

12
24m

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGIA

ESTADO DE GUERRERO
SECRETARIA DE SALUD
SECRETARIA DE EDUCACION
SECRETARIA DE ECONOMIA
SECRETARIA DE AGRICULTURA



**EFFECTOS DE LA L-ARGININA Y L-LISINA EN PANCREAS
Y GLANDULA PAROTIDA DE RATAS DIABETICAS
POR ALOXANA**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

LUCY LILIANA ALVAREZ PANTOJA

MEXICO, D. F.

1994

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO

**DR. JOSE DOMINGO MENDEZ
DOCTOR EN CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**DRA. SANTA PONCE
DOCTORA EN PATOLOGIA.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN
ENFERMEDADES METABOLICAS. C.M.N. SIGLO
XXI BAJO LA SUPERVISION DEL DR. EN C: JOSE
DOMINGO MENDEZ.

Y EN EL LABORATORIO DE PATOLOGIA DE LA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA DIVISION DE
ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION BAJO
LA SUPERVISION DE DRA. EN P: SANTA PONCE.

Todo lo que puedo me ha sido otorgado de antemano, porque lo que espero me mueve a superarme
¡Gracias Señor por TODO!

A mis padres:

Por su gran apoyo, estímulo y ejemplo que en todo momento me brindaron para lograr una de mis metas mas valiosas.

A mis hermanos:

Por su confianza y paciencia depositadas en mí para sentirme capaz de seguir adelante durante todos mis estudios.

A mis amigos:

por su apoyo incondicional

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por darme la oportunidad de pertenecer a ella.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
Generalidades	1
Objetivo.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17
Selección de ratas Sprague Dawley	17
Inducción de diabetes experimental	17
Control de peso	17
Niveles de glucosa en sangre total.....	17
Tratamiento con aminoácidos.....	18
• Sacrificio de animales.....	19
Determinación rápida de peso seco	20
Determinación rápida de proteínas.....	23
Determinación rápida de DNA	25
Determinación rápida de RNA.....	28
Esquema de trabajo	30
Procesamiento de tejidos para la obtención de cortes histológicos ..	31
RESULTADOS	32
DISCUSION.....	51
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	55

INTRODUCCION

DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es un síndrome heterogéneo clínico, genético e inmunológico que afecta el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas¹.

Se reconocen dos tipos de diabetes mellitus clínicamente manifiesta. La diabetes mellitus tipo I y la diabetes mellitus tipo II (variedad obeso y no obeso)².

Generalidades:

En los pacientes que no presentan una hiperglicemia en ayunas, la prueba de tolerancia a la glucosa puede ser usada para el diagnóstico de la diabetes. Esto consiste en determinar los niveles de glucosa en sangre en un estado de ayuno y durante dos horas con intervalos de treinta minutos. En el paciente diabético, la glucosa en sangre podría alcanzar un nivel más alto y permanece elevado por periodos de tiempo prolongado, dependiendo de la severidad de la enfermedad. Sin embargo muchos factores pueden contribuir a una respuesta anormal de la prueba de tolerancia a la glucosa. El paciente tiene que haber consumido una dieta alta en carbohidratos tres días antes. Casi cualquier infección y menor estrés (probablemente por los efectos en el sistema nervioso simpático) puede dar como resultado una respuesta anormal de la prueba de la tolerancia a la glucosa. Porque la elevación de los niveles de la glucosa en ayuno es uno de los criterios de diagnóstico de diabetes.

Las células blanco en el estado diabético disminuyen la utilización de la glucosa. Ya que se requiere insulina para que esos tejidos utilicen este carbohidrato. Esto sucede si el paciente diabético tiene deficiencia de insulina o ha desarrollado "resistencia a la insulina"

La resistencia a la insulina puede deberse a una anomalía del receptor de insulina o en pasos subsecuentes intermediarios a los efectos metabólicos de la hormona³.

Páncreas:

De acuerdo a Gepts LeCompte hay tres tipos de islotes presentes en el páncreas de la Diabetes Mellitus Insulinodependiente (IDDM) islotes pseudoatróficos, hiperactivos, e islotes PP.

Los islotes pseudoatróficos se han visto en caso de duración clínica corta, son distintos, regulares. Están compuestos de células pequeñas con grandes núcleos. Con la técnica inmunocitoquímica las células A, D, B son demostradas. Los islotes hiperactivos están raramente presentes en el niño diabético bajo dos años de edad, se presenta solamente en diabetes de menos de 10 años de duración. Los islotes PP son compuestos de células secretorias de polipéptido pancreático y se encuentran en la cabeza pancreática dorsal.

Fibrosis del islote: La fibrosis del islote se ha descrito en casos crónicos de IDDM cuando se presenta ocurre primordialmente en los islotes atróficos en general, la célula acinar adyacente está generalmente atrofica. Fibrosis en el islote generalmente está correlacionada con una deficiencia en la secreción del páncreas exócrino en 80% de los pacientes con IDDM.

Glándulas Salivales:

La función exócrina digestiva de las glándulas salivales se ha estudiado ampliamente, se han realizado estudios que permiten sospechar que también ejercen otras funciones, descubrimientos que hacen pensar que las glándulas salivales sean órganos con una función doble, una digestiva y la otra probablemente endócrina, su situación como glándulas anexas al aparato digestivo y su estructura anatómica las hacen muy parecidas a la glándula pancreática, que tiene esa función doble. En tanto este órgano tiene un aparato endócrino bien definido en los islotes de Langerhans. En las glándulas salivales parece existir solamente el aparato exócrino.

Apartir de 1936 Werle y Roden, descubrieron concentraciones elevadas de calicreina en las glándulas submaxilares, esta substancia fué la primera de una larga serie de polipéptidos biológicamente activos, se han identificado hasta el momento 27. Uno de estos es el glucagon, o substancia semejante al glucagon (SSG) que se ha identificado en las glándulas salivales de varias especies, incluyendo al hombre^{4 5 6 7}

Se ha sugerido que la SSG de las glándulas submaxilares (GSM), puede ser la fuente del glucagon persistente en la sangre de ratas pancreatectomizadas y evisceradas, pero con un hígado funcional. Esta substancia compite de manera eficaz el glucagon pancreático por la unión con sus receptores específicos de las membranas plasmáticas del hígado de rata.

Según Kelly y col, las glándulas submaxilares de las ratas machos contienen tres veces mas SSG que las ratas hembras⁹

1960 Godlowsky y cols, demostraron que después de una extirpación total bilateral de la glándula submandibular y sublingual realizada en 5 perros produjo un incremento significativo de sensibilidad a la insulina⁹.

1971 Godlowsky. Atribuyó, la fuente del glucagon en la glándula submandibular no puede excluir la posibilidad de que la glándula participe en la regulación del metabolismo de carbohidratos¹⁰.

Hoshino demostró el efecto hipoglucemiante de la atrofia glandular secundaria a la ligadura de los conductos excretores de la glándula submaxilar en ratones sanos¹¹.

Godlowsky¹⁰ Practicó la extirpación bilateral de las glándulas submaxilares y sublinguales en 65 pacientes diabéticos y observó que en dos de ellos la curva de tolerancia a la glucosa volvía a la normalidad, y que en 38 los requerimientos de insulina se reducían notablemente, en tanto que en los 25 pacientes no ocurría ninguna mejoría.

Hasta la fecha no se cuenta con ninguna demostración histoquímica convincente de alguna célula productora de glucagon.

Lawrence y col 1976, demostraron con técnicas inmunoreactivas que de los extractos de homogeneizados de glándulas salivales de rata, ratón, conejo y humanos contienen una cantidad significativa de un material semejante al glucagon⁶.

Sin embargo Cluter y col¹² informaron algunos cambios morfológicos en los conductos y células acinares de ratas tratadas con estreptozotocina. Todos estos datos indican la posibilidad de que efectivamente existen células especializadas encargadas de la síntesis de glucagon en las GSM.

Smith y col,(1984) hacen un estudio inmunocitoquímico de material semejante a la insulina en glándula parótida de rata. Ellos sugieren que la glándula parótida puede ser una fuente importante de insulina extrapancreática¹³.

El metabolismo de los carbohidratos es afectado por acción antagónica de la insulina. Se ha demostrado recientemente que la glándula parótida de roedores y humanos contiene un péptido semejante a la insulina^{14 15}.

Se ha confirmado por Lawrence y col⁶ y otros^{16 17 18 19} en contraste a la glándula submandibular, solo cantidades insignificantes de Glucagon o material semejante al glucagon (IRG) son encontradas en la glándula parótida y sublingual.

Ha sido reportado por Birnkrant²⁰ una marcada hipoglicemia como resultado de una parotidectomía bilateral en ratas. No encontró cambios histológicos en el hígado páncreas y testículos, y concluyó que la glándula parótida tiene que elaborar una substancia que actúa antagónicamente a la insulina. Sin embargo Zimmerman²¹ ha reportado que la extirpación de la glándula parótida no produce cambios consistentes de glucosa sanguínea en perros.

Se ha reportado recientemente que una sobredosis de arginina suprime el crecimiento de tumores experimentales^{22 23 24}

Mizunuma y col²⁵ Han demostrado el efecto del exceso de arginina puede ser debido al desbalance de aminoácidos y la consecuente disminución de síntesis de proteínas en las células acinares, Además han confirmado que se pueden producir alteraciones marcadas con un exceso de arginina no solo en el tejido pancreático sino también en el tejido adiposo.

Reaven y colaboradores: Han demostrado que la secreción insulínica por las células β en respuesta a la arginina declina con la edad.

Nogowski y col, demostraron el efecto del estímulo en la secreción de insulina que tiene la arginina administrada a conejos ya sea por vía intravenosa o por vía oral.

Los efectos estimulantes para la secreción de insulina de los aminoácidos in vivo e in vitro difieren dependiendo de la especie y el aminoácido utilizado

MANIFESTACIONES DE LA DIABETES MELLITUS EN LA CAVIDAD BUCAL

Las implicaciones de este síndrome en el aparato estomatognático es fundamental la odontopatía diabética, con el desarrollo de procesos infecciosos

hasta alteraciones funcionales que producen un impedimento en la masticación y deglución y consecuente en el proceso de nutrición.

Se ha comprobado la presencia de anomalías en el funcionamiento de las glándulas salivales en pacientes con diabetes mellitus tipo I, semejante a las alteraciones que característicamente ocurren en el Síndrome de Sjogren, así como crecimiento asintomático de las glándulas salivales submaxilares y parótidas.

Una de las manifestaciones más frecuentes de la diabetes es la xerostomía, se cree que es un reflejo de la deshidratación general que se presenta en individuos no controlados. Se ha encontrado que en diabéticos no tratados el flujo salival es reducido y que no hay anomalías cuando este es estimulado. Además de la xerostomía, inflamación e hipertermia de la mucosa y pérdida de papilas filiformes de la lengua, así como nódulos xantomatosos similares a los de la piel en el xantoma diabeticorum²⁶.

Las manifestaciones bucales de la diabetes comprenden, además de las periodontales; xerostomía, lengua ardiente mal gusto y mayor predisposición a las infecciones por candida albicans.

Faulconbridge y col 1981: Recientemente se ha demostrado que los diabéticos infantiles con la enfermedad bien controlada tienen más gingivitis que los controles correspondientes sin diabetes

Cohen y col 1970: Demostraron en adultos en un estudio longitudinal, que en pacientes con diabetes controlada tienen más gingivitis y pérdida de inserción epitelial que los no diabéticos.

La mayoría de las alteraciones pueden ser explicadas por la microangiopatía que implica un engrosamiento de las paredes vasculares y membranas basales con material PAS positivo.

GLUCOSA EN LOS FLUIDOS BUCALES

Los niveles elevados de glucosa sanguínea también se reflejan en los fluidos de la boca. Cuando se da una carga de glucosa, la concentración también aumenta en la saliva de la parótida. Los niveles de glucosa en saliva de individuos no diabéticos se encuentra entre 0.2 y 3.3 mg/dl, mientras que en los diabéticos estos valores son del doble (0.45 - 6.3 mg/dl).

Se ha demostrado también que hay una relación casi 1:1 entre los niveles de glucosa del plasma y el fluido crevicular gingival. En base a esto, se ha postulado que los niveles altos de glucosa y la disminución del flujo salival puede influir en la incidencia de caries, tanto en humanos, como en animales.

ALTERACIONES DENTARIAS

En hijos de madres diabéticas se han descrito alteraciones en la mineralización de la dentición primaria e hipoplasia simétrica del esmalte hasta en un 40% comparado con un 5% en niños normales.

El hallazgo reciente de que hay un riesgo mayor de que los hijos de madres diabéticas que son pobremente controladas al inicio del embarazo, (determinado esto por los niveles de hemoglobina glucosilada (HbGLA1c) durante el primer trimestre, ha sugerido que puede también haber una correlación entre los defectos dentales congénitos y el grado de control diabético durante la gestación²⁶.

CAMBIOS MORFOLOGICOS

En crías de ratas y ratones se han detectado malformaciones del esqueleto como la micrognatia la palatosquisis y la agnatia²⁷.

En ratas machos a los que se induce diabetes con aloxana. El consumo de alimento es significativamente mayor (53%) que en los controles después de tres días de experimentación. Su peso corporal disminuye. En contraste, el peso de la glándula parótida y su contenido de RNA y DNA no presentan diferencias significativas.

En los ductos acinares se forman grandes vacuolas intracelulares de contenido lipídico, así como numerosas imágenes mitóticas²⁸ ²⁹ En animales tratados con estreptozotocina. El peso promedio de la glándula submandibular disminuye, aunque la relación peso -glandular peso- corporal se incrementan debido a la pérdida de peso característica en los animales afectados por la diabetes³⁰.

En las ratas hembras tratadas con aloxana se observa retraso significativo en el crecimiento corporal, así como en las glándulas submandibulares, parótidas tiroideas y adrenales. El crecimiento de la glándula

submandibular de animales inmaduros cesa casi por completo, mientras que la parótida continua creciendo en forma anormal después de la inducción de la diabetes. Cuando los animales son tratados diariamente con dos unidades de insulina el peso de la glándula parótida es similar al de los controles.

Histologicamente, las dimensiones de las células acinares de la parótida de las ratas diabéticas son más pequeñas que las de los animales intactos tratados con insulina. Pero cuando el tratamiento se hace con tres unidades de insulina, las dimensiones celulares son mayores³¹.

CAMBIOS BIOQUIMICOS E INMUNOLOGICOS

En ratas machos con diabetes inducida con estreptozotocina se ha detectado disminución en la actividad de la enzima prolil-hidroxilasa, indispensable para la síntesis de colágena, manifestándose histologicamente por adelgazamiento de la membrana basal que permite la exacerbación del daño ocasionado por la enfermedad periodontal en el tejido conjuntivo adyacente al epitelio de la unión en la base del saco gingival³². Se ha observado también que cuando se induce diabetes con aloxana, los niveles de amilasa glandular disminuyen, mientras que los de peroxidasa no se afectan. El contenido de proteína salival no muestra diferencias entre diabéticos y no diabéticos^{28,29}.

En hámsters dorados machos también disminuyen significativamente la actividad de la amilasa salival y de algunos factores salivales antimicrobianos una semana después del tratamiento con estreptozotocina. El nivel total de la proteína disminuye significativamente (44%) dos semanas después de la inducción. Las actividades de lisozima y lactoperoxidasa disminuyen en 56 y 53% respectivamente después de una y dos semanas, mientras que los niveles de lactoferrina se incrementan a las cuatro semanas, (31%). La administración de insulina no revierte completamente la actividad de estas enzimas, ni afecta el nivel de lactoferrina. Por lo que se alteran los mecanismos de defensa contra las infecciones de la cavidad bucal producida por estreptococos (*S. mutans*, *S. pneumoniae*), lactobacilos, hongos (*candida*) y enterobacterias (*E. coli*, *V cholerae*)³³.

La administración de estreptozotocina induce una reducción significativa en el contenido de insulina, tanto en páncreas como en glándula parótida¹³.

Un signo común oral de diabetes mellitus es un incremento en la severidad de la enfermedad parodontal^{34,35}.

Takai y col, 1986 en su estudio demostraron que la diabetes por estreptozotocina, aumenta la susceptibilidad a la acumulación de placa y a la profundidad de las bolsas parodontales en ratas Sus, en un periodo relativamente corto. Los hallazgos histológicos indicaron que la inflamación gingival fué más severa y extensa en ratas Sus diabéticas³⁶.

Ramamurty y Golub (1985) reportaron que la actividad de la colagenasa y la pérdida de colágena aumentan en el tejido gingival de las ratas diabéticas por estreptozotocina, las cuales están reconocidas como un modelo apropiado para diabetes insulino dependiente. Esos estudios sugieren que las anomalías de los procesos fisiológicos en el tejido huésped son factores importantes en la disfunción gingival en la diabetes³⁷.

Takai y col, 1983: Reportaron que debido a que el ambiente bucal se ve influenciado en gran medida por la saliva, la disminución de secreción salival en ratas diabéticas puede ocasionar una severidad aumentada de la gingivitis³⁸.

Azuma y col, 1979; demostraron que: la placa fué el factor principal de la profundidad de bolsas en ratas Sus diabéticas, y que esta tiene alguna actividad tóxica y puede iniciar una reacción inflamatoria en el tejido periodontal³⁹.

DIABETES EXPERIMENTAL

El uso de animales representa enormes ventajas para el estudio de la diabetes, en un periodo corto, además permite el estudio de factores hereditarios y ambientales. Por regla general primero se tiene que experimentar en animales, una vez comprobado y rigurosamente analizados las observaciones hechas en estos animales pueden ser aplicadas al hombre.

DIABETES ESPONTANEA

La diabetes espontanea entre los animales es relativamente común. El primer caso fué descrito en 1851 en un mono. Esta enfermedad se presenta en una gran variedad de especies animales entre ellos perros, gatos, caballos, ganado ,cerdos, ovejas cabras y otros animales domésticos y silvestres. Los

datos de mamíferos superiores son escasos, solo algunos perros, gatos y unos cuantos primates han sido estudiados en detalle.

Los pequeños roedores de laboratorio, por su cantidad y bajo costo han proporcionado gran cantidad de información^{28,29, 40 41 42 43 44}.

El ratón obeso fué descubierto como una mutación espontánea autosómica recesiva en el año de 1949. Es ligeramente hiperglucémico, hiperinsulinémico y marcadamente obeso.

La mayoría de síndromes de diabetes espontánea en animales se caracterizan por hiperglucemia y por lo menos hiperinsulinemia transitoria.

Se hizo una investigación en ratas BB Wistar genéticamente diabéticas. Se compararon los efectos liberadores de insulina de glucosa por administración de arginina en los páncreas perfundidos de ratas BB Wistar moderadamente diabéticas. Las ratas BB estaban hiperglucémicas y se hicieron insulín dependientes pero tenían algunas reservas de insulina (6% del contenido pancreático). La glucosa (27.7 mM) fracasó en la liberación de insulina de los páncreas diabéticos mientras por el contrario, la arginina (8 mM) provocó un aumento en la secreción de insulina. Las relaciones entre la respuesta de los páncreas diabéticos y normales fueron incrementados respectivamente.

Concluyendo que la pérdida selectiva de los efectos de la glucosa sobre las secreciones de las células alfa y beta están asociadas con el estado diabético⁴⁵

A semejanza del humano la obesidad predispone a la diabetes mellitus. Los síndromes de hiperglucemia, hiperinsulinemia y obesidad son comunes entre los roedores de laboratorio. En general tienden a ser marcadamente obesos y a mostrar reversión espontánea de su diabetes.

Efectos de la dieta

La abundancia calórica parece facilitar el desarrollo de obesidad, y diabetes en humanos. En algunos roedores también se ha demostrado que los factores ambientales facilitan el desarrollo del síndrome, cuando consumen muchas calorías sufren marcadas consecuencias metabólicas y cerca del 1/3 de

los animales se presenta hiperfágicos, hiperinsulinémicos y ligeramente hiperglucémicos.

Diabetes inducida:

La inducción de la diabetes ha sido lograda por diversas técnicas experimentales. La pancreatectomía condujo a la diabetes y fué una observación clave en el estudio de esta enfermedad. En la actualidad los avances científicos y tecnológicos permiten la realización de estudios inclusive a nivel molecular.

La hormona epinefrina estimula la gluconeogenesis y los glucocorticoides y la somatotropina, tienen un efecto antagonista sobre la insulina. Cuando están presentes en exceso como una respuesta al estrés, o como una consecuencia patológica de un tumor, u otros desajustes metabólicos, la tolerancia a la glucosa es reducida pudiendo presentarse hiperglucemia. La epinefrina y el glucagon ejercen el mismo efecto contra la insulina en animales y humanos, cuando se administran en exceso también la administración de hidrocortisona y hormona adenocorticotrópica inducen hiperglucemia e hiperplasia de las células beta.

Inducción química:

El uso de agentes químicos para producir diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos, hormonales y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético.

Existen varias clases de agentes químicos. Las primeras son sustancias tóxicas células-específicas que destruyen a las células beta y causan un estado de deficiencia primaria de insulina. El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre células beta pero no las destruyen. una tercera clase incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan el páncreas y como consecuencia se presenta la diabetes. este último grupo incluye a las hormonas contra insulina, anticuerpos anti-insulina y algunos agentes quelantes, particularmente el zinc.

Los dos agentes que han sido más ampliamente usados son la aloxana y la estreptozotocina. Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células beta. Solamente en el hámster chino se ha

sugerido que la estreptozotocina puede dañar a la célula alfa además de la beta.

Aloxana

Es un derivado del ácido úrico, con la fórmula empírica $C_2H_2N_2O_4$. Desde hace muchos años se desconoce la actividad diabética de esta sustancia, el mecanismo de acción es aún desconocido. Algunas evidencias indican que el efecto inicial de la aloxana es mediado de alguna forma por una interacción a nivel de membrana de la célula beta. Otros estudios en los que se han utilizado aloxana marcada con ^{14}C han revelado que hay una alta afinidad del fármaco por las membranas de las células del islote. Existen también evidencias en los cambios de permeabilidad de la membrana que podrían explicar la necrosis selectiva.

Un aspecto muy importante es la ausencia de respuesta a la aloxana en el ratón. Se ha encontrado que las células beta de este animal carecen de zinc, esto evita que haya acción de esta droga. En ocasiones puede no producirse diabetes en animales en dosis recomendables, esto puede ser debido al uso de preparaciones "envejecidas" de aloxana. Algunos reportes indican que el uso de esta sustancia que se ha mantenido almacenada por períodos de cinco años o más, puede causar falla renal y muerte temprana antes de que aparezcan signos patognomónicos de diabetes, esto se ha atribuido a contaminantes que resultan de su oxidación (color rosa)²⁶.

Malaisse⁴⁶ ha revisado críticamente el dato en el mecanismo de la toxicidad de la aloxana concluyendo que todo el efecto de deterioro de aloxana en permeabilidad, transporte, rutas generadoras de energía intracelular, y secreción insulínica es más probable debido a la formación de radicales libres.

Okamoto y col⁴⁷, investigaron un concepto para el mecanismo uniforme y la acción de la aloxana y la estreptozotocina, y las moléculas similares. Ellos consideraron la fragmentación del DNA en las células β como un evento crucial. Causado por acumulación de su peróxido y radical OH y/o alquilación DNA. Las rupturas en las hebras del DNA son responsables del deterioro de la síntesis y secreción de insulina.

Esto inicia inmediatamente los procesos de reparación que involucran la activación de polí (ADP-ribose) sintasa y el empleo asociado de NAD.

Okamoto y col ⁴⁶, mantienen que la disminución del NAD es tan precipitada que llega a ser irreversible y resulta en la interpretación virtual de la energía dependiente del NAD, metabolismo de proteínas y la necrosis celular. Este concepto unificado está apoyado fuertemente por los efectos preventivos de la suplementación de la nicotinamida y la traslación de los radicales libres por varios limpiadores, tanto para la aloxana como para la STZ, los cuales inhiben la actividad del ADP-ribose-synthase (fig. 1).

Es intrigante que estos eventos tóxicos ocurran selectivamente en las células β . Se pueden hacer varias suposiciones: alta afinidad de la aloxana y la estreptozotocina por la membrana de la célula β ⁴⁶, relacionada con la sensibilidad excesiva de las células β . hacia la glucosa. Estas células asimilan mitades semejantes a la glucosa de moléculas de aloxana y estreptozotocina a concentraciones mas altas que en otras células. Las análogas de estreptozotocina con la mitad de la glucosa substituida por otras hexosas que no fueron efectivas. los grupos SH únicos para la membrana de la célula β . Pueden suministrarle especialmente sensibilidad para la interacción oxidativa con las citotóxicas. Las células β pueden tener una baja capacidad por los radicales libres. y una baja actividad de la glutation peroxidasa como lo propuso Malaisse ⁴⁷.

Abdel y col ⁴⁸ hicieron una investigación de los efectos de superóxido dismutasa (SOD) que reduce la nicotinamida adenina dinucleotido (NADPH) este tratamiento en las células β aislando los islotes de la rata antes del tratamiento de la aloxana. La aloxana disminuyó la secreción de la insulina al 35% del control. (SOD) incrementó este nivel a 73% de los valores control. El (NADPH) no provee ninguna protección a los islotes (fig. 1).

La administración de aloxana es más efectiva por vía intravenosa en una dosis de 40 a 45 mg/kg. Esto produce daño reversible de función de las células beta. Dentro de minutos y cambios estructurales dentro de horas en la mayoría de los roedores, perros, gatos, y conejos, chimpancés, ovejas, peces y pájaros. la aloxana puede ser derivada dentro de tres fases: hiperglicemia aproximadamente pasando dos horas, probablemente debido a la glucogenolisis del hígado, seguido por hipoglicemia transitoria., hasta aproximadamente 6 horas, debido a la no secreción de insulina desde el daño celular, después de comenzar hiperglicemia hasta 12 horas. La fase hipoglicémica puede ser completamente severa, y la aloxana no es dada en animales en ayuno. La hiperglicemia inicial y no esencial por acción citotóxica puede ser abolida por pretratamiento con p- hidroximercuribenzoato, D- mancoheptulosa, o difenilhidantoina.

MECHANISM OF ACTION OF ALLOXAN

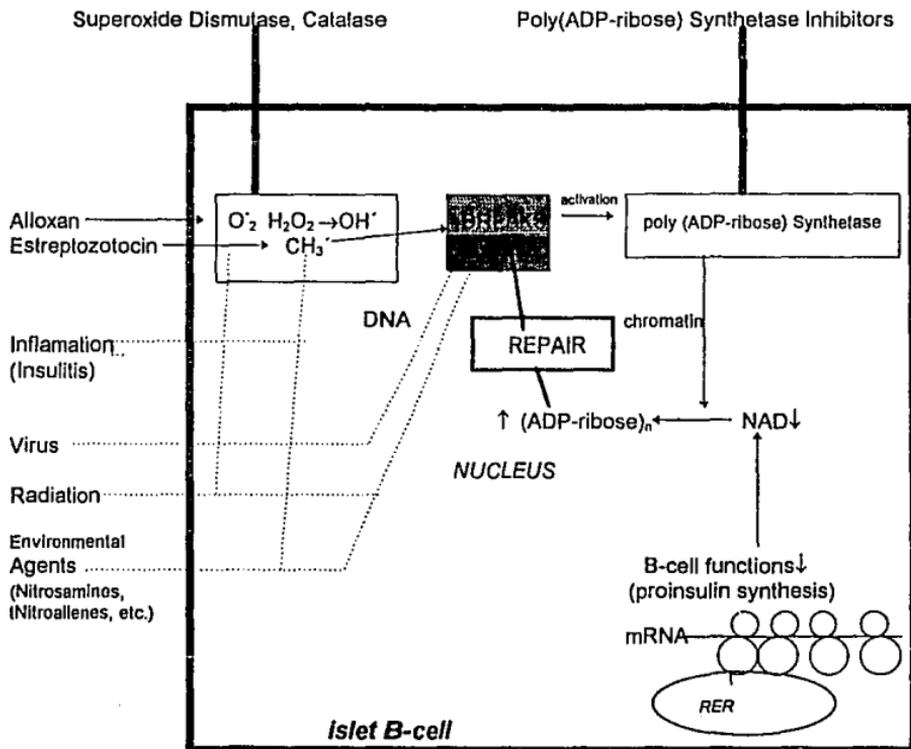


FIG.1

Varios tratamientos previenen el daño de la célula β in vivo, aparentemente por diferentes mecanismos. Alcalosis metabólica, inducida con bicarbonato de sodio o lactato antes a la aloxana, mientras la leucina es activa para ambos antes e inmediatamente después de la administración de la aloxana. (El mecanismo de protección es a través de la glucosa hasta ser asociado con células β a través de la membrana de transporte o glucoreceptor de sitio) Sin embargo recientes experimentos en los cuales la glucosa fué más efectivo que 3-O- metilglucosa, sugieren que la protección mediada por la glucosa está relacionada al metabolismo intracelular más que a la acción extracelular.

Los cambios metabólicos en la diabetes inducida por aloxana son similares a otras condiciones de deficiencia de insulina y son también revisados con aquellos animales diabéticos por estreptozotocina⁴¹.

Estudios previos^{28,29} Han demostrado un efecto de diabetes por aloxana e insulina in vivo en el crecimiento y desarrollo de glándulas salivales de rata.

Anderson y Johnson²⁹ reportaron que la saliva parotidea coleccionada de ratas diabéticas exhiben cambios desproporcionantes en los niveles de varias proteínas comparada con la saliva de las ratas control.

Los efectos de la diabetes por aloxana en la glándula parótida de rata pueden ser similares a los efectos en el páncreas exócrino, en los cuales hay alteraciones.

Por lo tanto la diabetes por aloxana puede resultar en un rompimiento de la estimulación neural del simpático o parasimpático de la parótida de la rata. Además esta hipótesis es más apoyada por los efectos causados por la diabetes por aloxana en la composición proteínica de la saliva parotidea en la rata; apesar de un incremento en la masticación, los efectos no paralelos de la diabetes en las proteínas salivales de la parótida²⁹.

Estreptozotocina

Es un antibiótico extraído de *Streptomyces acromogenes* y preparado en forma altamente pura. Su peso molecular es 265 con la fórmula empírica $C_8H_{13}N_3O_7$ conteniendo una función N-nitrosometilamida⁵⁰.

Reportes previos han tratado con una caracterización preliminar la acción diabetogénica de la estreptozotocina descubierta por Rakietyen, Rakietyen y Nadkarni en 1963⁵¹ reportaron que la estreptozotocina es diabetogénica, desde entonces esta administración intravenosa condujo hasta diabetes en perros y ratas. En los estudios histológicos, ellos atribuyen a diabetes un daño a las células β -pancreáticas.

Sin embargo Evans *et al*⁵² mientras confirman la acción diabetogénica, sugieren que puede no resultar el daño permanente o necrosis de las células- β . Pero antes de una inhibición de producción y/o secreción de insulina. Similarmente, Arison *et al*⁵³ de estos estudios han concluido, incluyendo la microscopía electrónica, que la estreptozotocina produce degranulación de las células β con auto necrosis.

Se ha demostrado que la acción diabetogénica de la estreptozotocina resulta principalmente de su alta y específica acción citotóxica sobre las células β de los islotes de Langerhans con necrosis rápida e irreversible. Aún mas se ha sugerido que la intensidad del daño a las células β podría ser graduado de acuerdo a la dosis utilizada.

Resultados recientes confirman la pérdida de la acción diabetogénica de la STZ mediante el pretratamiento con nicotinamida⁵⁴. Es muy interesante que la STZ se conoce ahora como derivado de N-nitroso de glucosamida⁵⁵

Es una sustancia química relativamente selectiva para las células β que en algunas especies de animales causa diabetes permanente. La estreptozotocina reduce el NAD celular en varios tejidos y esto afecta particularmente dañando y necrozando las células β . La nicotinamida, es el precursor del NAD protege a la diabetes por estreptozotocina. La nicotinamida protege a los animales contra la citotoxicidad tanto por estreptozotocina como por aloxana, Los efectos de la aloxana pueden ser prevenidos por carbohidratos siendo la 3-O-metil glucosa la más afectiva³ (fig.1)

Hand y cols, indujeron diabetes por estreptozotocina en una dosis 65 mg/kg, en ratas machos Long- Evans encontrando cambios de 4 horas hasta 1 año después de la inducción de la diabetes⁴⁰.

Junod, y cols⁴¹ han demostrado que la intensidad del daño de las células β podría ser graduada de acuerdo a la dosis utilizada, la severidad del estado diabético fué relacionada con la dosis de administración de STZ. Resultados recientes confirman la pérdida de la acción diabetogénica de la STZ mediante el pretratamiento con nicotinamida; ya que la estreptozotocina reduce el contenido del NAD celular en varios tejidos y esto afecta particularmente dañando y necrozando las células β . La nicotinamida es el precursor del NAD, protege a la diabetes contra la estreptozotocina.

OBJETIVO:

La presente investigación tiene como objeto fundamental evaluar el efecto de la L-arginina y L-lisina en páncreas y glándula parótida de ratas diabéticas por aloxana. Además de estudiar las alteraciones de las glándulas salivales en la diabetes experimental, con la idea de que los resultados que aquí se obtengan sirvan como estudios preliminares que serán aplicados para seguir una línea de investigación destinada a encontrar de que manera los aminoácidos contribuyen al tratamiento de la diabetes mellitus.

MATERIALES Y METODOS

1. SELECCION DE RATAS SPRAGUE DAWLEY:

Se realizó una investigación , en donde se tomaron como muestras 30 ratas machos Sprague Dawley con un peso de 340-380 g. Los cuales fueron repartidos en cuatro grupos para la inducción química de diabetes por aloxana, repartido de la siguiente forma:

- Grupo I Grupo control.
- Grupo II Grupo diabético sin tratamiento.
- Grupo III Grupo diabético tratado con L- arginina.
- Grupo IV Grupo diabético , tratado con L- lisina.

Los animales fueron criados en la misma colonia y fueron alimentados con agua y dieta normal.

2. INDUCCION DE DIABETES EXPERIMENTAL

La diabetes se indujo con una sola inyección intraperitoneal de monohidrato de aloxana en una dosis de (185 mg /kg) en solución salina fría (ajustando su pH 4)²⁹ En respuesta de este estudio los animales demostraron poliuria polidipsia y niveles de glucosa en sangre total mayores que 300 mg/dl. Los niveles de glucosa en sangre total son determinados mediante el uso de un GLUCOMETER II, la prueba se hizo cada tercer día.

3. CONTROL DE PESO

Los 30 animales fueron pesados diariamente de 9-10 A.M (Tabla 1) (Figura.6),utilizando la balanza del bioterio.

4. NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE TOTAL

La prueba de glucemia se hizo: quitando el día anterior el alimento para hacerlo en condiciones de ayuno. La prueba se hizo de 9 - 10 1/2 A.M., cortando la punta de la cola de la rata para obtener una gota de sangre que se depositó directamente sobre la tira reactiva y esta inmediatamente en el glucómetro. Los valores de glucosa están reportados en (Tabla 2) (Figura 7).

Principio químico del procedimiento:

La reacción de las áreas reactivas de valores bajos y altos del DESTROSTIX II se basan en la acción de la enzima glucosa-oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa de la sangre por el oxígeno de la atmósfera produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el peróxido de hidrógeno en presencia de la peroxidasa oxida la forma reducida de la orto- toluidina, produciendo en el área de valores bajos, tonos de color verde cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa, sobre el área de valores altos, con la presencia de la peroxidasa. La aminoantipirina y el sulfonato de dicloro hidroxibenceno en su forma reducida, son oxidados por el peróxido de hidrógeno, produciendo tonos de color anaranjado cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa en sangre.

Reactivos:

Cada 100 mg de reactivos contienen:

Area de valores bajos: Glucosa oxidasa 0.6 U.I. Dihidrocloreuro de orto-toluidina 75 mcg; Ingredientes no reactivos 91 mg.

Area de valores altos : Glucosa oxidasa 0.43 U.I.; Peroxidasa 1.11 U.I.; hidrocloreuro de 4-aminoantipirina 20 mcg; sulfonato 3, 5. dicloro 2 hidroxibenceno de sodio 9 mcg; ingredientes no reactivos 91 mg.

Los animales control fueron mantenidos en las mismas condiciones . Los animales a los que se les indujo diabetes, mostraron un incremento en el consumo de alimento.

5. TRATAMIENTO CON AMINOACIDOS

Los animales fueron tratados a partir de valores de glucemia de 300 mg/dl en adelante con L-arginina y L-lisina a 10 mM.

6. SACRIFICIO DE ANIMALES

Los animales fueron pesados, se hizo la prueba de glucemia y posteriormente, fueron sacrificados entre las 9 - 10 a.m. a los . 7, 14, 21 y 28 días de la inyección de aloxana: bajo tranquilizante: Dehydrobenzperidol (0.4 ml) de anestésico. Ketamina KETACLOR, (0.8 ml).

Posteriormente fueron sometidos a disección de glándula parótida y páncreas. La glándula parótida fué extirpada al hacer una incisión en una sola intención a nivel de la clavícula, encontrándose la glándula parótida adelante del oído y adherida al musculo masetero, una glándula fué colocada inmediatamente en solución salina para determinaciones bioquímicas, y la otra fué colocada en formol para observaciones histológicas. El páncreas fué disecado al hacer una incisión en una sola intención encontrándose adherido al bazo y detrás del estomago , con su color característico blanco-rosa. La mitad del páncreas fué colocada en formol para análisis histológico y la otra mitad fué colocada en solución salina para determinaciones bioquímicas.

Las muestras con fines histológicos fueron enviadas al laboratorio de patología de la facultad.

7. DETERMINACION RAPIDA DE PESO SECO

La determinación del peso seco se hizo por un método colorimétrico rápido y preciso ⁵⁶. (Fig. 2).

Fundamento:

El método consiste en hacer reaccionar estas muestras con una solución ácida de dicromato durante 20 minutos a 92°C, y enseguida determinar la densidad óptica a 630 nm del producto formado. Las ventajas de este procedimiento sobre el método estándar de pesada son: 1) requiere un mínimo de tiempo para la determinación, 2) su mayor sensibilidad, exactitud y precisión usando equipo estándar de laboratorio, 3) el método es insensible a compuestos inorgánicos y, por lo tanto, puede ser aplicado a homogeneizados de tejidos preparados en soluciones inorgánicas. La única desventaja del método parece ser que el dicromato reacciona específicamente con grupos que contienen carbono y, por lo tanto, la participación del nitrógeno u otros elementos en la composición del material biológico darán proporcionalmente menor absorbancia.

La propiedad del dicromato de potasio de oxidar compuestos orgánicos es bien conocida, y ha sido utilizada para producir la conversión completa de azúcares y otros materiales orgánicos en CO₂ y H₂O

Equipo utilizado:

- 1.- Epectofotómetro DU[®] - 64
- 2.- Material de cristalería.
- 3.- Parrilla.
- 4.- Vortex.

Materiales y métodos

El dicromato de potasio: Reactivo analítico, fué obtenido de Productos Químicos Monterrey, S.A., cat.2984.

Acido sulfúrico. Para obtener una adecuada solución del dicromato y estabilidad del mismo se requiere que el ácido sulfúrico sea de la mejor calidad

disponible. Hemos encontrado que, a mayor pureza del ácido sulfúrico, mayor será el tiempo que tarde en precipitar el dicromato. El ácido utilizado en este trabajo fué de Merck, cat 200731 (97 por ciento, 1,84 D).

Los estándares orgánicos, manitol, DNA y albúmina se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

El homogeneizado de Glándula parótida y Páncreas de rata 20 por ciento p/v fué preparado en solución salina , posteriormente se centrifugó y se separaron en diferentes alicuotas.

Solución de dicromato al 2 por ciento en ácido sulfúrico concentrado. La disolución de dicromato en ácido sulfúrico se facilitó calentando el ácido a 60 grados centígrados.

Procedimiento para determinar peso seco: De la solución problema se tomó una cantidad del homogeneizado que varía según el órgano que se este trabajando.

Para adicionar a tubos que se encuentren sumergidos en hielo. Después de 5 minutos se adicionaron cuidadosamente 10 ml de la solución de dicromato en ácido sulfúrico a cada tubo; para evitar el sobrecalentamiento, las soluciones se agitaron nuevamente con los tubos sumergidos en el hielo. En seguida, los tubos se pasaron a un baño de ebullición (92 grados centígrados en la ciudad de México) durante 20 minutos, se enfriaron con agua corriente y se leyeron a 630 nm. Para leer la absorbancia utilice un espectrofotómetro DU² - 64.

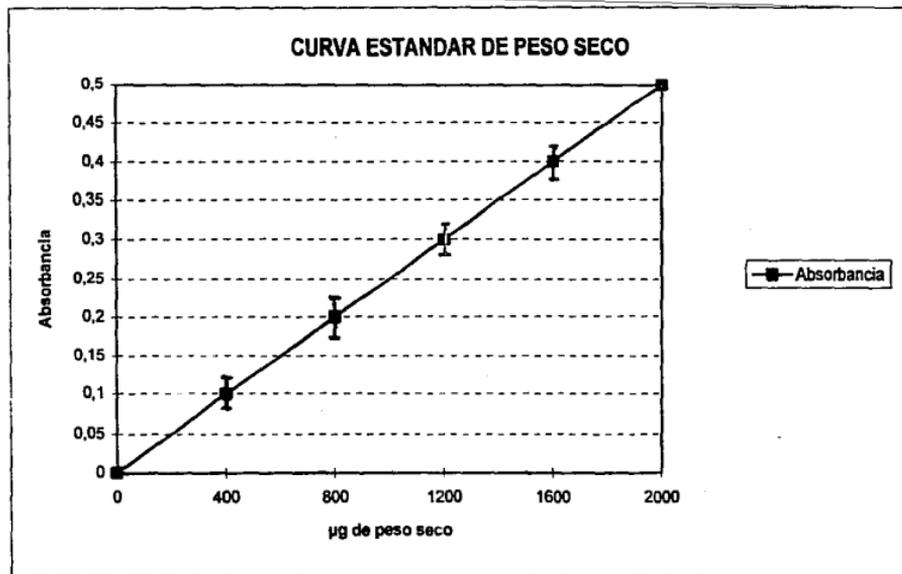


FIG. 2

8. DETERMINACION DE PROTEINAS

La determinación se hizo por el método de Lowry ⁵⁷. Basándose esta técnica en el complejo colorido formado por el cobre del reactivo de Biuret ⁵⁸ con los enlaces peptídicos de las proteínas (Fig. 3).

Equipo utilizado:

- 1.- Espectrofotómetro DU[®] - 64
- 2.- Material de cristalería

Reactivos:

Solución A: Carbonato de sodio al 2%, tartrato de sodio al 0.02% en hidróxido de sodio 0.1 M.

Solución B: Sulfato cúprico al 0.5% en agua desionizada.

Solución C: 50 ml solución A más 1.0 ml solución B. preparar al momento de usarse

Solución D: Reactivo de Folin ciocalteu diluido en una proporción de 1:1 ml de reactivo en 1.4 de agua desionizada.

Solución Estándar: Albúmina bovina al 30% (Difco) en una concentración final de 0.3 mg/ml en agua desionizada. Se utilizaron alícuotas adecuadas para obtener concentraciones de 0 a 150 µg.

Método.

Se tomaron alícuotas diferentes según el caso, y se llevaron a un volumen final de 500 µl con agua destilada, adicionándose 2.0 ml del reactivo C. Se dejó reposar 10 minutos, agregando después 0.2 ml de solución D, mezclando y dejando reposar 20 minutos, para después leer la absorción a 550 nm en un espectrofotómetro DU[®] - 64.

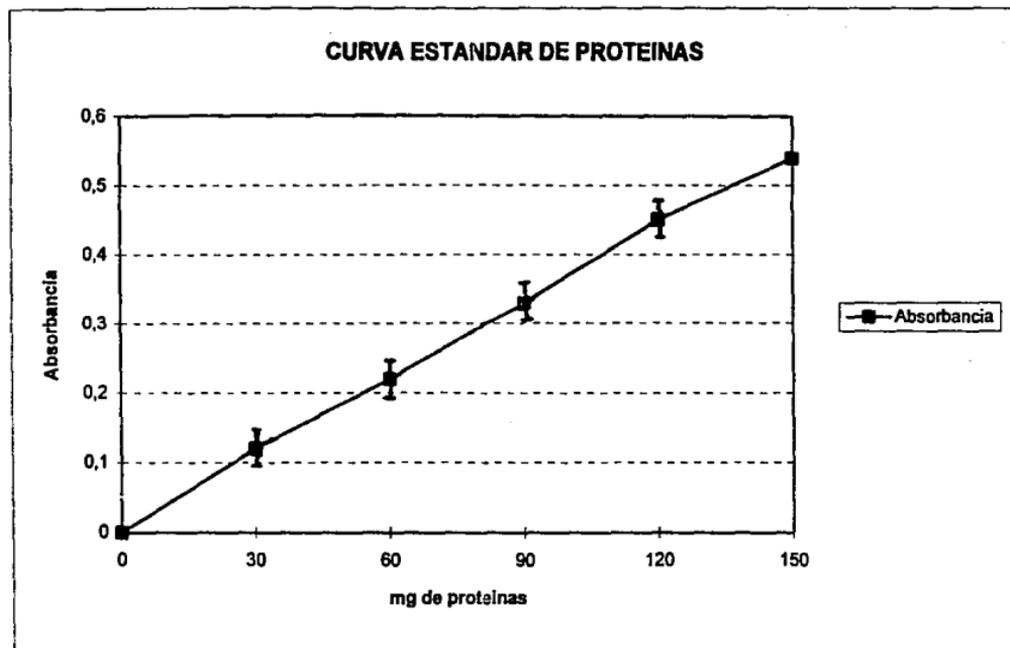


FIG 3.

9. DETERMINACION DE DNA

La reacción entre la ribosa y la difenilamina, es probablemente la más usada para la determinación del DNA. Dische ⁵⁹, describió este método que utiliza una mezcla de ácido sulfúrico, difenilamina y ácido acético. Burton ⁶⁰. En 1956 propuso una modificación a este método basado en la adición de acetaldehído, y señala que esta determinación es 3.5 veces más sensible que el método original descrito por Dische (Fig.4).

En 1965, Giles y Myers ⁶¹. publicaron una modificación al método de Burton que lo hace aun más específico; estos autores encontraron que puede reducirse la lectura del blanco omitiendo el ácido sulfúrico e incorporando el acetaldehído al final de la reacción, aunque después mencionan que éste no es requisito indispensable. Comunicaron también que la sensibilidad del método es incrementar al aumentar la concentración de difenilamina al 4%.

Equipo utilizado:

- 1.- Espectrofotómetro DU[®] - 64
- 2.- Material de cristalería.
- 3.- B.M. A 37 °C.

Reactivos:

Reactivo a). Acido perclórico 2 M (Baker).

Reactivo b) Acetaldehído (Merck). Se preparó una solución de 16 mg/ml, la cual se mantuvo congelada y al momento de usarse se diluyó 1:10 con agua destilada.

Reactivo c) Difenilamina (Merck). Se preparó una solución al 4% en ácido acético glacial.. (debe prepararse al momento de su uso).

Método:

Se tomaron 30 μ l de la fracción ácida y se llevaron a un volumen final de 500 μ l con el reactivo a, adicionándose 50 μ l del reactivo b, y finalmente 500 μ l de la solución de difenilamina; se mezclaron y taparon los tubos, dejando incubar a 37 grados centígrados durante un lapso de 18-24 horas., leyendo posteriormente la absorción a 600 nm en espectrofotómetro DU³ - 64.

Curva Estándar

Se preparó una solución patrón de DNA, conteniendo 1mg/ml la cual se hidrolizó a 70 grados centígrados durante 30 minutos, y se guardó congelada hasta el momento de usarse; al utilizarse se diluyó 1:10 para tener una concentración final de 0,1mg/ml se tomaron alícuotas adecuadas (100-500 μ l) para obtener concentraciones de 10 a 50 μ g por sistema.

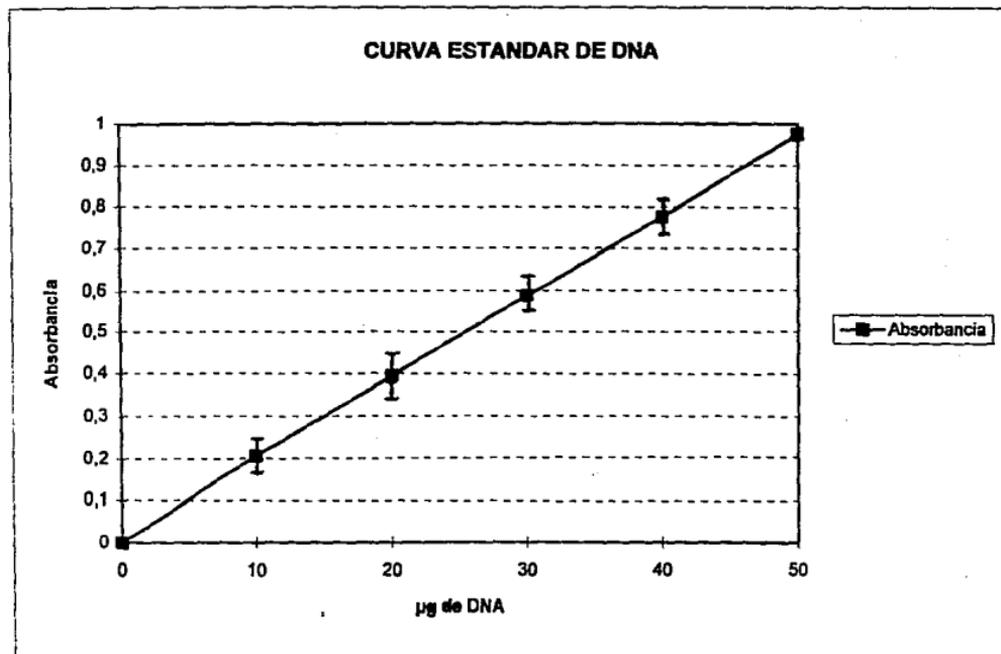


FIG 4.

10. DETERMINACION DE RNA

El método colorimétrico para la determinación del RNA se basa en el uso del orcinol⁸² que junto con la ribosa del ácido nucleico formarán un grupo cromóforo lo que permitirá cuantificar al RNA en forma específica y haciendo sus lecturas de absorbancia a 660 nm (Fig. 5).

Equipo utilizado:

- 1.- Espectrofotómetro DU[®] - 64
- 2.- Material de cristalería.
- 3.- Parrilla.
- 4.- Vortex.

Reactivos:

Reactivo a) Acido perclórico 0.5 M

Reactivo b) Acetato cúprico 0.5%. Se preparó 0.05 gr de acetato cúprico en 10 ml de ácido acético glacial.

Reactivo c) Orcinol al 1% . Se preparó 0,25 gr de orcinol en 25 ml HCl concentrado (se preparó al momento se usarse).

Método:

Se tomaron alícuotas diferentes según el caso, y se llevaron a un volumen final de 1000 µl con el reactivo a, adicionando 0.2 ml del reactivo b, y finalmente 1.5 ml de la solución de orcinol; se mezclaron y se taparon los tubos, posteriormente se pasaron a un baño de ebullición durante 20 minutos, se enfriaron con agua corriente y se leyeron a 600 nm. Para leer la absorbancia utilice un espectrofotómetro DU[®] - 64.

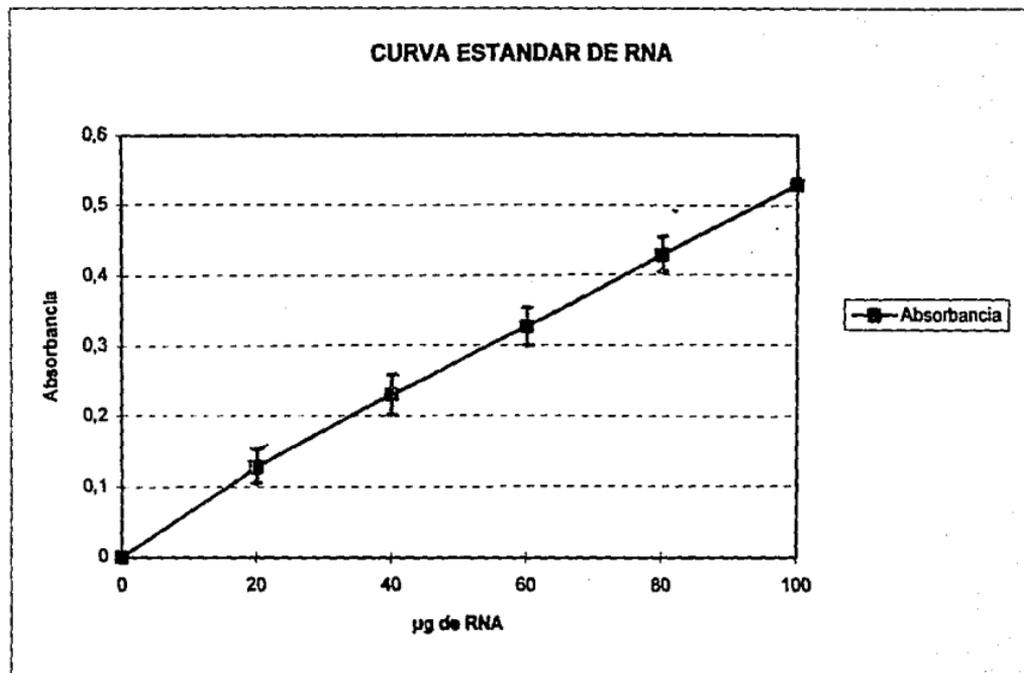
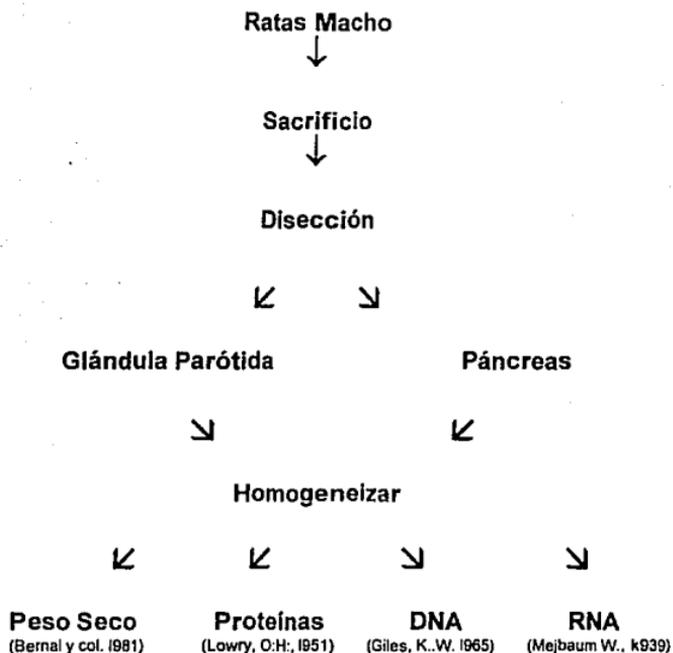


FIG 5.

ESQUEMA DE TRABAJO



12. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS Y OBTENCION DE CORTES HISTOLOGICOS.

1.- Fijación del tejido en formalina amortiguada al 10% de 24 a 48 horas. Posteriormente fué lavado durante 12 horas en agua corriente para eliminar el fijador.

2.- Deshidratación e Infiltración en el histokinette en alcoholes ascendentes comenzando por el alcohol de 60 %, 70, 80, 96% 1, 96% 2, alcohol del 100 1 y alcohol del 100 2 después el alcohol xilol en partes iguales, xilol 1 y xilol 2, parafina 1 y parafina 2. Posteriormente se incluyen en parafina limpia.

3.- Se hacen los cortes a cinco micras.

4.- Tinción con H-E.

5.- Observación al microscopio.

Análisis de Datos:

Fueron analizados por la prueba de ANOVA.

RESULTADOS

Los efectos de la diabetes por aloxana, el primer dato que llama la atención y que indica diferencias francas entre los grupos estudiados es precisamente la mortalidad, mortalidad ocurrida a partir de las 24 horas, presentan valores de glucemia mayores a 24 horas, los animales se muestran hiperactivos y deprimidos.

Al inicio del proyecto se trataba de estandarizar un número en cada grupo, esto no fué posible debido al alto índice de mortalidad, entonces se trató de completar el número de ratas en cada grupo.

Peso: La curva ponderal de los 4 grupos se encuentra expresada en la (Tabla 1),(Figura 6). Al observar la curva los animales en el día 0 comparada con el día 3 es significativamente reducido al observar que el peso de los animales de los grupos se conservó dentro de los límites normales y al final del experimento se encontró un ligero incremento. Se observó disminución progresiva en los primeros 10 días, los animales que sobrevivieron redujeron su peso considerablemente a menos de 200 gr. Los animales que se empezaron a tratar en los primeros días continuaron perdiendo peso pero, a partir del día 11 su peso empezó a incrementarse, y al finalizar el experimento al día 28 se incrementó ligeramente ($P < 0.005$).

Glucemia: En las glucemias se observaron variaciones dentro de cada grupo, probablemente porque no hubo un horario exacto para la extracción de sangre y se sabe que frecuentemente las glucemias varían con estímulos diversos en forma notable. Sin embargo se observaron variaciones significativas ($P < 0.005$). En los primeros días no se manifestó mejoría, posteriormente las cifras disminuyeron, acercándose a las cifras normales. Se encuentra expresado en la (Tabla 2),(Figura 7).

PESO CORPORAL: RATAS CONTROL, DIABÉTICAS Y TRATADAS CON L-arginina y L-lisina										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DIA										
MEDIA	361,57	358,12	348,89	338,89	324,05	303,41	288,72	301,17	310,71	304,58
D.E	12,27	17,63	19,01	21,25	15,06	17,48	17,67	19,45	14,32	20,14
DIA	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
MEDIA	303,99	300,3	307,13	308,27	302,42	308,72	297,53	298,22	295,6	304,92
D.E	15,7	13,23	16,53	12,88	18,08	17,27	17,27	19,7	11,54	12,16
DIA	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
MEDIA	307,35	296,42	288,87	273,59	286,75	275,45	281,09	283,67	291,59	
D.E	12,58	15,42	15,22	14,27	15,23	18,07	12,88	16,11	19,13	

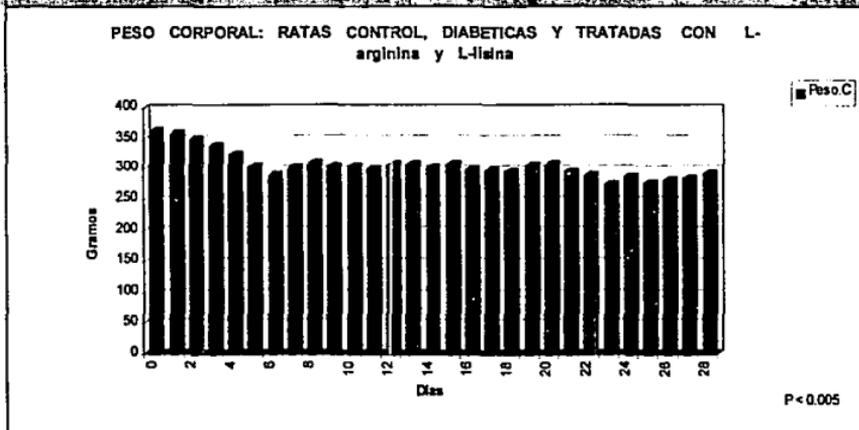


TABLA I-FIG 6. Cuantificación de peso corporal de ratas control, diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina

GLUCEMIA: RATAS CONTROL, DIABETICAS Y TRATADAS CON L-arginina y L-lisina (mg/dl)		0	3	7	10	14	18	21	28
Día		19	407	337	298	321	232	188	147
Medic									
D.E.		3,51	12,33	14,56	9,62	17,32	19,43	10,65	8,23

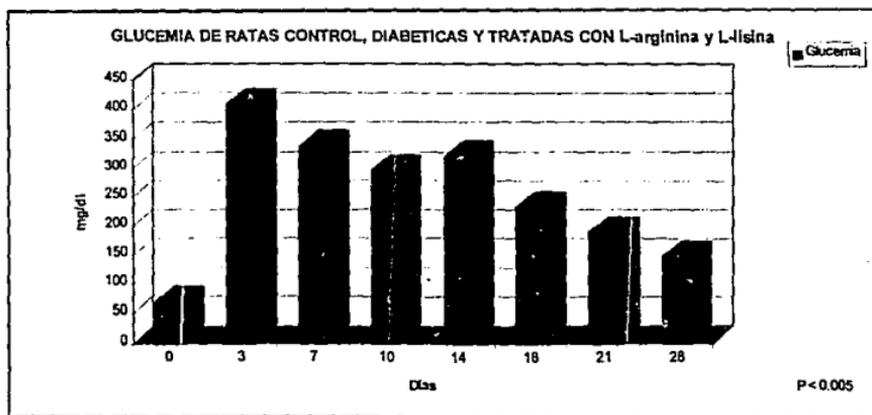


TABLA 4-FIG 7. Cuantificación de glucemia en ayunas de ratas no diabéticas, diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina.

Histopatología de Páncreas:

Control: Tamaño normal de los islotes de Langerhans así como las características citomorfológicas de las células acinares (Figs. 8A y 8B).

Ratas diabéticas a los tres días: Se observa una reducción notable en el tamaño del islote así como también el incremento de fibras de colágena alrededor de los conductos y de los lóbulos (Fig. 8C).

Biopsia de ratas diabéticas muertas a los 6 días sin tratamiento: Existe necrosis de las células acinares incremento en el tamaño del núcleo y los nucleolos se hacen evidentes, se concluye que la rata murió de coma diabético, reportaba una glucemia mayor a 500mg/dl (Fig. 8D).

Ratas diabéticas tratadas con L-arginina:

Ratas diabéticas tratadas con L-arg 7 días: Se observa vacuolización intracitoplasmica y nuclear en todo lo que son células acinares, disminución del tamaño de los islotes, incremento de la población linfocítica (Fig. 9A).

Ratas diabéticas tratadas con L-arginina 14 días: Se observa necrosis del parénquima afectando tanto células acinares como la mayoría de los islotes (Fig. 9B).

Ratas diabéticas tratadas con L-arginina 21 días: Se observa una leve regeneración del parénquima y de los islotes, incrementando el tamaño de los últimos en comparación como se presenta a los 14 días (Fig. 9C).

Ratas Diabéticas tratadas con L-arginina 28 días: Presenta una regeneración parcial a nivel de las células acinares y de los islotes pero no total como se observa en la glándula parótida (Fig. 9D).

Ratas diabéticas tratadas con L-Ilsina:

7 días: Se observa un incremento del núcleo perdiéndose la relación con el citoplasma, en algunas partes del parénquima hay pérdida de los islotes y disminución en el tamaño de los otros (Fig. 10A).

14 días: Se observa necrosis total del parénquima observando basicamente células acinares y disminución en el tamaño de los islotes (Fig. 10B).

21 días: Todavía se observa áreas de necrosis tanto en las células acinares e islotes, áreas de fibrosis, incremento en la vascularidad y estasis sanguíneo (Fig. 10C).

28 días: Existe una regeneración del parénquima así como de los islotes dando una apariencia casi normal (Fig. 10D).

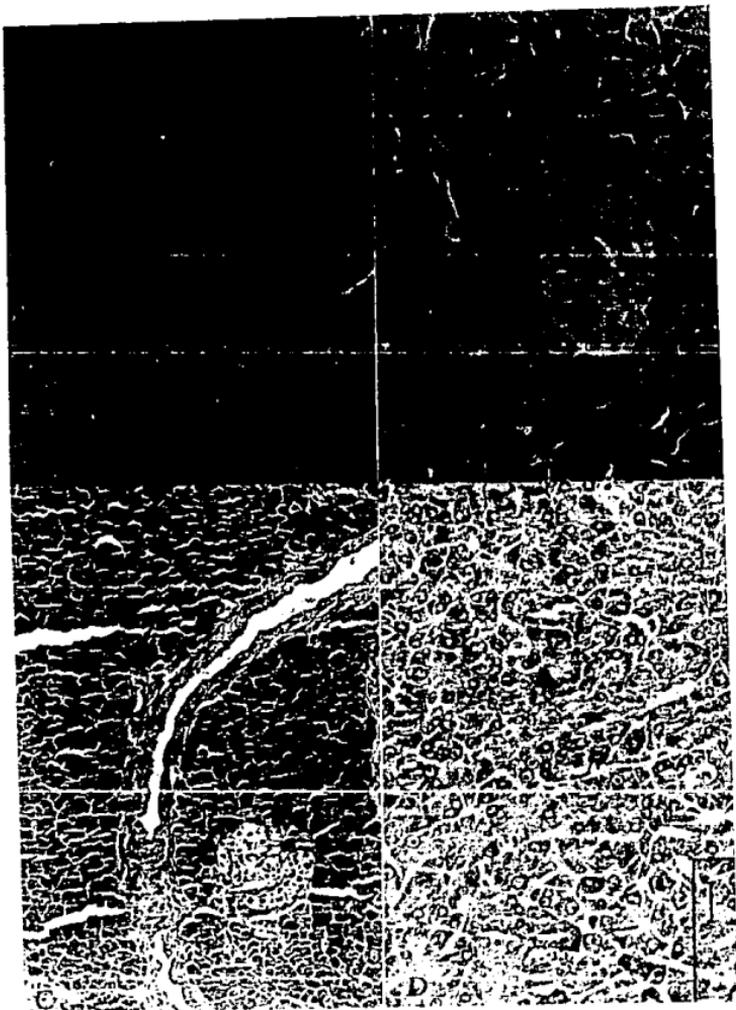


Fig. 8. 8A y B Muestra una porción del páncreas de rata no diabética H y E 20X. 8C: Se observa una reducción del tamaño del islote H y E, 8D: Biopsia 6 días después de la inducción muestra múltiples necrosis. H y E 20X.

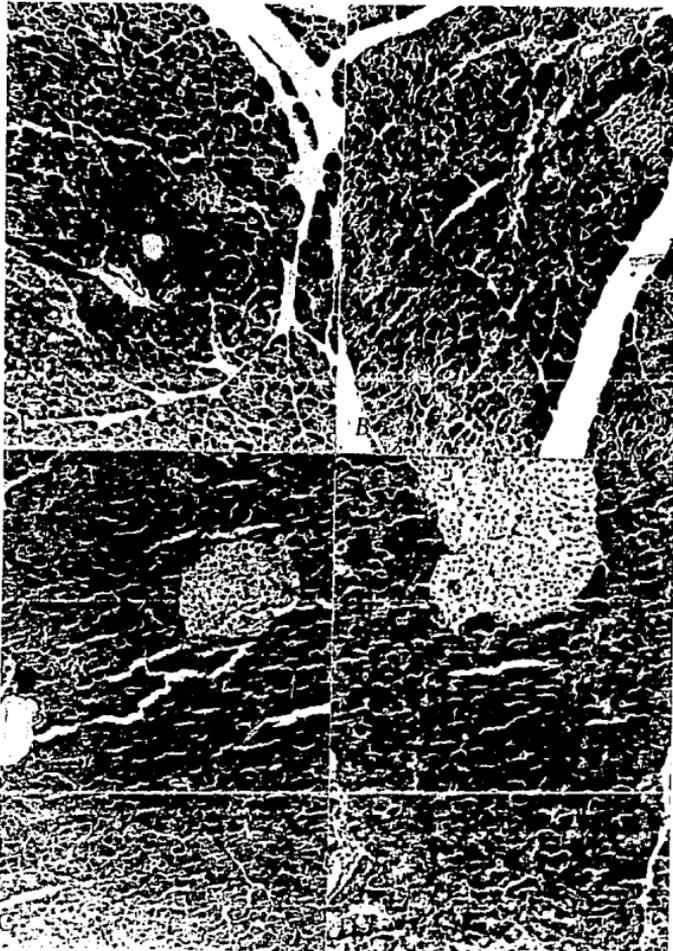


Fig 9. 9A páncreas tratado a los 7 días con L-arg Vacuolización intracitoplasmica e intranuclear, disminución en el tamaño de los islotes H y E 20X. 9B: 14 días L-arginina. Necrosis del parénquima, afectando las células acinares y los islotes. H y E 20X. 9C: 21 días tratada con L-arginina. Leve regeneración del parénquima H y E 20 X. 9D: 28 días con L-arginina regeneración parcial a nivel de las células acinares y de los islotes H y E 20X.



Fig 10. 10A Páncreas 7 días L-lys tratado con L-lisina. Pérdida de la relación núcleo citoplasma, pérdida de los islotes y disminución en su tamaño. H y E 20X. 10B: 14 días L-lys Necrosis del parénquima, disminución del tamaño de los islotes. H y E 20X. 10C: 21 días tratado con L-lys. Areas de nécrrosis tanto en células acinares e islotes, incremento en la vascularidad. H y E 20X. 10D: 28 días L-lys regeneración del parénquima así como una regeneración parcial de los islotesH y E 20X.

Histopatología de glándula parótida

Control: Tamaño normal de las células, con las características patognomónicas de la glándula (Fig. 11).

Diabéticas a los 3 días: microscópicamente se observó hipertrofia de células acinares así como la vacuolización intracitoplásmica e intranuclear, acumulación de gotas lipídicas e hiperromatismo nuclear así como incremento en su tamaño semejando una acromegalia (citología exfoliativa). Así como también se observó hiperplasia de conductos, estasis ductual (acumulación de moco). En el estroma se observó incremento en la vascularidad intra e interlobulillar (Fig. 12 A,B,C,D).

Ratas diabéticas tratadas con Arginina:

Ratas diabéticas tratadas con L-arginina 7 días: Se observó histopatológicamente que las glándulas presentaron poca vacuolización intracitoplásmica e intranuclear por acumulación de lípidos en las células acinares con núcleos prominentes e hiperromáticos e hiperplasia de los conductos en forma parcial.

También se observó que las células mioepiteliales eran bastante evidentes. El estroma mostró incremento en la vascularidad y congestión (Fig. 13A).

Ratas diabéticas tratadas con L-arginina 14 días: Los hallazgos microscópicos revelaron una hipertrofia de células acinares, por vacuolización tanto nuclear como intracitoplásmica, por acumulación de lípidos. También se pueden observar incremento en el tamaño nuclear e hiperromatismo. Los conductos estriados se encuentran parcialmente hiperplásicos así como se observa un incremento en el número de conductos intercalares. En el estroma se observa un incremento en la vascularidad con congestión (Fig. 13B).

Ratas diabéticas tratadas con L-arginina 21 días: Se observó regeneración en el parénquima glandular con disminución del tamaño de los núcleos así como también de las vacuolas, por lípidos los conductos presentaron estasis así como también no se observó que disminuyera la cantidad de vasos presentes en el estroma intra e interlobulillar. Siendo un estroma fibroso denso (Fig. 13C).

Ratas diabéticas tratadas con L-arginina 28 días: El parénquima glandular se observa regenerado sin presencia de vacuolas lipídicas o escasas dentro de las células acinares conservándose la hiperplasia de los conductos estriados así

como la estasis. El estroma está constituido por tejido conectivo fibroso denso (Fig. 13D).

Ratas Diabéticas tratadas con L-lisina

Ratas diabéticas tratadas con L-lisina 7 días: Se observó que las células acinares presentan escasa vacuolización por acumulación de lípidos, núcleos hiperromáticos y prominentes, hiperplasia de conductos estriados e hipertrofia de células acinares. El estroma está constituido por tejido conectivo fibroso denso y se observan áreas focales de linfocitos (Fig. 14A).

Ratas diabéticas tratadas con L-lisina 14 días: Se observa un incremento en la vascularización de células acinares tanto en el citoplasma como en el núcleo, así como hipertrofia de las células (Fig. 14B).

Ratas diabéticas tratadas con L-lisina 21 días: Se observa regeneración parcial del parénquima glandular incremento de los conductos intercalares así como una fibrosis alrededor de los conductos intercalares y estriados (Fig. 14C).

Ratas diabéticas tratadas con L-lisina 28 días : Se observa una regeneración total de la glándula parótida (Fig. 14D).

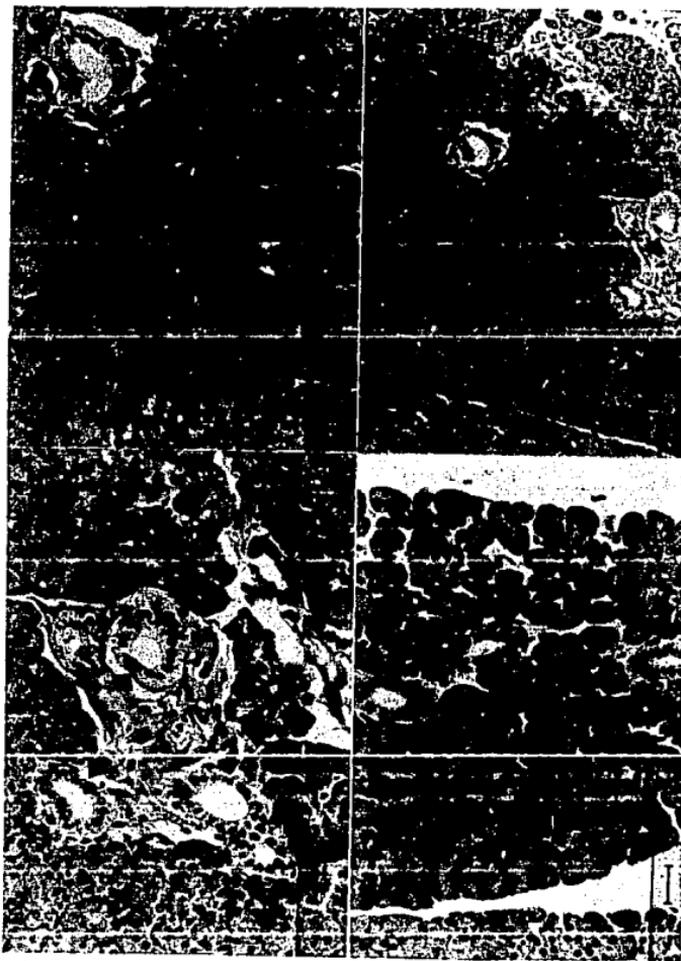


Fig 11. 11A,B,C,D Corte de glándula parótida de rata control. H y E 20X.

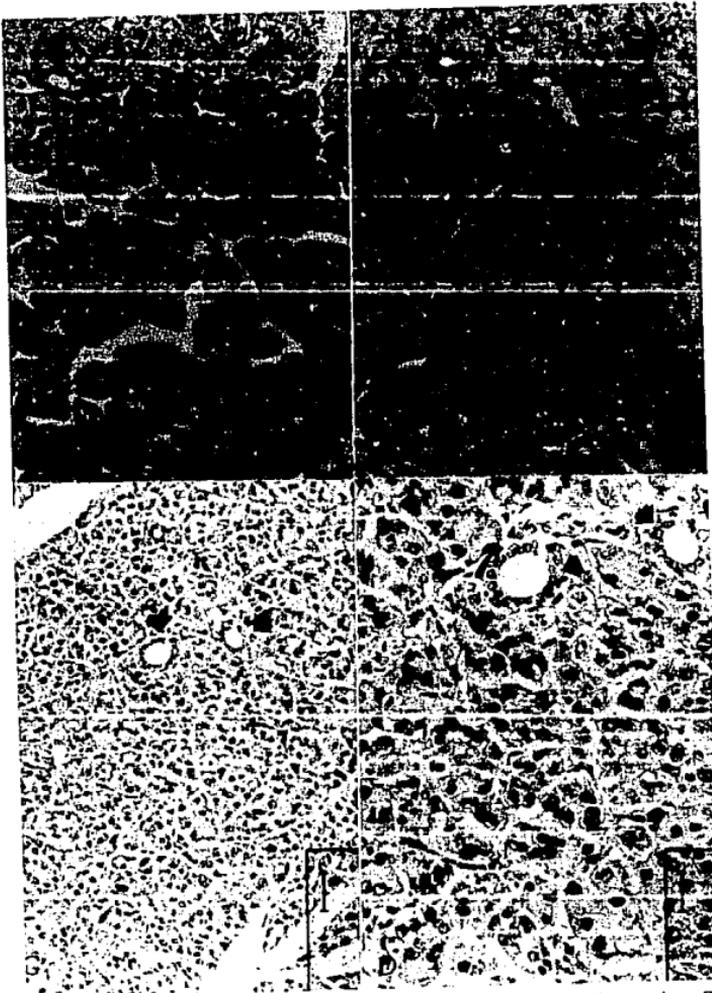


Fig 12. Corte de glándula parótida de rata diabética a los 3 días. A, B, C, D Hipertrofia de las células acinares, vacuolización intracitoplasmica e intranuclear, acumulación de de lipidos e hiperchromatismo nuclear, incremento en el tamaño nuclear. H y E 20X.

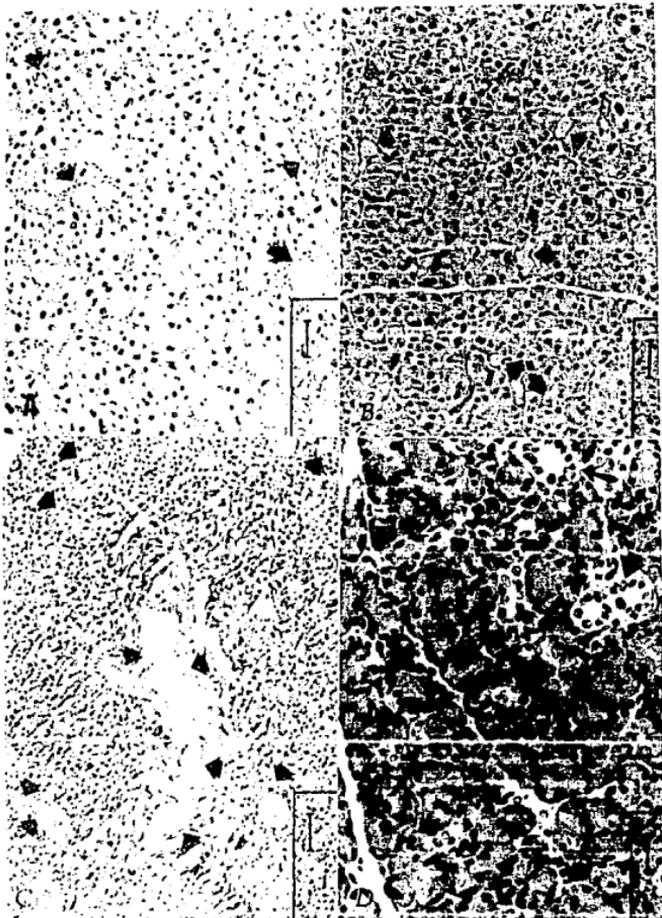


Fig 13. 13A Corte de glándula parótida 7 días tratada con L-arg. Poca vacuolización intracitoplasmica e intranuclear por la presencia de lípidos en las células acinares, núcleos prominentes. H y E 20X. 13B 14 días L-arg hipertrofia de las células acinares por vacuolización nuclear e intracitoplasmica por acumulación de lípidos, incremento en el tamaño nuclear H y E 20X. 13C: 21 días L-arg regeneración en el parénquima glandular con disminución en el tamaño de los núcleos y de las vacuolas por lípidos. H y E 20X. 13D: el parénquima glandular se observa totalmente regenerado sin presencia de gotas lipídicas. H y E 20X.

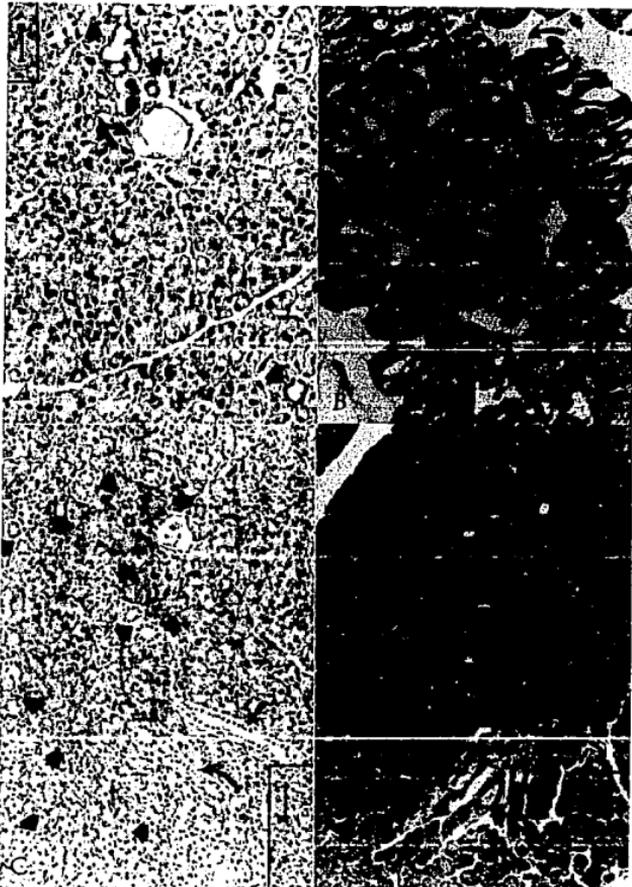


Fig 14. 14A 7 días después del tratamiento con L-lys las células acinares presentan escasa vacuolización, núcleos hiper cromáticos y prominentes, hiperplasia de conductos estriados e hipeplasia de células acinares H y E 20X. 14B: 14 días L-lys incremento en la vascularización de las células acinares tanto en el citoplasma como en el núcleo.H y E 20X 14C: 21 días L-arg regeneración parcial del parénquima glandular, incremento de los conductos intercalares, fibrosis alrededor de los conductos intercalares y estriados.H y E 20X. 14D: Se observa regeneración parcial de la glándula parótida. H y E 20X.

Efectos Bioquímicos:

Páncreas: su peso seco disminuye notablemente a los 3 días a partir del cuarto día comienza el tratamiento y se hace manifiesto en el día 14 tanto para L-arginina como para L-lisina a los 21 días disminuyó discretamente a los 28 días disminuyó. Esto es altamente significativo ($P < 0.001$) (Fig 15).

La disminución considerable de peso seco es explicable relacionada con la pérdida de peso corporal, hay pérdida de materia orgánica.

Proteínas: 0 a 3 días hay una disminución notable en la síntesis de proteínas esto es explicable ya que hay necrosis celular por lo tanto hay disminución de la síntesis de proteínas y después del tratamiento hay un moderado incremento, pero posteriormente disminuye ligeramente tanto para L-arginina como para L-lisina ($P < 0.001$) (Fig 16).

DNA y RNA a los tres días hay una disminución considerable, posterior al tratamiento hay un ligero incremento, y posteriormente disminuye y se mantiene, tanto para L-arginina como para L-lisina ($P < 0.001$).(Fig 17) y (Fig 18).

Glándula parótida: Su peso seco de la glándula tratada con L-arginina. El contenido, a los tres días disminuye, después del tratamiento se incrementa ($P < 0.001$) (Fig 19) .

Con el tratamiento con L-lisina. El contenido de peso seco en la glándula parótida a los tres días disminuye y después del tratamiento se incrementa considerablemente ($P < 0.001$) (Fig 19).

Proteínas totales de la glándula parótida tratada con L-arginina. El contenido de proteínas totales en la glándula parótida a los tres días y posterior al tratamiento se incrementa ($P < 0.001$). (Fig 20).

Proteínas totales de la glándula parótida tratada con L-lisina. El contenido de proteínas totales en la glándula parótida a los tres días disminuye y posteriormente al tratamiento se incrementa ligeramente ($P < 0.001$) (Fig 20).

DNA y RNA de la glándula parótida tratada con L-arginina Su contenido total es disminuido notablemente a los tres días y posteriormente se incrementa ($P < 0.001$) (Fig 21) y (Fig 22) respectivamente.

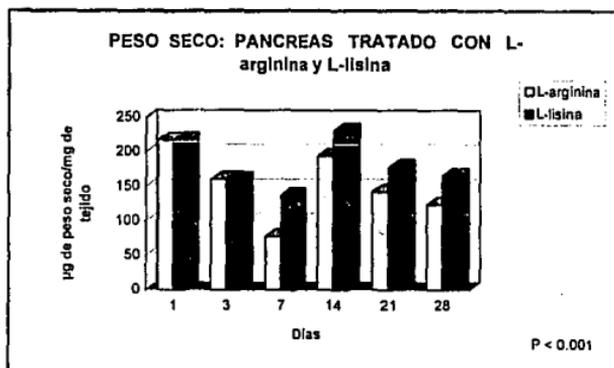


FIG 15. Cuantificación de peso seco de páncreas de ratas control diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina.

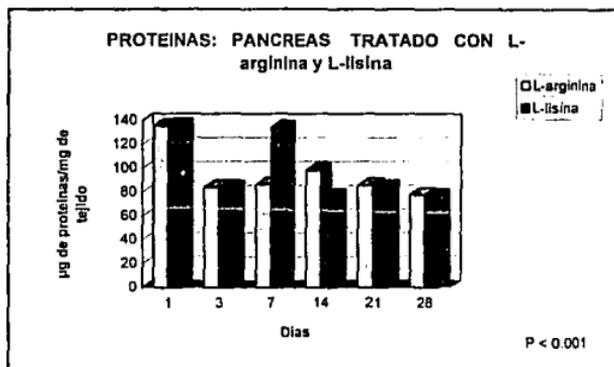


FIG 16. Cuantificación de proteínas de páncreas de ratas control diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina.

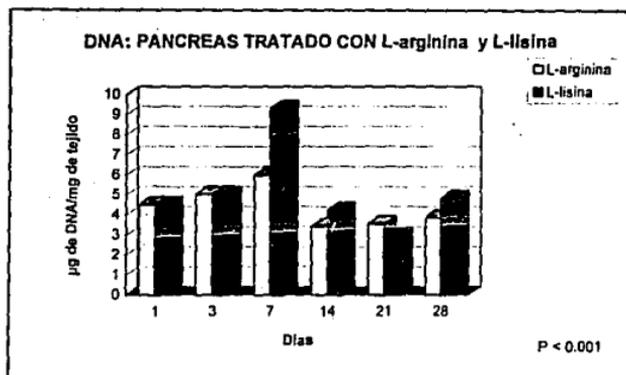


FIG 17. Cuantificación de DNA de ratas control, diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina

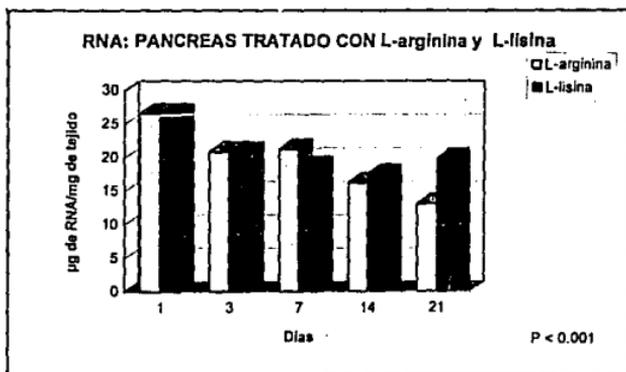


FIG 18. Cuantificación de RNA de ratas diabéticas, control y tratadas con L-arginina y L-lisina.

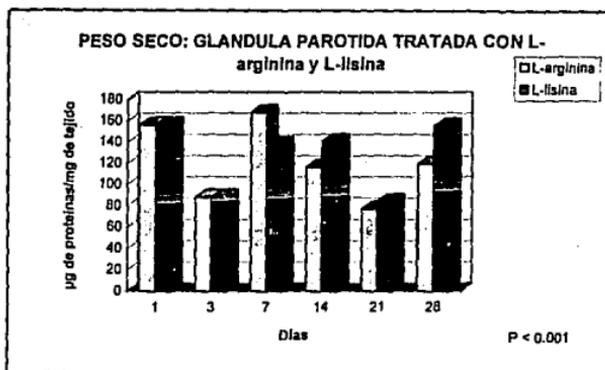


FIG 19. Cuantificación de peso seco de glándula parótida de ratas control, diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina.

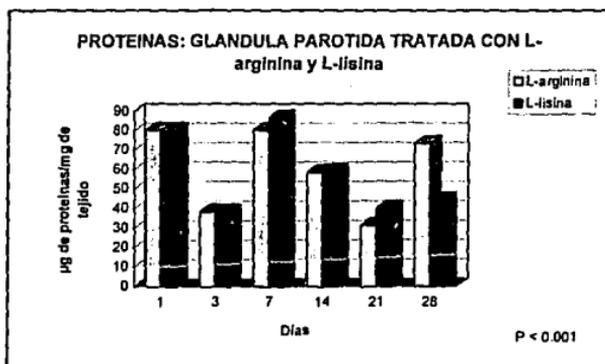


FIG 20. Cuantificación de proteínas de glándula parótida de ratas control, diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina.

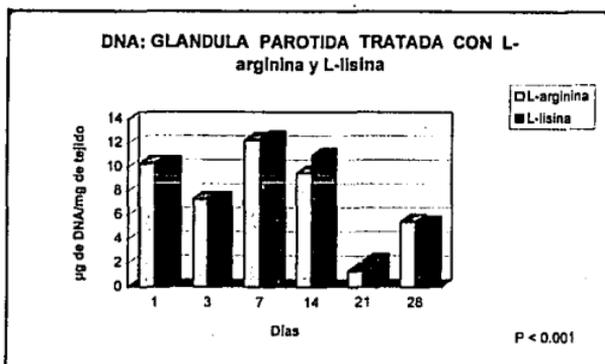


FIG 21. Cuantificación de DNA de glándula parótida de ratas control, diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina.

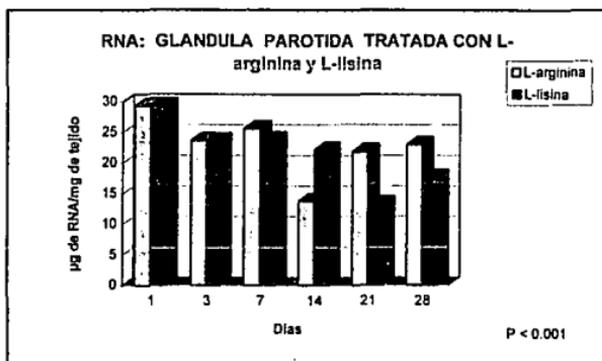


FIG 22. Cuantificación de RNA de glándula parótida de ratas control, diabéticas y tratadas con L-arginina y L-lisina.

DISCUSION

Nuestro estudio demostró un efecto de la diabetes por aloxana en los animales de laboratorio por medio de la destrucción selectiva de las células β de los islotes pancreáticos. Así como también fué evidente la necrosis de la glándula parótida acompañada de vacuolización intracitoplasmica e intranuclear e hipertrofia de las células acinares.

En nuestro estudio hay algo que llama la atención es el alto índice de mortalidad, la dosis elegida fué la misma que Anderson *et al*,²⁹ y se hizo en las mismas condiciones y nuestros resultados difieren, ya que la mortalidad no fué reportada por Anderson *et al* ²⁹.

El peso corporal revela una disminución progresiva en los primeros días, sin embargo después del tratamiento esta curva se tiende a normalizar y a recuperar el peso perdido y al finalizar el experimento se mantiene.

Glucemia:

Las variaciones de la glucemia observadas los primeros días son elevadas, a medida que son empezadas a tratar en los primeros días de tratamiento no se hace manifiesto y posteriormente empiezan a bajar y al termino del experimento tienden a normalizarse. Los datos de mejoría clínica concuerdan con los signos clínicos de la diabetes inducida.

Estudios Histopatológicos:

Páncreas: Los islotes de Langerhans revelan múltiples necrosis celular, células acinares necróticas, incremento en el tamaño del núcleo, pérdida de la relación núcleo citoplasma. La pérdida de peso corporal ha sido disminuida. Estos hallazgos son similares a los de Mohamed *et al*, en el hallazgo histológico que no concordamos es que ellos encontraron infiltración de glucógeno en las células β . En nuestro estudio se hicieron tinciones de PAS para -descartar si era glucógeno, en nuestros resultados se demostró que hubo una ligera infiltración de lípidos. y Mohamed *et al* ⁶³, encontraron que la infiltración de glucógeno fué evidente.

En las ratas diabéticas se observa una reducción notable en el tamaño del islote estos hallazgos histológicos concuerdan con Gepts⁶⁴, Maclean y col⁶⁵ Doniach y col⁶⁶ Bommer y cols⁶⁷, esto es explicable por la necrosis selectiva de las células β hay disminución en el tamaño del tejido.

Por su parte las glándulas salivales presentan necrosis acompañada de vacuolización intracitoplasmica e intranuclear, acumulación de gotas lipídicas, necrosis celular, estos hallazgos coinciden con los resultados de Davison *et al*⁶⁸, quienes hicieron un estudio de glándula parótida en pacientes diabéticos.

En el presente estudio el tratamiento con aminoácidos suponemos que provocó la secreción de insulina lo cual está comprobado ya que nos permitió llegar al día 28. Sin embargo nosotros no medimos insulina.

En el tratamiento con L-arginina nuestros resultados concuerdan con Von Haeften Wy cols 1989⁶⁹, Curry D L y col 1987⁷⁰, Nogowski L y col 1886⁷¹.

En este estudio demostramos que la aloxana produce una disminución de la insulina pancreática, y que también reduce significativamente la cantidad del péptido semejante a la insulina en la glándula.

Es posible que las células que contienen insulina de la glándula parótida pueden ser similares a las células β de los islotes pancreáticos.

Aloxana destruye parcialmente las células de la glándula parótida que contienen un péptido semejante a la insulina, y las células β también son destruidas parcialmente.

Efectos bioquímicos:

La función de la insulina que es regular el crecimiento de la glándula parótida. Mientras Liu y Lin³¹ reportaron que la diabetes provocó un crecimiento reducido en la glándula parótida y el tamaño de la célula acinar.

Anderson y Johnson²⁸ observaron diferencias no significativas, en el peso de la glándula, proteínas totales DNA y RNA entre el control y las ratas diabéticas. Hacer una comparación de los dos estudios es difícil porque la severidad de la diabetes inducida por Liu y Lin³¹ no fué reportada. Además el crecimiento y función de la glándula parótida en la rata es dependiente del

grado de estimulación funcional. Si hay estimulación hay crecimiento y función y hay incremento en peso seco, proteínas totales, DNA, RNA.

Nuestros resultados concuerdan con Anderson Leigh²⁹ quienes indujeron diabetes con aloxana y sus efectos en la glándula parótida. a una dosis de 185 mg/kg de aloxana en $ClNa_2$ en los primeros días hay una disminución de proteínas, DNA y RNA, y después del tratamiento con insulina hay un ligero incremento.

Las divergencias que existen en nuestros resultados dependen del tratamiento y la vía de administración. Ellos lo hicieron con insulina por vía intravenosa y nosotros lo hicimos con aminoácidos y por vía intraperitoneal, en nuestro estudio hubo una mejoría después de la administración del aminoácido.

En el páncreas fué menos manifiesto el efecto de los aminoácidos, histológicamente el islote de Langerhans no se regenera, nuestros resultados concuerdan con Weichselbaum A⁷², Gepts y col⁷³ Quienes demostraron que la regeneración del islote es un fenómeno raro. y se ha observado solamente en pacientes diabéticos jóvenes. hay una marcada disminución en el tamaño del islote, nuestros resultados concuerdan con estudios cuantitativos quienes han demostrado que la cantidad y tamaño del tejido del islote es marcadamente reducido⁶⁶⁻⁶⁹.

CONCLUSIONES

-La administración intraperitoneal de 185 mg/kg de aloxana fué altamente efectivo sobre las células β pancreáticas.

- La acción de la aloxana fué citotóxica en la glándula parótida ya que produjo necrosis..

- La dosis utilizada causó un alto índice de mortalidad 40%.

- La dosis de L-arginina provoco secreción de insulina y es más efectiva a nivel pancreático.

- La dosis de la L-lisina provoca secreción de insulina y es más efectiva en la glándula parótida.

- Nuestros resultados demuestran que la acción de los aminoácidos es más efectiva en glándula parótida que en el páncreas.

- La regeneración del islote solamente es parcial.

- En este estudio demostramos que la aloxana produce una disminución de la insulina pancreática, y que también reduce significativamente la cantidad del péptido semejante ala insulina en la glándula parótida.

- Es posible que las células que contienen insulina de la glándula parótida pueden ser similares a las células β de los islotes pancreáticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ¹ NATIONAL DIABETES DATA GROUP. *Diabetes* 28:1038-1057
- ² HARDIN W R 1992. Williams textbook of endocrinology. Edit. Jean D Wilson y Daniel W foster, 8th edición, W B Saunders Company , United States of America, 1-8pp.
- ³ WILEY A J & SONS 1992 . Biochemistry with Clinical Correlations, 3^a edición, New York, 312pp.
- ⁴ LAWRENCE A M KIRSTEINS L HOJVAT S RUBIN L PALOVAN V 1975. Salivary gland glucagon a potent extrapancreatic hyperglucemic factor. *Clin Res*, 23:356
- ⁵ LAWRENCE A M TAN S HOJVAT S KIRSTEINS K MITTON J 1976. Salivary gland glucagon in man and animals. *Metabolism* 25:1404
- ⁶ LAWRENCE AM, TAN S HOJVAT S, KIRSTEINS K MITTON J 1977 Salivary gland hyperglycemic factor: an extrapancreatic source of glucagon like material. *Science* 195:70-72.
- ⁷ SILVERMAN H DUNBAR J C 1974. The submaxillary gland as a possible source of glucagon. *Bull Sinai Hosp Detroit* 22:192.
- ⁸ KELLY PALOVAN V EDWARDS K KISLA J HOJVAT S 1977. Salivary gland glucagon effect of age and sex . *Clin Res* 25:572.
- ⁹ GODLOWSKY Z & CALANDRA J 1960. Salivary glands as endocrine organs. *J. Appl. Physiol.* 15(1):101-105.
- ¹⁰ GODLOWSKI Z & CALANDRA J C 1971. Ablation of salivary glands as initial step in the management of selected forms of diabetes mellitus. *Laryngoscope* 81:1337.
- ¹¹ HOSHINO K DECKER R F & MOLNAR F KIM Y.T. 1976 Hipoglycaemic effects of salivary duct ligation upon diabetes mellitus in mice. *Arch Oral Biol* 21:105.
- ¹² CUTLER L S, PINNEY H E, CHRISTIAN C & RUSSOTTO S B 1979. Ultrastructural studies of the rat submandibular gland in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Virchows Arch A Path Anat Histol* 382:301.

-
- ¹³ SMITH P H & PATEL D G 1984. Immunochemical studies of the insulin-like material in the parotid gland of rats. *Diabetes* 33:661-666.
- ¹⁴ LAWRENCE A M, KIRSTEINS L, & MITTON J 1976. Parotid gland insulin and extrapancreatic source of insulin in rats. *Abstract Diabetes* 25(Suppl. 1):328.
- ¹⁵ MURAKAMI K, TANIGUCHI H & BABA S 1982. Presence of insulin-like immunoreactivity and its biosynthesis in rat and human parotid gland. *Diabetologia* 22:358-61
- ¹⁶ BARTHENA SJ, SMITH SS, VOYLES NR, PENHOS JC & RECENT L 1977. Studies on submaxillary gland immunoreactive glucagon. *Biochem Biophys Res Commun* 74:1574.
- ¹⁷ DUNBAR JC, SILVERMAN H, KIRMAN E & FOA PP 1977. Role of the submaxillary gland and of the kidney in the hyperglucagonemia of eviscerated rats. In glucagon: Its Role in Physiology and Clinical Medicine. Edited by PP Foa JS baja. NL foa Springer-Verlag, New York, 157pp.
- ¹⁸ HJORTH JP 1979. Genetic variation in mouse salivary amylase rate synthesis. *Biochem Genet* 17:665.
- ¹⁹ JUNQUEIRA LCU 1964. Studies on the physiology on rat and mouse submaxillary glands. III.. On the function of the striated ducts of the mammalian salivary glands. In Salivary Glands and their Secretion. Edited by LM Sreebny, J Meyer. The Macmillan, New York, 123pp.
- ²⁰ BIRNKRANT W B & SHAPIRO R 1942. The influence of a parotid extract on the blood sugar and structure of the pancreas of the rat. *J Lab & Clin Med* 27:510.
- ²¹ ZIMMERMAN L M 1932. Effect of ligation of the parotid ducts on the carbohydrate tolerance of normal dogs. *Arch Int Med* 49:409.
- ²² LEVY H M, MONTAÑEZ G, FEAVER E R, MARPHY E A & DUNN M S 1954. Effect of arginine on tumor growth in rats. *Cancer Res* 14:198-200.
- ²³ NAKANISHI K 1969. Studies on tumor growth inhibition of arginine imbalanced diet. *Osaka Univ Med J.* 21:193-204.

-
- ²⁴ MILNER J A & STEPANVICH L V 1979 Inhibitory effect of dietary arginine on growth of Ehrlich ascites tumor cells in mice. *J Nutr* 109:489-494.
- ²⁵ MIZUNUMA T, KAWAMURA S & KISHINO Y 1984. Effects of injecting excess arginine of rat pancreas. *J Nutr* 114:467-471.
- ²⁶ TRIGER N & BOGUSLAW B 1990. The mouth in diabetes. In: Diabetes Mellitus, Rifkin, H. and Porter, D (Eds.) Fourth Edition. Elsevier Science. New York 850-855 pp.
- ²⁷ ERIKSSON U, DAHLSTROM E, LARSSON S & HELLESTROM C 1982. Increased incidence of genital malformations in the offspring of maternal insulin therapy. *Diabetes* 31:1 -6.
- ²⁸ ANDERSON L C 1983. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. *Am J Physiol* 245(8):431-437.
- ²⁹ ANDERSON L C & JOHNSON D A 1981. Effects of alloxan diabetes on rat parotid gland and saliva. *Comp Biochem Physiol B* 70:725-730.
- ³⁰ HIGH A S SUTTON & HOPPER A H 1985. A Morphometric Study of submandibular Salivary gland changes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol* 30:(9)667-671.
- ³¹ LIU FT & LIN H 1969. Role of insulin in body growth and the growth of salivary and endocrine glands in rats. *J Dent Res* 48:(4)559-567.
- ³² RAMAMURTHY N S GREENWALD R A SCHNEIR & GOLUB L M 1985. The effect of alloxan diabetes on prolyl and lysyl hydroxylase activity in uninflamed rat gingiva. *Archs Oral Biol* 30(9):679-683.
- ³³ MARATZU K & MORIOKA T 1985. Levels of salivary lysozyme lactoperoxidase, and lactoferrin in diabetic hamsters. *Infection and immunity* 48 (2): 389-394.
- ³⁴ FINESTONE A J & BOORUJY S R 1967 Diabetes mellitus and periodontal disease. *Diabetes* 16:336-340.

- ³⁵ GLAVIND L, LUND B, & LOE H 1968. The relation shi Between periodontal state and diabetes duration insulin dosage and retinal changes. *J Periodontal* 39:341-347.
- ³⁶ TAKAY N, SHINOHARAM YOSHIDA V, OHURA K MURIM & KAKUDO 1986. Effect of streptozotocin diabetes on gingivitis in plaque susceptible rats. *J dent res* 65:(1)49-52.
- ³⁷ RAMAMURTHY N S & GOLUB L M 1985. Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingival and skin. *J Periodontal Res*18:23-30.
- ³⁸ TAKAY N UCHIHASHI K YOSHIDA Y & KAKUDO Y 1983. Salivational and histological damage of submandibular and sublingual glands in streptozotocin-induced diabetic rats, *J osaka dent univ* 17:65-72.
- ³⁹ AZUMA Y SHINOHARA M & MORI M 1979. Experimental gingivitis in odu plaque susceptible rats III. Toxic activity of the rat dental plaque, *J periodontal* 50:416-418.
- ⁴⁰ HAND A R & WEISS R E 1984. Effects of estreptozotocin-induced diabetes on rat parotid gland. *Laboratory Investigation* 51(4):429-440.
- ⁴¹ JUNOD A, LAMBERT AE, ORCI L, PICTET R, GONET AE & RENOLD A E 1967. Stidies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med*.126:201-205.
- ⁴² BRIBIESCA L B & M MOURELL 1983. Función de las glándulas submaxilares y las células microgranulosas en la diabetes experimental por estreptozotocina en la rata. *Arch Invest Méd* 14(4):379-405.
- ⁴³ ANDERSON L C & B L SHAPIRO 1979. The effect of alloxan diabetes and insulin in vivo on peroxidase activity in the rat submandibular gland. *Arch Oral Biol* 24:343-345.
- ⁴⁴ ANDERSON L C & B L SHAPIRO 1980. The effect of alloxan diabetes and insulin of protein synthesis in the rat submandibular gland. *Horm metabolism* 12:47-51.
- ⁴⁵ GRILL V & HERBERG 1983. Glucose and arginine induced insulin and glucagon responses from the isolated perfused pancreas of the BB-Wistar

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

diabetic rat evidence for selective impairment of glucose regulation. *Acta Endocrinol* 102:561-566.

⁴⁶ MALAISSE WJ 1982. Mechanism of alloxan toxicity. *Biochem Pharmacol* 31:3527-3534.

⁴⁷ OKAMOTO H, YAMAMOTO H, TAKASAWA 1988. Lessons from animal diabetes II. Shafir E, Renold AE (eds). London, J Libbey, 149-157pp.

⁴⁸ COOPERSTEIN SJ, WATKINS D 1981. The islets of Langerhans . Cooperstein SJ, Watkins D (eds). New York, Academic Pres, 387-425pp.

⁴⁹ ABDEL-RAHMAN MS, ELRAKHAWY FI & ISKANDER FA 1992. Protection of B cells against the effect of alloxan. *Toxicol Lett* 63(2):155-164.

⁵⁰ HERR RR, EBLE TE, BERGY ME & JAHNKE HK 1959-1960. The structure of streptozotocin. *Antibiot Ann* 37:236

⁵¹ RAKIETEN N, RAKIETEN M L, NADKARNI M, V 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother.Rep* 29:91.

⁵² EVANS J S, GERRITSEN G C, MANN K M & OWEN S P 1965. Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep* 48:1.

⁵³ ARISON R N, CIACCIO E I, GLITZER M S, CASSARO A B & PRUSS M P 1967. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes* 16:51.

⁵⁴ SCHEIN P D, COONEY D & VERNON L 1967. Protection against streptozotocin induced diabetes. *Cancer Res.* 27:2324.

⁵⁵ HERR R R, JAHNKE H K & ARGOUEDELIS 1967. The structure of streptozotocin. *J Amer Chem Soc* 89: 4808.

⁵⁶ BERNAL ALFONSO, MENDEZ J D & ROSADO ALFONSO 1981. Determinación rápida de peso seco por colorimetría. *Arch Invest Méd* 12:83-88.

⁵⁷ LOWRY O H, ROSEBROUGH, N J FARR A L & RANDALL R J 1951. Protein Measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

-
- ⁵⁸ ITZHAKI RF & GILL DM 1964. A microbiuret method for estimating proteins. *Anal Biochem* 9:401-410.
- ⁵⁹ DISCHE 1930. Determination of DNA *Mikrochemie* 8:4.
- ⁶⁰ BURTON K J 1930. A study of the conditions and mechanism of the dipheylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Biochem* 62:315.
- ⁶¹ GILES K W & MYERS A 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of desoxyribonucleic acid. *Nature* 206:93.
- ⁶² MEJBAUM W HOPPE-SEYLER'S 1939. *J Physiol Chem* 258:117-123. SAN LIN RI & SCFRIDE SA 1969. Microestimation of RNA by the cupric ion catalized orcinol reaction. *Annal Biochem.* 27:473-483.
- ⁶³ MOHAMED S A-R, FATMA I E & FAKHRY A I 1992. Endocrine pancreas in the postnatal offspring of alloxan diabetic rats. *Toxicol Lett* 62(2-3)263-274.
- ⁶⁴ GEPTS W 1965. The diabetetic pancreas. *Diabetes* 14:619.
- ⁶⁵ MACLEAN N OGILVIE RF 1955. Statistical of diabetic pancreas. *Diabetes* 4:367.
- ⁶⁶ DONIACH I MORGAN RG 1973. The diabetic pancreas for estreptozotocin. *Clin Endocrinol* 2:223.
- ⁶⁷ BOMMER G MOROCHI T DRENCH CR 1981. Diabetogenic action of alloxan. *Verh Deutsch Ges Pathol.* 65:387
- ⁶⁸ DAVIDSON D M D, LEIBEL B S, BERRIS B 1969. Asymptomatic Parotid Gland Anlargement in Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine* 70(1)31-38
- ⁶⁹ VAN HAEFTEN TW, VOETBERG GA, GERICH JE, & VAN DER VEEN EA 1989 Dose-response characteristics for arginine-stimulates insulin secretion in man and influence of hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metabolism* 69(5)1059-1064
- ⁷⁰ CURRY DL, SAFARIK RH & REAVEN E 1987. Effect of age on the insulin secretory response of perfused rat pancreas to arginine and tolbutamide. *Horm metabol Res* 19:453-457

⁷¹ NOGOWSKI L & NOWAK KW 1986. Arginine administrated in various ways as a stimulator of insulin secretion in the rabbit. *Horm metabol Res* 18:730-733

⁷² WEICHELBAUM A 1910. *Sitzungsber akad Wissensch, Whien, Math-Naturwiss* 119:73.

⁷³ GEPTS W, LECOMPTE PM 1985. The diabetic páncreas. Arquilla ER(eds) New York, 341 pp.