



Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos *Wistar*

Valter Dias da Silva¹; Rosa Maria Barilli Nogueira¹

¹Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente-SP, Brasil.

RESUMO

A indução do *diabetes mellitus* com substâncias citotóxicas como a Aloxana em animais de experimentação tem sido amplamente empregada com a finalidade de desenvolver estudos voltados ao tratamento desta patologia, mas alguns pesquisadores apontam dificuldades na indução e de manter os animais em bom estado geral de saúde por longos períodos. O objetivo do estudo foi rever protocolos de indução encontrados na literatura e contribuir com resultados de experiência própria destes autores neste procedimento, uma vez que a grande variedade de protocolos encontrada na literatura dificulta a escolha do pesquisador. Os resultados do estudo indicaram que as maiores dificuldades da indução estão relacionadas com a dose, via de administração, tempo de jejum na pré-indução e monitoramento dos animais pós-indução. Conclui-se que o monitoramento intensivo dos animais na primeira semana de indução, controle da hipoglicemia e hiperglicemia resulta em maior número de animais diabéticos e redução no índice de óbitos, tornando o procedimento da indução experimental mais eficiente.

Palavras-chave: Aloxano. *Diabetes mellitus*. Ratos *Wistar*.

INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus*, quimicamente induzido com drogas citotóxicas em animais de experimentação tem sido amplamente empregado como modelo para os estudos de agentes terapêuticos e preventivos da doença, dos eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabético (Zanoello *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2007).

A hiperglicemia persistente no *diabetes mellitus* leva a complicações microvasculares, predominando a retinopatia, nefropatia e neuropatias debilitantes, e a complicações macrovasculares, como o acidente vascular cerebral, doenças que afetam artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores. Juntas, essas doenças fazem do diabetes a sétima causa de óbitos no mundo desenvolvido (Zanoello *et al.*, 2002; Kirsten, 2006; Cavalli *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007).

As consequências sociais e econômicas são consideradas devastadoras, uma vez que, quatro milhões de mortes por ano estão relacionadas ao diabetes e suas complicações, o que representa 9% da mortalidade mundial total (Vasconcelos *et al.*, 2008).

Frente a essa dura realidade, torna-se imprescindível a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes e de suas complicações, à procura de um tratamento capaz de contribuir para minimizar as alterações endócrino-metabólicas causadas pela doença e, principalmente, as lesões crônicas sobre os diferentes órgãos (Lerco *et al.*, 2003; Cavalli *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007).

Todo o empenho científico em estabelecer modelos de estudo, e novas técnicas, são desenvolvidas com o intuito de buscar caminhos para erradicar ou amenizar o problema de uma das doenças mais graves do nosso século (Santos Junior, 2006).

Diversos modelos de indução do *diabetes mellitus* estão disponíveis, os quais incluem: destruição química das células β pancreáticas, remoção cirúrgica da massa de células β ou pancreatectomia, injúria ao hipotálamo ventromedial, dietas ricas em açúcares, gorduras, má

nutrição *in utero* ou altas doses de hormônios contra-regulatórios como os glicocorticóides (Cazarolli, 2004), porém o mais frequentemente utilizado é a indução do diabetes químico pela administração dos agentes citotóxicos como a aloxana (AL) e estreptozotocina (STZ), ambos seletivos para células β (Delfino *et al.*, 2002; Negri, 2005; Lenzen, 2008).

A STZ, um glicosídeo nitrosouréia natural (N-metil-N nitrosouréia) isolado do *Streptomyces achromogenes*, estimula a produção de radicais livres, o que leva à destruição e disjunção das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas (Negri, 2005; Lenzen, 2008). Sua administração em ratos adultos produz sinais clínicos severos da doença, necessitando da administração de insulina quando os ratos precisam sobreviver por longo período. Acrescenta-se, ainda, que alguns problemas podem se fazer presentes, como o aparecimento de insulinoma, tumores de fígado e rins (Ribeiro *et al.*, 2007; Lenzen, 2008).

A aloxana, um dos agentes diabetogênicos mais estudado e comumente utilizado no meio científico para a indução do diabetes experimental, provoca sinais semelhantes aos encontrados na síndrome diabética em humanos, tais como perda de peso corporal, glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, cetonúria, cetonemia, além de possuir pequena ação oncogênica e menor custo comparada a STZ (Lerco *et al.*, 2003; Cavalli *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007).

Essa droga possui citotoxicidade específica para as células β do pâncreas, causando danos aos vasos sanguíneos das ilhotas pancreáticas, provocando a morte das células e quadro clínico de *diabetes mellitus* tipo 1 (Lerco *et al.*, 2003; Santos Junior, 2006; Cavalli *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Lenzen, 2008).

O *diabetes mellitus* tipo 1, desenvolve-se quando há uma destruição, de mais de 90% das células secretoras de insulina das ilhotas pancreáticas, como resultado de uma agressão química, viral ou auto-imune (Zanoello *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2007). Esse processo destrutivo leva a severa depleção de insulina, sendo necessária à administração exógena do hormônio (Ribeiro *et al.*, 2007).

Segundo Federiuk *et al.* (2004) é possível determinar e classificar o tipo de diabetes que acomete o animal. O tipo 1 apresenta uma oscilação glicêmica marcante, acompanhada por uma tendência a cetose, já no tipo 2 a hiperglicemia é estável e cetonas são ausentes ou aparecem em concentrações muito baixas. Federiuk desenvolveu um estudo para confirmação do tipo de diabetes que acomete o animal, determinando a tendência para cetose. Os animais que apresentavam concentração de cetonas no sangue num valor $\geq 1,5$ mm e glicemia ≥ 250 mg/dL foram considerados diabéticos tipo 1, já os animais que apresentavam hiperglicemia estável com concentração de cetona normal ou $< 1,5$ mm foram considerados diabéticos tipo 2. Foi observado neste estudo que uma porcentagem maior de ratos desenvolveu o diabetes tipo 1, após a administração da aloxana.

Apesar do uso da AL ser um bom modelo experimental para o *diabetes mellitus*, alguns pesquisadores relatam dificuldades em conseguir induzir o diabetes (Federiuk *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2007), devido aos problemas apresentados pela droga, decorrentes de sua instabilidade química, metabolismo rápido e fatores como dieta e idade, o que torna quase impossível estabelecer uma relação clara entre as doses de aloxana e sua concentração efetiva no pâncreas (Negri, 2005).

METODOLOGIA

Com vistas ao alcance do objetivo proposto, optou-se por um levantamento bibliográfico de artigos sobre a temática indução do *diabetes mellitus* com substâncias citotóxicas, publicados no período de 1998 a 2014, nos indexadores Scielo, PubMed e Medline. Para tal, foram utilizados os seguintes descritores: “aloxana induzida”, “*diabetes mellitus*” e “droga citotóxica”. Para a seleção da amostra, estabeleceu-se como critério de inclusão: artigos que abordassem a temática do estudo submetidos na íntegra e dissertações escritos nos idiomas português e inglês não sendo utilizados capítulos de livro, reportagens e editoriais sem disponibilidade na íntegra online e que constavam em mais de uma base de dados. Dessa forma, após os critérios aplicados, a amostra do presente estudo resultou em vinte e três publicações. Os artigos selecionados foram analisados e estão sendo apresentados neste estudo.

Ação diabetogênica da Aloxana

Aloxana (2,4,5,6-Tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) foi primeiramente descrita por Brugnatelli em 1818 (Szkudelski, 2001) e em 1838 sintetizaram um derivado da pirimidina, que mais tarde foi chamado de aloxana (Negri, 2005; Lenzen, 2008). A insulinopenia resultante provocava um estado de *diabetes mellitus* experimental insulinodependente denominado diabetes aloxânico, (Szkudelski, 2001; Bongioiolo, 2008; Lenzen, 2008).

O mecanismo de ação da aloxana foi intensamente estudado, *in vitro* e *in vivo*, sendo muito bem caracterizado. Usando ilhotas isoladas e pâncreas perfundido de rato, alguns pesquisadores demonstraram que a droga provocava um aumento súbito na secreção de insulina, na presença ou ausência de glicose, logo após o tratamento com aloxana (Szkudelski, 2001).

A aloxana promove uma liberação maciça de insulina, presumivelmente em virtude do influxo de íons cálcio ao citosol das células β , no entanto, trata-se de uma liberação de curta duração, seguida por completa supressão da resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, em decorrência de necrose das células β (Szkudelski *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2001; Szkudelski, 2001). A ação da aloxana no pâncreas é precedida por sua rápida absorção e acúmulo nas células beta, atribuída a uma elevada taxa de captação da droga por essa célula, através do transportador de glicose GLUT2 presente no plasma

(Lima *et al.*, 2001; Szkudelski, 2001; Zanoello *et al.*, 2002; Cavalli *et al.*, 2007; Lenzen, 2008). Portanto os efeitos patológicos da aloxana podem ser atribuídos as suas propriedades químicas, a absorção seletiva celular e ao acúmulo da mesma (Lenzen, 2008).

Pelo método imunoistoquímico, observou-se que o pâncreas dos animais com *diabetes mellitus* induzido por AL, apresentaram redução de 70% da área da ilhota ocupada pelas células β , chegando até a ausência delas, enquanto houve aumento da área ocupada por células δ e não houve alteração no conteúdo de células produtoras de glucagon nas ilhotas (Lima *et al.*, 2001).

A AL é um composto químico muito instável com uma estrutura molecular semelhante à glicose, ambas hidrofílicas que não penetram na bicamada lipídica da membrana plasmática. Estruturalmente a molécula de aloxana é tão similar a molécula de glicose, de modo que o transportador de glicose GLUT2, presente no plasma da membrana da célula β , aceita a molécula da droga e a transporta para o citosol promovendo sua entrada para o interior da célula. A AL não inibe a função do transportador, e pode seletivamente entrar nas células β de forma irrestrita, portanto não é tóxica para as células produtoras de insulina que não expressam esse transportador (Lenzen, 2008).

A meia-vida da AL em pH neutro e 37°C é de cerca de 1,5 minutos, em seguida se decompõe espontaneamente em ácido aloxânico não diabetogênico em minutos, quando diluída em solução aquosa. Devido a isso, ela deve-se acumular rapidamente nas células β , e se apresenta ineficaz quando o fluxo de sangue para o pâncreas é interrompido durante os primeiros minutos após a injeção (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008).

Na presença de tióis intracelulares, especialmente Glutathione, a aloxana produz espécies reativas de oxigênio por meio de uma reação redox cíclica com seu produto de redução, o ácido dialúrico. A formação de espécies reativas de oxigênio é precedida pela redução da aloxana, que ocorre nas células β , na presença de diferentes agentes redutores. A droga exibe alta afinidade por compostos celulares contendo sulfidril (SH), Glutathione reduzida (tripeptídeo glutathione-GSH), cisteína e grupos sulfidril contidos em proteínas (incluindo enzimas contendo SH), sendo estes compostos mais susceptíveis a sua ação (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008). No entanto, a redução de outros agentes como os ditióis e o ácido ascórbico também são adequados agentes redutores e pode, portanto, contribuir para a redução da aloxana (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008).

A redução da AL em ácido dialúrico na célula exige a presença do tripeptídeo glutathione (GSH) para gerar a ciclagem redox, ácido dialúrico e glutathione oxidada. Quando mantida sob a forma oxidada, a AL não gera espécies reativas de oxigênio, assim, não é citotóxica. O produto de redução do ácido dialúrico também não é tóxico quando mantido sob a forma reduzida, entretanto, em contraste com aloxana, o ácido dialúrico auto-oxida

espontaneamente na presença de O₂, gerando espécies reativas de oxigênio citotóxicas na ausência de tióis (Lenzen, 2008).

Quando as concentrações de agentes redutores da AL são significativamente aumentadas na corrente sanguínea ou no espaço extracelular, através da injeção de um tiol, mais AL é reduzida extracelularmente de modo que, menos está disponível para a acumulação intracelular. No entanto, a capacidade de redução da AL, ciclo redox e a geração de espécies reativas de oxigênio na circulação, normalmente não são suficientes para evitar que a molécula de aloxana entre na célula β (Lenzen, 2008).

Um dos compostos contendo SH essencial para a secreção de insulina induzida pela glicose é a glicoquinase, enzima contendo grupo tiol mais sensível na célula β , sendo muito vulneráveis à ação da droga. A aloxana reage com dois grupos SH da glicoquinase, resultando na formação de uma ligação dissulfeto e inativação da enzima; entretanto a glicose pode proteger contra a inativação glicoquinase, dificultando o acesso da aloxana aos grupos SH da enzima (Szkudelski, 2001).

A inibição da glicoquinase reduz a oxidação da glicose e geração de ATP, suprimindo assim o sinal de ATP que desencadeia a secreção de insulina. A inibição da secreção de insulina após a exposição à aloxana é restrita pela indução de glicose e seu epímero, manose, os quais induzem a secreção de insulina através da interação com a glicoquinase. Tem sido argumentado que a glicose neutraliza a citotoxicidade da aloxana *in vitro* e *in vivo*, no entanto, essa capacidade não resulta apenas da proteção da glicoquinase. O efeito protetor da glicose contra a necrose e morte das células β pode ser devido à interação do açúcar com o transportador de glicose GLUT2, resultando numa captação limitada de AL (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008).

A ação tóxica da AL nas células β é iniciada pelos radicais livres formados na reação redox (Lenzen, 2008). Esses radicais hidroxila, afetam o metabolismo oxidativo da célula, com subsequente necrose seletiva das células β , e morte celular, o que provoca um estado de diabetes insulino dependente (Zanoello *et al.*, 2002; Lenzen, 2008). O fato da célula β demonstrar maior sensibilidade aos radicais peróxidos quando comparada a outros tecidos acontece devido à baixa atividade da enzima GSH-peroxidase, que catalisa a redução de peróxidos nessas células (Lima *et al.*, 2001; Szkudelski, 2001; Zanoello *et al.*, 2002; Cavalli *et al.*, 2007).

A captação similar de aloxana também ocorre no fígado, entretanto, o fígado e outros tecidos são mais resistentes às espécies reativas de oxigênio em comparação com as células β do pâncreas, e essa resistência protege contra a toxicidade da aloxana (Malaisse *et al.*, 1982; Szkudelski, 2001).

Foi proposto, que distúrbios na homeostase do cálcio intracelular constitui também um importante fator na ação diabetogênica da aloxana. Este conceito

foi confirmado *in vitro* e *in vivo* demonstrando que a aloxana eleva a concentração de Ca^{2+} citosólico livre nas células β pancreáticas. A droga induz um influxo de cálcio do líquido extracelular, resultante de sua capacidade em despolarizar as células β do pâncreas. A despolarização da membrana celular abre os canais de cálcio dependentes de voltagem e aumenta a entrada de cálcio nas células. A concentração exagerada deste íon contribui para a liberação suprafisiológica de insulina, juntamente com espécies reativas de oxigênio, provocando consequentemente, danos as células β pancreáticas (Szkudelski, 2001; Bongiorno, 2008).

Resultados de experimentos com antagonistas de canais de cálcio (verapamil e diltiazem) têm confirmado o importante papel do cálcio citosólico na ação citotóxica da aloxana. O pré-tratamento de ratos com verapamil impediu o aumento induzido pela aloxana na concentração de Ca^{2+} celular, e aboliu o efeito estimulante da droga sobre a liberação de insulina e também suprimiram a hiperglicemia e o aparecimento de diabetes induzido com AL em ratos. Em suma, a ação tóxica da AL em células β pancreáticas, é a soma de vários processos, tais como oxidação de grupos-SH essenciais, a inibição da glicocinase, a geração de radicais livres e os distúrbios na homeostase do cálcio intracelular (Szkudelski, 2001).

Múltiplos fatores são capazes de influenciar os efeitos diabetogênicos da droga, podendo não estabelecer o quadro de diabetes ou levar o animal à morte. Estar atento a estes fatores é de vital importância, uma vez que, o objetivo é a satisfação na indução do diabetes com maior número de animais diabéticos, menor índice de mortalidade e manutenção dos animais em boas condições.

A influência destes fatores envolve velocidade de infusão, dose, via de administração, dieta, tempo de jejum, peso do animal e interação com outros fármacos (Lerco *et al.*, 2003; Federiuk *et al.*, 2004). Além desses fatores, um tratamento adequado após a indução da doença também é de extrema importância, quando há a necessidade de manter os animais em boas condições durante um período significativo. Assim, muitas questões devem ser abordadas, incluindo a desidratação, desnutrição devido à descontrolada hiperglicemia e a hipoglicemia causada pela liberação maciça de insulina, logo após a aplicação da droga. Além disso, quando o diabetes é mal controlado, o animal torna-se fraco e propenso a infecção (Federiuk *et al.*, 2004).

Espécie, Doses e vias de administração

A AL pode ser utilizada para indução do *diabetes mellitus* em ratos, cães, coelhos, hamster, cobaias e até ovinos (Lerco *et al.*, 2003; Federiuk *et al.*, 2004). Porém os ratos têm sido amplamente utilizados por pesquisadores em todo o mundo, por apresentarem inúmeras vantagens em relação aos demais animais, são de fácil manuseio (alimentação, higiene, acomodação), possibilita trabalhar simultaneamente com vários grupos experimentais, sem

a ocupação de grandes espaços, tem elevada resistência à infecção e facilidade para remoção dos diversos órgãos estudados. Além desses fatos, apresentam semelhanças clínicas, laboratorial e histopatológica com o diabetes humano (Lerco *et al.*, 2003).

A AL exerce sua ação diabetogênica quando é administrada por via parentérica: intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose de AL necessária para induzir o diabetes depende da espécie animal, via de administração e estado nutricional (Szkudelski, 2001).

Quando administrada por via intravenosa, a dose mais frequentemente utilizada em ratos é de 42 a 65mg/kg, por meio da veia peniana ou veia da cauda (Carvalho *et al.*, 2003; Lerco *et al.*, 2003; Szkudelski, 2001; Cavalli *et al.*, 2007). No entanto, pesquisadores utilizam doses mais elevadas, de 120mg/kg pela mesma via (Federiuk *et al.*, 2004) ou pela via intraperitoneal (Maheshwari *et al.*, 2013) e doses de 150mg/Kg intraperitoneal (Abuelgassim, 2013; Baragob *et al.*, 2014).

A velocidade de infusão é importante, quando a via intravenosa é utilizada, doses efetivas de AL 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 usada via intravenosa. Szkudelski (2001) relatou ainda, que a dose intraperitoneal abaixo de 150mg/kg, pode ser insuficiente para induzir o diabetes em ratos, necessitando de uma segunda dose. Entretanto, Silva (2011) e Oliveira (2012) mostram em seus estudos, a eficácia da dose de 120mg/Kg pela via intraperitoneal em ratas.

No coelho, doses muito elevadas devem ser ministradas pela via intraperitoneal ou subcutânea, para que se atinja o mesmo efeito diabetogênico (Lerco *et al.*, 2003).

Embora maior parte dos pesquisadores tenha utilizado a via intravenosa na maioria das espécies animais, onde os efeitos da aloxana são mais evidentes, Federiuk *et al.* (2004) em seu estudo utilizaram vários protocolos para indução do diabetes, e observaram que 70% dos ratos que receberam uma dose de 120mg/kg de AL intravenosa morreram nos primeiros dois dias após a indução, apesar de adotarem 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, o autor abandona esta via de administração e não a recomenda.

Por outro lado, os mesmos autores relatam uma satisfação na indução do diabetes, quando utilizada a dose de 200mg/kg de AL por via intraperitoneal em um grupo de 10 animais, visto que apenas um animal morreu durante a primeira semana, e o restante dos animais permaneceram vivos por mais de 200 dias. É importante observar que a dose foi ajustada de 120 para 200mg/kg, com a troca da via intravenosa pela intraperitoneal.

Oliveira (2012) relata que uma dose de 200mg/Kg via intraperitoneal causa alta porcentagem de animais diabéticos grave, no entanto, também induz a um maior índice de óbito comparado a doses menores de 80 e 120mg/Kg.

Dieta e jejum

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

O jejum promove maior sensibilidade à ação diabetogênica da droga, e tem importância significativa na resposta dos animais à AL. Segundo Lerco *et al.* (2003), 95% dos ratos tratados com AL, 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 realizado. Entretanto, estes mesmos animais, refratários a doses subsequentes, tornam-se diabéticos após 60 horas de jejum, com uma dose padrão de aloxana. O tempo de jejum pode variar de 12, 24, 48 a 60 horas, como apontam alguns estudos, 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).

Oliveira (2012) mostra resultados satisfatórios na indução com jejum de 24 horas e não recomenda maior tempo por questões éticas.

Substâncias que interferem na ação diabetogênica da aloxana

Algumas substâncias agem direta ou indiretamente sobre os mecanismos de ação da aloxana. Os barbitúricos tornam os animais mais sensíveis aos efeitos da droga. Por outro lado, algumas substâncias, tais como o ácido nicotínico e o ácido dicarboxílico piridínico, podem proteger o animal desses danos, se administrados simultaneamente com a droga (Lerco *et al.*, 2003). O pré-tratamento das ilhotas com a picolinamida, benzamida, teofilina e nicotinamida, podem parcialmente restringir a toxicidade da aloxana (Szkudelski, 2001).

Gestão de um tratamento pós-indução

Logo após a administração da AL, a gestão de um acompanhamento intensivo é necessário para evitar um alto índice de mortalidade, ou seja, aumentar a sobrevivência dos animais, uma das principais prioridades em diversos experimentos. Tal gestão inclui o monitoramento frequente da glicose sanguínea, medição de cetona e tratamento precoce com insulina se a concentração de ambos estiver alta, além de medidas preventivas a desidratação, desnutrição e hipoglicemia.

A AL é conhecida por causar hiperglicemia, entretanto Federiuk *et al.* (2004) relatam que nas primeiras 48 horas após a sua administração, pode levar a uma acentuada hipoglicemia, devido a liberação maciça de insulina pelas células β danificadas. Medidas cautelosas são necessárias para evitar este desfecho potencialmente fatal. Por esta razão, monitorar a concentração sanguínea de glicose com frequência (duas a três vezes ao dia) nas primeiras 48 horas pós-indução ou até mesmo na primeira semana, e permitir aos animais acesso ilimitado a uma fonte hídrica contendo açúcar, são medidas que fazem parte do tratamento (Mazzanti *et al.*, 2003; Federiuk *et al.*, 2004; Cavalli *et al.*, 2007; Silva, 2011; Oliveira, 2012).

Federiuk *et al.* (2004), testaram várias opções de tratamento oral a base de carboidratos de ação rápida em ratos que apresentavam hipoglicemia. Segundo os pesquisadores, para episódios de hipoglicemia leve a moderada (glicemia entre 50 e 75mg/dL) é dado aos animais uma solução altamente calórica, como melaço e xarope de milho, palatável aos roedores ou solução de glicose 25% via oral por gavagem (Federiuk *et al.*, 2004).

Para animais inconscientes o tratamento oral não é recomendado, pois poderia levar à aspiração traqueal e pneumonia. Para animais letárgicos com hipoglicemia (<50mg/dL) é administrada dextrose 10% por via subcutânea. Nos casos de coma, animais em estado de estupor, hipotermia ou com hipoglicemia acentuada (<40mg/dL), recomenda-se dar glicose 10% por via intravenosa. Se uma veia não está prontamente disponível para o tratamento, uma alternativa aceitável é administrar glucagon (0,125-0,25mg) via subcutânea ou via intraperitoneal. Para o tratamento da hipotermia, os animais podem ser mantidos em manta térmica ou caixa aquecida, até adequada normotermia (Federiuk *et al.*, 2004).

Nos casos de glicose sanguínea >200mg/dL e cetona >1,5mm recomenda-se a insulino terapia (Federiuk *et al.*, 2004).

Pode ser administrada uma combinação de insulinas de ação curta (insulina lis-pro: Humalog®, ou insulina aspart: NovoRapid®), e de ação prolongada (insulina glargina: Lantus®), prática frequentemente utilizada em seres humanos. No entanto, é importante salientar que, os padrões de alimentação dos seres humanos são diferentes dos ratos. Humanos consomem um pequeno número de refeições de alto teor calórico diário, que pode ser precedida pela administração de insulina de curta duração, projetado para combinar com o aumento da glicemia induzida pela refeição. Os ratos, por outro lado, tem tendência a

uma dieta imprevisível, e em alguns casos se alimentam principalmente à noite. Devido a estes hábitos alimentares, a insulina de ação curta tende a causar hipoglicemia frequente, devido a isso não é recomendada sua utilização, exceto para os quadros de aumento acentuado nos níveis glicêmicos, utilizando-a com cautela e moderação (Federiuk *et al.*, 2004).

Assim, Federiuk *et al.* (2004), recomendam o uso de um recente advento na terapia insulínica, a insulina glargina (Lantus®), uma vez que permite dosagem menos freqüente, o que era tipicamente necessário com uso das insulinas intermediárias, tais como NPH. Em seu experimento, os ratos recebiam uma única dose de insulina glargina todas as manhãs, e quando necessário, uma segunda dose à tarde só nos casos de hiperglicemia acentuada (Tabela 1). Raramente foi utilizada insulina de ação rápida. Nos casos em que a utilização de uma combinação de insulina de ação prolongada e ação curta é conveniente, recomenda-se o uso de duas seringas, pois a glargina deve ser mantida em pH ácido, e quando misturada com outras insulinas o pH tende a aumentar, e isso deve ser evitada.

Tabela 1. Esquema de dosagem de insulina recomendada para ratos Sprague-Dawley com *Diabetes mellitus* tipo 1 (administrada por via subcutânea).

	Dia		Noite	
	*Lenta (U/Kg)	**Rápida (U/Kg)	*Lenta (U/Kg)	**Rápida (U/Kg)
< 80		0	0	0
80-150	0,5	0	0	0
151-200	1	0	0	0
201-250	1,5	0	1	0
251-300	2	0	1,5	0
301-350	2,5	0	2	0
351-400	3	0	2,5	0
401-450	3,5	0	3	0
451-500	4	0,5-1,0	3,5	0
> 500	4,5	1,5-2,0	4	1,0

* Insulina glargina (Lantus®).

** Insulina lis-pro (Humalog®) ou insulina aspart (NovoRapid®). Nota: Verificar a concentração de cetonas, se a concentração de glicose sanguínea (BG) for > 350mg/dL. Nota: Deve-se administrar a glargina e a insulina de ação rápida em seringas diferentes. Recomenda-se que a insulina de ação rápida seja usada com cautela e moderação.

Apesar do esquema de doses de insulina elaborada por Federiuk *et al.* (2004) mostrada na Tabela 1, é importante observar que a dose deve ser individualizada e ajustada frequentemente com base na resposta de cada animal (Federiuk *et al.*, 2004).

É importante mencionar que hiperglicemia aguda, marcada por valores de glicose sanguínea > 400mg/dL, é muitas vezes acompanhada por letargia, e desidratação devido à glicosúria osmótica. Nos casos de desidratação

confirmada, à administração de uma solução salina por via subcutânea é recomendada, e em casos mais leves pode ser administrada água ou solução salina por gavagem (Federiuk *et al.*, 2004).

Tomadas todas as medidas necessárias para um controle glicêmico estável, a concentração de glicose sanguínea passa a ser monitorada duas vezes ao dia. Em última análise, com o *diabetes mellitus* consistentemente bem controlado, essa freqüência pode ser reduzida a uma vez por dia.

Oliveira (2012) monitorou ratos diabéticos induzidos com AL na primeira semana, uma vez ao dia e utilizou a insulina glargina (Lantus®) no tratamento dos animais hiperglicêmicos. O monitoramento consistiu na aferição da glicemia e controle do estado hiper e hipoglicêmico, além do controle da desidratação. Com o monitoramento houve uma incidência de 0% de óbito nos dois primeiros dias e ao final de uma semana 78,3% de animais estavam diabéticos e somente 3,3% morreram, níveis bem superiores aos encontrados por Silva (2011) de 25% de diabéticos e 15% de óbito ao final de uma semana, onde o monitoramento não foi realizado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A indução do diabetes mellitus com aloxana pode ser utilizada de forma segura na experimentação animal em ratos, no entanto um monitoramento intensivo da temperatura corporal, hipo e hiperglicemia na primeira semana após indução é de suma importância para se conseguir um maior número de animais diabéticos com menor incidência de óbito.

ABSTRACT

Diabetes mellitus experimental by alloxan in Wistar rats

The induction of diabetes mellitus with cytotoxic substances such as Alloxan in experimental animals has been widely employed for the purpose of developing studies related to the treatment of this pathology, but some researchers point out difficulties in inducing and maintaining animals in good general health by long periods. The aim of the study was to review induction protocols in the literature and contribute to results of these authors own experience in this procedure, since the wide variety of protocols found in the literature complicates the choice of the researcher. The study results indicated that the greatest difficulties are related to the induction dose, route of administration, duration of fasting pre - induction and post - induction monitoring of animals. We conclude that intensive monitoring of the animals in the first week of induction, the hypoglycemia and hyperglycemia results in greater number of diabetic animals and reduction in the rate of deaths, making the procedure more efficient experimental induction. Keywords: Alloxan. *Diabetes mellitus*. *Wistar* rat.

REFERÊNCIAS

- Abuelgassim AO. Effect of Acacia nilotica fruit extract on serum glucose and lipid concentrations in alloxan-induced diabetic rats. Pak J Biol Sci. 2013;16(21):1398-1402.
- Baragob AE, Almalki WH, Shahed I, Bakhdhar FA, Bafhaid HS Edden OM. The hypoglycemic effect of the aqueous extract of the fruits of *Balanites aegyptica* in alloxan-induced diabetic rats. Pharmacognosy. 2014;6(1):1-5.
- Bongiolo AM. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) sobre a hiperglicemia e dislipidemia de ratos diabéticos induzidos por aloxana. [Dissertação]. Criciúma: Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2008.
- Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreira LM. Experimental model of induction of *Diabetes mellitus* in rats. Acta Cir Bras. 2003;18(n.espe):60-4.
- Cavalli VLLO, Sordi C, Tonini K, Grando A, Muneron T, Guigi A, Roman Júnior WA. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill). Rev Bras Farmacogn. 2007;17(1):64-70.
- Cazarolli LH. Estudo da atividade de flavonóides e de complexos de vanádio na glicemia de ratos diabéticos induzidos com aloxana. [Dissertação]. Florianópolis: Mestrado em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis; 2004.
- Delfino VDA, Figueiredo JF, Matsuo T, Favero ME, Matni AM, Mocelin A. *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. J Bras Nefrol. 2002;24(1):31-6.
- Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. Induction of type-1 *diabetes mellitus* in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. Comp Med. 2004;54(3):252-7.
- Kirsten VR. Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional. [Dissertação]. Porto Alegre: Mestrado em Medicina e Ciência da Saúde, Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008;51(2):216-26.
- Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini SA, Padovani CR. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido por Aloxana em ratos. Estudo clínico e Laboratorial. Acta Cir Bras. 2003;18(2):132-42.
- Lima MA, Lima LMB, Rita DPC, Navarro FC, Tatsukawa RS, Pereira GA, Reis LC, Abreu MEA, Borges MF. Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. Medicina (Ribeirão Preto). 2001;34(1):308-14.
- Maheshwari P, Baburao B, Pradeep KCH, Rama NRA. Antidiabetic activity of methanolic extract of *Hiptage bengalensis* leaves in alloxan induced diabetic models. Pak J Biol sci. 2013;16(17):844-51.
- Mazzanti CM, Schossler DR, Filappi A, Prestes D, Balz D, Miron V, Morsch A, Schetinger MRC, Morsch VM, Cecim M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. Cienc Rural. 2003;33(6):1061-5.
- Negri G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. Rev Bras Cienc Farm. 2005;41(2):121-42.
- Oliveira IVG. Monitoramento da indução do *Diabetes mellitus* em ratos *Wistar* com aloxana em diferentes doses. [Dissertação]. Presidente Prudente: Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista; 2012.
- Ribeiro C, Oliveira CAM, Mello MAR. Exercício e prevenção do *diabetes mellitus*: importância do modelo experimental utilizando ratos. Motriz. 2007;13(1):72-7.
- Santos Júnior ER. O efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina em ratos *Wistar* na fase pré-gestacional e suas conseqüências no concepto. [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas; 2006.
- Silva VD. Indução experimental do *Diabetes mellitus* em ratos *Wistar* submetidos à injeção intraperitoneal de aloxana em diferentes doses. [Dissertação]. Presidente Prudente: Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista; 2011.
- Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz M. Alloxan *in vivo* does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. Physiol Res. 1998;47(5):343-6.
- Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res. 2001;50(6):536-46.
- Vasconcelos FAO, Reis LL, Bonvent JJ. Análise da administração de insulina por sonoforese e por microagulhas sobre a glicemia em ratos diabéticos induzidos por aloxano. In: 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica; 2008; Salvador, Bahia; 2008.
- Zanoello AM, Mazzanti CM, Gindri JK, Filappi A, Prestes D, Cecim M. Efeito Protetor do *Syzygium cumini* contra *Diabetes mellitus* induzido por Aloxano em Ratos. Acta Farm Bonaer. 2002;21(1):31-6.

Recebido em 27 de novembro de 2013

Aceito em 26 de fevereiro de 2014

