

PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DE DIABETES COM ALOXANA EM PACU *Piaractus mesopotamicus**

Victor Alexander CUEVA-QUIROZ^{1,*}; Jefferson YUNIS-AGUINAGA¹; Fernando RAMOS-ESPINOZA¹; Gustavo S. CLAUDIANO²; Fausto A. MARINHO-NETO²; Sirlei A. ABREU^{1,2}; Flávio R. MORAES^{1,2}; Julieta R. E. MORAES^{1,2}

¹Centro de Aquicultura da Unesp, CAUNESP, Jaboticabal, SP *acuevaq@gmail.com

²Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UESP, Jaboticabal, SP

*Apoio financeiro: FAPESP (processo 2015/14289-8) e CNPq (446917/2014-1).

Palavras-chave: diabetes; aloxana; glicemia; peixes

INTRODUÇÃO

Os modelos experimentais animais são de grande importância para compreender fenômenos biológicos particulares, com expectativa de que as descobertas feitas no modelo fornecerão uma visão sobre o funcionamento de outros organismos (FERREIRA *et al.*, 2005). Os peixes são amplamente utilizados como modelo no estudo das causas e consequências dos distúrbios metabólicos como estresse, envelhecimento, obesidade e diabetes (SCHARTL *et al.*, 2014).

O estabelecimento de um novo modelo animal para o estudo de uma determinada doença requer a padronização de metodologias e especificações de procedimentos. Neste estudo foi padronizada a indução de diabetes em pacu *Piaractus mesopotamicus* usando o método da destruição de células β pancreáticas produtoras de insulina mediante inoculação de aloxana.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e condições experimentais

Foram utilizados pacus de 102 g e 17 cm em média, adquiridos de piscicultura comercial e adaptados em sistema de fluxo contínuo em caixas de 250 L. Foram testados 8 protocolos de indução de diabetes (Tabela 1), usando-se 20 peixes em jejum de 24 h por protocolo. O fármaco foi dissolvido em buffer citrato e os animais anestesiados ou não com benzocaína 100 mg L⁻¹. Para o desenvolvimento dos protocolos foram usados dados de pesquisas prévias desenvolvidas em ratos, camundongos e outras espécies de peixes (XU *et al.*, 2004).

Verificação da indução de diabetes

A mensuração da concentração de glicose plasmática foi realizada após 5 dias da inoculação com aloxana. Para o qual foi utilizado o kit comercial Glicose Liquiform (133-1, Labtest, Lagoa Santa, Brasil). Peixes que apresentavam mais de 130 mg dL⁻¹ de glicose, foram considerados como diabéticos. Este valor é decorrente da somatória de 3 vezes o desvio

padrão e a média do valor normal de glicemia após 12 horas da alimentação (XU *et al.*, 2004). Assim mesmo, amostras de pâncreas endócrino (corpos de Brockman) foram avaliadas histopatologicamente com coloração H&E.

Tabela 1. Protocolos de indução de diabetes com aloxana utilizados.

Protocolo	Aloxana (mg kg ⁻¹ de peixe)	Concentração de buffer citrato (M)	Via	Volume (mL kg ⁻¹ de peixe)	Anestesia
1	300	0,01	endovenosa	2	sim
2	300	0,01	intraperitoneal	2	sim
3	150	0,01	endovenosa	2	sim
4	150	0,01	intraperitoneal	2	sim
5	150	0,1	endovenosa	2	sim
6	150	0,01	endovenosa	7,5	sim
7	150	0,01	endovenosa	2	não
8	150	0,01	bexiga natatória	2	sim

RESULTADOS

Três dos protocolos produziram mortalidade de 100% dos animais antes das 24 horas (Figura 1). Os protocolos considerados menos tóxicos foram o 3, 7 e 4. No entanto, o sucesso na indução de diabetes foi extremadamente baixo no protocolo 4, pois só o 33% dos animais sobreviventes apresentaram glicemia acima de 140 mg mL⁻¹, nível no qual os animais são considerados como diabéticos (Tabela 2).

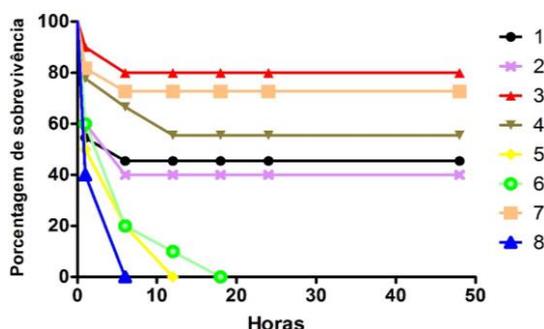


Figura 1. Sobrevivência de pacus à indução de diabetes com aloxana com 8 protocolos distintos.

Tabela 2. Verificação da indução de diabetes (glicose > 140 mg mL⁻¹) em pacus após 5 dias do tratamento com aloxana.

Protocolo	Número de animais	Diabéticos	Porcentagem	Ilhotas pancreáticas
3	16	13	81,25	Severa necrose
7	12	9	75,00	Severa necrose
4	15	5	33,33	Moderada necrose

DISCUSSÃO

A aloxana é um fármaco altamente oxidante e conseqüentemente com capacidade citotóxica (SZKUDELSKI, 2001). Não é de se surpreender que foi registrado até 100% de mortalidade em vários dos protocolos testados. No entanto, os protocolos que apresentaram menor sobrevivência não diferiram na quantidade de aloxana comparado com protocolos que foram considerados exitosos. Outros fatores como a concentração ou volume do veículo podem alterar a homeostase modificando o equilíbrio ácido-base ou o pH do sangue, impossibilitando o correto funcionamento das enzimas plasmáticas levando os animais ao óbito (HEISLER, 1989). Os protocolos com maior sucesso na indução da diabetes foram o 3 e o 7, ambos protocolos só diferiram na utilização de anestesia ou não. Foi relatado por XU *et al.* (2004) que o anestésico pode alterar a função da aloxana sobre as células pancreáticas. No entanto, neste estudo foi observado que os animais que não foram anestesiados apresentaram resultados similares aos anestesiados nas mesmas condições, motivo pelo qual recomenda-se utilizar o protocolo 3 com anestesia prévia, por considerações éticas.

CONCLUSÕES

Recomenda-se utilizar a dose de 150 mg kg⁻¹ de aloxana diluída em buffer citrato 0,01 M aplicada via endovenosa em um volume total de 2 mL kg⁻¹ em animais previamente anestesiados para indução exitosa da diabetes nesta espécie.

REFERÊNCIAS

- FERREIRA L.M.; HOCHMAN B.; BARBOSA M.V.J. 2005 Experimental models in research. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 20: 28-34.
- HEISLER, N. 1989 Acid-base regulation in fishes. 1. Mechanisms. In: MORRIS, R.; TAYLOR, E.W.; BROWN, D.J.A.; BROWN, J.A. (eds.). *Acid toxicity and aquatic animals*. p.85-96.
- SCHARTL, M. 2014 Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. *Disease Models & Mechanisms*, 7(2): 181-192.
- SZKUDELSKI, T. 2001 The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiology Research*, 50: 537-546.
- XU, B.Y.; MORRISON, C.M.; YANG, H.; WRIGHT, J.R. 2004 Tilapia islet grafts are highly alloxan-resistant. *General and Comparative Endocrinology*, 137(2): 132-140.