

Comparação da indução do *Diabetes mellitus* com aloxana em diferentes doses em ratos Wistar

Comparison of induction of *Diabetes mellitus* with alloxan in different doses in Wistar rats

Valter Dias da Silva^{1*}; Rosa Maria Barilli Nogueira²;
Gloriane Izabel Wojciechovisk de Oliveira¹; Rogério Giuffrida²

Resumo

Diabetes mellitus é uma desordem metabólica associada com hiperglicemia e causada por defeito na secreção de insulina. A busca por melhor compreensão, dos mecanismos fisiopatológicos de indução experimental do diabetes e suas complicações é de grande importância. O objetivo deste estudo foi comparar a indução do diabetes mellitus, usando a aloxana a 2% em diferentes doses em ratos Wistar. Foram comparadas doses de 120, 150, 200mg/Kg de aloxana a 2% e grupo controle. Hiperglicemia e óbito foram observados nos três grupos, no entanto, a maior glicemia e menor percentual de óbito foram significativas utilizando a dose de 120mg/Kg. Glicosúria, poliúria e polidipsia estiveram presentes nos animais dos três grupos, mas foram significativamente maiores para o G2 comparado aos demais grupos e a perda de peso foi mais intensa no G1. Diminuição de densidade urinária foi significativa no G2 comparado ao G1 e G3 e houve aumento do pH urinário em todos os grupos comparado ao controle. Positividade para nitrito ocorreu no G2 e sangue oculto na urina em todos os grupos, com maior intensidade para o G1 seguido do G3 e G2. Aloxana a 2% nas três doses utilizadas induz experimentalmente o diabetes mellitus em ratos Wistar, sendo a dose de 120mg/kg a mais eficiente por induzir a doença em um maior número de animais e causar menor incidência de óbito.

Palavras-chave: Aloxana, diabetes, endocrinologia, glicemia, rata

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder associated with hyperglycemia and caused by defect in insulin secretion. The search for better understanding of the mechanisms of induction of experimental diabetes and its complications is very important. The purpose of this study was to compare the induction of diabetes mellitus using alloxan 2% in Wistar rats at different doses. Doses of 120, 150, 200mg/kg alloxan 2% and control group were compared. Hyperglycemia and death were observed in all groups, but the higher glycemia and less percentage of death were significant at a dose of 120mg/kg. Glycosuria, polyuria and polydipsia were present in the animals of the three groups, but were significantly higher for G2 compared to other groups and weight loss was more intense in G1. Decreased urinary density was significant in G2 compared to G1 and G3 and there was an increase in urinary pH in all groups compared to control. Positive results for nitrite occurred in G2 and occult blood in the urine in all groups, with greater intensity for G1 followed by G2 and G3. Alloxan 2% intraperitoneally at the three doses used experimentally induced diabetes mellitus in Wistar rats. The

¹ Discentes do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP. E-mail: vrdiass-farm@uol.com.br; gloriane@unoeste.br

² Profs. do Programa de Mestrado em Ciência Animal, UNOESTE, Presidente Prudente, SP. E-mail: rosa@unoeste.br; rgiuffrida@unoeste.br

* Autor para correspondência

dose of 120mg/kg was the most effective and induced disease in a greater number of animals and cause a lower incidence of death.

Key words: Alloxan, diabetes, endocrinology, glycemia, rat

Introdução

O diabetes mellitus é uma doença endócrina que se caracteriza por um quadro de hiperglicemia persistente resultante da deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina (AHMAD, 2014).

Entre as complicações do diabetes mellitus podem ser citadas as microvasculares, predominando a retinopatia, nefropatia e neuropatia debilitante e entre as macrovasculares, destacam-se o acidente vascular cerebral e as doenças da artéria coronária, afetando artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores (CAVALLI et al., 2007; SHAH; KANAYA, 2014). A prevalência do diabetes tem aumentado rapidamente em todo o mundo, no entanto, Beagley et al. (2014) relataram em seu estudo que existe uma alta proporção de diabetes mellitus não diagnosticada, especialmente em países em desenvolvimento.

A aloxana, é um dos agentes diabetogênicos mais estudado e comumente utilizado no meio científico para a indução do diabetes experimental (CAVALLI et al., 2007), por induzir sinais clínicos semelhantes aos encontrados na síndrome diabética em humanos tais como, perda de peso corporal, glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, cetonúria e cetonemia; além de possuir pequena ação oncogênica e ter um custo menor quando comparada a outras drogas citotóxicas (CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO; OLIVEIRA; MELLO, 2007).

Uma grande variação e diferentes protocolos de indução são relatados, e diversos fatores podem influenciar na ação diabetogênica da aloxana, dentre elas a concentração da droga, velocidade de infusão, dose, via de administração, dieta, tempo de jejum e peso do animal. Frente a esta diversidade de protocolos, este estudo teve como objetivo, comparar a indução do diabetes mellitus, usando

a aloxana a 2% em três diferentes doses em ratas Wistar.

Material e Métodos

Duzentos e dez ratas, da linhagem Wistar, adultas, com idade de 60 dias e peso médio de 180g, foram mantidas em caixas individuais de polietileno, em local com temperatura ambiente controlada (22°C ± 2°C) e fotoperíodo controlado (12h claro/12h escuro) com ração e água à vontade.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais. Grupo controle (GC n=30): recebeu solução de cloreto de sódio 0,9% intraperitoneal (ip); Grupo 1 (G1 n=60); Grupo 2 (G2 n=60) e Grupo 3 (G3 n=60) receberam aloxana diluída a 2% em solução de cloreto de sódio 0,9% ip, nas doses de 120mg/kg (FEDERIUK et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007), 150mg/kg (FEDERIUK et al., 2004; MAZZANTI et al., 2003) e 200mg/kg de peso corporal, respectivamente (BONGIOLO, 2008; FEDERIUK et al., 2004). Após jejum de 24 horas e administração de aloxana nos animais dos grupos experimentais, os mesmo foram alimentados normalmente e receberam uma solução de glicose a 10% via oral, como única fonte hídrica, durante 24 horas, e água sem glicose após este período. Segundo Mazzanti et al. (2003) e Zanoello et al. (2002), o fornecimento de glicose a 10%, é fundamental para evitar uma hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina que ocorre após a destruição das células β pancreáticas

Avaliou-se o percentual e número de animais diabéticos e de óbito nos momentos M7 (7 dias) e M14 (14 dias) (CAVALLI et al., 2007; LERCO et al., 2003). Para a verificação da glicemia, os animais foram submetidos previamente a jejum alimentar de 12 horas, e em seguida foram contidos em cone

acrílico de contenção para ratos, com exposição da cauda, onde foi feita uma pequena incisão, utilizando-se lâmina de bisturi, para a coleta de uma gota de sangue, a qual foi depositada diretamente na tira de leitura de glicose do glicosímetro Breeze 2-Bayer®. Foram considerados diabéticos, animais com glicemia de jejum em dois níveis de intensidade: diabetes moderado (DM), glicemia de jejum de 120 a 200mg/dL e diabetes grave (DG), glicemia de jejum acima de 200mg/dL (LERCO et al., 2003).

No M8 (8 dias) e M15 (15 dias), 12 animais de cada grupo, selecionados pelos maiores valores glicêmicos foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais, com alimentação e água à vontade e mantidos por 24 horas, para análise do volume urinário em mililitros (mL) e exame químico da urina (densidade, pH, glicose, urobilinogênio, corpos cetônicos, leucócitos, nitrito, proteína, bilirrubina, sangue oculto) por meio de fitas reagentes Combur-Test-UX. Todos os animais de cada grupo experimental foram submetidos à avaliação do peso corporal em gramas (g) utilizando balança digital, ingestão hídrica em mililitros (mL) e ingestão alimentar em gramas (g) no M8 e M15. Ao final do estudo todos os animais foram sacrificados por meio de injeção intraperitoneal de tiopental na dose de 100mg/kg (RHODEN et al., 2006).

Na análise estatística, para os parâmetros clínicos e laboratoriais empregou-se o teste de Análise de Variância para o esquema fatorial 2x3 (três grupos em dois momentos). Para comparar os efeitos observados nos momentos M7, M14 e M8, M15 dentro de cada grupo, empregou-se o teste t-pareado e teste de Wilcoxon. Para as variáveis não paramétricas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para provar se os percentuais de óbitos se distribuíam de forma homogênea em relação às três doses de medicamentos testadas, aos 7 e aos 14 dias. Adotou-se nível de significância de 5%.

Para confrontar os percentuais de animais diabéticos e percentual de animais não diabéticos e

animais que vieram a óbito, além dos percentuais de animais sobreviventes com diabetes moderado (DM) e diabetes grave (DG) aos 7 e 14 dias foi utilizado o teste exato de Fisher ou Qui-quadrado com contrastes pelo método de partição. Na partição do Qui-quadrado o nível de significância de 5% foi ajustado para 2,5% em razão das múltiplas comparações (PAGANO; GAUVREAU, 2004).

O estudo foi protocolado (43/09) e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição de origem e esta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

Resultados

Na Tabela 1 encontram-se os dados do número e percentual de animais diabéticos do G1, G2 e G3 no M7 e M14. Na Tabela 2 encontram-se os percentuais de animais com diabetes moderado e grave.

Tabela 1. Números e percentuais de animais diabéticos para o G1, G2 e G3 no M7 (7 dias) e M14 (14 dias) após administração de aloxana 2%.

Grupos	Diabéticos	
	M7	M14
G1 (120 mg/Kg) ^A	15 (25%)	9 (17,6%)
G2 (150 mg/Kg) ^B	13 (21,7%)	7 (13,7%)
G3 (200 mg/Kg) ^C	7 (20,0%)	0 (0%)

Tabela 2x3 - $X^2 = 3,68$, 2 g.l, $p = 0,1581$.

Fonte: Elaboração dos autores.

Com relação ao percentual de óbito, quando comparado os grupos no M7, observou-se diferença estatística significativa entre os mesmos, com maior percentual de óbito para o G3, seguido do G2 e G1. No M14 não houve diferença entre os grupos (Tabela 3). Na comparação entre momentos, dentro de cada grupo, diferença significativa ocorreu no G2 e G3 com maior percentual de óbito no M7 comparado ao M14 (Tabela 3).

Tabela 2. Números e percentuais de animais com diabetes moderado (DM) e diabetes grave (DG) para os animais sobreviventes, do G1, G2 e G3 no M7 (7 dias) e M14 (14 dias) após administração de aloxana 2%.

Grupos	DM		DG	
	M7	M14	M7	M14
G1 (120 mg/Kg) ^A	4 (6,7%)	6 (11,8%)	11 (18,3%)	3 (5,0%)
G2 (150 mg/Kg) ^B	5 (8,3%)	4 (11,4%)	8 (13,4%)	3 (5,0%)
G3 (200 mg/Kg) ^C	3 (5%)	0 (0%)	4 (6,7%)	0 (0%)

Tabela 2x3 - $X^2 = 0,71$, 2 gl, $p = 0,6993$

Partição do *Qui-quadrado*

B versus A: $X^2 = 0,43$, 1 g.l., $p = 0,5120$

B versus C: $X^2 = 0,28$, 1 g.l., $p = 0,5932$.

Fonte: Elaboração dos autores.

Tabela 3. Números e percentuais de óbitos para o G1, G2 e G3 nos M7 (7 dias) e M14 (14 dias) após administração de aloxana 2%.

Variável	Momentos	Grupos		
		G1 (120mg/Kg)	G2 (150mg/Kg)	G3 (200mg/Kg)
Óbitos	M7	9 (15%)Aa	25 (41,7%)Ba	42 (70%)Ca
	M14	7 (13,7%)Aa	3 (8,6%)Ab	5 (27,8%)Ab

Valores seguidos de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente.

Fonte: Elaboração dos autores.

Para os animais do GC a média da ingestão e G3 nos mesmos momentos houve aumento hídrica e alimentar no M8 foi de 32,8±9,5mL e significativo no consumo de água e alimento 13,5±1,8g, no M15 de 39,9±2,9mL e 16,7±5,2g caracterizando polidipsia e polifagia (Tabela 4). respectivamente. Para os animais do G1, G2

Tabela 4. Médias e desvios-padrões da ingestão hídrica/24h (ml) e alimentar/24h (g) para os animais do G1, G2 e G3 no M8 (8 dias) e M15 (15 dias) após administração de aloxana 2%.

Variáveis	Momentos	Grupos		
		G1 (120 mg/Kg)	G2 (150 mg/Kg)	G3 (200 mg/Kg)
Ingestão hídrica (ml)	M8	77,6 ± 21,4Aa	92,7 ± 30,9Ba	86,5 ± 21,6Aba
	M15	93,2 ± 19,1Aa	97,2 ± 24,4Aa	92,6 ± 21,4Aa
Ingestão alimentar (g)	M8	22,4 ± 4,6Aa	19,3 ± 5,9Ba	19,0 ± 5,1Ba
	M15	23,8 ± 4,6Aa	18,1 ± 5,3Ba	23,5 ± 5,3Aa

Valores seguidos de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente.

Fonte: Elaboração dos autores.

O aumento do volume urinário em 24 horas, ocorreu para os animais do G2, no M8, diferindo significativamente dos demais grupos, e no M15 diferindo do G3. Diminuição da densidade urinária

foi estatisticamente significativa para o G2 no M15 quando comparado ao G1 e G3. O pH urinário elevou-se em todos os grupos comparado ao controle (Tabela 5).

Tabela 5. Médias e desvios-padrões do volume urinário (24h) e parâmetros do exame químico da urina realizada com a fita Combur¹⁰ Test[®]UX para os animais do G1, G2 e G3 no M8 (8 dias) e M15 (15 dias) após administração de aloxana 2%.

Parâmetros avaliados	Momentos	Grupos		
		G1 (120 mg/Kg)	G2 (150 mg/Kg)	G3 (200 mg/Kg)
Volume urinário de 24h (mL)	M8	4,5 ± 1,9Aa	8,3 ± 3,6Ba	2,7 ± 1,6Aa
	M15	4,1 ± 1,8ABa	5,4 ± 2,5Aa	1,6 ± 1,3Ba
Densidade	M8	1013,2 ± 6,8Aa	1010,8 ± 7,9Aa	1011,7 ± 7,9Aa
	M15	1008,9 ± 8,9Aa	1000,0 ± 0,0Ba	1008,6 ± 8,0Aa
pH	M8	6,9 ± 0,9Aa	7,2 ± 1,2Aa	7,2 ± 0,9Aa
	M15	7,7 ± 1,3Aa	9,0 ± 0,0Ba	7,8 ± 1,2Aba

Valores seguidos de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente.

Fonte: Elaboração dos autores.

Na urina houve positividade de nitrito para o G2 no M8 diferindo dos demais grupos, sangue oculto nos três grupos no M8, com maior intensidade no G1, seguido do G3, G2 e glicosúria para o G1 e G2 no M8 e para o G1 no M15. Urobilinogênio, corpos cetônicos, leucócitos, proteína e bilirrubina foram ausentes.

Discussão

Nos protocolos de indução, a administração da aloxana intravenosa (iv) é mais frequentemente utilizada em ratos na dose de 40 a 65mg/kg (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003; CAVALLI et al., 2007; LERCO et al., 2003; SZKUDELSKI, 2001), mas quando administrada por via intraperitoneal ou subcutânea, a dose eficaz geralmente é de duas a três vezes maior (SZKUDELSKI, 2001). Soares, Costa e Cecim (2000) utilizaram a dose de 40mg/kg via intraperitoneal e observaram hiperglicemia moderada, enquanto Lerco et al. (2003) obtiveram

com a dose 42mg/kg via intravenosa severa hiperglicemia.

Autores relataram que a dose única de 120mg/kg de aloxana iv causou óbito em 70% dos animais nos primeiros dois dias após a indução, desta forma os mesmos abandonaram esta dose por esta via de administração e não a recomendam (FEDERIUK et al., 2004). Neste estudo, o menor índice de óbito observado foi de 15% sete dias após o uso de aloxana, utilizando a mesma dose de Federiuk et al. (2004), porém pela via intraperitoneal.

Szkudelski (2001) relatou ainda, que dose abaixo de 150mg/kg via ip, pode ser insuficiente para induzir o diabetes em ratos, necessitando de uma segunda dose. Entretanto, os achados deste estudo mostram a eficácia da dose de 120mg/Kg por esta via em ratos.

Estes fatos sugerem que doses mais elevadas e administradas por outras vias, que não a via intravenosa, podem atenuar a resposta hiperglicêmica no diabetes induzido com aloxana.

A redução no número de animais diabéticos ao longo do tempo no G1 e G2 (hiperglicêmicos no 7º dia e normoglicêmico no 14º dia) pode ter ocorrido por uma toxicidade inicial maior e posterior metabolização e eliminação da mesma; pela capacidade de recuperação de danos das células β das ilhotas pancreáticas como relato por Lenzen (2008) e Ribeiro, Oliveira e Mello (2007); ou devido a droga não ter atingido todas as células β , ficando uma população de células sem degenerar, principalmente pelo tempo de jejum adotado de 24h (questões éticas) e relatos de que a sensibilidade do animal à aloxana aumenta proporcionalmente ao aumento do tempo de jejum (CAVALLI et al., 2007; FEDERIUK et al., 2004; LERCO et al., 2003; SOARES; COSTA; CECIM, 2000; ZANOELLO et al., 2002).

À medida que se aumentou a dose da aloxana, houve aumento somente do índice de óbito, provavelmente pelo não monitoramento do grau de hidratação, temperatura e glicemia dos animais na primeira semana, relatado por Federiuk et al. (2004) como de grande importância para obtenção de maior número de animais diabéticos e menor incidência de óbito.

No estudo de Oliveira (2012), doses de 120 e 200mg/Kg de aloxana ip, associadas ao monitoramento dos animais na primeira semana, conforme indicado por Federiuk et al. (2004), induziu a 78,3% e 54,5% de animais diabéticos e 0% e 13,3% de óbito respectivamente, confirmando a importância do monitoramento dos animais durante o protocolo de indução do diabetes.

A avaliação dos parâmetros clínicos peso, ingestão hídrica, alimentar e diurese para obtenção de um diagnóstico mais preciso, é de suma importância, uma vez que nas primeiras horas da administração da aloxana pode ocorrer uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subsequentes (CAVALLI et al., 2007; LERCO et al., 2003; NOGUEIRA; MARCO, 2008;

RIBEIRO; OLIVEIRA; MELLO, 2007; SALES et al., 2010).

A diminuição do volume urinário no G3, pode ter ocorrido em consequência do óbito de alguns animais antes do momento da coleta, gerando uma média do volume total reduzido.

O pH alcalino, presença de nitrito e sangue oculto na urina relaciona-se possivelmente com a ocorrência de infecção urinária, bastante comum no paciente diabético e que deve ser monitorada para que não ocorra uma infecção ascendente nas vias urinárias e o desenvolvimento de insuficiência renal (JIDO, 2014). Pourghasem, Nasiri e Shafi (2014) relataram ainda que lesões estruturais não glomerulares ocorrem nos rins de pacientes diabéticos e que o diagnóstico é possível mesmo antes do aparecimento de distúrbios funcionais importantes.

Conclusões

Conclui-se que a aloxana a 2% nas doses de 120, 150 e 200mg/Kg induz experimentalmente o diabetes mellitus em ratas Wistar com alterações clínicas e laboratoriais bem caracterizadas. A dose de 120mg/kg administrada via intraperitoneal comparada às demais doses foi mais eficiente, por induzir os sinais clínicos e laboratoriais da doença em um maior número de animais com menor índice de óbitos.

Referências

- AHMAD, K. Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, Pakistan, v. 34, n. 2, p. 234-237, 2014.
- BEAGLEY, J.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; MOTALA, A. A. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. *Diabetes Research and Clinical Practice*, Belgium, v. 103, n. 2, p. 150-160, 2014.
- BONGIOLO, A. M. *Efeito do extrato hidroalcoólico de Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) sobre a hiperglicemia e dislipidemia de ratos diabéticos induzidos por aloxana.*

2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma.
- CARVALHO, E. M.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of *diabetes mellitus* in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 18, p. 60-64, 2003. Número Especial.
- CAVALLI, V. L. L. O.; SORDI, C.; TONINI, K.; GRANDO, A.; MUNERON, T.; GUIGI, A.; ROMAN JUNIOR, W. A. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 64-70, 2007.
- FEDERIUK, I. F.; CASEY, H. M.; QUINN, M. J.; WOOD, M. D.; WARD, W. K. Induction of type-1 *diabetes mellitus* in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comparative Medicine*, Portland, v. 54, n. 3, p. 252-257, 2004.
- JIDO, T. A. Urinary tract infections in pregnancy: evaluation of diagnostic framework. *Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation*, Nígeria, v. 25, n. 1, p. 85-90, 2014.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia*, Hannover, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.
- LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, A. S.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido por Aloxana em ratos. Estudo clínico e Laboratorial. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.
- MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais diabéticos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1061-1065, 2003.
- NOGUEIRA, R. M. B.; MARCO, V. Terapêutica das principais endocrinopatias em cães e gatos. In: ANDRADE, S. F. *Manual de terapêutica veterinária*. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 397-431.
- OLIVEIRA, D. M.; SANTOS, D.; SILVA, L. A. G. L.; NEIVA, C. M. Modulação do perfil lipídico e da glicemia de ratos diabéticos submetidos a treinamento anaeróbio de alta intensidade. *Investigação-Revista Científica da Universidade de Franca*, Franca, v. 7, n. 1, p. 53-60, 2007.
- OLIVEIRA, G. I. V. *Monitoramento da indução do Diabetes mellitus em ratos Wistar com aloxana em diferentes doses*. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente.
- PAGANO, M.; GAUVREAU, K. *Princípios de bioestatística*. São Paulo: Thomson Pioneira, 2004. 522 p.
- POURGHASEM, M.; NASIRI, E.; SHAFI, H. Early renal histological changes in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, Iran, v. 3, n. 1, p. 11-15, 2014.
- RHODEN, C. R.; MASLINKIEWICZ, A.; PEREIRA, M. S. M.; RHODEN, E. L. Eutanásia em animais de laboratório. In: RHODEN, E. L.; RHODEN, C. R. *Princípios e técnicas em experimentação animal*. Porto Alegre: UFRGS, 2006. p. 55-58.
- RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELLO, M. A. R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. *Motriz: Revista de Educação Física*, Rio Claro, v. 13, n.1, p. 72-77, 2007.
- SALES, A. L. C. C.; TEIXEIRA, J. M. R.; SOARES, L. F. M.; DAMASCENO, D. C. F.; ALMEIDA, I. P.; NUNES, P. H. M.; MARTINS, M. C. C. Dieta enriquecida em fibras e ácidos graxos poli-insaturados: efeitos no controle glicêmico e perfil lipídico de ratos diabéticos. *Ars Veterinária*, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 138-146, 2010.
- SHAH, A.; KANAYA, A. M. Diabetes and associated complications in the South Asian population. *Current Cardiology Reports*, Philadelphia, v. 16, n. 5, p. 1-16, 2014.
- SOARES, J. C. M.; COSTA, S. T.; CECIM, M. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com *Diabetes Mellitus* aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium Jambolanum*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 113-118, 2000.
- SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, Prague, Czech Republic, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.
- ZANOELLO, A. M.; MAZZANTI, C. M.; GINDRI, J. K.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra *Diabetes mellitus* induzido por aloxana em ratos. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, Buenos Aires, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2002.

