

# PROTOCOLO PARA INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE DIBETES MELLITUS POR ALOXANA EM RATAS – resultados preliminares

Taís Andrade DIAS<sup>1</sup>, Neusa Margarida PAULO<sup>2</sup>, Kênnia Rocha REZENDE<sup>3</sup>, Luiz Augusto de SOUZA<sup>4</sup>, Fernanda Figueiredo MENDES<sup>1</sup>, Danilo Ferreira RODRIGUES<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestranda, Escola de Veterinária e Zootecnia – UFG, [taisdiasvet@yahoo.com.br](mailto:taisdiasvet@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Professora Doutora, Escola de Veterinária e Zootecnia – UFG

<sup>3</sup>Professora Doutora, Faculdade de Farmácia – UFG

<sup>4</sup>Doutorando, Escola de Veterinária e Zootecnia – UFG

**Palavras chave:** pâncreas, glicemia, modelo experimental

## INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma doença crônica sistêmica decorrente de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina, que compromete o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Esse comprometimento metabólico é causado pela hiperglicemia resultante da ausência de secreção de insulina ou da resistência a sua ação nos tecidos (PÖPPL & GAONZÁLEZ, 2005; PINTO et al., 2009).

Nas últimas décadas, devido ao aumento de sua prevalência, morbidade e mortalidade, o diabetes mellitus tem se tornado um sério problema de saúde pública (RATHMANN & GIANI, 2004). Esta enfermidade está entre as dez maiores causas de mortalidade no Brasil (COBAS & GOMES, 2010) e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), ainda neste século serão 11 milhões de indivíduos diabéticos no país e, até 2030, 366 milhões no mundo (TORQUATO et al., 2000; RATHMANN & GIANI, 2004).

Diversas complicações estão relacionadas com a presença do diabetes, entre elas a nefropatia, cegueira, aterosclerose, doença cardiovascular, trombose, infartos e amputações de membros, sendo a doença uma das principais causas de incapacitação física para o trabalho (LERCO et al., 2003).

Desta forma, estudos básicos são importantes para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes, bem como, para sua prevenção e tratamento. Modelos experimentais que possam determinar de maneira controlada o papel de cada um dos componentes envolvidos na patogenia da doença, fornecendo subsídios para sua melhor compreensão, são indispensáveis para tais estudos (CESARETTI & KOHLMANN, 2006).

A indução química do diabetes em animais tem sido amplamente empregada nos estudos das complicações causadas pela doença. Vários agentes químicos são citotóxicos para as células  $\beta$  do pâncreas, porém apenas a aloxana e a estreptozotocina (STZ) tem sido sistematicamente investigadas e amplamente empregadas para induzir diabetes nos animais (RODRÍGUEZ & MÉNDEZ, 1994).

A aloxana é uma pirimidina com estrutura semelhante ao ácido úrico e a glicose. Possui propriedades diabetogênicas com ação seletiva e destrutiva sobre as células  $\beta$  pancreáticas. A indução ao diabetes mellitus em animais experimentais, está relacionada à formação de radicais superóxido e hidroxila que são especificamente tóxicos para tais células, levando à degeneração e morte definitiva das mesmas. 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 dissulfide (LIMA et al., 2001).

Apesar de sua ampla utilização, os protocolos de indução diabética por aloxana ainda não estão totalmente elucidados e estabelecidos, havendo ainda algumas controvérsias a serem esclarecidas. Neste contexto, o presente estudo tem por objetivo padronizar um protocolo de indução experimental do diabetes mellitus em ratas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Até o momento foram utilizados 18 ratos da linhagem Wistar, fêmeas, adultas, com peso corporal inicial variando entre 160-200g, fornecidas pelo Biotério da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas contendo três indivíduos cada, receberam alimentação específica para espécie e água potável à vontade, sendo submetidos a período de adaptação de 10 dias.

Para indução química do diabetes, os animais foram mantidos em jejum sólido por 24 horas. Após este período realizou-se a pesagem e dosagem da glicemia de cada indivíduo na pré-indução. Os níveis de glicose foram monitorados por meio de glicosímetro comercial OneTouch Ultra (Johnson & Johnson<sup>®</sup>).

A solução de aloxana monoidratada (Sigma-Aldrich Inc, St Louis, MO, USA) foi preparada minutos antes da aplicação por meio da diluição do fármaco em solução salina 0,9%, em uma concentração de 60mg/mL. O preparo da solução foi realizado em ambiente escuro, utilizando frasco âmbar envolvido por papel alumínio para evitar contato da luz, visto que o composto é fotossensível. Além disso, após a

diluição, o frasco foi mantido refrigerado até o momento da aplicação. Os animais receberam única dose de 120mg/kg de aloxana via intraperitoneal. Uma hora e meia depois, a alimentação foi reintroduzida aos animais.

Dez dias após a indução, os animais foram submetidos a 8 horas de jejum sólido e reavaliados quanto ao peso e nível glicêmico. Aqueles que obtiveram glicemia superior a 200mg/dL foram considerados diabéticos. Os animais que não obtiveram este índice foram novamente submetidos ao protocolo de indução. Os indivíduos diabéticos foram pesados e tiveram seus níveis de glicemia aferidos semanalmente durante 21 dias.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 18 animais submetidos à indução química do diabetes, 11 (61,2%) obtiveram glicemias superiores à 200mg/dL e foram considerados severamente diabéticos, visto que os níveis de glicose sanguínea considerados normais para a espécie variam entre 50 à 135mg/dL (HARKNESS & WAGNER, 1993). Dentre os animais diabéticos, quatro (36,4%) necessitaram de duas tentativas de indução para confirmação da doença. Os índices de sucesso na indução do diabetes por aloxana em ratos variam nos diferentes estudos. CARVALHO et al. (2003), LERCO et al. (2003) e DINIZ (2007) obtiveram cerca de 40% de ratos diabéticos após aplicação de aloxana utilizando diferentes protocolos, porém não relataram a necessidade de repetição do protocolo. Desta forma, o protocolo utilizado se mostra de acordo com a literatura consultada.

Além disso, a literatura menciona índices variados de mortalidade dos animais após a indução diabética. Múltiplos fatores capazes de mudar os efeitos da droga e a sensibilidade do hospedeiro podem estar ligados à morte dos animais, como: estado de hidratação da droga, velocidade de infusão, via de administração, dieta, tempo de jejum, peso do animal, entre outros (LERCO et al., 2003). Até o momento nenhum óbito foi registrado no presente estudo.

Como esperado foi observado aumento progressivo dos níveis de glicose sanguínea e perda significativa do peso corporal dos animais (Tabela 1) durante o período experimental, caracterizando o quadro diabético grave e permanente provocado pela aloxana.

Tabela 1: Médias e desvios padrões do nível de glicemia sanguínea em jejum e peso de 18 ratas Wistar no pré e pós indução química do diabetes mellitus por aloxana nos diferentes períodos experimentais.

|                           | <b>Pré-<br/>indução</b> | <b>Confirmação</b> | <b>7 dias</b> | <b>14 dias</b> | <b>21 dias</b> |
|---------------------------|-------------------------|--------------------|---------------|----------------|----------------|
| Glicemia em jejum (mg/dL) | 88,7±27,2               | 441,8±65,2         | 467,2±48,6    | 498,9±36,3     | 527,6±31,6     |
| Peso (g)                  | 176,4±17                | 157,3±13,4         | 149,1±17,5    | 149,2±19,5     | 165,6±22,5     |

Outros sinais clínicos associados ao diabetes mellitus também foram observados como polifagia, polidipsia, poliúria, apatia, desidratação e comprometimento progressivo e acentuado do estado geral dos animais. Esta sintomatologia é causada pela severidade do diabetes mellitus provocado pela aloxana e também pela ausência de tratamento e controle dos níveis glicêmicos. Pesquisadores que trabalham com a indução química do diabetes mellitus por meio da aloxana são unânimes em relatar o surgimento e a permanência destes sinais em todos os trabalhos consultados (CARVALHO et al., 2003; LERCO et al., 2003; DINIZ, 2007; DUARTE et al., 2010; LEME et al., 2010), confirmando a eficácia do protocolo proposto.

## **CONCLUSÕES**

Até o momento, o protocolo proposto para indução experimental do diabetes mellitus utilizando aloxana se mostrou eficaz. Todos os sinais clínicos e laboratoriais esperados foram encontrados e permaneceram durante todo o tempo de avaliação, caracterizando um quadro severo e progressivo da doença. Além disso, não houve nenhum registro de óbito até o momento sugerindo metodologia mais segura.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Augusto de Rezende e ao Doutorando Raul Hernandes Bortolin da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela grande contribuição.

## **REFERÊNCIAS**

CARVALHO, E.N.; CARVALHO, N.A.S.; FERREIRA, L.M. Experimental model of induction of *diabetes mellitus* in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.18 (edição especial online), 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>.

CESARETTI M. L. R.; KOHLMANN O.JR. Modelos experimentais de Resistência a Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v.50, n.2, p.190-197, 2006.

COBAS, R.A.; GOMES, M.B. Diabetes Mellitus. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, Ano 9, suplemento 2010, p. 68-75, 2010.

DINIZ, S.F. **Influência do Diabetes Mellitus no processo de reparação de fraturas. Estudo experimental em ratos**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

DUARTE, V.M.G.; RODRIGUES, A.S.; REZENDE, L.A.; RAMOS, A.M.O.; SOUZA, R.M.; FREIRE NETO, F.P.; MEDEIROS, A.C.; BRANDÃO NETO, J.; ALMEIDA, M.G.; REZENDE, A.A. Relationship between oxidative stress and diabetic osteopenia in premenopausal rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.46, n.3, p.539-549, 2010.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1993. p.48-55.

LEME, J.A.C.A.; CASTELLAR, A.; REMEDIO, R.N.; BARBOSA, R.A.; MOURA, L.P.; DALIA, R.A.; GOMES, R.J.; CAETANO, F.H.; MELLO, M.A.R.; LUCIANO, E. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para Indução de diabetes em ratos wistar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.26, n.3, p.451-456, 2010.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, J.L.M.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.18, n.2, p.132-142, 2003.

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. 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.

PINTO, M.V.M; ANJOS, C.B.; LOPES, D.V.; SANTOS, H.R.; SILVA, A.L.S.; BARBOSA, L.G.; GONÇALVES, R.V.; COSTA, D.A.; SILVA, C.M.; XAVIER, J.B.; JUSTINO, G.C.M.; MEYER, P.F.; SCAGLIONE, G.M.; AGUIAR, J.L.N. Influência da laserterapia de 632,8 nm por 150 mw na cicatrização de úlcera diabética. Relato de caso. **Revista Dor**, São Paulo, v.10, n.2, p.194-199, 2009.

PÖPPL, A.G.; GONZÁLEZ, F.H.D. Aspectos epidemiológicos e clínico laboratoriais da diabetes mellitus em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, n.1, p.33-40, 2005.

RATHMANN, W.; GIANI, G. Global prevalences of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, Alexandria, v.27, n.10, p.2568-2569, 2004.

RODRÍGUEZ, H.G.R.; MÉNDEZ, J.D. Diabetes mellitus experimental. **Ciencia Veterinaria**, México-DF, v.6, p.347-377, 1994.

TORQUATO, M.T.C.G.; MONTENEGRO, R.M.; VIANA, L.A.L.; SOUZA, R.A.H.G.; LANNA, C.M.; LUCAS, J.C.B.; DURIN, C.B.; FOSS, M.C. Prevalence of diabetes mellitus ,impaired glucose tolerance and cardiovascular risk factors in the urban adult population of Ribeirão Preto. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v.50, suppl.1, p.140-141, 2000.