

EFEITOS EM CURTO PRAZO DA APLICAÇÃO DE ALOXANA PARA INDUÇÃO DE DIABETES EM RATOS WISTAR

EFFECTS IN SHORT-TERM OF ALLOXAN APPLICATION TO DIABETES INDUCTION IN WISTAR RATS

José Alexandre Curiacos de Almeida LEME¹, Alexandre CASTELLAR², Rafael Neodini REMEDIO², Rodrigo Avelaira BARBOSA², Leandro Pereira de MOURA³, Rodrigo Augusto DALIA⁴, Ricardo José GOMES⁵, Flávio Henrique CAETANO⁶, Maria Alice Rostom de MELLO⁷; Eliete LUCIANO⁷

1. Doutorando em Ciências da Motricidade, Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil. zecuriacos@terra.com.br ;
2. Mestrando em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia - UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil;
3. Graduando em Educação Física, Departamento de Educação Física - UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil.
4. Mestrando em Ciências da Motricidade, Departamento de Educação Física - UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil.;
5. Professor adjunto, Universidade Federal de São Paulo (Baixada Santista), Santos, São Paulo, Brasil;
6. Professor adjunto, Departamento de Ciências Biológicas - UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil;
7. Professor adjunto, Departamento de Educação Física - UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo verificar a ação da aloxana em parâmetros metabólicos e do sistema imune 24 e 192 horas após sua aplicação em ratos Wistar. Para isso, oito ratos foram mantidos em jejum de 12 horas e receberam aloxana monoidratada, Sigma (32 mg/kg de peso corporal) via endovenosa. Foram registrados os valores de massa corporal, ingestão hídrica e alimentar e realizada a contagem de leucócitos totais previamente, 24 e 192 horas após a aplicação da aloxana. As análises de glicemia e trigliceridemia foram realizadas previamente e 192 horas após a aplicação da aloxana. Após 24 horas, a aplicação da aloxana causou aumento da ingestão hídrica e redução da massa corporal, ingestão alimentar e contagem de leucócitos. Na avaliação realizada 192 horas após a aplicação da aloxana houve recuperação da ingestão alimentar e contagem de leucócitos. Por outro lado, neste período houve aumento da glicemia e ingestão hídrica além de redução da massa corporal. Isso indica que parte dos sinais de diabetes causados pela aloxana manifesta-se em curto prazo da administração da droga.

PALAVRAS-CHAVE: Aloxana. Diabetes. Metabolismo. Sistema Imune.

INTRODUÇÃO

As diretrizes para tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus, recentemente lançadas pela Sociedade Brasileira de Diabetes, apontam dados epidemiológicos que demonstram aumento de 5 a 6 vezes na população diabética nos últimos 17 anos, estimando-se cerca de 8 milhões de pessoas portadoras de diabetes no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

Estes dados reforçam a importância de estudos básicos que contribuam para prevenção e tratamento do Diabetes Mellitus. Dentre os modelos experimentais de diabetes que contribuem para estes avanços, encontra-se a aplicação de aloxana cuja injeção intravenosa destrói seletivamente as células β pancreáticas, sendo captadas rapidamente pelos transportadores de glicose (GLUT2) e causando formação de radicais livres após uma série de reações que culminam com a lesão celular (MALAISSE et al., 1982; LENZEN, 2008).

A aloxana proporciona discreta redução glicêmica cerca de 30 minutos após sua injeção,

como resultado de estimulação da secreção de insulina e conseqüente aumento da insulinemia. Contudo, após 60 minutos da injeção ocorre hiperglicemia decorrente de decréscimo da insulinemia persistindo nas próximas 4 horas, ocorrendo nessa fase as primeiras alterações morfológicas das células β , como dilatação do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias, além de diminuição do complexo de Golgi, dos grânulos e do conteúdo de insulina. No período de 4 a 8 horas ocorre grande aumento da insulinemia, como conseqüência de ruptura da membrana celular. Posterior e permanentemente segue a hiperglicemia, que ocorre de forma crescente entre 9 a 144 horas, estabilizando-se em seguida. Esta fase é alcançada com a completa desgranulação e perda de integridade das células beta, ocorrendo aumento da presença de macrófagos no pâncreas (BOQUIST, 1977; SZKUDELKI, 2001; LENZEN, 2008).

Estas breves alterações são de fundamental importância para o desenvolvimento do quadro diabético no animal que, em longo prazo, incluem redução no peso, polifagia, polidipsia e alterações no sistema imunológico. Desta forma, o objetivo

deste estudo foi verificar as alterações no comportamento alimentar e nos leucócitos circulantes 24 e 192 horas após a aplicação da aloxana em ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, foram utilizados 8 ratos machos (120 dias) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu e mantidos no biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Rio Claro, SP, à temperatura ambiente de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas de claro/escuro, em gaiolas coletivas de polietileno (4 ratos por gaiola), alimentados com ração balanceada Purina e água “*ad libitum*”.

Delineamento experimental

Foram realizados contagem total de leucócitos, pesagem, registro da ingestão hídrica e alimentar na véspera e após 24 e 192 horas da aplicação da aloxana. Análises de glicemia e trigliceridemia foram realizadas na véspera e 192 horas após a aplicação da aloxana

Aplicação da aloxana

Os ratos foram mantidos em jejum de 12 horas, visto que em jejum são mais sensíveis à aloxana (BOSQUIST, 1977) e, em seguida, receberam aloxana monohidratada Sigma (32 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5, via endovenosa pela veia peniana dorsal. Após aplicação da aloxana os animais receberam solução glicosada (30%) via oral durante 24 horas para evitar as complicações da hipoglicemia aloxânica (LENZEN, 2008).

Análises

Todas as análises foram realizadas sem jejum prévio. Amostras de sangue foram coletadas

através de pequeno corte na extremidade da cauda dos animais para determinação de:

- Glicose: A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase (HENRY et al., 1974).

- Triglicerídeos: A concentração de triglicerídeos séricos foi determinada através de kit comercial (Laborlab® CAT2700) pelo método enzimático lido em espectrofotômetro.

- Leucócitos totais: Após coleta com pipeta de Thoma para diluição de glóbulos brancos, esta foi completada e diluída em solução de Turk. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado, gotejado em câmara de Neubauer; a contagem de leucócitos foi então feita em microscópio Zeiss (LIMA et al., 2001).

Os resultados que apresentaram homogeneidade e normalidade foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) *one way*, com aplicação do teste “*post-hoc*” de Bonferroni ou teste t de *student*, com nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Nos casos das variáveis que não apresentaram normalidade ou homogeneidade foi empregado o teste não paramétrico *Fredman test*.

RESULTADOS

A aplicação da aloxana causou aumento da glicemia no oitavo dia após a aplicação da droga. A trigliceridemia, contudo, não foi alterada neste mesmo período experimental (Tabela 1).

Na Tabela 2, pode-se observar que o peso corporal dos animais foi reduzido quando medida 24 horas após a aplicação e manteve-se reduzido no registro realizado no oitavo dia após a aplicação. Com relação à ingestão alimentar, houve redução na observação realizada no primeiro dia após a aplicação da aloxana, mas no oitavo dia este parâmetro foi restabelecido. Quanto à ingestão hídrica, houve um aumento inicial 24 horas após a aplicação da aloxana e um aumento adicional no oitavo dia.

Tabela 1. Glicemia (mg/dL) e trigliceridemia (mg/dL) pré e 192 horas após a aplicação da aloxana nos animais.

| Parâmetros | Grupos | |
|-----------------|---------------|-------------------------|
| | Pré-aplicação | Pós-aplicação |
| Glicemia | 130,5±19,8 | 256,1±51,9 ^a |
| Trigliceridemia | 140,5±50,7 | 194,1±42,7 |

Valores expressos como média ± desvio padrão, teste t de *student* ($p < 0,05$). a ≠ Pré-aplicação.

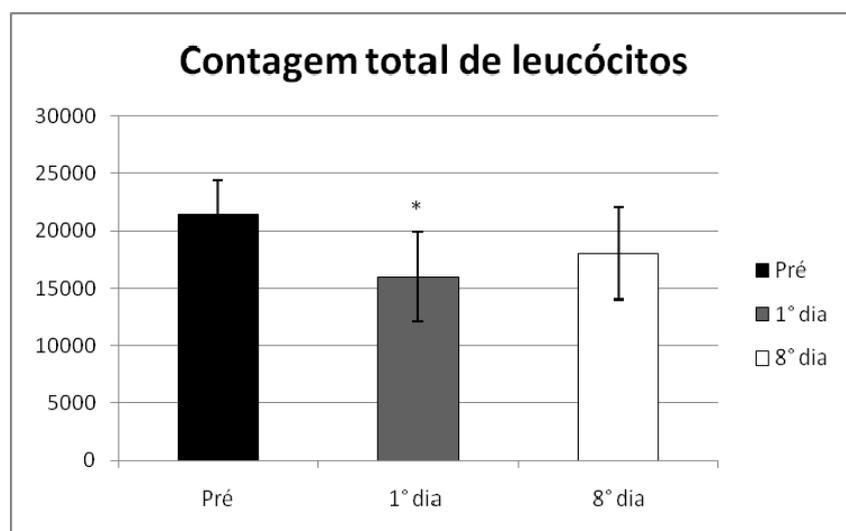
Tabela 2. Peso corporal (g), ingestão alimentar (g/kg/dia) e ingestão hídrica (ml/kg/dia) pré, 24 e 192 horas após a aplicação da aloxana nos animais.

| Parâmetros | Grupos | | |
|--------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|
| | Pré-aplicação | 1° dia pós-aplicação | 8° dia pós-aplicação |
| Peso corporal | 383,7±17,2 | 335,3±18,8 ^a | 351,9±16,8 ^a |
| Ingestão alimentar | 29,3±3 | 10,3±1,5 ^a | 28,3±3,6 ^b |
| Ingestão Hídrica | 52,5±10,4 | 118±8 ^a | 160±14,7 ^{a,b} |

Valores expressos como média ± desvio padrão, teste de Fredman ($p < 0,05$). a ≠ Pré-aplicação; b ≠ 1° dia após-aplicação

Na Figura 1 pode-se observar que houve redução na contagem total de leucócitos após 24 horas da

aplicação, que retornou aos valores basais decorridas 192 horas.



Valores expressos como média ± desvio padrão, ANOVA one-way ($p < 0,05$). *≠ Pré-aplicação

Figura 1. Contagem total de leucócitos dos animais pré, 24 e 192 horas após a aplicação da aloxana.

DISCUSSÃO

O aumento da incidência de diabetes é uma das maiores preocupações atuais em saúde pública, sendo projetado em cálculos epidemiológicos que o número de diabéticos chegue a aproximadamente 330 milhões no ano de 2030, caso não haja intervenções (WILD et al., 2004). Desta forma tornam-se imprescindíveis estudos envolvendo modelos experimentais de Diabetes Mellitus, que forneçam informações que possam ser úteis no desenvolvimento de procedimentos mais eficazes na prevenção e no tratamento da doença. O modelo diabético aloxânico é reconhecido pela similaridade ao quadro diabético insulino-dependente (LENZEN, 2008). O presente estudo verificou os efeitos da aplicação de aloxana 24 e 192 horas após sua injeção em ratos.

A análise da glicemia foi realizada como forma de controle da eficiência aloxânica na

destruição das células β . Estudos clássicos demonstraram o aumento glicêmico após a aplicação de aloxana (KAPLAN et al., 1945; LENZEN, 2008). Desta forma, o presente estudo mostrou aumento da glicemia 192 horas após aplicação, demonstrando haver lesão celular e perda da massa das células β . Contudo, as primeiras 24 horas são de fundamental importância para as alterações encontradas no quadro diabético aloxânico. Isto porque a glicemia sofre bruscas mudanças durante a ação da aloxana, um processo tetrafásico, que compreende inicialmente diminuição da glicose sérica por cerca de 30 minutos, causada por estímulo da secreção insulínica. Posteriormente ocorre retenção da insulina nas células β e conseqüente aumento da glicemia, que dura até 4 horas após a aplicação da droga. A dilatação do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias e a diminuição do complexo de Golgi e dos grânulos são as primeiras

alterações morfológicas nas células β . A fase seguinte é a ruptura da membrana celular induzida pela aloxana, que causa um grande aumento da insulinemia. Nesta fase, é necessário que o animal ingira glicose, para evitar hipoglicemia severa. A quarta e última fase é a encontrada no animal de forma permanente com completa lise das células e redução da massa de células β , hipoinsulinemia e hiperglicemia (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008).

Apesar da alteração glicêmica, não foi encontrada alteração na trigliceridemia no oitavo dia. Estudo prévio realizado em nossos laboratórios envolvendo um período maior de implantação do quadro diabético demonstrou hipertrigliceridemia em animais diabéticos aloxânicos (LEME et al., 2007). O quadro diabético em humanos e animais apresenta aumento de trigliceridemia junto à hiperglicemia, ambos gerados pela hipoinsulinemia (SIRAJ et al., 2006; O'BRAIAN et al., 1998), com progressiva elevação nos triglicérides séricos com o avanço da doença (ALTURA et al., 1981). A diminuição da atividade catalítica da enzima lipase lipoprotéica (LPL) no tecido adiposo é apontada como principal responsável por este aumento de triglicérides séricos (SIMSOLO et al., 1992). Contudo, no período de 192 horas, o presente estudo demonstrou ausência de alterações significativas neste parâmetro.

A redução do peso corporal aconteceu no primeiro dia após aplicação da aloxana e manteve-se após 192 horas da aplicação. Concomitante à redução do peso corporal, houve redução de ingestão alimentar no primeiro dia. A ingestão de água foi aumentada no primeiro dia e apresentou-se ainda maior 192 horas após a injeção, diferentemente da ingestão de alimentos que voltou aos valores basais no oitavo dia.

A redução do peso corporal no primeiro dia pode estar diretamente relacionada à redução de ingestão alimentar após a aplicação de aloxana, visto que a evolução da doença causa perda acentuada de peso. Posto que a insulina tenha ação anorexigênica, modulando o controle cerebral da fome, a destruição das células beta causa aumento transiente da insulinemia, o que poderia contribuir para redução da ingestão alimentar e consequentemente da massa corporal nas primeiras 24 horas após a administração da aloxana

(SCHWARTS, 2000). A manutenção do peso reduzido no oitavo dia pode estar relacionada ao quadro diabético induzido pela aloxana.

A polidipsia, característica clínica no quadro diabético, apareceu no primeiro dia após a aplicação da aloxana e manteve-se após 192 horas. A polidipsia está relacionada à hiperglicemia e à poliúria, a qual resulta em perda não apenas de glicose (glicosúria), mas também de água livre e eletrólitos (ALBERTINI et al., 1998).

A contagem total de leucócitos demonstrou redução destes no primeiro dia após a aplicação, com posterior retorno aos valores basais. Poucos estudos analisaram os efeitos imediatos da aloxana sobre os leucócitos. Após a lise das células β , sabe-se que ocorre aumento da presença de macrófagos no pâncreas (LENZEN, 2008). Dados referentes aos efeitos da aloxana apontam que as alterações nos animais injetados referem-se a efeitos crônicos da mesma. Com relação a esse aspecto, Oliveira e colaboradores (2002) demonstraram não haver aumento da contagem total de leucócitos após seis semanas de período experimental, mas relataram redução do peso do timo, órgão importante para manutenção do sistema imune. Em seus estudos, Pavelic e colaboradores (1977) demonstraram que este prejuízo no sistema imunológico de ratos diabéticos aloxânicos foi revertido após aplicação de insulina.

Desta forma, o presente estudo demonstrou que no período de 24 horas após a aplicação de aloxana, ratos Wistar sofrem redução do peso e ingestão alimentar, concomitante a aumento da ingestão hídrica e redução do número de leucócitos circulantes. Após 192 horas, a aplicação da aloxana causou aumento da glicemia, recuperação da ingestão alimentar e do número de leucócitos, bem como redução da ingestão hídrica e redução do peso comparado ao primeiro dia após a aplicação da droga. Isso indica que parte dos sinais de diabetes causados pela aloxana manifesta-se em curto prazo após administração da droga.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio e José Roberto Silva. Este trabalho foi suportado pelo CNPq.

ABSTRACT: The present study aimed to verify action of alloxan in metabolic and immune parameters after 24 and 192 hours of the injection in Wistar rats. Thus, eight rats were fasted and received monohydrated alloxan Sigma (32 mg/kg body weight) via endovenous. Glycemia and triglyceridemia analyzes were performed before and 192 hours after alloxan application. After 24 hours, alloxan application increased water intake and decreased body mass, food intake and

leucocytes counting. 192 hours after alloxan application, there was a recuperation in food intake and leucocytes counting. On the other hand, in this period there was an increase of glycemia and water intake and reduction of body mass. These results indicate that some of diabetic signs caused by alloxan occur in short-term after drug administration.

KEYWORDS: Alloxan. Diabetes. Metabolism. Immune System.

REFERÊNCIAS

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2006.

MALAISSÉ, W. J., MALAISSÉ-LAGAE, F., SENER, A., PIPELEERS, D. G. [Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell.](#) **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington v. 79, n. 3, p. 927-30, 1982.

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

BOQUIST, L. [The endocrine pancreas in early alloxan diabetes. Including study of the alloxan inhibitory effect of feeding and some hexoses.](#) **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 219-29, 1977.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, Prague, n. 50, p. 536-546, 2001.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. *Clinical chemistry, principles and techniques*, 2nd ed. New York: Harper and Row Publishers Inc 1974.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. *Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnicas e Interpretação*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, New York, v. 27, p. 1047–1053, 2004.

KAPLAN, N. O.; FRANKS, M.; FRIEDGOOD, C. E. Metabolism in diabetic coma produced by alloxan. **Science**, Nova York, v. 102, n. 2653, p. 447-449, 1945.

LEME, J. A. C. A.; GOMES, R. J.; MELLO, M. A.; LUCIANO, E. [Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats.](#) **Growth Factors**, Chur, v. 25, n. 1, p. 9-14, 2007.

SIRAJ, E. S.; SEYOUM, B.; SAENZ, C.; ABDULKADIR, J. [Lipid and lipoprotein profiles in Ethiopian patients with diabetes mellitus.](#) **Metabolism: Clinical and Experimental**, New York, v. 55, n. 6, p. 706-10, 2006.

O'BRIEN, T.; NGUYEN, T. T.; ZIMMERMAN, B. R. Hyperlipidemia and diabetes mellitus. **Mayo Clinic proceedings**, Rochester, v. 73, n. 10, p. 129-133, 1998.

ALTURA, B. M.; LUM, G.; TURLAPATY, P. D.; ALTURA, B. T. Sequential changes in serum glucose, triglycerides and cholesterol in aging of normal and alloxan-diabetic rats. *Experientia*, Basel, v. 15, p. 224-226, 1981.

SIMSOLO, R. B.; ONG, J. M.; SAFFARI, B.; KERN, P. A. Effect of improved diabetes control on the expression of lipoprotein lipase in human adipose tissue. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 33, p. 89-95, 1992.

SCHWARTZ, M. V. Staying slim with insulin in mind. **Science**, New York, v. 289, p. 2066-7, 2000.

ALBERTINI, J. P.; VALENSI, P., LORMEAU, B., AUROUSSEAU, M. H.; FERRIÈRE, F.; ATTALI, J. R.; GATTEGNO, L. Elevated concentrations of soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM. Effect of intensive insulin treatment. **Diabetes Care**, New York, v. 21, n. 6, p. 1008-13, 1998.

OLIVEIRA, C. A. M.; ROGATTO, G. P.; LUCIANO E. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 8, n. 6, p. 219-224, 2002.

PAVELIĆ, K; SLIJEPCEVIĆ, M.; PAVELIĆ, J. Recovery of immune system in diabetic mice after treatment with insulin. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, v. 10, n.5, p.381-6, 1978