of newly diagnosed diabetic cats with glargine insulin improves glycaemic control and results in higher probability of remission than protamine zinc and lente insulins. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 8, p. 683-691, 2009.
- MARTIN, P. A., CRUMP, M. H. The endocrine pancreas. In: PINEDA, M. H.; DOOLEY, M. P. (Ed). **McDonald's veterinary endocrinology and reproduction** 5th ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 141-160.
- MENTE, E.D.; CENEVIVA, R.; NETTO, J.C. Transplante de ilhotas pancreáticas em dispositivos de imunoisolamento celular-Resultados iniciais. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, p. 84-87, 2001.
- McLETCHIE, N. G. B. Alloxan diabetes: the sorcerer and his apprentice. **Diabetologia**, v. 23, n. 1, p. 72-75, 1982.
- MOHN, A. et al. Nocturnal glucose control and free insulin levels in children with type 1 diabetes by use of the long-acting insulin HOE 901 as part of a three-injection regimen. **Diabetes Care**, v. 23, n. 4, p. 557-9. 2000.
- NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005. p. 881- 910.
- NELSON, R. W. Canine diabetes mellitus. In: MOONEY C. T.; PETERSON, M. E. (Ed.). **BSAVA manual of small animal endocrinology**. 3rd ed. United Kingdom: British Small Animal Veterinary Association, 2004. p. 112-128.

NELSON, R. W. Disorders of the endocrine pancreas. In: NELSON R, W.; COUTO, C. G. (Ed.). Small animal internal medicine. 4th ed. China: Moby Elsevier, 2009. p. 764 – 802.

OLIVEIRA, J. E. P; MILECH, A. **Diabetes Mellitus**: clínica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 7-11.

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.

PÖPPL A. G. et al. Estudo preliminar da ligação hormônio-receptor da insulina à membranas de músculo e da tolerância à glicose em fêmeas caninas durante o ciclo estral. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, supl. 2, p. 462-464, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/29226>>. Acesso em: 17 out. 2011.

RAND, J. S. Feline diabetes mellitus: pathogenesis and principles of therapy. In: NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 2007, Orlando. **Proceedings...** Orlando, Florida. 2007. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/132.asp?LA=1>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

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

REUSCH, C. E. Experiences with blood glucose home monitoring by owners of diabetic dogs and cats. In: WSAVA CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Proceedings...** Granada: WSAVA, 2002. Disponível em: <<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2559>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

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. Fis.**, v. 13, n. 1, p. 72-77, 2007.

RIOS, L.; WARD, C. Feline diabetes mellitus: pathophysiology and risk factors. **Compendium Continuing Education for Veterinarians**, v. 30, n. 12, p. E1-E7. 2008.

ROLLIN, G. et al. Utilização da insulina Glargina em crianças menores de oito anos de idade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 6, p. 721-725, 2009.

ROOMP, K.; RAND, J. Intensive blood glucose control is safe and effective in diabetic cats using home monitoring and treatment with glargine. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 668-682, 2009.

RUCINSKY, R. et al. AAHA Diabetes management guidelines for dogs and cats. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 46, p. 215-224, 2010.

SADLER, T. W. **Langman embriologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 199-201, 2005.

SANTOS, F. A. **Diabetes Mellitus em cães e gatos: estudo retrospectivo de 35 casos clínicos**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

SCHOBER, E. et al. Glargine at PSGol: comparative trial between insulin glargine and NPH insulin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, v. 15, n. 4, p. 369-76. 2002.

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.

SILVA, V. D. **Indução experimental do Diabetes Mellitus em ratos wistar submetidos à injeção intraperitoneal de aloxana em diferentes doses**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**: 2011. Jardim Londrina, SP: AC Farmacêutica, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus**: diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2007.

STEIN, J. E.; GRECO, D. S. Portable blood glucose meters as a means of monitoring blood glucose concentrations in dogs and cats with diabetes mellitus. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 17, p. 70 – 72, 2002.

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.

THOMPSON, M. D. et al. Comparison of glucose concentrations in blood samples obtained with a marginal ear vein nick technique versus from a peripheral vein in healthy cats and cats with diabetes mellitus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, p. 389 – 392. 2002.

TSCHIEDEL, B.; PUNÃLES, M.K.C. **Insulinas**: insulinizando o paciente com diabetes. São Paulo: AC Farmacêutica, 2010. cap. 3-6, p. 5-75.

WESS, G.; REUSCH, C. Evaluation of five portable blood glucose meters for use in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, p. 203 – 209. 2000.

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

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.

1 **ARTIGO CIENTÍFICO**2 **MONITORAMENTO DA INDUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS* EM RATOS**3 ***WISTAR* COM ALOXANA EM DIFERENTES DOSES**4 **MONITORING THE INDUCTION OF *DIABETES MELLITUS* IN *WISTAR* RATS**5 **WITH ALLOXAN IN DIFFERENT DOSES**6 ***G.I.V. Oliveira^I; R.M.B. Nogueira^{II}; C.B. Laposy^{II}; V.D. Silva^I; L. Fidelis^I**7 ^IAluna do Mestrado em Ciência Animal-Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE,
8 Presidente Prudente-SP. e-mail: gloriane@unoeste.br9 ^{II} Docente Mestrado em Ciência Animal- Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE,
10 Presidente Prudente-SP; ^{III} Faculdade de Farmácia- Universidade do Oeste Paulista-
11 UNOESTE, Presidente Prudente-SP.12 **RESUMO**

13 O objetivo deste trabalho foi monitorar a indução experimental do *diabetes mellitus* em ratos
14 *Wistar* fêmeas, pela administração intraperitoneal de aloxana em diferentes doses e avaliar
15 qual dose estabelece a maior incidência de diabetes com menor índice de óbitos. Quatro grupos
16 experimentais com 30 animais em cada um sendo: grupo controle (GC) recebeu via
17 intraperitoneal (ip) solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo G80, G120 e G200, receberam
18 via (ip) aloxana 2% diluída em solução fisiológica nas doses de 80, 120 e 200mg/Kg
19 respectivamente. Avaliou-se glicemia, temperatura, peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar
20 e percentual de óbitos em diferentes momentos. Conclui-se que todas as doses de aloxana
21 administrada pela via intraperitoneal após 24 horas de jejum foram capazes de induzir o
22 *diabetes mellitus* e o monitoramento da temperatura, glicemia e desidratação dos animais na
23 primeira semana, foi de suma importância para o sucesso da indução, sendo a dose de
24 120mg/Kg a mais eficaz para obtenção de maior número de animais diabéticos e menor
25 incidência de óbitos.

26 **Palavras-chave:** aloxana, monitoramento, *Diabetes mellitus*, rato *Wistar*.27 **ABSTRACT**

28 The aim of this study was to monitor the induction of experimental diabetes mellitus in
29 female Wistar rats by intraperitoneal administration of alloxan in different doses and dose to
30 assess which provides the highest incidence of diabetes with lower death rates. Four
31 experimental groups of 30 animals each as follows: control group (CG) received
32 intraperitoneal (ip) solution of sodium chloride 0.9% and group G80, G120 and G200,
33 received via (ip) diluted in 2% alloxan solution physiological doses of 80, 120 and 200mg/kg

34 respectively. We evaluated blood glucose, temperature, weight, water intake, food intake and
35 percentage of deaths at different times. It is concluded that all doses of alloxan administered
36 intraperitoneally after 24 hours of fasting were able to induce diabetes mellitus and
37 monitoring of temperature, glucose and dehydration of the animals during the first week, was
38 paramount to the success of induction, and 120mg/kg dose of the most effective in achieving
39 greater number of diabetic animals and lower incidence of deaths.

40 **Keywords:** alloxan, monitoring, *Diabetes mellitus*, *Wistar* rat .

41 INTRODUÇÃO

42 O *Diabetes mellitus* (*DM*) é caracterizado como uma desordem metabólica com hiperglicemia
43 crônica, de repercussão sócio-econômica importante em função das complicações crônicas
44 secundárias ao controle metabólico deficiente (Koro *et al.*, 2004; Santos, 2012), resultante da
45 deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina (Negri, 2005; Oliveira *et al.*,
46 2008), levando a distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas e a
47 complicações microvasculares e macrovasculares (Sacks *et al.*, 2002; Scheffel *et al.*, 2004).

48 O *DM* está presente também em animais de estimação como cães, podendo ser fatal se não
49 diagnosticada e adequadamente tratada (Faria, 2007). Ocorre na maioria das vezes em cães
50 adultos, idosos, obesos e sedentários. Nas fêmeas a incidência é maior em relação aos
51 machos; as raças caninas mais predispostas são: Poodle, Cocker, Beagle, Fox paulistinha,
52 Pinscher, Rotweiller, Schnauzers, Dachshund e Terrier (Faria, 2007; Nogueira e Marco,
53 2008).

54 O método mais utilizado atualmente para indução experimental do diabete é através da
55 utilização de agentes citotóxicos seletivos para destruição de células β , como aloxana (AL) e
56 estreptozotocina (STZ) (Negri, 2005; Lenzen, 2008).

57 A AL destrói seletivamente as células β pancreáticas sendo captadas pelos transportadores de
58 glicose (GLUT2) levando a lesão celular, além de possuir custo menor quando comparada a
59 STZ (Jansson e Sandler, 1986; Cavalli *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007). Diversos fatores
60 podem influenciar na ação diabetogênica da aloxana tais como: concentração da droga,
61 velocidade de infusão, dose, via de administração, dieta, tempo de jejum, peso e idade do
62 animal (Lerco *et al.*, 2003; Federiuk *et al.*, 2004).

63 O monitoramento do *DM* induzido experimentalmente com agentes citotóxicos parece ser
64 importante para o sucesso da indução (Federiuk *et al.*, 2004), principalmente o controle dos
65 episódios de hipoglicemia (Chase *et al.*, 2003).

66 O objetivo deste trabalho foi monitorar a indução experimental do *diabetes mellitus* em ratos
67 *Wistar*, pela administração intraperitoneal de aloxana em diferentes doses e avaliar qual dose
68 estabelece a maior incidência de diabete com menor índice de óbitos.

69 **MATERIAIS E MÉTODOS**

70 Este estudo foi protocolado (43/09), avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
71 Animais da instituição de origem. Cento e vinte ratos da linhagem *Wistar*, fêmeas, adultas,
72 com idade de 60 dias e peso médio de 200g, foram submetidos a jejum de 24 horas antes da
73 indução e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais com 30 ratos em cada
74 um sendo: Grupo controle (GC) recebeu 1mL (ip) ou 0,03UI (sc) de solução de cloreto de
75 sódio 0,9%; G80, G120, G200, receberam respectivamente 80, 120 e 200mg/Kg de aloxana
76 2% (Alloxan monohydrate, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) diluída em solução
77 fisiológica (ip) (Carvalho *et al.*, 2003; Lerco *et al.*, 2003; Bongioiolo, 2008; Oliveira, 2008;
78 Oliveira *et al.*, 2008; Silva, 2011). Os animais foram mantidos em caixas individuais de
79 polietileno, em local com temperatura ambiente controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodos
80 controlados (12h claro/12h escuro), água e ração foram oferecidos de acordo com o protocolo
81 experimental. O protocolo de indução e monitoramento e acompanhamento dos animais após
82 o período de monitoramento encontra-se na Tab. 1. As avaliações ocorreram em diferentes
83 momentos sendo: M0 (momento antes da indução), M1 (dia da indução), M2, M3, M4, M5,
84 M6 e M7 (momentos do monitoramento) e M8, M9, M16, M17 e M18 (momentos de
85 acompanhamento dos animais após o período de monitoramento) representando os dias de
86 avaliação.

87 Em todos os momentos onde foi verificada a temperatura retal utilizou-se termômetro digital
88 (G-Tech[®]) e para glicemia o glicosímetro (Breeze2-Bayer[®]) após contenção dos animais em
89 cone acrílico para ratos, com exposição da cauda, sendo feita uma pequena incisão com
90 auxílio de lâmina de bisturi, coletando-se uma gota de sangue depositada diretamente na tira
91 de leitura de glicose do glicosímetro.

92 Foram considerados diabéticos, animais com glicemia em duas concentrações, ao qual se
93 classificou o estado diabético: diabete moderado (DM) (glicemia de 120 a 200mg/dL), diabete
94 grave (DG) (glicemia acima de 200mg/dL) (Calderon *et al.*, 1999; Silva, 2011).

95 As doses de insulina glargina (Lantus[®]) para correção da hiperglicemia foram ministradas de
96 acordo com a tabela (modificada) de Federiuk *et al.* (2004) (Tab. 2), a correção da
97 desidratação foi realizada com administração de 1mL de solução fisiológica via subcutânea
98 após observação da elasticidade da pele e do não consumo de água pelos animais; para

99 correção da hipoglicemia foi administrado 1mL de glicose 5% por gavagem quando a
 100 glicemia era ≤ 60 mg/dL; para correção da temperatura, os animais foram colocados em caixa
 101 de luz durante 30 minutos quando a mesma era $\leq 34^{\circ}\text{C}$.

102 Nos momentos em que a água e ração eram controlados utilizou-se 200mL de água e 50g de
 103 ração. No M18 (décimo oitavo dia após a indução) todos os animais foram sacrificados com
 104 100mg/Kg de tiopental (ip) (Rhoden *et al.*, 2006).

105 Tabela 1 - Protocolo de indução, monitoramento e acompanhamento dos animais após o
 106 período de monitoramento nos diferentes momentos representados por dias (M0, M1, M2,
 107 M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M16, M17, M18).

DIAS DE AVALIAÇÃO	INDUÇÃO E MONITORAMENTO	
M 0 (antes da indução)	GC, G80, G120, G200 – peso e jejum por 24 horas	
M 1 (dia da indução)	GC – 1ml de solução fisiológica (ip)	G80, G120, G200 - aloxana 2% (ip) nas dose de 80, 120 e 200mg/Kg
	Após 30 minutos ração e água glicosada 5% à vontade	
M 2	GC, G80, G120, G200 - temperatura retal, glicemia, substituindo à água glicosada por água sem glicose	
M 3	GC - temperatura, glicemia, SF (sc)	G80, G120, G200 – temperatura, glicemia (insulina) (Tab. 2) ou glicose
M 4, 5, 6	GC- idem M 3+ correção da desidratação	G80, G120, G200 – idem M 3+ correção da desidratação
M 7	GC – idem M 4,5,6 + pesagem, jejum alimentar por 24horas	G80, G120, G200 – idem M4,5,6 + pesagem, jejum alimentar por 24 horas
	PERÍODO DE ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS APÓS O MONITORAMENTO	
M 8	GC, G80, G120, G200 - temperatura, glicemia, água e ração controlada	
M 9	GC, G80, G120, G200 – avaliação ingestão alimentar e hídrica em 24 horas, ração e água à vontade	
M16	GC, G80, G120, G200 – pesagem, jejum alimentar por 24 horas	
M17	GC, G80, G120, G200 - temperatura, glicemia, água e ração controlada	
M18	GC, G80, G120, G200 - avaliação ingestão alimentar e hídrica em 24 horas e eutanásia dos animais	

108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115

116 Tabela 2 – Recomendação de doses de insulina Glargina para ratos com Diabetes tipo 1
117 segundo Federiuk *et al.* (2004) (modificada).

MANHÃ	
Concentração de glicose sanguínea (mg/dL)	Insulina Glargina (U/Kg)
< 80	0
80 – 150	0,5
151 – 200	1,0
201 – 250	1,5
251 – 300	2,0
301 – 350	2,5
351 – 450	3,0
451 – 450	3,5
451 – 500	4,0
> 500	4,5

118

119 ANÁLISE ESTATÍSTICA

120 Para comparar os pesos, a concentração sérica de glicose e temperatura retal dos ratos, entre
121 os momentos distintos, dentro de cada grupo, empregou-se o teste de análise de variância para
122 amostras repetidas, com contrastes pelo método de Tukey-Kramer. Para comparar o volume
123 de água ingerida e ingestão de ração entre momentos, dentro de cada grupo, empregou-se o
124 teste t-pareado. O teste de Qui-quadrado e teste de exato de Fischer foram utilizados nas
125 Tabelas de contingência 2x2 para provar se os percentuais de óbitos se distribuíam de forma
126 homogênea entre os grupos estudados. Foi adotado

127 $p < 0,05$ como nível de significância (Maroco, 2007).

128 RESULTADOS

129 Para a variável glicemia comparando momentos dentro do mesmo grupo, foi observado que
130 todos os animais do GC apresentou valores glicêmicos médios dentro da normalidade, ou
131 seja, inferior a 120mg/dL em todos os momentos de avaliação. No G80 a média da glicemia
132 foi maior que 120mg/dL no M2 e M4, havendo diferença ($p < 0,05$) em relação ao M8 e M17.
133 No G120 a glicemia ficou acima de 200mg/dL em todos os momentos. No M2 e M4 os
134 valores foram considerados bastante elevados (> 500 mg/dL) diferindo ($p < 0,05$) dos demais
135 momentos. Para o G200 os valores médios glicêmicos foram superiores a 200mg/dL no M2,
136 M4, M8 com diferença ($p < 0,05$) do M17 (Tab. 3).

137 Na comparação entre grupos, a média dos valores ficou > 200 mg/dL no G80, M2 e M4, para o
138 G200 no M2, M4, M8 e no G120 em todos os momentos de avaliação. Houve diferença

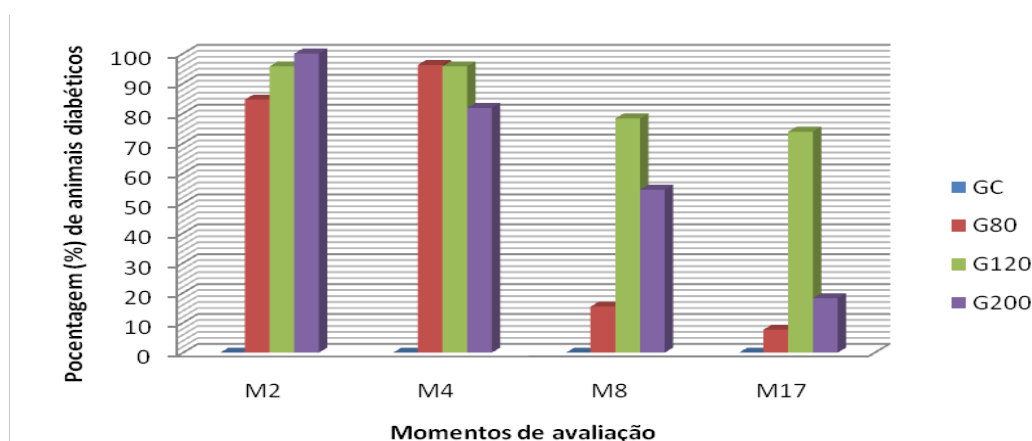
139 ($p < 0,05$) no M2 e M4 de todos os grupos em relação ao GC e do G120 em relação ao G80. No
 140 M8 e M17 o G120 diferiu ($p < 0,05$) do GC e do G80 (Tab. 3).

141 Tabela 3 - Valores das médias e desvio padrão da glicemia (mg/dL) dos animais nos
 142 diferentes grupos e momentos de avaliação.

GRUPOS	MOMENTOS			
	M2	M4	M8	M17
GC	101,0±9,5 ^{Aa}	95,7±12,3 ^{Aa}	90,9±8,3 ^{Aa}	83,3±9,2 ^{Aa}
G80	215,1±166,7 ^{Ab}	224,8±158,4 ^{Ab}	114,8±76,0 ^{Ba}	96,7±79,2 ^{Ba}
G120	506,5±153,4 ^{Abc}	536,3±139,6 ^{Abc}	337,8±175,5 ^{Bb}	205,9±101,1 ^{Bb}
G200	352,3±220,1 ^{Abc}	376,5±228,9 ^{Abc}	279,3±214,0 ^{Ab}	107,2±82,1 ^{Ba}

143 Letras maiúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo. Letras minúsculas comparam grupos dentro do mesmo
 144 momento.

145 Considerando os animais sobreviventes em cada momento (M2, M4, M8 e M17) observou-se
 146 que a porcentagem de animais diabéticos foi diminuindo ao longo dos momentos de avaliação
 147 em todos os grupos, exceto o controle, sendo para o G80, 84,6%, 96,2%, 15,4%, 7,7%; para o
 148 G120, 95,7%, 95,7%, 78,3%, 73,9%; para o G200, 100%, 81,3%, 54,5% e 18,2% (Fig. 1) e
 149 houve diferença quanto a incidência de DM e DG (Fig. 2).



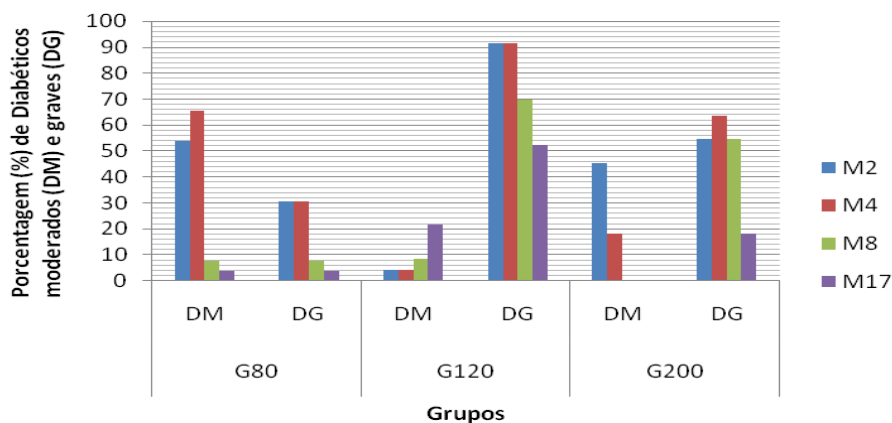
150

151 Figura 1 – Porcentagem de animais sobreviventes diabéticos do, G80 (80mg/Kg), G120
 152 (120mg/Kg), G200 (200mg/Kg) nos diferentes momentos de avaliação (M2, M4, M8, M17)
 153 representados por dias.

154 No M2 todos os animais sobreviveram sendo que no G200, 100% dos animais estavam
 155 diabéticos com 45,5% dos animais com DM (acima de 120mg/dL) e 54,5% com DG (acima
 156 de 200mg/dL) em seguida no G120 95,7% dos animais estavam diabéticos com 91,4% de DG
 157 e 4,3% de DM e por último o G80 mostrou que 84,6% dos animais estavam diabéticos sendo
 158 53,8% DM e 30,8% DG (Fig. 2).

159 No M4 o G80 teve 96,2% de diabéticos com 65,4% DM e 30,8% DG seguido do G120 com
 160 95,7% de diabéticos sendo 91,4% DG e 4,3%DM e por último o G200 com 81,8% de
 161 diabéticos sendo 63,6% DG e 18,2% DM (Fig. 2).

162 No M8 e M17 o G120 permaneceu com maior número de animais diabéticos 78,3% (69,6%
 163 DG e 8,7% DM) e 73,9% (52,2% DG e 21,7% DM) respectivamente, seguido do G200 com
 164 54,5% e 18,2% (todos DG) e por último o G80 com 15,4% (7,7% DG e 7,7% DM) e 7,7%
 165 (3,9% DG e 3,8% DM) (Fig. 2).



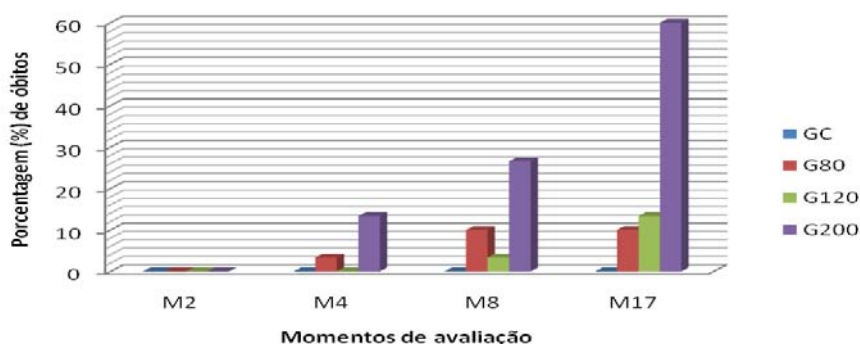
166

167 Figura 2 – Porcentagem de diabetes moderado (DM) ou grave (DG) nos animais
 168 sobreviventes do G80 (80mg/Kg), G120 (120mg/Kg), G200 (200mg/Kg) nos diferentes
 169 momentos de avaliação (M2, M4, M8, M17) representados por dias.

170 Na verificação do percentual de óbitos, 100% dos animais do GC sobreviveram em todos os
 171 momentos de avaliação. Para o G80, G120, G200 houve um aumento crescente na
 172 percentagem de óbito ao longo dos momentos de avaliação e no M2 em todos os grupos. No
 173 M4 o G120 manteve-se com 100% de sobreviventes e os G80 e G200 tiveram 3,3% e 13,3%
 174 de óbito. Ao final do período de monitoramento, ou seja, no M8 o menor índice de óbito
 175 (3,3%) ocorreu no G120, seguido do G80 (10%) e G200 (26,6%). No último momento (M17)
 176 o maior percentual de óbito foi para os animais do G200 (60,0%), seguido pelo G120 (13,3%)
 177 e G80 (10,0%) (Fig. 3).

178

179



180

181 Figura 3 – Porcentagem de óbitos no GC (grupo controle), G80 (80mg/Kg), G120
 182 (120mg/Kg), G200 (200mg/Kg) nos diferentes momentos de avaliação (M2, M4, M8, M17)
 183 representados por dias.

184 A média da temperatura em todos os animais do GC manteve-se dentro da normalidade. No
 185 G80 houve diminuição da média da temperatura ao longo dos momentos de avaliação até o
 186 M8 com diferença ($p < 0,05$) do M2 em relação ao M4 e M8. No G120 a menor média da
 187 temperatura foi no M17 ($32,8^{\circ}\text{C} \pm 1,5$) que diferiu ($p < 0,05$) do M2, M4 e M8. No G200 não
 188 foi observado nenhuma diferença na comparação entre momentos dentro do grupo (Tab. 4).

189 Na comparação entre grupos no M2 a diminuição da temperatura em todos os grupos diferiu
 190 do GC. No M4 o G80 e G120 diferiram ($p < 0,05$) do GC e o G120 e G200 diferiram do G80 o
 191 qual teve a média mais baixa da temperatura ($35,0 \pm 0,9$) em relação aos demais grupos. No
 192 M8 e M17 todos os grupos diferiam do GC e o G120 diferiu do G80 (Tab. 4).

193 Tabela 4 - Valores das médias e desvio padrão da variável temperatura ($^{\circ}\text{C}$) dos animais dos
 194 diferentes grupos e momentos de avaliação.

GRUPOS	MOMENTOS			
	M2	M4	M8	M17
GC	$36,2 \pm 0,8^{\text{Aa}}$	$36,5 \pm 0,8^{\text{Aac}}$	$36,8 \pm 0,8^{\text{Aac}}$	$36,6 \pm 0,6^{\text{Aac}}$
G80	$35,7 \pm 0,6^{\text{Ab}}$	$35,0 \pm 0,9^{\text{Bb}}$	$34,9 \pm 1,0^{\text{Bb}}$	$35,2 \pm 0,8^{\text{Ab}}$
G120	$35,6 \pm 1,0^{\text{Ab}}$	$35,9 \pm 0,9^{\text{Abc}}$	$35,4 \pm 1,0^{\text{Abc}}$	$32,8 \pm 1,5^{\text{Bbc}}$
G200	$35,7 \pm 1,2^{\text{Ab}}$	$36,5 \pm 0,7^{\text{Aabc}}$	$36,2 \pm 1,1^{\text{Abc}}$	$34,8 \pm 2,3^{\text{Abc}}$

195 Letras maiúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo. Letras minúsculas comparam grupos dentro do mesmo
 196 momento.

197 O peso no GC manteve-se em média com 212,3 gramas. Para os demais grupos houve
 198 diminuição do peso em todos os momentos ao longo do tempo. No G80 houve diferença
 199 ($p < 0,05$) do M7 em relação M0 e M16. No G120 e G200 a maior perda de peso foi observada
 200 no M16 com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao M0 e M7 (Tab.5).

201 Tabela 5 - Valores das médias e desvio padrão da variável peso (g) dos animais dos diferentes
 202 grupos e momentos de avaliação.

GRUPOS	MOMENTOS		
	M0	M7	M16
GC	$212,7 \pm 24,8$	$208,4 \pm 21,2$	$208,5 \pm 20,0$
G80	$177,7 \pm 18,3$	$169,7 \pm 21,5^*$	$179,8 \pm 22,9$
G120	$194,7 \pm 9,3$	$166,5 \pm 17,5$	$160,9 \pm 26,9^{\#}$
G200	$178,0 \pm 23,6$	$158,1 \pm 29,9$	$153,8 \pm 36,8^{\#}$

203 * $p < 0,05$ X M0,M16; # $p < 0,05$ X M0,M7

204 Em relação à ingestão alimentar e hídrica as avaliações ocorreram no nono (M9) e décimo
205 oitavo (M18) dias após indução e de acordo com as médias observadas em cada grupo houve
206 muito pouca variação do consumo de ração e água. Observou-se aumento ($p < 0,05$) na
207 ingestão alimentar e hídrica no M18 comparado ao M9 com 6,9% (ração) e 17,2% (água) para
208 o G80 e 20,2% (ração) e 28,3% (água) para o G120 respectivamente.

209 **DISCUSSÃO**

210 Na literatura existem diferentes estudos que mostram diferentes doses e vias de administração
211 da aloxana para indução do *Diabetes mellitus* do tipo I. Dentre todas as doses observadas a
212 mais frequentemente utilizada em ratos é de 35 a 65mg/Kg, sendo a veia peniana ou veia da
213 cauda a via mais indicada (Mente *et al.*, 2001; Szkudelski, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Lerco
214 *et al.*, 2003; Cavalli *et al.*, 2007; Leme *et al.*, 2010), no entanto outros autores citam outras
215 doses e via como, Kodama *et al.* (1993) onde citam 200mg/Kg intraperitoneal, Soares *et al.*
216 (2000) utilizaram 40mg/Kg via intraperitoneal, Federiuk *et al.* (2004) onde utilizaram doses
217 mais elevadas de 120mg/Kg pela via intravenosa e Silva (2011), doses de 120, 150 e
218 200mg/Kg via intraperitoneal.

219 A velocidade de infusão da aloxana também parece influenciar no sucesso da indução e Lerco
220 *et al.* (2003) relatam que caso a via intravenosa seja a escolhida a administração deve ser
221 rápida, pois administrações realizadas de forma lenta não são efetivas e não induzem o
222 diabete.

223 No estudo de Soares *et al.* (2000) a dose de 40mg/Kg via intraperitoneal causou hiperglicemia
224 moderada, no entanto, relatam que outros autores utilizaram a mesma dose por via
225 intravenosa, e obtiveram como resultados severa hiperglicemia. Este fato sugere que outras
226 vias, que não a intravenosa atenuam a resposta hiperglicêmica no diabete induzido com
227 aloxana.

228 De acordo com Szkudelski (2001), quando a aloxana é administrada por via intraperitoneal ou
229 subcutânea, a dose eficaz deve ser duas a três vezes maior, que a dose para via intravenosa e
230 relata ainda, que a dose intraperitoneal abaixo de 150mg/Kg, pode ser insuficiente para
231 induzir o diabetes em ratos, necessitando de uma segunda dose. Os achados de Silva (2011)
232 discordam de Szkudelski (2001) e relata que a dose de 120mg/Kg é suficiente e capaz de
233 induzir os sinais clínicos clássicos do diabete, portanto este atual estudo também discorda do

234 mesmo autor e concorda com Silva (2011), pois foi possível induzir o diabetes nos animais,
235 que receberam dose $\leq 120\text{mg/Kg}$ de aloxana via intraperitoneal.

236 Embora maior parte dos pesquisadores, tenha utilizado a via intravenosa na maioria das
237 espécies animais, onde os efeitos da aloxana são mais evidentes, Federiuk *et al.* (2004)
238 observaram que 70% dos ratos que receberam uma dose de 120mg/Kg de aloxana intravenosa
239 morreram nos primeiros dois dias após a indução, mesmo tendo sido usadas medidas
240 preventivas a desnutrição, desidratação e hipoglicemia. Devido ao alto índice de mortalidade,
241 provavelmente decorrente da liberação maciça de insulina pelas células β lesadas, o autor
242 abandonou esta dose por esta via de administração e não a recomenda. Neste estudo,
243 utilizando-se a mesma dose de Federiuk *et al.* (2004) 120mg/Kg porém, pela via
244 intraperitoneal, o percentual de óbitos foi de 0% até o quarto dia de avaliação e de 3,3% no
245 oitavo dia, quando associado o monitoramento dos animais em relação a glicemia,
246 temperatura e desidratação.

247 Os 78,3% de animais diabéticos e 3,3% de óbito encontrado neste estudo, no oitavo dia após
248 indução usando a dose 120mg/Kg via intraperitoneal também são bem superiores em relação a
249 eficácia quando comparado aos resultados de Silva (2011) onde relata no mesmo momento,
250 25% de diabéticos e 15% de óbito quando a mesma dose e via foram utilizadas. Estes atuais
251 resultados foram com certeza superiores e mais eficientes na indução em virtude do
252 monitoramento dos animais, realizado de forma intensiva e diária.

253 No momento subsequente (M17), após o período de monitoramento o percentual de animais
254 diabéticos diminuiu e o de óbito aumentou, provavelmente pelo fato de alguns animais que se
255 apresentavam hiperglicêmicos no 8º dia, apresentarem oscilação glicêmica, já que neste
256 momento não havia mais o monitoramento constante dos mesmos e pelo fato de alguns
257 animais do G80 (15,4%), G120 (8,7%) e G200 (18,2%) apresentarem hipoglicemia.

258 Soares *et al.* (2000) sugerem que a diminuição de animais diabéticos ao longo do tempo pode
259 estar relacionado ao fato da droga não atingir todas as células β , ficando uma população de
260 células sem degenerar e estas, por sua vez, poderiam sofrer uma hipertrofia compensatória e
261 Ribeiro *et al.*, (2007) descrevem a capacidade das células β das ilhotas pancreáticas em se
262 recuperar após danos principalmente em pacientes jovens.

263 Algumas células β podem não ser destruídas devido a aloxana ser um composto químico
264 muito instável, com uma estrutura molecular semelhante à glicose a qual é transportada para o
265 citosol da célula β por meio do transportador de glicose GLUT2 presente na membrana

266 plasmática, desta forma pode não inibir a função do transportador, e pode seletivamente entrar
267 nas células β de forma irrestrita (Malaisse *et al.*, 1982; Jansson e Sandler, 1986; Cavalli *et al.*,
268 2007; Lenzen, 2008).

269 Federiuk *et al.*, (2004) relatam que a medida em que aumenta-se a dose da aloxana ocorrem
270 maiores efeitos da mesma, podendo levar os animais à morte, devido à desidratação e
271 desnutrição, consequência de descontrolada hiperglicemia e/ou morte por hipoglicemia,
272 devido a liberação maciça de insulina pelas células β danificadas.

273 Neste estudo, observou-se elevados níveis glicêmicos com 0% de óbito em todos os grupos
274 estudados até dois dias após indução e nenhuma morte por hipoglicemia até o oitavo dia,
275 resultado do monitoramento constante dos animais, concordando com Federiuk *et al.* (2004)
276 onde relatam 90% de eficácia na indução em ratos quando foram tomadas medidas
277 preventivas. Outro fator relevante e que corrobora com outros autores foi o fato de ter sido
278 usado a insulina glargina para o controle glicêmico. Outros autores relatam que a insulina
279 glargina quando comparada a outras insulinas (Ex: NPH) tem maior estabilidade e controla de
280 forma mais eficiente a hiperglicemia e reduz episódios de hipoglicemia, principalmente
281 episódios noturnos (Chase *et al.*, 2003).

282 O jejum prévio à administração da aloxana também influencia no sucesso ou não da indução.
283 O tempo de jejum pode variar de 12, 24, 48 a 60 horas, como apontam alguns pesquisadores,
284 sendo que a sensibilidade do animal a ação da droga aumenta respectivamente com o aumento
285 do tempo de jejum (Zanoello *et al.*, 2002; Lerco *et al.*, 2003; Federiuk *et al.*, 2004; Cavalli *et*
286 *al.*, 2007). Segundo Lukens (1948), 95% dos ratos tratados com aloxana, administrada com o
287 animal em jejum prolongado de 48 a 60 horas, tornam-se diabéticos, enquanto que uma dose
288 similar administrada em animais onde o jejum não foi observado diminui essa resposta em
289 25%. No atual estudo os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas antes
290 da administração da aloxana e não foi usado tempo superior, por questões éticas e mesmo
291 assim, foi encontrado um alto percentual de animais diabéticos nos três grupos.

292 Kodama *et al.* (1993), relataram que utilizando aloxana 2% na dose de 200mg/Kg (ip) durante
293 o período neonatal, foi encontrado severa hiperglicemia com valores glicêmicos superiores a
294 250mg/dL.

295 Os parâmetros clínicos representados pela temperatura, evolução do peso, ingestão hídrica e
296 ingestão alimentar evoluíram de forma característica, com a presença de hipotermia, perda de

297 peso, polifagia e polidipsia, sinais clínicos compatíveis com o *Diabete mellitus*, concordando
298 com os achados de outros trabalhos (Cavalli *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007, Silva, 2011).

299 Cabe ressaltar que o aumento de ingestão alimentar e hídrica foi maior no M18, período sem
300 monitoramento, quando comparado ao momento anterior M9, período após o término do
301 monitoramento.

302 **CONCLUSÃO**

303 Conclui-se que todas as doses de aloxana administrada pela via intraperitoneal após 24 horas
304 de jejum foram capazes de induzir o *diabetes mellitus* e o monitoramento da temperatura,
305 glicemia e desidratação dos animais na primeira semana, foi de suma importância para o
306 sucesso da indução, sendo a dose de 120mg/Kg a mais eficaz para obtenção de maior número
307 de animais diabéticos e menor incidência de óbitos.

308 **AGRADECIMENTOS**

309 A Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade do Oeste Paulista pelo apoio
310 financeiro. Ao Dr. Rogério Giuffrida pela análise estatística.

311 **REFERÊNCIAS**

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

316 CALDERON, I.M.P.; RUDGE, M.V.C.; RAMOS, M.D.; PERAÇOLI, J.C. Estudo
317 longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabéticas – Relação com a
318 acrossomia e o retardo de crescimento intra-uterino. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v.21, p.91-
319 98, 1999.

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

322 CAVALLI, V.L.L.O.; SORDI, C.; TONINI, K. *et al.* Avaliação *in vivo* do efeito
323 hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill). *Rev.*
324 *Bras. Farmacogn.*, v.17, p.64-70, 2007.

325 CHASE, H.P.; DIXON F.; PEARSON J.; FIALLO-SCHARER R., *et al.* Reduced
326 hypoglycemic episodes and improved glycemic control in children with type 1 diabetes using
327 insulin glargine and neutral protamine Hagedorn insulin. *J. Pediatr.*, p.737-740, 2003.

328 FARIA, P.F. Diabetes mellitus em cães. *Acta Veterinaria Brasílica*, v.1, p.8-22, 2007.

- 329 FEDERIUK, I.F.; CASEY, H.M.; QUINN, M.J. *et al.* Induction of type-1 diabetes mellitus in
330 laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment.
331 *Comp. Med.*, v.54, p.252-257, 2004.
- 332 JANSSON, L.; SANDLER, S. Alloxan-induced diabetes in the mouse: Time course of
333 pancreatic B-cell destruction as reflected in an increased islet vascular permeability. *Virchows*
334 *Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, v.410, p.17-21, 1986.
- 335 KODAMA, T.; IWASE, M.; NUNOI, K. A new diabetes model induced by neonatal alloxan
336 treatment in rats. *J. Diabetes Res. Clin. Pract.*, v.20, p.183-189, 1993.
- 337 KORO, C.E.; BOWLIN, S.J.; BOURGEOIS, N. *et al.* Glycemic control from 1988 to 2000
338 among US adults diagnosed with type 2 diabetes: a preliminary report. *Diabetes Care*, v.27,
339 p.17-20, 2004.
- 340 LEME, J.A.C.A.; CASTELLAR, A.; REMEDIO, R.N.; BARBOSA, R.A., *et al.* Efeitos em
341 curto prazo da aplicação de aloxana para Indução de diabetes em ratos wistar. *Bioscience*
342 *Journal*, v.26, p.451-456, 2010.
- 343 LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*,
344 v.51, p.216-226, 2008.
- 345 LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, J.L.M. *et al.* Caracterização de um modelo
346 experimental de *Diabetes mellitus*, induzido por Aloxana em ratos. Estudo clínico e
347 Laboratorial. *Acta Cir. Bras.*, v.18, p.132-142, 2003.
- 348 LUKENS, F.D.W. Alloxan diabetes. *Physiol. Rev.*, v.28, n.3, p.304-330, 1948.
- 349 MALAISSE, W. J.;MALAISSE-LAGAE F.;ABDULLAH S. *et al.* Determinants of the
350 selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.79, n.3, p.927-
351 930, 1982.
- 352 MAROCO, J. Análise Estatística - com utilização do SPSS. 3 ed. Lisboa: Símbolo, 2007,
353 p.824.
- 354 MENTE, E.D.; CENEVIVA, R.; NETTO, J.C. Transplante de ilhotas pancreáticas em
355 dispositivos de imunisolamento celular-Resultados iniciais. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.16,
356 p.84-87, 2001.
- 357 NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Rev. Bras.*
358 *Cienc. Farm.*, v.41, p.121-142, 2005.
- 359 NOGUEIRA, R.M.B.; MARCO, V. Terapêutica das principais endocrinopatias em cães e
360 gatos. In: ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 3.ed. Roca: São Paulo. cap.16,
361 p.398-408, 2008.

- 362 OLIVEIRA, D.M. *Influência da ingestão de erva mate (Ilex paraguariensis) sobre*
363 *parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos Wistar.* São
364 Paulo, 2008. Dissertação (mestrado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde
365 Pública.
- 366 OLIVEIRA, T.V.; MOREIRA G.V.; TOLEDO M. T. Análise Morfométrica da Placenta de
367 Ratas Wistar Prenhes Induzidas ao Diabetes Mellitus por Aloxana. *Rev. Eletr. Bio.*, v.1, p. 28-
368 41, 2008.
- 369 RHODEN, C.R.; MASLINKIEWISZ, A.; PEREIRA, M.S.M. *et al.* Eutanásia em animais de
370 laboratório. In: Rhoden E.L., Rhoden C.R., editors. *Princípios e técnicas em experimentação*
371 *animal.* 1. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p.55-58. 2006.
- 372 RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C.A.M.; MELLO, M.A.R. Exercício e prevenção do diabetes
373 mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. *Motriz Rev. Educ. Fís.*, v.13,
374 p.72-77, 2007.
- 375 SACKS, D.B.; BRUNS D.E.; GOLDSTEIN, D.E. *et al.* Guidelines and Recommendations for
376 Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes mellitus. *Clin. Chem.*,
377 v.48, p.436- 472, 2002.
- 378 SANTOS, F.A. *Diabetes Mellitus em cães e gatos : estudo retrospectivo de 35 casos clínicos.*
379 Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina
380 Veterinária, Lisboa, 2012.
- 381 SCHEFFEL, R.S.; BORTOLANZA, D.; WEBER, C.S. *et al.* Prevalências de complicações
382 micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito tipo 2
383 em atendimento ambulatorial. *Rev. Ass. Med. Bras.*, v.50, p.263-267, 2004.
- 384 SILVA, V.D. *Indução experimental do diabetes mellitus em ratos wistar submetidos à*
385 *injeção intraperitoneal de aloxana em diferentes doses.* Presidente Prudente, 2011.
386 Dissertação Mestrado em Ciência Animal , Universidade do Oeste Paulista- Presidente
387 Prudente- São Paulo.
- 388 SOARES, J.C.M.; COSTA, S.T.; CECIM, M. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com
389 *Diabetes mellitus* aloxano induzido tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium*
390 *jambolanum.* *Ciência Rural*, v.30, n.1, p.113- 118, 2000.
- 391 SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat
392 pancreas. *Physiol. Res.*, v.50, p.536-546, 2001.

- 393 ZANOELLO, A.M.; MAZZANTI, C.M.; GINDRI, J.K. *et al.* Efeito Protetor do *Syzygium*
394 *cumini* contra *Diabetes Mellitus* induzido por Aloxano em Ratos. *Acta Farm. Bonaer.* v.21,
395 n.1, p.31-36, 2002.