

CARACTERÍSTICAS DO *DIABETES MELLITUS* INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE ALOXANA EM RATOS

CHARACTERISTICS OF DIABETES MELLITUS INDUCED BY NEONATAL ADMINISTRATION OF ALLOXAN IN RATS

Camila Aparecida Machado de OLIVEIRA¹; Eliete LUCIANO¹; Maria Alice Roston de MELLO¹

RESUMO: Com o objetivo de analisar as características do diabetes provocado pela administração neonatal de aloxana, ratos recém nascidos (2 e 4 dias), de ambos os sexos, receberam aloxana (200 mg/Kg p.c.-i.p.). Como controles foram utilizados ratos injetados com veículo (tampão citrato). Aos 28, 60 e 90 dias de idade os animais foram avaliados quanto a: glicemia de jejum, glicemia pós-prandial e tolerância à glicose oral (TTGo). Os resultados mostraram maior glicemia no TTGo ($p>0,05$) até os 60 dias, regredindo aos 90 dias em ambos os sexos. Aos 90 dias os animais foram sacrificados por decapitação. Ficou evidente que os machos que receberam a droga aos dois dias foram os mais prejudicados, mostrando os menores teores de insulina e razão proteína/DNA pancreáticos e os níveis mais elevados de A.G.L. sanguíneo ($p<0,05$). Concluindo, embora a intolerância à glicose seja transitória, a recuperação dos animais é incompleta, pois algumas alterações orgânicas persistem.

UNITERMOS: Aloxana, Diabetes, Modelo Neonatal de Diabetes

INTRODUÇÃO

Diabetes quimicamente induzido em animais tem sido amplamente empregado como modelo experimental para os estudos das complicações causadas pelo diabetes. A streptozotocina (STZ) é a droga mais popular para a indução do diabetes em ratos (BALAMURUGAN et al., 2003). A administração de STZ a ratos adultos produz diabetes severo que, muitas vezes, necessita de administração de insulina quando os ratos precisam sobreviver por longo período (RERUP, 1970). Por outro lado, ratos recém nascidos tratados com STZ desenvolvem hiperglicemia leve a moderada na idade adulta, assemelhando-se ao diabetes mellitus não insulino dependente, ou NIDDM (CUMAN et al., 2001; MURALI; GOYAL, 2001; PORTHA et al., 1989). Nesse modelo foi demonstrado que a hiperglicemia é transitória. Os valores glicêmicos retornam ao normal após a primeira semana de vida, com recuperação da produção de insulina e da massa de células β . Isso caracteriza um modelo de NIDDM em ratos, no qual os animais experimentais apresentam boa sobrevida (PORTHA et al., 1989). Embora o diabetes induzido pela STZ venha sendo

amplamente utilizado, existem alguns problemas para experimentos crônicos, especialmente recuperação espontânea da hiperglicemia pelo desenvolvimento de insulinoma funcionante (IWASE et al., 1991; YAMAGAMI et al., 1985) e alta incidência de tumores no fígado e nos rins (ARISON; FEUDALE, 1967; MAUER et al., 1974). Esses problemas são devidos à forte ação oncogênica da STZ (KASUMI et al., 1978). Já a aloxana, uma droga mais antiga que a

STZ, tem pequena ação oncogênica (YAMAGAMI et al., 1985), mas é menos empregada que esta, devido as dificuldades por alguns grupos de pesquisa em induzir o diabetes e manter os animais em boas condições.

Kodama et al. (1993) desenvolveram um outro modelo de indução neonatal de diabetes, através da substituição da streptozotocina por aloxana. Nesse estudo a aloxana foi administrada aos 2, 4 ou 6 dias de vida. Quando analisados aos 60 dias de idade, os ratos que receberam aloxana no 2º dia de vida apresentaram glicemia no estado alimentado ligeiramente superior à de ratos controle, enquanto que aqueles que receberam a droga nos 4º e 6º dias mostraram glicemia

¹ Departamento de Educação Física. Universidade Estadual Paulista. Campus do Rio Claro, SP.
Received 15/04/03 Accept 09/12/03

significativamente maior que a dos controles. Os autores consideraram o modelo útil aos estudos sobre complicações crônicas do diabetes. Contudo, salientaram que mais estudos são necessários para determinar se o mesmo também tem características de NIDDM, como verificado no modelo streptozotocina neonatal. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar as características do diabetes mellitus induzido pela administração neonatal de aloxana em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, de ambos os sexos, recém nascidos, que receberam aos dois ou aos quatro dias de idade, injeção intra-peritoneal de aloxana monoidratada dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (200 mg/Kg de peso corporal), após jejum de 16 horas. A solução foi preparada de maneira que cada animal recebesse 0,2 mL da mesma. Como controle, foram utilizados ratos da mesma idade injetados com 0,2 mL de veículo (tampão citrato). Em seguida, os recém nascidos foram distribuídos de forma que fossem amamentados em ninhadas de 8 animais. Cada mãe amamentou um único tipo de ninhada (i.e. aloxana ou controle), e a identificação dos grupos foi feita nas gaiolas. Os ratos foram mantidos no Biotério do setor de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP – Campus de Rio Claro em sala com temperatura mantida em $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e foto período claro/escuro de 12/12 horas, tendo livre acesso à água e ao alimento (ração balanceada para roedores).

Grupos Experimentais

Após o desmame (28 dias), os filhotes foram separados em 6 grupos e permaneceram em experimento até os 90 dias de idade:

- Controles (CM): machos injetados com tampão citrato (n=11);
- Controles (CF): fêmeas injetadas com tampão citrato (n=27);
- Aloxana 2 dias (DM): machos injetados com aloxana aos 2 dias de vida (n=29);
- Aloxana 2 dias (DF): fêmeas injetadas com aloxana aos 2 dias de vida (n=8);
- Aloxana 4 dias (QM): machos injetados com aloxana aos 4 dias de vida (n=15);
- Aloxana 4 dias (QF): fêmeas injetadas com aloxana aos 4 dias de vida (n=20).

Avaliações

Avaliações Efetuadas Antes do Sacrifício Avaliações Gerais

Todos os animais tiveram peso corporal e ingestão alimentar e hídrica registrados semanalmente após o desmame. O cálculo das áreas sob as curvas de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica ($\ddot{A}P = \text{g.10 semanas}$; $\ddot{A}A = \text{g de ração/100 g de peso corporal.10 semanas}$; $\ddot{A}H = \text{mL de água/100 g de peso corporal.10 semanas}$, respectivamente), durante o experimento foi feito através da construção de curvas individuais utilizando-se os valores obtidos nas avaliações, com posterior cálculo da área sob as mesmas, pelo método trapezoidal. Tal método é adequado quando existem várias medidas ao longo do tempo, transformando diversos resultados em um único valor, simplificando a análise estatística, a interpretação dos dados, e fornece respostas relevantes à pesquisa (MATTHEWS et al., 1990).

Glicemia

A confirmação da indução do diabetes neonatal foi efetuada nos animais ao desmame (28 dias) e repetida aos 60 e 90 dias de idade, pela determinação, às 8:00 h da manhã, da glicemia em jejum de 15 horas e glicemia determinada 30 minutos após a administração de solução de glicose (2,0 g/kg p. c.) por sonda oro-gástrica (glicemia pós-prandial) pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990).

Teste de Tolerância à Glicose Oral (GTT)

Foi realizado após 15 horas de jejum, com os animais aos 28, 60 e 90 dias de idade. Os ratos foram moderadamente anestesiados com inalação de éter etílico e a primeira coleta de sangue foi feita da cauda do animal ao tempo zero (0). Em seguida, uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago pôr via oral e uma solução de glicose de 20% (2,0 g/Kg de peso corporal) administrada. Amostras de sangue foram coletadas através de corte na extremidade distal da cauda do animal nos tempos 0, 30, 60, e 90 minutos utilizando-se tubos capilares heparinizados e calibrados para 25 μL . Após a administração da glicose a determinação da glicemia foi realizada pelo método da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990), através da coleta de 25 μL de sangue e dissolvidos em 200 μL de TCA 4%. O cálculo da área sob a curva de glicose sanguínea ($\ddot{A}G = \text{mM.90min}^{-1}$), durante o GTT foi feito pelo método trapezoidal (MATTHEWS et al., 1990).

Avaliações Efetuadas após o Sacrifício Sacrifício dos Animais

Aos 90 dias de idade, decorridas 48 horas do teste de tolerância, todos os animais foram sacrificados por decapitação, sem jejum prévio, para a obtenção de: sangue, fígado, músculo sóleo, tecido adiposo epididimal e pâncreas.

Avaliações Efetuadas no Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para verificação dos teores de glicose, ácidos graxos livres e proteínas totais por métodos colorimétricos (NOGUEIRA et al., 1990) e insulina por radioimunoensaio (kit DPC Coat-A-Count).

Avaliações Efetuadas em Tecidos

Fígado, músculo sóleo esquerdo, tecido adiposo epididimal esquerdo e pâncreas foram totalmente extirpados e pesados em balança analítica. Nesses tecidos foram avaliados teores de proteína total (LOWRY et al., 1951) e DNA (GILES; MAYERS, 1965), visando inferir sobre o número (pelo total de DNA celular) e tamanho (pela razão proteína total/DNA) das células (WINICK et al., 1972). No fígado foram medidas, também, as concentrações de lipídeos (NOGUEIRA et al., 1990) e de glicogênio (DUBOIS et al., 1956). No músculo sóleo foi avaliado o conteúdo de glicogênio e, no pâncreas, o teor de insulina.

Extração da Insulina Pancreática

Inicialmente, 0,2g de pâncreas foram coletados em frascos contendo 2 mL de HCl 1N. O material foi incubado em estufa a 40 °C durante 24 horas. O material assim extraído foi diluído 1:5000 em soro-albumina bovina a 0,25% em tampão borato pH 5,5, conforme preconiza Carpinelli (1978). A concentração de insulina pancreática foi determinada pelo método do radioimunoensaio (kit DPC Coat-A-Count).

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) com duas fontes de variação: gênero e dia de administração da droga. Quando necessário foi utilizado o teste Post Hoc de Newman-Keuls, com um nível de significância pré-estabelecido de 5%.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados referentes às áreas sob as curvas de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica dos animais no período

experimental. A análise estatística encontrou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas no parâmetro peso corporal, onde os machos mostraram maior área quando comparados às fêmeas.

Os dados da glicemia de jejum, glicemia pós-prandial e área sob a curva de glicose no TTGo dos animais ao desmame (28 dias) encontram-se na Tabela 2. A glicemia de jejum não foi diferente entre os grupos. Com relação à glicemia pós-prandial, os machos que receberam a droga (DM e QM) tiveram valores glicêmicos elevados ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Apenas as fêmeas do grupo QF apresentaram maior concentração de glicose no sangue ($p < 0,05$) que as fêmeas dos demais grupos (CF e DF). Para a área sob a curva de glicose sanguínea no TTGo, a ANOVA mostrou que os grupos que receberam aloxana mostraram maior área ($p < 0,05$) que o grupo controle em ambos os gêneros. Conforme Tabela 2 podemos notar ainda que, entre os machos, o grupo DM apresentou maiores valores de área sob a curva de glicose sanguínea que o grupo QM. Entre as fêmeas, o grupo QF teve área sob a curva de glicose maior que o outro grupo que recebeu a droga. Entre os animais que receberam aloxana aos dois dias de vida, o efeito mais acentuado sobre a glicemia ocorreu no grupo DM (DM > DF) ao passo que entre os animais que receberam a droga aos quatro dias, o grupo QF foi o que mostrou ser mais sensível à aloxana (QF > QM), apresentando maiores níveis glicêmicos.

A Tabela 3 mostra que, entre os machos, apenas o grupo que recebeu aloxana aos 2 dias mostrou maior glicemia de jejum e pós-prandial que o controle ($p < 0,05$). Com relação às fêmeas, o grupo QF apresentou maior glicemia de jejum que os grupos CF e DF. Trinta minutos após sobrecarga oral de glicose, o grupo DF teve menor glicemia que o grupo CF e QF. A área sob a curva de glicose sanguínea no TTGo aos 60 dias apresentou comportamento semelhante ao observado aos 28 dias, com o grupo DM, apresentando maiores valores glicêmicos enquanto que entre as fêmeas isso ocorreu no grupo Q (Tabela 3).

Os resultados observados na Tabela 4 referem-se à glicemia dos animais aos 90 dias. Na glicemia de jejum, os machos não diferiram entre si ao passo que as fêmeas que receberam aloxana tiveram menor glicemia que as controle ($p < 0,05$). Além disso, os machos dos grupos DM e QM apresentaram maiores valores glicêmicos que as fêmeas dos respectivos grupos. Os valores da glicemia pós-prandial foram semelhantes para todos os grupos. A estatística não apontou diferença significativa entre os grupos para área sob a curva de glicose sanguínea durante TTGo.

Tabela 1. Área sob as curvas de peso corporal (g.10 semanas), ingestão alimentar (g de ração/100 g de peso corporal.10 semanas) e ingestão hídrica (mL de água/100 g de peso corporal.10 semanas) dos animais durante o período experimental. (ΔP = área sob a curva de peso corporal; ΔA = área sob a curva de ingestão alimentar; ΔH = área sob a curva de ingestão hídrica).

Grupos	ΔP	ΔA	ΔH
CM (n=4)	2787,05 + 83,30*	74,44 + 1,42	117,49 + 4,00
DM (n=4)	2894,06 + 71,76*	75,70 + 2,15	106,43 + 3,44
QM (n=3)	2896,85 + 75,77*	70,59 + 1,41	111,76 + 4,56
CF (n=3)	1885,00 + 92,49	72,19 + 4,03	110,80 + 7,07
DF (n=3)	1833,56 + 18,52	72,68 + 0,46	117,85 + 1,66
QF (n=3)	1808,00 + 67,52	71,61 + 1,54	114,50 + 8,50

Resultados expressos como média \pm erro padrão, com o número de observações entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxa injetada aos 2 dias; Q = Aloxa injetada aos 4 dias. Diferença significativa ($p > 0,05$). * em relação ao respectivo grupo do gênero oposto.

Tabela 2. Glicemia de jejum (mg/dL) e pós-prandial (mg/dL) e área sob a curva de glicose no TTGo (mg/dL.90min) dos animais ao desmame (28 dias).

Grupos	Glicemia de Jejum	Glicemia Pós-Prandial	Área sob a Curva de Glicose
CM (n=11)	52,30 + 10,30	102,16 + 11,60	8016,54 + 661,84
DM (n=27)	67,54 + 23,38	139,18 + 21,53 ^a	10830,37 + 915,09 ^{a,*}
QM (n=29)	66,08 + 17,42	124,39 + 17,32 ^a	9599,48 + 820,91 ^{a,b,*}
CF (n=06)	57,96 + 06,04	103,00 + 18,21	8325,50 + 890,97
DF (n=15)	58,27 + 06,86	119,10 + 20,39	9473,20 + 1058,33 ^c
QF (n=20)	58,47 + 11,81	142,85 + 32,27 ^{c,d}	10439,50 + 1373,52 ^{c,d}

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxa injetada aos 2 dias; Q = Aloxa injetada aos 4 dias. Glicemia de jejum = após 15 horas de jejum; Glicemia pós-prandial = 30 min. após sobrecarga oral de glicose 2,0 g/Kg p.c.; TTGo = sobrecarga oral de glicose de 2,0 g/Kg p.c. após 15 horas de jejum, com coletas de sangue antes e após 30, 60 e 90 minutos. Diferença significativa ($p < 0,05$). a. em relação a CM; b. em relação a DM; c. em relação a CF; d. em relação a DF; * em relação ao respectivo grupo do gênero oposto.

Tabela 3. Glicemia de jejum (mg/dL) e pós-prandial (mg/dL) e área sob a curva de glicose no TTGo (mg/dL.90min) dos animais ao 60 dias.

Grupos	Glicemia de Jejum	Glicemia Pós-Prandial	Área sob a Curva de Glicose
CM (n=08)	57,00 + 11,26	82,50 + 12,27	7057,50 + 776,98
DM (n=19)	79,61 + 16,86 ^{a,*}	102,47 + 14,75 ^a	8555,68 + 1096,78 ^{a,*}
QM (n=09)	67,96 + 15,02*	97,16 + 11,02	8132,50 + 926,90 ^{a,*}
CF (n=09)	52,44 + 07,05	96,44 + 08,58	7786,66 + 362,21
DF (n=09)	59,77 + 08,62	84,44 + 08,11 ^c	7116,66 + 378,21 ^c
QF (n=06)	88,51 + 09,80 ^{c,d}	107,78 + 13,52 ^d	9239,25 + 844,81 ^{c,d}

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxa injetada aos 2 dias; Q = Aloxa injetada aos 4 dias. Glicemia de jejum = após 15 horas de jejum; Glicemia pós-prandial = 30 min. após sobrecarga oral de glicose 2,0 g/Kg p.c.; TTGo = sobrecarga oral de glicose de 2,0 g/Kg p.c. após 15 horas de jejum, com coletas de sangue antes e após 30, 60 e 90 minutos. Diferença significativa ($p < 0,05$). a. em relação a CM; b. em relação a DM; c. em relação a CF; d. em relação a DF; * em relação ao respectivo grupo do gênero oposto.

Tabela 4. Glicemia de jejum (mg/dL) e pós-prandial (mg/dL) e área sob a curva de glicose no TTGo (mg/dL.90min) dos animais ao 90 dias.

Grupos	Glicemia de Jejum	Glicemia Pós-Prandial	Área sob a Curva de Glicose
CM (n=08)	62,77 + 04,94	86,40 + 08,95	7305,50 + 871,28
DM (n=08)	63,45 + 05,95*	79,30 + 07,89	7088,81 + 536,93
QM (n=05)	62,10 + 08,53*	77,76 + 07,49	6747,30 + 728,21
CF (n=05)	63,64 + 06,32	90,96 + 05,47	7588,20 + 406,43
DF (n=10)	53,60 + 03,60 ^c	79,44 + 12,30	6797,25 + 813,39
QF (n=08)	50,28 + 05,02 ^c	83,26 + 17,56	6665,06 + 717,78

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. Glicemia de jejum = após 15 horas de jejum; Glicemia pós-prandial = 30 min. após sobrecarga oral de glicose 2,0 g/Kg p.c.; TTGo = sobrecarga oral de glicose de 2,0 g/Kg p.c. após 15 horas de jejum, com coletas de sangue antes e após 30, 60 e 90 minutos. Diferença significativa ($p < 0,05$). a. em relação a CM; b. em relação a DM; c. em relação a CF; d. em relação a DF; * em relação ao respectivo grupo do gênero oposto.

Os teores de glicose, insulina, proteínas totais e ácidos graxos livres do soro dos animais após o sacrifício encontram-se na Tabela 5. A análise de variância não mostrou diferença entre os grupos quanto à glicose sérica. Machos e fêmeas também não apresentaram valores diferentes ($p < 0,05$) para os níveis de insulina e proteínas totais, com exceção do grupo QM, que teve maior teor de proteínas totais que o grupo QF. Com relação

aos ácidos graxos livres, a estatística revelou diferença significativa em função da droga e interação entre as duas fontes de variação. As fêmeas não diferiram entre si, ao passo que os machos que receberam aloxana aos 2 dias tiveram maior teor de ácidos graxos livres que os machos dos demais grupos (CM e QM) e as fêmeas que também receberam a droga aos 2 dias (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração de glicose (mg/dL), insulina (μ U/mL), proteínas totais (g/dL) e ácidos graxos livres (μ Eq/L) do soro dos animais obtidos após o sacrifício (90 dias).

Grupos	Glicose	Insulina	Proteínas Totais	AGL
CM (n=8)	104,06 + 20,56	12,15 + 0,98	7,17 + 0,97	101,40 + 22,40
DM (n=8)	101,25 + 17,11	13,77 + 3,01	6,97 + 0,76	231,12 + 58,59 ^{a,*}
QM (n=8)	99,37 + 28,49	13,22 + 2,59	7,55 + 0,56*	127,35 + 28,07 ^b
CF (n=8)	101,25 + 26,04	10,98 + 1,37	6,57 + 0,79	158,01 + 62,11
DF (n=8)	123,43 + 22,67	11,03 + 1,40	6,10 + 0,33	134,42 + 45,59
QF (n=8)	128,75 + 21,12	12,30 + 3,14	6,59 + 0,30	146,22 + 106,13

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. Diferença significativa ($p < 0,05$). a. em relação a CM; b. em relação a DM; c. em relação a CF; d. em relação a DF; * em relação ao respectivo grupo do gênero oposto.

A Tabela 6 mostra os teores de insulina e razão proteína/DNA do pâncreas dos animais bem como os teores de glicogênio e razão proteína/DNA do músculo sóleo após o sacrifício. A análise dos resultados mostrou interação entre gênero e dia de administração da droga para o primeiro parâmetro supracitado. Entre os machos, o grupo DM apresentou menores níveis do hormônio ($p < 0,05$) que os grupos CM e QM, e ainda que o respectivo grupo do gênero oposto. Para as fêmeas nenhuma alteração foi observada. O grupo DM também

teve valores reduzidos da razão proteína/DNA quando comparados com os animais do grupo CM e QM. As fêmeas que receberam aloxana aos 4 dias (QF) apresentaram maior valor deste parâmetro que os ratos dos grupos CF, DF e QM. Os níveis de glicogênio muscular não foram diferentes entre os grupos. A razão proteína/DNA do músculo sóleo foi diferente ($p < 0,05$) entre os gêneros, com as fêmeas que receberam aloxana tendo valores superiores aos dos machos dos respectivos grupos.

Tabela 6. Concentração de insulina (U/g) e razão proteína/DNA do pâncreas, teores de glicogênio e razão proteína/DNA do músculo sóleo dos animais após sacrifício (90 dias).

Grupos	Insulina	Proteína/DNA	Glicogênio	Proteína/DNA
CM (n=8)	2,94 + 0,80	25,76 + 4,77	0,13 + 0,02	66,27 + 25,80
DM (n=8)	1,92 + 0,33 ^a	19,58 + 2,44 ^a	0,14 + 0,02	34,26 + 15,28*
QM (n=8)	3,11 + 0,78 ^b	25,94 + 5,09 ^{b,*}	0,14 + 0,03	68,07 + 37,09*
CF (n=8)	3,59 + 0,93	28,72 + 3,33	0,16 + 0,04	75,08 + 25,45
DF (n=8)	3,43 + 0,58	22,26 + 6,11 ^c	0,13 + 0,04	89,34 + 31,54
QF (n=8)	2,54 + 0,77	40,34 + 13,48 ^{c,d}	0,16 + 0,03	111,08 + 50,02

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. Diferença significativa ($p < 0,05$). a. em relação a CM; b. em relação a DM; c. em relação a CF; d. em relação a DF; * em relação ao respectivo grupo do gênero oposto.

Na Tabela 7 temos a razão proteína/DNA, teores de glicogênio e lipídeos hepáticos e razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal. A estatística mostra diferença em função da aloxana e entre gênero e período de administração da droga ($p < 0,05$) para a razão proteína/DNA do fígado. As fêmeas não foram diferentes entre si, enquanto que entre os machos, o grupo DM teve menor valor que os grupos CM e QM. O grupo QM teve maior valor da razão proteína/DNA que o grupo QF. A quantidade de glicogênio hepático foi maior para os machos

($p < 0,05$) dos grupos C e D quando comparados às fêmeas dos mesmos grupos, e menor para as fêmeas que receberam aloxana aos 2 dias que para as demais (CF e QF). Com relação aos lipídeos hepáticos, diferenças em função do gênero e da aloxana foram apontadas pela ANOVA. As fêmeas do grupo QF tiveram teores reduzidos de lipídeos ($p < 0,05$) comparados as do grupo CF, DF e QM. Entre os machos, não houve alteração. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos para a razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal (Tabela 7).

Tabela 7. Razão proteína total/DNA, glicogênio (mg/100mg) e lipídeos (mg/100mg) hepáticos e razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal dos animais após o sacrifício (90 dias).

Grupos	Proteína/DNA	Glicogênio	Lipídeos	Proteína/DNA
CM (n=8)	76,10 + 14,91	3,88 + 0,66*	5,20 + 0,58	86,11 + 12,23*
DM (n=8)	52,52 + 08,40 ^a	3,09 + 1,15*	5,20 + 1,18	72,47 + 16,47
QM (n=8)	86,00 + 21,35 ^{b,*}	3,47 + 0,80	5,23 + 0,21*	73,45 + 23,65
CF (n=8)	62,18 + 08,09	2,55 + 0,48	5,06 + 0,68	64,10 + 09,90
DF (n=8)	63,37 + 14,11	1,60 + 0,35 ^c	4,66 + 0,48	54,90 + 7,63
QF (n=8)	67,37 + 12,82	2,63 + 1,33	3,52 + 0,30 ^{c,d}	66,63 + 14,75

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. Diferença significativa ($p < 0,05$). a. em relação a CM; b. em relação a DM; c. em relação a CF; d. em relação a DF; * em relação ao respectivo grupo do gênero oposto.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características do modelo de diabetes neonatal induzido por aloxana.

Com relação à ingestão alimentar, ingestão hídrica e peso corporal, Kodama et al. (1993) encontraram

valores semelhantes aos nossos, mostrando que a aloxana injetada aos 2 ou 4 dias não interferiu nestes parâmetros. Resultados diferentes acerca do peso corporal têm sido encontrados por pesquisadores que induziram diabetes com streptozotocina (CORTRIGHT et al., 1996; HEMMINGS; SPAFFORD, 2000; PORTHA et al., 1974; PORTHA et al., 1979). Contudo, esses estudos foram

realizados com ratos de diversas linhagens, o que poderia explicar essa grande variabilidade de dados encontrados na literatura. Além disso, nas pesquisas supracitadas, os animais tratados com streptozotocina que apresentaram menor peso foram os que receberam 100 mg/Kg de peso corporal da droga. Hemmings e Spafford (2000) verificaram que essa dose resultou numa redução dos hormônios tireoidianos, que são de fundamental importância no processo de crescimento e poderiam ter causado essa alteração.

Com relação à glicemia, analisando o conjunto dos resultados obtidos podemos perceber que, até os 60 dias, a aloxana causou elevados níveis de glicose pós-prandial e área sob a curva de glicose sanguínea em relação aos grupos controle, pela destruição seletiva de parte das células beta (LENZEN; PANTEN, 1988). Tal comportamento se assemelha ao quadro de diabetes experimental não insulino dependente (NIDDM) induzido por streptozotocina (HEMMINGS; SPAFFORD, 2000; PORTHA et al, 1974; PORTHA et al, 1979; PORTHA et al, 1989). Embora os grupos DM e QF apresentem maior glicemia em jejum aos 60 dias, tais valores não podem ser caracterizados como hiperglicemia. Entretanto, diferentemente dos resultados obtidos por outros pesquisadores (KODAMA et al., 1993; PORTHA et al., 1989; WANG et al., 1996), em nosso estudo a alteração glicêmica nos ratos machos não se agravou em função da elevação da idade em que a droga foi aplicada. Machos e fêmeas mostraram respostas diferentes à aloxana. Entre os machos, a ação da droga parece ter sido mais forte no grupo em que a aloxana foi administrada aos 2 dias, contrariando os achados da literatura, enquanto que, entre as fêmeas, isso ocorreu no grupo que recebeu a aloxana aos 4 dias. Kodama et al. (1993) não observaram alterações glicêmicas no grupo que recebeu a droga aos 2 dias. Já aos 90 dias, observamos uma regressão da hiperglicemia pós-prandial em todos os grupos que receberam aloxana, com os níveis de glicose sendo iguais aos dos animais controle. O mesmo ocorreu com a área sob a curva de glicose sanguínea. Os pesquisadores citados anteriormente não verificaram este comportamento nos animais em que a droga foi administrada aos 4 dias de vida, que mantiveram quadro hiperglicêmico durante as 56 semanas do experimento (KODAMA et al., 1993).

Um possível mecanismo para explicar a recuperação glicêmica seria a regeneração das células β . Dados obtidos em estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que as células β podem desencadear mecanismos eficientes de recuperação após injúrias não-letais, inclusive as provocadas por aloxana (EIZIRIK et al., 1993; EIZIRIK, 1996). Bonnerweir e Smith (1994) citam, em seu artigo de revisão, que o crescimento das ilhotas ocorre

pela replicação das células beta pré-existentes e pela formação de novas ilhotas (neogênese) através da proliferação e subsequente diferenciação das células epiteliais do ducto pancreático. A replicação destas células, que é vista como a principal forma de expansão após o nascimento (BONNERWEIR; SMITH, 1994; WANG et al., 1994), é estimulada por elevadas concentrações de glicose (BONNERWEIR; SMITH, 1994). Desta forma, a hiperglicemia provocada pela aloxana em nossos animais pode ter colaborado para a reversão deste quadro aos 90 dias.

Os resultados referentes aos parâmetros séricos avaliados após o sacrifício parecem indicar que, embora os níveis insulinêmicos estivessem inalterados para os animais tratados com aloxana em relação aos controles (o que explica o mesmo comportamento para os teores de glicose e proteínas totais) os danos causados pela aloxana nos machos que receberam a droga aos 2 dias foram eficazes em levar a uma alteração metabólica nesse grupo. Os valores elevados de ácidos graxos livres no grupo DM sugerem que, ao menos para esses animais, apesar dos níveis séricos de insulina e glicose estarem normais, não houve uma recuperação metabólica completa. Desta forma, a impossibilidade da utilização adequada de glicose levaria o organismo a uma adaptação, aumentando sobremaneira a utilização de gordura. Corroborando essa hipótese, o grupo DM mostrou ligeira redução no peso total do tecido adiposo epididimal (dado não apresentado). Apesar disso, não houve alteração da razão proteína/DNA deste tecido.

Os teores de insulina e a razão proteína/DNA (utilizada como índice do tamanho celular) pancreáticos reduzidos no grupo DM fortalecem a hipótese de que as células β dos animais desse grupo não estavam totalmente recuperadas. A droga também causou redução da razão proteína/DNA no grupo DF.

Nenhuma alteração foi observada nos teores de glicogênio muscular. Contudo, com relação ao glicogênio hepático, as fêmeas que receberam a droga aos 2 dias tiveram menores valores que as demais fêmeas e que os machos do mesmo grupo. Uma vez que a insulina promove a captação de glicose e seu armazenamento na forma de glicogênio, isso também pode ser uma indicação da recuperação apenas parcial do pâncreas desses animais. Resistência à insulina no fígado, como encontrado por Portha e Blondel (1988) em animais tratados com streptozotocina aos 5 dias de vida, também poderia levar à redução dos teores de glicogênio deste órgão, pelos mesmos motivos citados acima. O grupo QF, ao contrário, apresentou um quadro de aumento da razão proteína/DNA, indicando hipertrofia das células pancreáticas sem

nenhuma alteração significativa na quantidade produzida do hormônio. Wang et al. (1996) encontraram resultados semelhantes nas células secretoras de insulina de ratos Wistar tratados com streptozotocina, e sugerem que essa alteração possa ser decorrente de uma hiperatividade funcional destas células, na tentativa de manter a homeostase glicêmica. Isso pode ser indício de que não houve recuperação total das células, uma vez que essa atividade exagerada teria como objetivo compensar outras células com função prejudicada ou ainda, em número reduzido.

A razão proteína/DNA do músculo sóleo foi diferente apenas em função do gênero, com as fêmeas que receberam aloxana tendo valores superiores aos dos machos dos respectivos grupos. No fígado, este parâmetro foi menor no grupo DM que nos demais animais machos e nas fêmeas DF. Os danos causados nas células beta podem também ser os responsáveis pelo menor crescimento dos hepatócitos, já que o hormônio por elas secretado, a insulina, é um dos principais estimuladores do processo anabólico no organismo, ao promover maior captação de aminoácidos pelas células e permitindo, desta forma, maior síntese proteica. Podemos ver desta forma que, a maioria das alterações se manifestou nos grupos que tiveram tamanho reduzido das células pancreáticas.

Com relação aos lipídeos hepáticos, as fêmeas

do grupo QF tiveram teores reduzidos de lipídeos comparadas as dos grupos CF, DF e QM. Apesar dos teores de ácidos graxos livres desses animais estarem normais, isso pode indicar também uma adaptação metabólica do organismo.

CONCLUSÃO

Concluindo, o modelo em questão não desenvolveu “diabetes” característico, já que a elevação glicêmica e a intolerância à glicose foram transitórias. Entretanto, a recuperação dos animais foi incompleta, visto que importantes alterações metabólicas, como elevação dos A.G.L. circulantes, permaneceram. Estudos adicionais são necessários para determinar se esse modelo reúne características de NIDDM.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo: 02/04814-8) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (processo – 522755/96-98). Os autores agradecem a assistência técnica laboratorial de Clarice Y. Sibuya, José Roberto Rodrigues da Silva e Eduardo Custódio.

ABSTRACT: The present study was designed to analyse the characteristics of diabetes induced by the neonatal alloxan administration. Male and female newborn rats (2 and 4 days old) received alloxan (200 mg/Kg b.w.-i.p.). Vehicle injected rats were used as control. At 28, 60 and 90 days old the animals were evaluated with respect to: fasting glycemia, non-fasting glycemia and oral glucose tolerance (TTGo). The results showed higher glycemia during the TTGo ($p > 0,05$) in the alloxan injected rats than in controls at the 60th day old, but not at the 90th day. At 90 days old, the animals were sacrificed by decapitation. It was clearly demonstrated that the male rats receiving alloxan at the 2nd day of life were the most affected by the drug. They showed the lowest pancreatic insulin content and protein/DNA ratio and the highest serum F.F.A. levels ($p < 0,05$). In conclusion, although the glucose intolerance is transitory, the animals rehabilitation is incomplete, since some biochemical alterations remain.

UNITERMS: Alloxan, Diabetes, Diabetes Neonatal Model

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARISON, R. N.; FEUDALE, E. L. Induction of renal tumour by streptozotocin in rats. *Nature*, London, v. 214, n. 5094, p. 1254-1255, jun. 1967.

BALAMURUGAN, A. N.; GU, Y.; MIYAMOTO, M.; WANG, W.; INOUE, K.; TABATA, Y. Streptozotocin (STZ) is commonly used to induce diabetes in animal models. *Pancreas*, Hagerstown, v. 26, n. 1, p. 102-103, jan. 2003.

BONNERWEIR, S.; SMITH, F. E. Islet cell growth and the growth factors involved. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 5, n. 2, p. 60-64, mar. 1994.

CARPINELLI, A. R. **Estudo da secreção de insulina e da homeostase glicêmica em ratos desnutridos**. 1978. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

CORTRIGHT, R. N.; COLLINS, H. L.; CHANDLER, M. P.; LEMON, P. W. R.; DICARLO, S. E. Diabetes reduces growth and body composition more in male than in female rats. **Physiology & Behavior**, Tarrytown, v. 60, n. 5, p. 1233-1238, nov. 1996.

CUMAN, R. K.; BERSANI-AMADO, C. A.; FORTES, Z. B. Influence of type two diabetes on the inflammatory response in rats. **Inflammatory Research**, Basel, v. 50, n. 9, p. 460-465, sep. 2001.

DUBOIS, B.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Calorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, mar. 1956.

EIZIRIK, D. L.; SANDLER, S.; PALMER, J. P. Repair of pancreatic β -cells: a relevant phenomenon in early IDDM? **Diabetes**, Alexandria, v. 42, n. 10, p. 1383-1391, oct. 1993.

EIZIRIK, D. L. β -cell defence and repair mechanisms in human pancreatic islets. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, v. 28, n. 6, p. 302-305, jun. 1996.

GILES, K. W.; MYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature**, London, v. 206, n. 4979, p. 93, jan. 1965.

HEMMINGS, S. J.; SPAFFORD, D. Neonatal streptozotocin model of type II diabetes mellitus in the Fisher 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, Exeter, v. 32, n. 8, p. 905-919, aug. 2000.

IWASE, M.; NUNOI, K.; WAKISAKA, M.; KIKUCHI, M.; MAKI, Y.; SADOSHIMA, S.; FUJISHIMA, M. Spontaneous recovery from non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin treatment in spontaneously hypertensive rats. **Metabolism**, Rome, v. 40, n. 1, p. 10-14, jan. 1991.

KAZUMI, T.; YOSHINO, G.; FUJII, S.; SHIGEKAI, B. Tumorigenic action of streptozotocin on the pancreas and kidney in male Wistar rats. **Cancer Research**, Baltimore, v. 38, n. 7, p. 2144-2147, jul. 1978.

KODAMA, T.; IWASE, M.; NUNOI, K.; MAKI, Y.; YOSHINARI, M.; FUJISHIMA, M. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 183-189, jun. 1993.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, New York, v. 31, n. 6, p. 337-42, jun. 1988.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-75, nov. 1951.

MATTHEWS, J. N. S.; ALTMAN, D. G.; CAMPBELL, M. J.; ROYSTON, P. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, London, v. 300, n. 6719, p. 230-235, jan. 1990.

MAUER, S. M.; LEE, C. S.; NAJARIAN, J. S.; BROWN, D. M. Induction of malignant kidney tumors in rats with streptozotocin. **Cancer Research**, Baltimore, v. 34, n. 1, p. 158-160, jan. 1974.

MURALI, B.; GOYAL, R. K. Improvement in insulin sensitivity by losartan in non-insulin dependent diabetic (NIDDM) rats. **Pharmacological Research**, London, v. 44, n. 5, p. 385-389, nov. 2001.

NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H.; ABDALLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C. Sangue-parte I: Glicídios. In: _____. **Métodos de bioquímica clínica**. São Paulo: Pancast, 1990. p.153-168.

PORTHA, B.; LEVANCHER, C.; PICON, M. D.; ROSSELIN, M. D. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. **Diabetes**, Alexandria, v. 23, n. 11, p. 889-895, nov. 1974.

PORTHA, B.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. **Diabetologia**, New York, v. 17, n. 6, p. 371-377, dec. 1979.

PORTHA, B.; BLONDEL, O. Insulin resistance in rats with NIDDM induced by neonatal (5 days) streptozotocin: evidence for reversal following phlorizin treatment. **Diabetologia**, New York, v. 31, n. 7, p. 532A, jul. 1988.

PORTHA, B.; BLONDEL, O.; SERRADAS, P.; EVOY, R.; GIROIX, M. H.; KERGOAT, M.; BAILBE, D. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabete & Metabolisme**, Paris, v. 15, n. 2, p. 61-75, mar.-apr. 1989.

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

WANG, R. N.; BOUWENS, L.; KLÖPPEL, G. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. **Diabetologia**, New York, v. 37, n. 11, p. 1088-1096, nov. 1994.

_____. Beta-cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period. **Diabetologia**, New York, v. 39, n. 5, p. 548-57, may, 1996.

WINICK, M.; BASEL, J.A.; ROSSO, P. A nutrition and cell growth. In: WINICK, M. (Ed.). **Nutrition and development**. New York: John Wiley, 1972. p. 49-97.

YAMAGAMI, T.; MIWA, A.; TAKASAWA, S; YAMAMOTO, H.; OKAMOTO, H. Induction of rat pancreatic B-cell tumors by the combined administration of streptozotocin or alloxan and poly (adenosine phosphate ribose) synthetase inhibitors. **Cancer Research**, Baltimore, v. 45, n. 4, p. 1845-1849, apr. 1985.