

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA
EN ENFERMEDADES METABOLICAS

17

ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES EN GLANDULA PAROTIDA DE
RATAS CON DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA.

TESIS DE DOCTORADO

Que presenta

SERGIO A. ISLAS ANDRADE

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS (MORFOLOGIA)

TUTOR: DR ALFREDO FERIA VELASCO

COMITE TUTORIAL: DR. ALFONSO CARABEZ TREJO

DR. ARTURO ZARATE TREVIÑO



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Agradecimientos

A la memoria de mis padres

A mi esposa y a mis hijos

A mi tutor y amigo, el Dr. Alfredo Feria Velasco

A mi comité tutorial, Dr. Alfonso Carabez Trejo
Dr. Arturo Zárate Treviño

A mis investigadores por su ayuda y apoyo:

Dra María Cristina Revilla Monsalve

Dr. Salvador Sánchez de la Peña

A los estudiantes de la Unidad,

por su ayuda en la realización de éste trabajo: Dra. Ana C. Polanco
Dr. Miguel Angel Palomino

A la Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

Lista de Abreviaturas	4
Resumen en Español	5
Resumen en Inglés	6
1. Diabetes Mellitus	7
1.1. Antecedentes. Concepto	7
1.2. Clasificación del Grupo Nacional de Datos de Diabetes (NDGDM).	7,14
1.2.1 Clases clínicas	8
1.2.1.1 Tipo I Diabetes mellitus dependiente de insulina	8
1.2.1.2 Tipo II Diabetes mellitus no dependiente de insulina	9
1.2.1.3 Diabetes mellitus asociada con desnutrición	9
1.2.1.4 Otros tipos de diabetes mellitus	9
1.3. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).	15
1.4. Clasificación del Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA)	16
1.5. Criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus.	19
2. Diabetes Experimental	19
2.1 Mecanismo de acción diabetogénica de la aloxana	20
2.2 Mecanismo de acción diabetogénica de la estreptozotocina	21
2.2.1 Procesos de metilación	21
2.2.2 Radicales libres	21
2.2.3 Oxido nítrico	22
2.3 Relación de la dosis de estreptozotocina con la severidad de la diabetes	22
2.4 Preparación de la estreptozotocina	25
2.5 Susceptibilidad a la estreptozotocina en diferentes cepas de ratas.	25
3. Glándulas Salivales y diabetes	26
3.1 Aspectos Morfológicos	26
3.2 Su relación con la diabetes mellitus	26
4. Planteamiento del problema	28
5. Hipótesis	28
6. Objetivos	28
6.1 Objetivo General	28
6.2 Objetivos Particulares	28

7.	Materiales y métodos	29
7.1	Integración de los grupos	29
7.2	Triglicéridos	30
7.3	Colesterol Total	30
7.4	Glucosa plasmática	30
7.5	Insulina plasmática	30
7.6	Sacrificio de los animales y extracción del tejido	30
7.7	Estudio morfológico	31
7.8	Análisis estadístico	32
8.	Resultados:	32
8.1	Análisis Bioquímico	32
8.2	Análisis Morfológico de los Islotes de Langerhans con microscopía de luz	37
8.3	Análisis Morfológico de la Glándula Parótida	41
8.3.1	Microscopía de Luz.	41
8.4	Microscopía Electrónica	44
8.4.1	Animales testigo	44
8.4.2	Animales Experimentales	49
9.	Discusión	53
10.	Referencias	57

Tablas y Figuras:

Tabla 1	33
Tabla 2	36
Tabla 3	38
Tabla 4	44
Gráfica 1	34
Gráfica 2	35
Figura 1	31
Figura 2	37
Figura 3	38
Figura 4	38
Figura 5	39
Figura 6	40
Figura 7	41
Figura 8	42
Figura 9	42
Figura 10	43
Figura 11	43
Figura 12	45
Figura 13	46
Figura 14	48
Figura 15	50
Figura 16	51
Figura 17	52
Figura 18	53

Lista de Abreviaturas:

NDDG:	National Diabetes Data Group
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ADA:	American Diabetes Association
HLA:	Sistema de Antígenos de Histocompatibilidad
DM tipo 1:	Diabetes Mellitus tipo 1 (insulino-dependiente)
DM tipo 2:	Diabetes Mellitus tipo 2 (no insulino-dependiente)
MODY:	Maturity Onset Diabetes in Young
DMG:	Diabetes Mellitus Gestacional
GAD ₆₅ :	Glutámico Descarboxilasa
IGT:	Intolerancia a la Glucosa de Ayuno (Impaired Glucose Tolerance)
IFG:	Intolerancia o anomalías de la Glucosa de Ayuno (Impaired Fasting
Glucose)	
FGP:	Glucosa Plasmática de Ayuno
STZ:	Estreptozotocina
AL:	Aloxana
DNA:	Acido Desoxirribonucleico
ON:	Oxido Nítrico
Sprague-Dawley:	Un tipo de cepa específica de ratas
Wistar:	Un tipo de cepa específica de ratas
Sherman:	Un tipo de cepa específica de ratas
BALB/c.	Un tipo de cepa específica de ratas
Wistar-Kyoto:	Un tipo de cepa específica de ratas
ip:	Intraperitoneal
iv:	Intravenosa
sc:	Subcutánea
ic:	Intracardiaca
im:	Intramuscular
mmol/l:	milimoles/litro
μU/l:	microunidades/litro
mg/dl:	miligramos/decilitro
M:	concentración molar
T Student:	prueba estadística
DE:	desviación estándar

RESUMEN

Los estudios acerca del papel que las glándulas salivales tienen en la patogenia de la diabetes mellitus, son aislados y algunos controversiales. Debido a lo anterior, decidimos caracterizar los cambios morfológicos del sistema glandular endocrino en la diabetes experimentalmente producida por estreptozotocina (STZ) en la rata, así como evaluar el modelo de diabetes experimentalmente producido por aloxana (AL) y STZ en la rata. Conocer los cambios morfológicos de la glándula parótida de rata con diabetes experimentalmente producida por STZ, en función del tiempo de evolución del trastorno metabólico. Se estudiaron 108 ratas macho Sprague-Dawley con peso de 250 ± 44 g, que se dividieron al azar, en 2 grupos con 9 subgrupos experimentales cada uno. Cada subgrupo estuvo integrado por 3 ratas, con un número igual de ratas control. La diabetes fue inducida en 27 ratas con una inyección intraperitoneal (ip) de AL: 120 mg / kg de peso. A las ratas control (20) se les inyectó el mismo volumen ip. de agua bidestilada. La STZ se inyectó ip a 27 ratas, 60 mg/kg de peso. A las ratas control (20) se les inyectó el mismo volumen ip de agua bidestilada. Todos los animales se pesaron y se les tomó muestra de sangre de la vena de la cola, 2 ml., para estudios basales de triglicéridos, colesterol total, glucosa e insulina. Los pesos corporales basales fueron de 250 ± 44.1 g Después del día 5 de la inyección de STZ; los pesos fueron diferentes significativamente. Parámetros bioquímicos AL: Los niveles de glucosa fueron más elevados al 5º día después de la inyección ip. (29.5 mmol/l), y posteriormente una disminución significativa al día 20 (10.6 mmol/l). La concentración más baja de insulina fue el día 5 después de la inyección ip. (5.04 μ U/ml), coincidiendo con los niveles más altos de glucosa. Para el día 20 después de la inyección ip, los niveles de glucosa estaban prácticamente recuperados (19.6 μ U/ml). Los valores de triglicéridos fueron más elevados en el día 9 (166 mg/dl) con disminución al día 20 (85.6 mg/dl). El colesterol total se incrementó paulatinamente después de la inyección alcanzando sus valores más elevados en el día 20 (89 mg/dl). STZ: Los niveles de glucosa más elevados fueron al 9º día después de la STZ (34.5 mmol/l), pero iniciaron su incremento desde el 2º día. Los niveles de insulina iniciaron su descenso desde los 30 minutos después de la inyección ip. y la concentración más baja fue el día 20 (4 μ U/ml). Los triglicéridos alcanzaron su nivel más elevado el día 20 (182 mg/dl) después de la STZ, pero su elevación se inició desde el día 5. Las concentraciones de colesterol también alcanzaron su nivel más elevado el día 20 (94.2 mg/dl). Cuando se compararon los valores de glucosa e insulina entre los 2 grupos experimentales, hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.005$) en la mayoría de los diferentes tipos estudiados. Microscopia electrónica (ME) 8 días: los acini glandulares, con desorganización parcial de los componentes intracelulares en las células secretoras, distensión del espacio intercelular, y diferente ubicación de los núcleos en las células acinares. Desorganización en la distribución de las sistemas de retículo endoplásmico granular y la presencia de vacuolas claras de diferente tamaño en el citoplasma de las células acinares. Numerosos gránulos con un material finamente granular y de aspecto lúcido al haz de los electrones. Estas granulaciones estuvieron mezcladas entre los gránulos de zimógeno. Debido a la electrodensidad de los gránulos de zimógeno, no se pudieron identificar lisosomas. Se identificaron algunos citosomas, principalmente hacia la región basal de algunas células acinares. En los conductos excretores se identificaron células de citoplasma denso al haz de los electrones y células con citoplasma claro con moderada cantidad de organelos y muy escasos gránulos esféricos limitados por membrana. Estas células claras fueron más numerosas en algunos conductos de mediano calibre. La membrana basal de los túbulos excretores fue normal. 30 días: Desorganización de los componentes celulares en numerosos acini glandulares, con una disminución importante en gránulos de zimógeno electrodensos, mezclados con gránulos claros cuyo contenido fué un material finamente granular, semejante al observado a los 8 días de la inyección de STZ. No obstante que la mayoría de las células acinares mostraron regularidad en la distribución de las sistemas del retículo endoplásmico granular y del aparato de Golgi, en varias células acinares se observó distorsión de esos elementos con desorganización estructural de los mismos. Las mitocondrias se observaron lúcidas al haz de los electrones y de localización principalmente submembranal tanto en la región basal como en las zonas laterales de las células acinares. Se observaron cambios nucleares principalmente consistentes en irregularidad de la cisterna perinuclear, aumento de la heterocromatina, y cambios morfológicos semejantes a los observados en células con apoptosis. El nucleolo fué muy prominente en varias de estas células, algunas de las cuales se observaron binucleadas. Los conductos excretores mostraron cambios semejantes a los observados en el material correspondiente a los 8 días de la inyección de STZ. El resto de las estructuras interacinares, intertubulares e intertubulilares, no mostraron alteraciones morfológicas. Los hallazgos de nuestro estudio sugieren que las glándulas parótidas de ratas con diabetes inducida por STZ, tienen alteraciones ultraestructurales que son más importantes conforme avanza el tiempo de evolución de la diabetes y que correlacionan con las alteraciones bioquímicas en los niveles de glucosa, insulina y lípidos.

ABSTRACT

Studies related with the role of the salivary glands in the pathogenicity of diabetes are few and controversial. So we decided to analyze the morphological changes of the endocrine glandular system in experimentally induced diabetes in rats, searching for the morphological changes of the parotid gland in relation with the evolution of this metabolic disorder. In order to determine the best experimental model we induced diabetes with alloxan (AL) and with streptozotocin (STZ).

108 male Sprague-Dawley rats with an average weight of 250 ± 44 g were randomly allotted in two groups with 9 subgroups each and subgroup with 3 experimental and 3 control rats. Diabetes was induced to 27 rats with an intraperitoneally injection (i.p.) of AL (120 mg/kg) 20 control rats received an i.p. injection of the same volume of bidistilled water. STZ was ip. injected to 27 rats (60 mg/kg) and the control rats also received an i.p. injection of the same volume of bidistilled water. The determination of glucose, insulin, triglycerides and total cholesterol was performed 30 minutes, and 1, 2, 5, 7, 9, 12 and 15 days after the diabetes induction. All the rats were weighted and from a sample of the tail vein blood, basal levels of triglycerides, total cholesterol, glucose and insulin were determined. Five days after the i.p. injection of STZ the body weight was significantly different.

In AL rats glucose levels were higher the 5th day after i.p. injection (29.5 mmol/l) with a significant reduction on day 20 (10.6 mmol/l). The lowest levels of insulin (5.04 μ U/ml) were detected on day 5, coinciding with the highest levels of glucose. On day 20 after i.p. injection insulin was practically normal (19 μ U/ml). Triglycerides values were higher on day 9 (166 mg/dl) reducing its levels on day 20 (85.6 mg/dl). Total cholesterol levels increased gradually after ip. injection reaching the highest levels on day 20 (89 mg/dl).

In STZ injected rats the highest glucose levels (34.5 mmol/l) were detected on day 9 after the i.p. injection but started increasing from day 2 on. The insulin levels started its decrease 30 minutes after the i.p. injection and the lowest concentration (4 μ U/ml) were detected on day 20. Triglycerides reached its highest levels (182 mg/dl) on day 20, but the increase started on day 5. Cholesterol concentrations also reached the highest levels (94.2 mg/dl) on day 20. When the glucose and insulin levels of the 2 groups were compared there was a significant difference ($p < 0.005$) in most of the different times studied.

Due to the fact that STZ was a better diabetes inductor we decided to perform the structural analysis of the parotid gland in the STZ treated rats.

The ultrastructural analysis of the glandular acini revealed a partial disruption of the intracellular components of the secretory cells, distension of the intercellular space and a different localization of the acinar cells' nuclei. There was also disruption of the granular endoplasmic reticulum and presence of clear vacuole of different sizes in the cytoplasm of the acinar cells. Remarkable was the presence of translucent granules located between the zimogen granules. Due to the electron density of the zimogen granules it was not possible to identify lysosomes. Citosegregosomes were identified mainly in the basal region of some acinar cells. In the excretory ducts there were cells with an electron density cytoplasm and cells with a clear cytoplasm with moderate quantity of organelles and scarce membrane limited spherical granules. These clear cells were more numerous in some of the mid caliber ducts. The basal membrane of the excretory ducts was normal. 30 days after the i.p. injection the glandular acini showed a disruption of the cellular components with an important reduction of the electron density zimogen granules, mixed with clear granules whose content was a finely granular material, similar to the one observed 8 days after the i.p. injection. Nevertheless that most of the acinar cells showed regularity in the distribution of the cisternae of the granular endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, in various acinar cells there was a distortion of that elements with structural disruption. Mitochondria were translucent to the electron beam and were located mainly submembranal in the basal and in the lateral zone of the acinar cells.

Nuclear changes were observed consisting in irregularity of the perinuclear cistern, increase of the heterochromatin and morphological changes similar to those observed in apoptotic cells. The nucleus was very prominent in many cells; some of them were binucleated. The excretory ducts showed changes similar to those observed in the 8 days material. The rest of the interacinar structures, interlobular and interlobular showed no morphological changes.

The findings of this study suggest that the parotid gland of the STZ induced diabetic rats show ultrastructural alterations that are more important with the time of evolution of diabetes and that these alterations correlate with the biochemical alterations of glucose, insulin and triglyceride levels.

1. DIABETES MELLITUS.

1.1 ANTECEDENTES, CONCEPTO.

La expresión diabetes mellitus por sí sola no define a la enfermedad; pero en la práctica cualquier trastorno que produzca elevación de la glucosa plasmática después de ayuno tiende a denominarse diabetes mellitus. Algunas enfermedades se acompañan de hiperglucemia persistente y de esta forma tienen características para suponer el diagnóstico.

En términos más concretos, la diabetes mellitus es una enfermedad determinada genéticamente en la que el sujeto que la padece tiene alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, junto con una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a ésta. Cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de pacientes con larga evolución de la enfermedad, por complicaciones microangiopáticas, en especial renales y oculares, así como macroangiopatía con afección de arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía¹⁻⁴

Aunque las diferencias fenotípicas mayores en los distintos tipos de diabetes clínica se conocen desde hace muchos años, sólo en la última década se incrementó el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad, empero de manera incompleta. Hasta ahora, dicho conocimiento indica que la diabetes es no sólo la simple elevación de glucosa en sangre, sino un trastorno muy heterogéneo que implica varias anormalidades. Esta heterogeneidad significa que hay diferencias entre grupos de pacientes en cuanto a etiología y patogenia genéticas, ambientales e inmunológicas, así como en la historia natural y en la respuesta al tratamiento. De tal forma, la diabetes no es una simple enfermedad sino un síndrome que debe enfocarse desde el punto de vista integral.

1.2, CLASIFICACION

En 1979, el National Diabetes Data Group (NDDG)⁵, de los Institutos Nacionales de Salud, en Estados Unidos, publicó la clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías de la intolerancia a la glucosa (cuadro 1).

En el cuadro 1-2 se presenta la clasificación que propuso el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1980 y que se revisó en 1985⁶.

Estas clasificaciones tenían en común el abandono de terminología previa como diabetes química, linitrofe, subclínica, latente y diabetes sintomática.

En la clasificación NDDG se requieren datos de laboratorio que confirmen características genéticas e inmunológicas para poder emplear el término de diabetes tipo I y que además, incluyan la medición de anticuerpos contra islotes, que no pueden demostrarse en 10 a 15% de los casos con diabetes mellitus dependiente de insulina. Exige además la determinación de haplotipos y otros que sólo se encuentran disponibles en centros de

investigación y por tanto fuera del alcance de laboratorios de rutina convencionales. El comité de expertos de la OMS prefiere el término de diabetes mellitus dependiente de insulina y no el de diabetes tipo I.

En relación con la diabetes mellitus tipo II, ya que no existe una definición realmente adecuada, se prefería la denominación de diabetes mellitus no dependiente de insulina.

1.2.1 Clases clínicas

La diabetes mellitus se subdivide en cuatro grupos diferentes. El tipo I y el tipo II son las formas clínicas más frecuentes en el mundo occidental, mientras la relacionada con desnutrición (tercer grupo) es la forma clínica predominante en parte de África, Asia y el Caribe. El cuarto grupo comprende otras entidades que, en contraste con la diabetes primaria o esencial, es secundaria o asociada a ciertos síndromes genéticos raros.

1.2.1.1 Tipo I. Diabetes mellitus dependiente de insulina

Se subdividía en tipo IA o clásica y IB primaria o autoinmunitaria. La de tipo I representa acerca de 10% de todos los diabéticos del mundo occidental. Los factores genéticos son muy importantes en la mayoría de los pacientes, como lo manifiesta su asociación con ciertos antígenos de histocompatibilidad (HLA) del cromosoma 6. Se han encontrado asociados con alta prevalencia los antígenos HLA B8, BW15, B18, A1, CW3, DW3, DW4, DR3 y DR4. En menor frecuencia los antígenos B7 y DW2. Según el equilibrio que guarden la expresión de estos genes y el ambiente aumentará o disminuirá el daño sobre la célula beta. Entre los factores ambientales, figuran ciertas infecciones virales y agentes químicos superimpuestos o factores genéticos que pueden causar destrucción autoinmunitaria de células beta. De esta forma, por razones genéticas, existen formas de respuesta inmunitaria anormal (ligadas al sistema HLA), caracterizadas por autoinmunidad celular y humoral francamente anormales. Los anticuerpos contra insulina están presentes en 80% de los pacientes al momento del diagnóstico, pero desaparecen pocos años después en el curso de la enfermedad; ocurre en la infancia o en la adolescencia. En general, tiene inicio brusco con síntomas que obedecen a la falta de insulina (poliuria, polifagia, polidipsia, pérdida de peso, fatiga) y tendencia a la cetosis.

La dependencia de la insulina implica que la administración de la misma es esencial para prevenir cetosis espontánea, estado de coma y muerte.

Dentro de la diabetes mellitus dependiente de insulina, un pequeño porcentaje tiene la autoinmunidad primaria involucrada (tipo IB), al asociarse enfermedades autoinmunitarias endocrinas como la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves-Basedow, la de Addison, la insuficiencia gonadal primaria y otro tipo de enfermedades autoinmunitarias como anemia perniciosa, enfermedades del tejido conectivo, enfermedad celiaca y *miastenia gravis*. Estos pacientes tienen también antecedentes familiares de enfermedades autoinmunitarias y endocrinas. Este tipo de diabetes ocurre con más

frecuencia en mujeres que en hombres y cursa con inicio tardío de los síntomas diabéticos, usualmente entre los 30 y los 50 años de edad. Estos pacientes tienen mayor asociación con antígenos HLA DR3, mientras la clásica diabetes tipo I (A) se caracteriza por antígenos HLA DR4.

1.2.1.2 Tipo II. Diabetes mellitus no dependiente de insulina

La diabetes mellitus tipo II representa a casi 90% de todos los diabéticos del mundo occidental. También tiene bases genéticas que se expresan por una mayor ocurrencia familiar. Los factores ambientales y el estilo de vida influyen con fuerza en el desencadenamiento y evolución de la enfermedad. Los pacientes con este padecimiento y sobrepeso son subclasificados como obesos. La obesidad cursa además con resistencia a la insulina, factor importante en la patogenia de la mayoría de pacientes con este tipo de diabetes. La hiperglucemia en ayunas y la curva de tolerancia a la glucosa suelen mejorar al corregir el peso. En la mayoría de pacientes el diagnóstico se efectúa en la edad media de la vida.

Una subclase especial de diabetes mellitus no dependiente de insulina incluye familias con diabetes que puede reconocerse en niños, adolescentes y adultos jóvenes y se define como diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes in Young). Se hereda con carácter autosómico dominante. Conviene aclarar que la mayoría de los diabéticos no dependientes de insulina no heredan la enfermedad en esta forma.

En la diabetes tipo II no se han encontrado asociaciones con ningún antígeno HLA, ni tampoco en la diabetes MODY. Sin embargo, tres tipos específicos de población se asocian con diabetes tipo 2: indios Pimas con HLA-A2, Xhosas con HLA-A2 y Fijians con HLA-BW6.

1.2.1.3 Diabetes mellitus asociada con desnutrición

Ocurre en ciertas partes del mundo. Es más frecuente en la diabetes dependiente de insulina. Tiene una frecuencia particular en la India y ciertas partes de África. Se observa en gente joven y se caracteriza por la grave desnutrición proteica y emaciación. En algunos pacientes pueden evidenciarse cálculos pancreáticos en la radiografía de abdomen. La diabetes de estos enfermos cursa con gran hiperglucemia sin cetosis.

1.2.1.4 Otros tipos de diabetes

Incluyen entidades secundarias o asociadas con ciertas alteraciones o síndromes; así, se denominan diabetes asociada con acromegalia, o síndrome de Cushing, glucagonoma, etc.; o bien, secundaria a la administración de ciertos fármacos, como diuréticos, preparaciones a base de estrógenos, etc.

Finalmente, la diabetes puede asociarse con defectos genéticos de los receptores de insulina, bien en el número o en la afinidad de éstos, o por defectos genéticos que cursan con anticuerpos contra receptores, con o sin enfermedad autoinmunitaria asociada.

Las clases con riesgo estadístico son aquéllas en las que ciertos sujetos con anomalías en la curva de tolerancia a la glucosa pueden clasificarse de acuerdo con el estado en que se encuentran (cuadros 1 y 2).

Con base en estas clasificaciones es fácil reconocer la necesidad de una reconsideración como una necesidad en todo el mundo, por las razones que siguen.

Las clasificaciones anteriores, no incorporaban el aspecto dinámico de la enfermedad.

Esta evoluciona y por lo tanto la expresión fenotípica varía en el mismo individuo, según el tiempo de evolución, la existencia de complicaciones, etc. Tampoco incorporaban la interrelación estrecha entre resistencia a la acción de la insulina y la secreción de la hormona en la diabetes tipo II. Además, no tomaban en cuenta los conceptos actuales acerca de la historia natural de la denominada tipo I, sobre todo en el período preclínico, ni eran flexibles para cambiar o adoptar de acuerdo con los avances de la investigación actual. No tomaban en cuenta aspectos de terapéutica, más que sólo la dependencia o no de insulina. Para el investigador son muy simplistas, para el clínico demasiado rígidas y para el epidemiólogo demasiado complicadas.

En Mayo de 1995 se reunió un Comité Internacional de Expertos con el aval de la Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association), para analizar los conceptos vertidos en la literatura sobre el tema desde 1979 y decidió efectuar cambios en el diagnóstico y en la clasificación. Los resultados de consenso de dicho comité fueron publicados recientemente⁷ y los comentaremos a continuación.

Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes y abarcan desde la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas con la consecuente deficiencia de insulina, hasta las anomalías que resultan de la acción de la resistencia a ésta⁷

La deficiente acción de la insulina se origina por la inadecuada secreción de ésta y/o la disminución de la respuesta tisular⁸. Estos defectos coexisten siempre en el mismo paciente:

A) Existen diversos trastornos, la mayoría de ellos raros, pero que tienen en común la intolerancia a la glucosa como hallazgo.

B) Existen grandes diferencias en la prevalencia entre los diferentes grupos raciales alrededor del mundo⁹.

C) Los pacientes con intolerancia a la glucosa tienen también grandes variaciones fenotípicas (por ejemplo, los insulino dependientes con obesidad, los que tienen resistencia a la insulina, etc.).

D) Existen evidencias genéticas, inmunológicas y clínicas que muestran que en los países occidentales las formas de diabetes que inician primariamente en personas jóvenes, son diferentes de aquellas formas que inician en la edad adulta.

E) Existe un tipo de diabetes no dependiente de insulina en personas jóvenes, que se hereda con carácter autosómico dominante y que es claramente diferente de la que inicia en niños, que se conoce como Maturity Onset Diabetes in Young (MODY)¹⁰.

Sobre estas bases, el Comité Internacional de Expertos ha considerado proponer cambios a las clasificaciones del NDDG y de la OMS.

Los principales aspectos considerados para dichos cambios son:

1. Los términos *insulino dependiente* y *no-insulino dependiente* son eliminados debido a que son a menudo confundidos (en las siglas: DMID y DMNID) y se basan en el tratamiento solo con insulina, más que en la etiología.

2. Los términos *tipo I* y *tipo II* deberán continuar su uso, pero con números arábigos no con números romanos *Tipo 1* y *tipo 2*.

En el caso de la *diabetes tipo 1*, la mayor parte de los casos se asocia con marcadores de destrucción inmune de la célula β incluyendo anticuerpos antiinsulina, autoanticuerpos contra insulina, autoanticuerpos contra ácido glutámico-descarboxilasa (GAD₆₅) y autoanticuerpos contra tirosin-fosfatasa IA-2, IA-2 β ¹¹⁻¹⁴. Por lo menos uno o más de estos anticuerpos están presentes en el 80-90% de los pacientes cuando tienen hiperglucemia de ayuno¹¹⁻¹².

En los casos en donde estos hallazgos no se pueden demostrar, deberá clasificarse como *tipo 1 idiopática*.

3. La denominada *tipo 2*, es el tipo más prevalente de diabetes y es resultado de la resistencia a la insulina con un defecto en su secreción. Dentro de este tipo, está el tipo 2, con predominio de la resistencia a la insulina, que inicia en la edad adulta y que tiene una relativa deficiencia de insulina, más que absoluta⁹⁻¹⁵.

Al menos desde el inicio y a lo largo de su vida, los individuos con este tipo (que son la mayor parte de diabéticos adultos en el mundo), no necesitan de insulina para sobrevivir. Asimismo, la mayor parte de los individuos que tienen la diabetes tipo 2, son obesos y la obesidad contribuye a cierto grado de resistencia a la insulina⁹⁻¹⁶. El hecho de tener aumento de la grasa abdominal, en las medidas antropométricas, aún sin tener el criterio de obesidad por sobrepeso; se ha asociado a resistencia a la insulina⁹. La mayor parte de

los pacientes con este tipo de diabetes son obesos y la obesidad por sí sola causa resistencia a la insulina^{15,17}. Los que no son obesos por sobrepeso, pueden tener aumento de la distribución de grasa en la región abdominal¹⁶.

La cetoacidosis, no es un evento frecuente en la diabetes tipo 2, pero cuando se presenta, se asocia con enfermedades subyacentes como infecciones graves¹⁸⁻²⁰.

La diabetes tipo 2, a menudo pasa desapercibida durante mucho tiempo (meses o años) antes de que la hiperglucemia se haga evidente²¹⁻²³, sin embargo tales pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar complicaciones macro y microvasculares²³⁻²⁶. Estos pacientes pueden tener niveles normales o elevados de insulina, con niveles elevados de glucosa en sangre²⁰. Ello traduce un efecto de resistencia a la insulina y un defecto para compensarla. La resistencia a la insulina puede mejorar con reducción de peso corporal y/o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia que por sí sola, ésta última regresará a lo normal^{22,26}.

El riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, se incrementa con la edad, con la obesidad y con la pérdida de la actividad física²². Esto ocurre más frecuentemente en mujeres con diabetes gestacional y en individuos con hipertensión arterial e hiperlipidemia; con variaciones en diferentes grupos étnicos²¹⁻²³.

4. La clasificación del tipo de diabetes relacionada con la desnutrición desaparece, ya que la teoría de que la diabetes se origina por una deficiencia proteica nunca fue convincente. La enfermedad del páncreas fibrocalculosa (subtipo de la asociada a desnutrición) ha sido reclasificada como una enfermedad del páncreas exócrino.

5. El estado de *intolerancia a la glucosa (IGT= impaired glucose tolerance)* permanece dentro de la clasificación. Asimismo, se incluye ahora, un estado intermedio de intolerancia a la glucosa en ayunas, que se denominará *intolerancia a la glucosa en ayunas (IFG= impaired fasting glucose)*.

Los estados de *IGT* e *IFG* reflejan pasos intermedios entre la diabetes y la homeostasis de la glucosa. El término de *IFG* se refiere a los niveles de la glucosa plasmática de ayuno (*FPG*) ≥ 110 mg/dl (6.1 mmol/l) pero < 140 mg/dl (7.8 mmol/l). En la nueva clasificación se ha tomado la *FPG* de 110 mg/dl, como superior a la "normal" y aunque es un poco arbitraria, pero es el límite en el cual la fase de secreción aguda de insulina se pierde en respuesta a la administración endovenosa de glucosa²⁷ y es asociado con un riesgo mayor de desarrollar complicaciones macro y microvasculares²⁸⁻³².

Muchos individuos con *IGT* son euglicémicos y pueden tener niveles normales o casi normales de hemoglobina glucosilada³³ y manifiestan hiperglucemia sólo cuando son sujetos de una carga oral de 75 gr de glucosa.

En ausencia de embarazo, la *IFG* y la *IGT* no son entidades clínicas que por sí solas, pero algo contribuyen como factores de riesgo para futura diabetes y enfermedad cardiovascular.

6. La clasificación de Diabetes Mellitus Gestacional permanece igual que en las clasificaciones previas (NDDG y OMS).

7. El grado de hiperglucemia puede tener variaciones en la evolución de la enfermedad (cuadro 4)

CRITERIOS DIAGNOSTICOS PARA DIABETES MELLITUS

Los criterios diagnósticos han sido modificados de los recomendados por las clasificaciones anteriores. Los criterios revisados para el diagnóstico se observan en el cuadro

Hay tres formas posibles de diagnosticar diabetes y cada una debe ser confirmada. Por ejemplo, un paciente con síntomas clásicos con una elevación casual de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dl, debe ser confirmada al día siguiente con *FPG* ≥ 126 mg/dl, curva de tolerancia oral con carga de 75 gr de glucosa, con cifras ≥ 200 mg/dl a las 2 horas. Para fines de realizar estudios epidemiológicos que estimen la prevalencia y la incidencia de diabetes, pueden basarse en una glucosa plasmática de ayuno (*FPG*) ≥ 126 mg/dl. Esta recomendación la hace el Comité de Expertos con el propósito de estandarizar criterios y facilitar el campo de trabajo, especialmente para disminuir costos y tiempo, que permitiría realizar mayor número de estudios en grandes grupos de población sin tener que efectuarles necesariamente a todos, curva de tolerancia a la glucosa. Esta recomendación pudiera tender ligeramente a disminuir la estimación de la prevalencia que si se utilizara la combinación de *FPG* y curva de tolerancia a la glucosa. El Comité de Expertos reconoce que puede haber grupos de pacientes con categorías intermedias que no reúnan las categorías para el diagnóstico de diabetes:

FPG < 110 mg/dl = Glucosa de ayunas normal

FPG ≥ 110 mg/dl y < 126 mg/dl = IFG = Intolerancia a la glucosa de ayuno.

FPG ≥ 126 mg/dl = diagnóstico provisional de diabetes que debe confirmarse como ya se mencionó.

Las categorías correspondientes cuando se utiliza la Curva de Tolerancia a la Glucosa (CTG) son:

A las 2h postcarga (2hPG) < 140 mg/dl = Tolerancia a la glucosa normal.

2hPG ≥ 140 mg/dl y ≤ 200 mg/dl = IGT

2hPG ≥ 200 mg/dl = diagnóstico provisional de diabetes que debe confirmarse como se mencionó.

El tener el punto de corte de 2h-CTG de 140 mg/dl identificará a más personas con alteraciones de la homeostasis de glucosa, más que 110 mg/dl en ayunas. Esto es esencial para que los investigadores mencionen que parámetro utilizan en sus estudios de investigación.

Cuadro 1. Clasificación de diabetes mellitus y otras categorías relacionadas (Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes, Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos, 1979)

**CLASES CLINICAS
DIABETES MELLITUS**

Diabetes mellitus dependiente de insulina o tipo I (DMID)
Diabetes mellitus no dependiente de insulina o tipo II (DMNID)
No obeso
Obeso
Diabetes asociada con otras situaciones o síndromes
Enfermedad pancreática
De etiología hormonal
Inducido por sustancias químicas o fármacos
Anormalidades del receptor de insulina
Síndromes genéticos
Misceláneas
Diabetes mellitus gestacional (DMG)

ANORMALIDADES DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA (ATG)

No obeso
Obeso
Asociada con otras situaciones o síndromes (misma subdivisión de la DM asociada con otras situaciones o síndromes)

CLASES CON RIESGO ESTADISTICO

Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa DM o ATG previas, sin alteración bioquímica presente.
Anormalidad potencial de la tolerancia a la glucosa. Pacientes con historia familiar de DM, macrosomía, problemas obstétricos, miembros de tribus con prevalencia alta de DM, gemelo idéntico a otro con diabetes, anticuerpos a islotes positivos, obesos.

*Sujetos con tolerancia a la glucosa normal, pero con riesgo aumentado de desarrollar diabetes.

1.3. Clasificación de la diabetes mellitus. Comité de Expertos de la OMS.

Cuadro 2. Clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías relacionadas. Comité de Expertos de la OMS, 1985

A. CLASES CLINICAS DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus dependiente de insulina (DMID)
Diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNID)
No obeso
Obeso
Diabetes mellitus relacionada con malnutrición (DMRM)
Diabetes pancreática fibrocalculosa
Diabetes relacionada con desnutrición con deficiencia proteica
Diabetes asociada con otras situaciones o síndromes
Enfermedad pancreática
Enfermedad de etiología hormonal
Inducida por sustancias químicas o fármacos
Anormalidades de la molécula de insulina o sus receptores
Ciertos síndromes genéticos
Misceláneas
Diabetes mellitus gestacional (DMG)

ANORMALIDAD DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA

No obeso
Obeso
Asociada con otras situaciones o síndromes

B. CLASES CON RIESGO ESTADISTICO

Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa
Mismo criterio que GNDD
Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa
Mismo criterio que GNDD

* Sujetos con tolerancia a la glucosa normal, con riesgo aumentado de desarrollar diabetes.

1.4 Clasificación de la Diabetes Mellitus, Comité de Expertos de la ADA.

Cuadro 3. Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus. Comité de Expertos de la American Diabetes Association, 1997.

I. Diabetes tipo 1* (destrucción de células β , que conduce a una deficiencia absoluta de insulina):

- A. Mediada por mecanismos inmunológicos
- B. Idiopática

II. Diabetes tipo 2* (con variaciones desde la resistencia a la insulina predominante con relativa deficiencia de insulina al defecto en la secreción predominante con resistencia a la insulina).

III. Otros tipos específicos:

A. Defectos genéticos de la función de la célula β en:

1. Cromosoma 12, HNF-1 α (MODY 3).
2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2).
3. Cromosoma 20, HNF-4 α (MODY 1).
4. ADN mitocondrial.
5. Otras.

B. Defectos genéticos en la acción de la insulina

1. Resistencia a la insulina tipo A
2. Leprechaunismo
3. Síndrome de Rabson-Mendehall
4. Diabetes lipoatrófica
5. Otras.

C. Enfermedades del páncreas exócrino

1. Pancreatitis
2. Traumatismo/pancreatectomía
3. Neoplasia
4. Fibrosis quística
5. Hemocromatosis
6. Pancreatopatía fibrocalcúlosa
7. Otras

D. Endocrinopatías

1. Acromegalia
 2. Síndrome de Cushing
 3. Glucagonoma
 4. Feocromocitoma
 5. Hipertiroidismo
 6. Somatotatinoma
 7. Aldosteronoma
 8. Otras
- E. Sustancias químicas o drogas capaces de inducir diabetes:
1. Pentamidina
 2. Acido nicotínico
 3. Glucocorticoides
 4. Hormona tiroidea
 5. Diazóxido
 6. Agonistas β -adrenérgicos
 7. Tiazidas
 8. Difenilhidantoína
 9. α -interferon
 10. Otras
- F. Infecciones
1. Rubeola Congénita
 2. Citomegalovirus
 3. Otras
- G. Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente:
1. "Síndrome del Hombre rígido"
 2. Anticuerpos contra el receptor de insulina
 3. Otras
- H. Otros síndromes que algunas veces se asocian con diabetes:
1. Síndrome de Down
 2. Síndrome de Klinefelter
 3. Síndrome de Turner
 4. Síndrome de Wolfram
 5. Ataxia de Friedreich
 6. Corea de Huntington

1.5 Criterios para el Diagnóstico de Diabetes Mellitus

Cuadro 5. Criterios para el Diagnóstico de Diabetes Mellitus.

1. Síntomas de diabetes y una elevación casual de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dl.(11.1 mmol/l) Casual se refiere como en cualquier tiempo y día pero sin relación con el tiempo del último alimento. Los síntomas clásicos son: poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable por otras causas

ó

2. FPG ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l). Ayuno es definido como la no-ingestión de calorías por lo menos en las 8 horas anteriores.

ó

3. 2h PG > 200 mg/dl durante una CTG. La prueba debe ser realizada con los criterios de la OMS, utilizando 75 gr de glucosa para la carga oral disuelta en agua.

2. DIABETES EXPERIMENTAL

Los modelos genéticos que semejan a la diabetes mellitus tipo 2, son producidos a través de selección de especies, mutaciones espontáneas o ingeniería genética. Algunos ejemplos incluyen a los ratones db/db, los ob/ob, los KK, los NZO, las ratas *fa/fa* Zucker y las diabéticas *fa/fa* Zucker. La mayoría de esos modelos tienen grados variables de hiperglucemia, de insulinemia y de obesidad.

Químicamente, la diabetes mellitus, puede ser inducida por la inyección de diversos agentes, siendo el más usado, la estreptozotocina^{34, 35}

Los modelos genéticos o químicos que semejan a la diabetes mellitus tipo 1, son los que ocasionan reducción del número de células β ³⁶. Estos incluyen a los ratones NOD y a las ratas diabéticas BB. En esos animales, la diabetes ocurre espontáneamente con una total dependencia de insulina exógena para poder sobrevivir. Desde el punto de vista químico, se pueden clasificar a los agentes en:

1.5 Criterios para el Diagnóstico de Diabetes Mellitus

Cuadro 5. Criterios para el Diagnóstico de Diabetes Mellitus.

1. Síntomas de diabetes y una elevación casual de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dl.(11.1 mmol/l) Casual se refiere como en cualquier tiempo y día pero sin relación con el tiempo del último alimento. Los síntomas clásicos son: poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable por otras causas

ó

2. FPG ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l). Ayuno es definido como la no-ingestión de calorías por lo menos en las 8 horas anteriores.

ó

3. 2h PG > 200 mg/dl durante una CTG. La prueba debe ser realizada con los criterios de la OMS, utilizando 75 gr de glucosa para la carga oral disuelta en agua.

2. DIABETES EXPERIMENTAL

Los modelos genéticos que semejan a la diabetes mellitus tipo 2, son producidos a través de selección de especies, mutaciones espontáneas o ingeniería genética. Algunos ejemplos incluyen a los ratones db/db, los ob/ob, los KK, los NZO, las ratas fa/fa Zucker y las diabéticas fa/fa Zucker. La mayoría de esos modelos tienen grados variables de hiperglucemia, de insulinemia y de obesidad.

Químicamente, la diabetes mellitus, puede ser inducida por la inyección de diversos agentes, siendo el más usado, la estreptozotocina^{34, 35}

Los modelos genéticos o químicos que semejan a la diabetes mellitus tipo 1, son los que ocasionan reducción del número de células β ³⁶. Estos incluyen a los ratones NOD y a las ratas diabéticas BB. En esos animales, la diabetes ocurre espontáneamente con una total dependencia de insulina exógena para poder sobrevivir. Desde el punto de vista químico, se pueden clasificar a los agentes en:

- 1). Aquellos que causan daño específico a la célula β ,
- 2). Aquellos que causan inhibición temporal de la producción y/o secreción de insulina.
- 3). Aquellos que causan inhibición de la eficacia metabólica de la insulina en los órganos blanco.

En general, los agentes químicos de la primera categoría producen lesiones que ocurren durante la destrucción de la célula β semejante a lo que ocurre con diabetes tipo 1. Estos agentes permiten estudiar a los modelos animales por tiempo prolongado ya que producen lesiones prácticamente de largo plazo. La aloxana un análogo cíclico de la urea, fue el primer agente en esta categoría, que se informó para producir diabetes permanente en animales de laboratorio³⁵ La estreptozotocina ha reemplazado a la aloxana y en la actualidad es el principal agente utilizado para producir diabetes experimental. Ello se debe a su gran selectividad por la célula β ³⁷, la menor mortalidad de los animales y su vida media prolongadamente activa en el cuerpo del animal ³⁵.

2.1 MECANISMO DE LA ACCIÓN DIABETOGÉNICA DE LA ALOXANA (AL)

Fue el primer agente diabetogénico descubierto por Dunn and Mc Letchie accidentalmente que producía necrosis de las células de los islotes del páncreas de conejos. *In vitro*, la aloxana posee una capacidad específica inhibitoria y citotóxica sobre las células beta, sin afectar a otras células de los islotes ³⁸. Sin embargo, ese mecanismo de acción no es del todo conocido. Algunos estudios reflejan el hecho de que aloxana ejerce su efecto interactuando en la membrana de las células β originando una necrosis selectiva ³⁹⁻⁴⁰. Se ha informado, que inhibe la liberación de insulina a la estimulación con glucosa ⁴⁰; y que a dosis elevadas produce necrosis de las células β - con una deficiencia de insulina, con cetosis.

La aloxana es un potente tóxico a la célula β de ratones; es soluble en agua y tiene alta afinidad por los grupos tiol y por el Zn^{++} e inhibe la hexokinasa y otras enzimas ⁴⁰. En ciertas especies, dichas características químicas de la aloxana, son responsables de la no-aparición de los efectos diabetogénicos. De ese modo es posible que la interferencia con el metabolismo de esos elementos pueda ser importante en la acción de la droga ^{38,41}.

Okamoto al estudiar el mecanismo de acción de la aloxana propuso un modelo en el cual, la fragmentación del DNA nuclear de las células β era importante para la inducción de la diabetes con acumulación de radicales hidroxilo y superóxido ⁴²⁻⁴³. Actualmente, las dosis bajas de aloxana para inducir diabetes experimental, ocasionan una reducción parcial de la masa de células β y produce un moderado estado de deficiencia de insulina, sin cetosis y también con resistencia a la insulina ⁴⁴⁻⁴⁵

Se ha informado también, que la sensibilidad a este agente varía con la especie, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional ⁴¹.

2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DIABETOGÉNICA DE LA ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

La estreptozotocina es un antibiótico de amplio espectro proveniente del *Streptomyces achromogenes*. La acción diabética inicial fue descrita por los Laboratorios Upjohn durante las pruebas como potencial antibiótico. No obstante, el primero que describió la necrosis de las células β así como la elevación de los niveles de glucosa en sangre después de la dosis endovenosa del fármaco, fue Rakieta⁴⁶ quien la describió, tanto en ratas como en perros.

La estructura química de la estreptozotocina incluye a una molécula de glucosa con alta reactividad en la cadena lateral de la nitrosourea y es así como se inicia la acción citotóxica. La glucosa atrae directamente a este agente a la célula β del páncreas, donde se une al receptor de membrana y ocasiona el daño estructural. Cuando se sustituye a la glucosa por otros azúcares, disminuye la eficacia de la inducción de la diabetes, lo que sustenta la idea de que los receptores de membrana son estereoespecíficos o bien que tengan reconocimiento específico de la membrana probablemente a través de transportadores como GLUT 2 ⁴⁷.

Ya en el ámbito intracelular ocurren frecuentemente 3 fenómenos responsables de la muerte de la célula β : 1) Procesos de metilación, 2) Generación de radicales libres y 3) Producción de óxido nítrico.

2.2.1. Procesos de metilación:

El efecto deletéreo de la estreptozotocina resulta de la generación altamente reactiva de iones carbonio ($\text{CH}_3\cdot$). Estos iones causan ruptura del DNA por alquilación de las bases del DNA en varias posiciones⁴⁸ originando activación de enzimas nucleares poli-sintetasa (ADP-ribosa) como parte del mecanismo reparador celular. Como nucleótidos celulares, particularmente el NAD^+ , son utilizados como sustratos por enzimas nucleares, ocurriendo así una profunda disminución en NAD^+ dentro de los primeros 20 minutos. En efecto, un abrupto e irreversible agotamiento del NAD^+ , conduce a una cesación de la energía y metabolismo proteico dependientes de NAD^+ , llevan finalmente a la muerte celular.

2.2.2. Radicales libres:

Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno puede ser producido en los islotes del páncreas después de la exposición a la estreptozotocina tanto *in vivo* como *in vitro* ⁴⁹⁻⁵⁰. La

superóxido-dismutasa, enzima que ha demostrado dar protección contra las acciones diabetogénicas de la estreptozotocina, ha permitido suponer que el estrés oxidativo juega un papel en la toxicidad celular de la estreptozotocina ⁵¹.

2.2.3. Oxido nítrico:

Se ha propuesto al óxido nítrico, dentro de las sustancias que actúan para mediar los efectos diabetogénicos de la estreptozotocina. No queda claro el mecanismo preciso de acción que conduce a la generación de óxido nítrico, sin embargo dicha producción de óxido nítrico generada por estreptozotocina, parece estar involucrada en la citotoxicidad hacia las células β ⁵².

También recientemente, se ha integrado una hipótesis que intenta explicar el mecanismo de acción de la estreptozotocina, a través de la producción de superóxido que genera superoxinitritos. Estos a su vez, se disocian en óxido nítrico y radicales hidroxilo que conducen a dañar el DNA de la célula β produciendo apoptosis⁵³. Cualquiera que sea el mecanismo, el DNA nuclear y mitocondrial son reparados utilizando la poli-sintetasa (ADP-ribosa) nuclear. La actividad de ésta enzima se incrementa de manera importante dentro de los 10 minutos después de la inyección de la estreptozotocina. Esta enzima utiliza como sustrato a NAD la cuál disminuye notablemente dentro de los 20 minutos después de la inyección, con ello se producen unidades de ADP-ribosa, necesarias para reparar el DNA ⁵⁴.

Después de múltiples inyecciones de estreptozotocina a dosis bajas, existen degeneración de islotes por acción directa citotóxica, lo cual inicia la respuesta inflamatoria con migración de células mononucleares y la transformación a macrófagos³⁴. Dichas células fagocitan a las células β , liberando mediadores químicos celulares e infiltración de linfocitos⁵⁵.

Diversos mecanismos han sido postulados para explicar porque ocurren estos efectos fatales y selectivos sobre las células β , que incluyen; la elevada afinidad de la estreptozotocina sobre la membrana de la célula β ; la presencia de grupos SH con sensibilidad especial a las interacciones oxidativas; la baja capacidad de las células β para deshacerse de radicales libres y por último, una disminuida relación NAD⁺/DNA en islotes, comparada con la de otros tejidos.

2.3. RELACIÓN DE LA DOSIS DE ESTREPTOZOTOCINA CON LA SEVERIDAD DE LA DIABETES.

Desde el inicio de la utilización de la estreptozotocina en 1963 por Rakietyen y colaboradores⁴⁶, ésta ha sido administrada en un amplio rango de dosis, vías de administración tanto en ratas como en otros animales.

Junod y colaboradores fueron los primeros en describir el patrón trifásico de cambios en la glucosa sanguínea e insulina en las 24 horas siguientes a la administración de 65 mg/kg de la droga, en ratas macho de la cepa Wistar. Una hiperglucemia inicial que fue seguida de un período crítico de marcada hipoglucemia, la cual traducía una desgranulación masiva de las células β con una gran cantidad de insulina pancreática liberada. La hiperglucemia uniforme se estableció dentro de las 24 a 48 horas siguientes, permaneciendo las cifras de glucosa de 3 a 4 veces por arriba de lo normal, con una reducción de insulina plasmática y pancreática de 5% con respecto a los controles⁵⁶. Aunque estos animales son deficientes en insulina, no requieren suplementos de insulina para sobrevivir un tiempo y no desarrollan cetonuria. Después de una sola dosis de estreptozotocina, la necrosis de la célula β puede detectarse dentro de 2 a 4 horas en el examen ultraestructural y dentro de 24 horas con microscopía de luz⁵⁶. Así, 4 días después de la administración de estreptozotocina en ratas adultas, los islotes remanentes muestran desgranulación y proliferación celular que puede durar varios meses y probablemente la preexistencia de precursores de células β más que transformación de células acinares o ductales dentro de la célula β ⁵⁷.

El grupo de Junod también estableció que la dosis de 25 mg/kg de estreptozotocina, no produjo una hiperglucemia después de 7 días.

La dosis de 100 mg/kg de estreptozotocina causa necrosis severa de las células β . La desintegración y la fagocitosis de las células necróticas son rápidas sin evidencia de inflamación visible después de 3 días. De la misma forma, hubo una marcada elevación de glucosa sérica dentro de las primeras 24 horas y cetonuria importante con muerte de la mayor parte de los animales, debido a la pérdida de insulina y a la falta de insulina exógena para suplir a la primera. Dosis entre 25 y 100 mg/kg tuvieron una variación en la severidad de la diabetes, tanto en la elevación de la glucosa como en la disminución de la insulina pancreática. La relativa severidad se reflejó en los cambios en el peso corporal de las ratas en un período de 5 semanas, con las ratas que recibieron entre 55 y 65 mg/kg de estreptozotocina, no aumentaron de peso.

Con dosis de 35 mg/kg, el 25% de las ratas recuperaron espontáneamente la diabetes que habían presentado al inicio, con una correlación entre la insulina pancreática y la recuperación de la diabetes. También demostraron que una segunda inyección de estreptozotocina, produjo diabetes de manera similar a la primera inyección, por ejemplo; dos inyecciones de 25 mg/kg con algunos días de diferencia, provocaron diabetes de manera similar a una sola dosis de 50 mg/kg, incluso con la primera dosis de 25 mg no tuvieron signos clínicos de diabetes. Todos estos datos sugieren que el contenido de insulina pancreática es una buena forma de medir la severidad de la diabetes.

Los hallazgos del grupo de Junod con relación a la dosis-respuesta de la estreptozotocina fueron confirmados por Bar-On⁵⁸ quien administró entre 25 a 85 mg/kg de la droga a ratas Sprague-Dawley con pesos entre 150 a 200 g. Las dosis de 25 a 35 mg/kg no incrementaron la glucosa plasmática ni los triglicéridos, mientras que dosis de 45 a 55 mg/kg, si la incrementaron. La estabilidad a largo plazo de la condición diabética fue

analizada por Ar'Rajab ⁵⁹ quien utilizó ratas macho Sprague-Dawley con pesos de 240 a 260 g, administrando dosis de 50 a 70 mg/Kg de peso de estreptozotocina.

Los estudios mencionados informan una dependencia de las dosis de estreptozotocina, sin embargo, no hay un consenso sobre las dosis en particular. Mientras que Junod y su grupo utilizaron ratas Wistar en ayuno antes de la inyección de estreptozotocina, Ar'Rajab, y Bar-On utilizaron ratas Sprague-Dawley, sin que estuvieran en ayunas antes de la inyección de la droga. Bar-On encontró al menos una muerte de seis animales con dosis de 55 mg/kg, mientras que Ar'Rajab no encontró muertes. Resultados de otros estudios que se muestran en el siguiente cuadro, indican que aún cuando la ruta de administración y la dosis de estreptozotocina son constantes, existe una amplia variabilidad en la severidad de la diabetes, entre los diferentes grupos de investigadores y con diferentes cepas de ratas.

Cuadro 6. Rutas de Administración de la Estreptozotocina

Ruta	Dosis (mg/Kg)	Peso (g)	Cepa	Glucosa (mmol/l)	Referencias
iv	50	100-200	Sherman	16.5	46
iv	25-100	170-230	Wistar	variable	56
iv	25- 85	150-250	Sprague-Dawley	variable	58
iv	30- 70	250			
iv	30-100	150-200	Sprague-Dawley	variable	60
ip	40- 60	350-450	Wistar	variable	61
ip	100	200	Sprague-Dawley	25.3	62
ip	35	260-270	Wistar	27.5	63
ip	100	180-220	Sprague-Dawley	>16.6	64
ip	70	140-160	Sprague-Dawley	23.9	65
ip	50	200-225	Sprague-Dawley	25.3	66
sc	40 dos veces	170-190	Sprague-Dawley	25	67
sc	40 dos veces				
ic	65	290-350	Sprague-Dawley	15.9	68
im	20-120	100-300	Sprague-Dawley	variable	69

Claves: iv = intravenosa, ip = intraperitoneal, sc = subcutánea, ic = intracardiaca, im = intramuscular

2.4 PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA

La estabilidad máxima de la droga es con un pH de 4. Dicha estabilidad se pierde si el pH aumenta o disminuye. Como consecuencia, la mayoría de los investigadores la preparan en un amortiguador de citratos ajustando el pH a 4.6 ó en solución salina al 0.9%, acidificada a pH de 4.5 inyectando la solución dentro de un corto tiempo (5 minutos aproximadamente). El requerimiento convencional para el pH de 4.6 en amortiguador de citratos fue puesto en duda por Axler⁶² quien encontró una efectiva acción diabetogénica en solución salina a pH de 7.2, incluso cuando la solución fue calentada a 37°C por 30 minutos antes de ser inyectada a ratones hembra BALB/c. Povoski⁷¹ utilizó soluciones de estreptozotocina preparadas y almacenadas a 6°C por varios días para inducir diabetes en hámsters dorados; no encontrando diferencias en los niveles de glucosa plasmática al día 9 después de la inyección de estreptozotocina. Él utilizó soluciones frescas comparadas con las almacenadas a temperatura ambiente por 7 días. La dosis utilizada fue de 50 mg/kg inyectadas intraperitonealmente por 3 días consecutivos. Los niveles de glucosa plasmática 9 días después de la inyección final, fueron de 16.2 a 17.8 mmol/l. Los autores concluyen que es preferible preparar la solución de estreptozotocina, equilibrarla o ajustar su pH y almacenar alicuotas a 6°C.

2.5 SUSCEPTIBILIDAD A LA ESTREPTOZOTOCINA EN LAS DIFERENTES CEPAS DE RATAS.

Ramanadham y colaboradores⁷² han utilizado ratas Wistar y Wistar- Kyoto con pesos de 175 a 200 g con dosis de 55 y 65mg/kg por vía endovenosa. Diferencias en los niveles de lípidos sanguíneos fueron evidentes entre las dos cepas. Así por ejemplo las ratas Wistar-Kyoto desarrollaron hiperlipidemia menos severa y menor afección cardíaca que las ratas de la cepa Wistar, estudios que también han sido confirmados al ser estudiadas por Rodrigues⁷³. Es de llamar la atención que en las ratas Wistar-Kyoto, no se demostró una elevación importante de los niveles de triglicéridos plasmáticos a pesar de haber utilizado dosis elevadas de estreptozotocina (75 mg/kg). Las diferencias en la respuesta diabetogénica de la estreptozotocina entre esas dos cercanas cepas de ratas, indica que existe diferente tipo de respuestas entre las diferentes cepas de ratas. Otras cepas pueden ser aún más sensibles a los efectos de la estreptozotocina. Por ejemplo, en ratas espontáneamente hipertensas, los niveles séricos de glucosa y triglicéridos se elevan después de la administración de una dosis de 35 mg/kg de la droga, mientras que en la cepa de ratas Wistar-Kyoto, no tuvieron mayor elevación⁷⁴.

3. LAS GLÁNDULAS SALIVALES.

3.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Las glándulas salivales humanas se localizan en la cavidad bucal y tienen conductos que se abren al interior de la cavidad misma. Existen tres pares de glándulas mayores, las cuales están clasificadas como glándulas salivales mayores o glándulas salivales propiamente dichas, estas son, las parótidas, las submaxilares y las sublinguales⁷⁵.

Las parótidas están colocadas por debajo y enfrente del oído, tienen un conducto denominado parotídeo o de Stenon que se abre a la cara interna de la mejilla. Las submaxilares y sublinguales situadas entre la mandíbula y la parte inferior de la lengua, las sublinguales tienen un conducto denominado conducto de Wharton.

Además hay numerosas glándulas pequeñas ampliamente distribuidas en la mucosa y submucosa de la cavidad oral; estas son conocidas como las glándulas salivales menores. De acuerdo a las sustancias que las células secretoras elaboran, las glándulas pueden ser mucosas, serosas y mixtas⁷⁶. Las células secretoras de las glándulas mucosas elaboran una secreción viscosa que contiene mucina. La porción secretada de las glándulas serosas tiene una secreción líquida rica en albúmina y finalmente, las glándulas mixtas tienen células productoras de porciones serosas y moco. Las glándulas sublinguales son predominantemente mucosas con muy pocos acinos serosos⁷⁶. Las glándulas parótidas son exclusivamente serosas, sin embargo; dentro de los lóbulos se pueden encontrar células grasas entre los acinos serosos. Los núcleos de las células serosas son redondos y están localizados en la región basal de la célula. Se identifican células mioepiteliales en los acini. El sistema de conductos de esta glándula es esencialmente similar a los de la glándula submaxilar (intercalada, estriada y excretora). Los linfocitos y las células plasmáticas son evidentes en el tejido conjuntivo que rodea a los acini y los conductos pequeños de las glándulas salivales.

De acuerdo a lo anterior, queda claro que mientras la función exócrina de las glándulas salivales es mejor conocida⁷⁷⁻⁷⁸, la función endócrina es representada por algunos péptidos biológicamente activos, aunque sólo algunos de ellos están relacionados con el metabolismo de los carbohidratos⁷⁹.

3.2 SU RELACIÓN CON LA DIABETES MELLITUS.

Se ha demostrado que, los extractos de glándulas submaxilares tienen efectos hiperglucemiantes cuando son inyectados a animales⁸⁰ y como contraparte, la extirpación bilateral de las glándulas submaxilares o la atrofia acinar debida a la ligadura del conducto salival, ocasiona disminución de los niveles de glucosa tanto en animales sanos como en diabéticos⁷⁹⁻⁸¹, así como en seres humanos con diabetes mellitus⁸².

Algunos investigadores sostienen que estos hallazgos indican la presencia de una sustancia similar al glucágon en esos órganos. El glucágon inmunorreactivo⁸³, y las células

neuroendócrinas han sido encontrados en glándulas submaxilares humanas y animales. Más aún, los gránulos neuroendócrinos se han visto incrementados en las glándulas submaxilares de un pequeño grupo de pacientes diabéticos y también en ratas a las que se les indujo diabetes mellitus con estreptozotocina⁸⁴. Estos hallazgos, fueron después reproducidos en seres humanos con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), a los que se les estudió en autopsia, y se encontró aumento significativo en el número de gránulos en las glándulas salivales en comparación con los no diabéticos. El peso de las glándulas fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con DM2 que en los no diabéticos⁸⁵. La explicación de este hecho, pudiera obedecer a una hiperplasia glandular.

El mecanismo responsable del aumento de tamaño de las glándulas salivales en la diabetes mellitus no se conoce, sin embargo; el sólo hecho de haber encontrado glucágon inmunorreactivo en las glándulas parótidas humanas, además de diferentes precursores hormonales, hacen sospechar que estas glándulas juegan un papel importante en la patogenia de la diabetes mellitus⁸⁶.

Los diferentes precursores hormonales encontrados son: el factor de crecimiento neuronal, el factor de crecimiento epidérmico y la gastrina inmunorreactiva. Asimismo, los niveles elevados de hormona de crecimiento encontrados en diabéticos, podrían participar en el aumento de tamaño de las glándulas salivales, situación que también ha sido relacionada con el crecimiento renal y en otras complicaciones tardías de estos enfermos⁸⁷.

La hiperglucagonemia es un hallazgo común en la diabetes mellitus tipo 2 y en la diabetes experimental^{79,81-83}.

La diabetes experimental inducida por estreptozotocina produce acumulación de depósitos cristaloides citoplásmicos, agrandamiento del aparato de Golgi de las células acinares, alteraciones focales de la membrana basal y otros cambios como la hiperplasia de células microgranulares que pueden tener relación directa con la propia estreptozotocina o indirecta entre el glucágon y la insulina⁸⁷⁻⁹⁰.

Existe un trabajo de investigación controversial en cuanto al tamaño de las glándulas salivales de ratas diabéticas inducidas con aloxana, en donde se menciona que disminuyó su tamaño y peso comparadas con ratas no diabéticas. Sin embargo, se menciona también que las ratas con diabetes inducida tuvieron acumulo de lípidos dentro de las células acinares y morfométricamente la cantidad de inclusiones correlacionó positivamente con los niveles de glucosa. El tamaño de las células acinares estuvo significativamente incrementado en las mismas ratas con diabetes⁹¹.

Posteriormente se ha demostrado que las glándulas parótidas de ratas con diabetes inducida con estreptozotocina, tienen la facilidad de internalizar proteínas exógenas como peroxidasa y ferritina y se han encontrado vacuolas densas y cristaloides presentes en el citoplasma apical de las células de los conductos estriados. Dichas vacuolas contienen proteínas de secreción acinar y se observan por microscopía electrónica, como vacuolas electro-densas⁹². Estos estudios demuestran que las células de los conductos estriados

captan proteínas salivales y que la endocitosis de algunas proteínas pueden tener una función significativa de dichas células en ciertas condiciones patológicas.

Además la saliva humana se caracteriza por tener arginasa, que es una enzima dependiente de manganeso. A diferencia de la arginasa de otros tejidos, su actividad máxima es a un pH de 9.6 a 9.8 y tiene una Km de 4.2 mmol/l⁹³.

Estudios previos han demostrado que la composición proteica de la saliva de ratas con diabetes inducida por aloxana se altera y produce una relativa reducción de las proteínas ácidas ricas en prolina y una proteína identificada como fracción V⁹⁴.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se puede apreciar, los estudios con relación al papel que las glándulas salivales tienen en la patogenia de la diabetes mellitus, son aislados y algunos controversiales y hasta han existido modelos experimentales con modificaciones dietéticas para intentar explicar mejor la patogenia^{79-91,95}, sin embargo; no existe un estudio que intente integrar y correlacionar las alteraciones funcionales con los aspectos ultraestructurales.

5. HIPÓTESIS

En la diabetes experimentalmente inducida por estreptozotocina en la rata, existen cambios estructurales en las glándulas parótidas correlacionables con la evolución en tiempo del trastorno metabólico, determinado por las alteraciones bioquímicas.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL.

Caracterizar los cambios morfológicos del sistema glandular endocrino en la diabetes experimentalmente producida con estreptozotocina en la rata.

6.2 PARTICULARES.

6.2.1. Evaluar el modelo de diabetes experimentalmente producido por aloxana en la rata

6.2.2. Evaluar el modelo de diabetes experimentalmente producido por estreptozotocina en la rata

6.2.3. Conocer los cambios morfológicos de la glándula parótida de rata con diabetes experimentalmente producida por estreptozotocina, en función del tiempo de evolución del trastorno metabólico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios con Aloxana:

Se utilizaron 108 ratas macho Sprague-Dawley con peso promedio de 250 ± 44 g, que se dividieron al azar, en 2 grupos con 9 subgrupos experimentales cada uno. Cada subgrupo estuvo integrado por 3 ratas, con un número igual de ratas control. Todos los animales se mantuvieron en condiciones ideales de bioterio con alternancia de luz/oscuridad de 12/12 hs respectivamente, con alimento y agua ad-libitum. El manejo, cuidados y tratamiento de los animales y la obtención de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos nacionales e internacionales referentes a los animales de experimentación.

La diabetes fue inducida a 27 ratas con una inyección intraperitoneal (ip) de aloxana a razón de 120 mg / kg de peso corporal disueltos en 1.0 ml de agua bidestilada. A las ratas control (20) se les inyectó el mismo volumen ip. de agua bidestilada.

Estudios con estreptozotocina:

La estreptozotocina se inyectó en una sola dosis ip. a 27 ratas, a razón de 60 mg/kg de peso en 1.0 ml de amortiguador acetatos 0.1 M, pH 4.6. A las ratas control (20) se les inyectó el mismo volumen ip de agua bidestilada.

Los animales de cada grupo se pesaron y se les tomó muestra de sangre de aproximadamente 2 ml., de la vena de la cola, para estudios basales de los siguientes parámetros: Triglicéridos, colesterol total, glucosa e insulina.

7.1 INTEGRACIÓN DE LOS GRUPOS

Grupo I Diabetes inducida:

Grupo II Controles

Subgrupo Ia estudio a los 30 minutos.	Ila estudio a los 30 minutos.
Subgrupo Ib estudio a las 24 hs.	Ilb estudio a las 24 hs.
Subgrupo Ic estudio a las 48 hs.	Ilc estudio a las 48 hs.
Subgrupo Id estudio a los 5 días.	Ild estudio a los 5 días.
Subgrupo Ie estudio a los 7 días.	Ile estudio a los 7 días.
Subgrupo If estudio a los 9 días.	Ilf estudio a los 9 días.
Subgrupo Ig estudio a los 12 días.	Ilg estudio a los 12 días.
Subgrupo Ih estudio a los 15 días.	Ilh estudio a los 15 días.
Subgrupo Ii estudio a los 20 días.	Ili estudio a los 20 días.

6.2.3. Conocer los cambios morfológicos de la glándula parótida de rata con diabetes experimentalmente producida por estreptozotocina, en función del tiempo de evolución del trastorno metabólico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios con Aloxana:

Se utilizaron 108 ratas macho Sprague-Dawley con peso promedio de 250 ± 44 g, que se dividieron al azar, en 2 grupos con 9 subgrupos experimentales cada uno. Cada subgrupo estuvo integrado por 3 ratas, con un número igual de ratas control. Todos los animales se mantuvieron en condiciones ideales de bioterio con alternancia de luz/oscuridad de 12/12 hs respectivamente, con alimento y agua ad-libitum. El manejo, cuidados y tratamiento de los animales y la obtención de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos nacionales e internacionales referentes a los animales de experimentación.

La diabetes fue inducida a 27 ratas con una inyección intraperitoneal (ip) de aloxana a razón de 120 mg / kg de peso corporal disueltos en 1.0 ml de agua bidestilada. A las ratas control (20) se les inyectó el mismo volumen ip. de agua bidestilada.

Estudios con estreptozotocina:

La estreptozotocina se inyectó en una sola dosis ip. a 27 ratas, a razón de 60 mg/kg de peso en 1.0 ml de amortiguador acetatos 0.1 M, pH 4.6. A las ratas control (20) se les inyectó el mismo volumen ip de agua bidestilada.

Los animales de cada grupo se pesaron y se les tomó muestra de sangre de aproximadamente 2 ml., de la vena de la cola, para estudios basales de los siguientes parámetros: Triglicéridos, colesterol total, glucosa e insulina.

7.1 INTEGRACIÓN DE LOS GRUPOS

Grupo I Diabetes inducida:

Grupo II Controles

Subgrupo Ia estudio a los 30 minutos.	Ila estudio a los 30 minutos.
Subgrupo Ib estudio a las 24 hs.	Ilb estudio a las 24 hs.
Subgrupo Ic estudio a las 48 hs.	Ilc estudio a las 48 hs.
Subgrupo Id estudio a los 5 días.	Ild estudio a los 5 días.
Subgrupo Ie estudio a los 7 días.	Ile estudio a los 7 días.
Subgrupo If estudio a los 9 días.	Ilf estudio a los 9 días.
Subgrupo Ig estudio a los 12 días.	Ilg estudio a los 12 días.
Subgrupo Ih estudio a los 15 días.	Ilh estudio a los 15 días.
Subgrupo Ii estudio a los 20 días.	Ili estudio a los 20 días.

A los animales de ambos grupos y subgrupos se les realizó en los tiempos indicados, las siguientes determinaciones de laboratorio, previo sacrificio en cada uno de los tiempos establecidos:

7.2 Triglicéridos: Se determinó con el método modificado según Wahlefeld⁹⁶ basado en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos por la lipasa y determinación enzimática subsiguiente del glicerol formado por medio de las enzimas glicerol-cinasa, fosfoglicerol-oxidasa y peroxidasa; con lo que se forma un complejo colorido cuya absorbancia se mide a 620 nm que es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra.

7.3 Colesterol Total: Se cuantificó por el método de Siedel y Katterman⁹⁷⁻¹⁰¹ de reacción colorimétrica que se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los ésteres de colesterol por la colesterol-esterasa y la oxidación del colesterol libre por la colesterol oxidasa. La concentración de colesterol es directamente proporcional a la absorbancia que da el complejo a 540 nm.

7.4 Glucosa: Se utilizó el método de glucosa-oxidasa de Trinder¹⁰² que se basa en la oxidación de glucosa por la glucosa-oxidasa, con la subsiguiente cuantificación del peróxido de hidrógeno liberado, con el empleo del reactivo de color (4-aminofenazona) y fenol que por medio de la fenol oxidasa se forma un complejo colorido cuya absorbancia se mide a 540 nm, que es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

7.5 Insulina: Por radioinmunoanálisis con el empleo del reactivo INSI-PR (Cis-Bio International[®]). La medición del precipitado radiactivo se realizó con un contador gamma. La concentración sérica se informa en $\mu\text{U/L}$.

7.6 Sacrificio de los Animales y extracción del tejido:

Los animales se pesaron entre las 9:00 y las 10:00 hs y se tomaron muestras sanguíneas para la medición de los parámetros anotados. Se procedió a sacrificarlas a los 30 minutos, 24 h, 48 h, 5, 7, 9, 15 y 20 días después de la inyección de aloxana o de estreptozotocina, bajo anestesia general con ketamina. Se extrajo la glándula parótida (Figura 1) y el páncreas, de los que la mitad de cada tejido se fijó en formol al 4% y glutaraldehído al 3% respectivamente, diluidos en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2-7.4.

El páncreas solamente se estudió con microscopía de luz, mientras que las glándulas parótidas se estudiaron con microscopía de luz y electrónica.

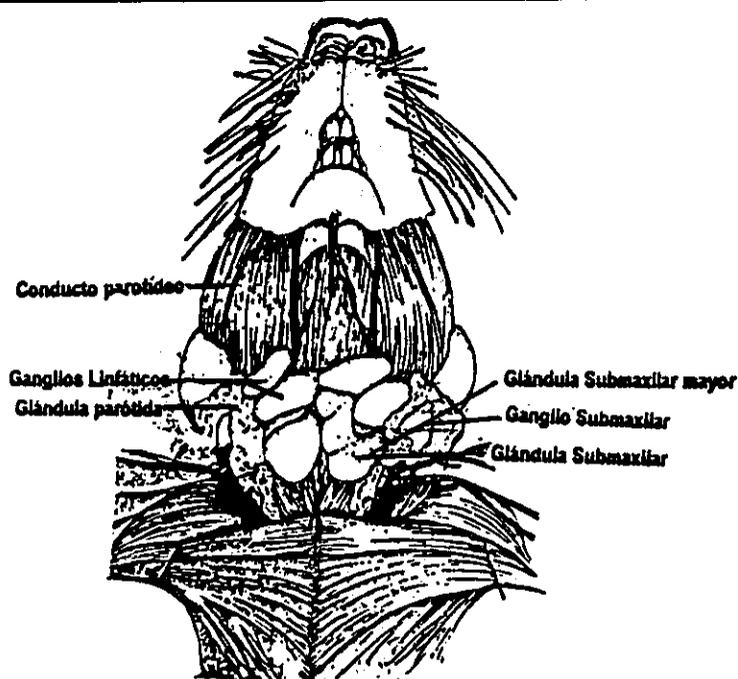


Figura 1. Esquema de la localización y acceso para la disección de las glándulas parótidas.

7.7 ESTUDIO MORFOLÓGICO:

Los estudios morfológicos aquí referidos, corresponden a animales inyectados con estreptozotocina y se dividieron en 2 partes, una de microscopía de luz y otra de microscopía electrónica.

Para la microscopía de luz, el tejido se fijó en formol al 4%, se incluyó en parafina, y se efectuaron cortes de tejido de glándula parótida y de páncreas de 4 micrómetros, en 5 diferentes sitios; se tiñeron con hematoxilina-eosina y se determinaron insulina y glucágon con anticuerpos policlonales de *cuyo* y anti-cerdo, marcados con peroxidasa. Estos anticuerpos, se detectaron tanto en animales control como en experimentales, para cerciorarse del efecto de la estreptozotocina sobre los islotes de Langerhans.

Para la microscopía electrónica, se utilizó la siguiente técnica:

El tejido se fijó con glutaraldehído al 3% en amortiguador fosfatos pH 7.4 y se postfijó en tetraóxido de osmio al 1% y se procesó de acuerdo a la técnica convencional para microscopía electrónica. La inclusión se realizó en Epon 850 y se efectuaron cortes semifinos teñidos con Paragon y finos que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM-906.

Antes y después de la inducción de diabetes, los animales fueron pesados diariamente entre las 9:00 h y las 10:00 h y se llevó el registro correspondiente. El mismo procedimiento se efectuó en el grupo control.

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se utilizó la prueba T de Student para comparar los promedios de los animales del grupo control vs cada uno de los tiempos de los animales experimentales. Los parámetros comparados fueron, la glucosa, la insulina, los triglicéridos y el colesterol total. Los resultados se expresaron como media y Desviación Estándar (DE), siendo una $p < 0.005$ como significancia estadística entre las diferencias identificadas.

8. RESULTADOS

8.1.1 ANÁLISIS BIOQUÍMICO

La mortalidad dentro del grupo experimental de aloxana, fue de 3 de 6 de seis animales, con lo que fue necesario incluir más animales para quedar con un total de 27 ratas diabéticas para cada grupo; en el grupo control no hubo mortalidad. La mortalidad dentro del grupo experimental de estreptozotocina, fue uno de seis animales por lo que también se incluyeron más animales para tener finalmente un total de 27 ratas diabéticas para cada grupo; en el grupo control no hubo mortalidad.

RATAS TRATADAS CON ALOXANA (AL):

Los niveles de glucosa fueron más elevados al 5º día después de la inyección i.p. (29.5 mmol/l), para mostrar posteriormente una disminución significativa al día 20 (10.6 mmol/l). La concentración más baja de insulina fue detectada en el día 5 después de la inyección i.p. (5.04 μ U/ml), coincidiendo con los niveles más altos de glucosa. Para el día 20 después de la inyección i.p., los niveles de glucosa estaban prácticamente recuperados (19.6 μ U/ml).

Los valores de triglicéridos fueron más elevados en el día 9 (166 mg/dl) con disminución al día 20 (85.6 mg/dl). El colesterol total se incrementó paulatinamente después de la inyección alcanzando sus valores más elevados en el día 20 (89 mg/dl) Tabla 1.

RATAS TRATADAS CON ESTREPTOZOTOCINA (STZ):

Los niveles de glucosa fueron más elevados al 9º día después de la inyección i.p. de STZ (34.5 mmol/l), pero comenzaron a incrementarse desde el 2º día. Los niveles bajos de insulina iniciaron su descenso desde los 30 minutos después de la inyección i.p. pero la concentración más baja fue el día 20 (4 μ U/ml), tabla 2. Los triglicéridos alcanzaron su nivel más elevado el día 20 (182 mg/dl) después de la inyección i.p. de STZ, pero su elevación se inició desde el día 5. Las concentraciones de colesterol también alcanzaron su nivel más elevado el día 20 (94.2 mg/dl). Cuando se compararon los valores de glucosa

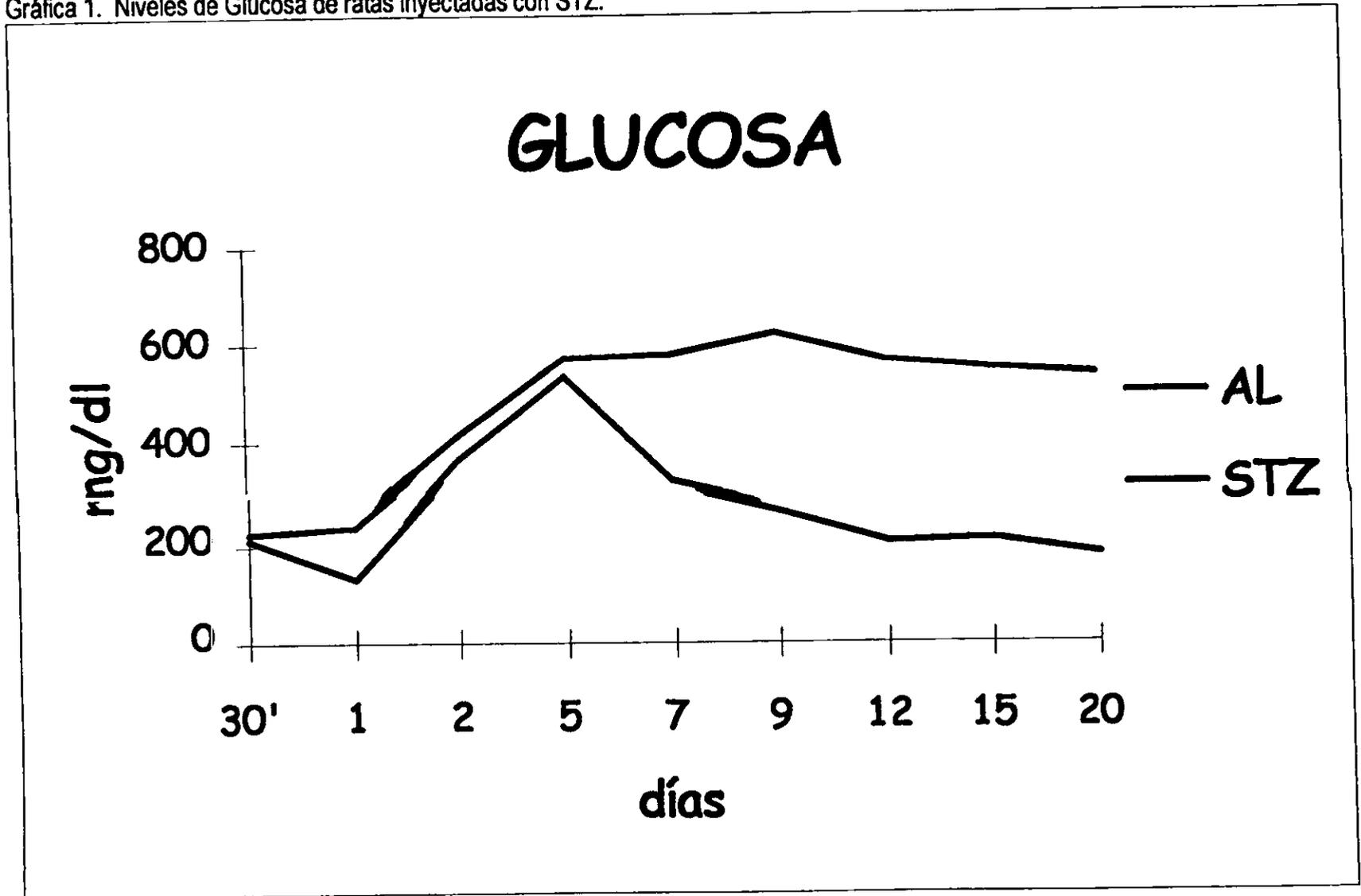
e insulina entre los 2 grupos experimentales, hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.005$) en la mayoría de los diferentes tipos estudiados. Tabla 1, Gráficas 1 y 2

Tabla 1

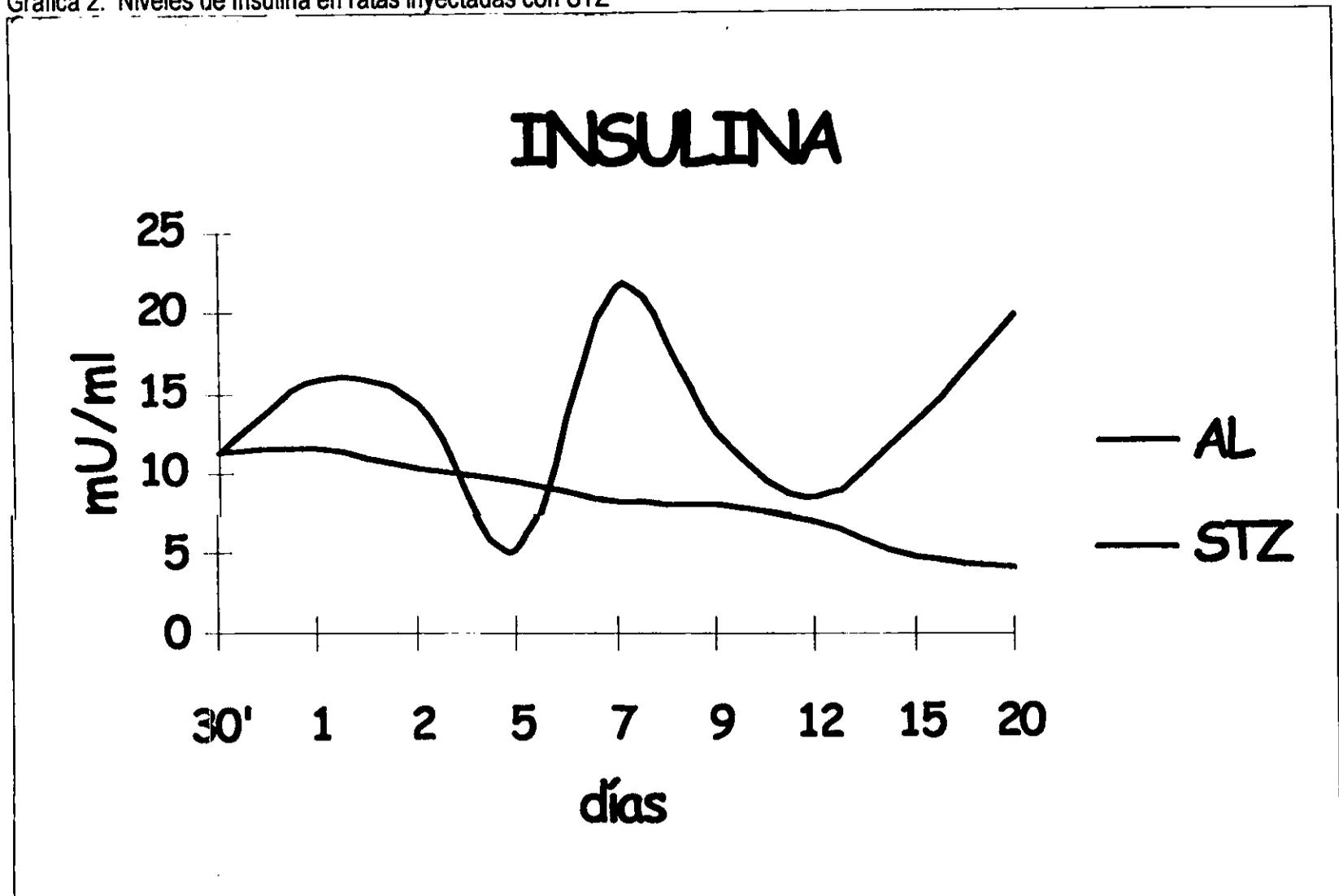
Ratas N	Glucosa mmol/L media \pm D.E.		Insulina μ U/ml media \pm D.E.		Triglicéridos mg/dl media \pm D.E.		Colesterol total mg/dl media \pm D.E.	
	Aloxana / Estreptozotocina		Aloxana / Estreptozotocina		Aloxana / Estreptozotocina		Aloxana / Estreptozotocina	
Controles N 48	7.9 \pm 0.2		18.5 \pm 3.3		87.9 \pm 14.4		52.5 \pm 4.4	
Experimental Groups Aloxana / STZ								
30 minutos n 3/3	11.8 \pm 1.7	12.4 \pm 0.1 **	11.3 \pm 0.8	11.4 \pm 0.8 **	48.3 \pm 2.05 ^a	58.8 \pm 1.0 ^a	56 \pm 10.1 ^b	54.3 \pm 10.0 ^b
1er día 3/3	7.3 \pm 0.6	13.3 \pm 1.2 *	15.8 \pm 1.5	11.6 \pm 0.4 *	56 \pm 12.2 ^a	61 \pm 8.5 ^a	60 \pm 3.5 ^a	66 \pm 6.0 ^a
2º día 3/3	20.3 \pm 2.1	23 \pm 4 **	14.4 \pm 1.07	10.2 \pm 1.05 *	62 \pm 3.60 ^b	93 \pm 4.5 ^b	65.3 \pm 2.5 ^a	65 \pm 5.5 ^a
8º día 3/3	29.8 \pm 0.45	31.7 \pm 2.0 **	5.04 \pm .03	9.4 \pm 0.6 *	75.3 \pm 15.6 ^b	100 \pm 0.9 ^a	62 \pm 6.0 ^b	73 \pm 3.6 ^a
7º día 3/3	17.6 \pm 0.35	32.1 \pm 1.6 *	21.8 \pm 1.30	8.1 \pm 0.35 *	135 \pm 82 ^b	142 \pm 75 ^b	75.3 \pm 3.0 ^a	77 \pm 3.0 ^a
9º día 3/3	14.9 \pm 0.25	34.5 \pm 2.1 *	12.4 \pm 0.90	8.0 \pm 0.3 *	166 \pm 20.1 ^a	182 \pm 21 ^a	67.6 \pm 2.06 ^a	84 \pm 5.0 ^a
12º día 3/3	11.4 \pm 0.41	31.2 \pm 1.6 *	8.03 \pm 1.8	6.6 \pm 2.5 **	115 \pm 9 ^a	165 \pm 16 ^a	61.8 \pm 1.5 ^a	65.3 \pm 5.0 ^a
16º día 3/3	11.8 \pm 1.3	30 \pm 0.9 *	13 \pm 2.31	4.7 \pm 0.62 *	144 \pm 15.1 ^a	176 \pm 8.6 ^a	74.3 \pm 1.6 ^a	92.7 \pm 3.6 ^a
20º día 3/3	10.6 \pm 0.25	29.7 \pm 0.3 *	18.6 \pm 1.1	4.0 \pm 1.0 *	85.6 \pm 12 ^b	182 \pm 3.9 ^a	69 \pm 16 ^a	94.2 \pm 4.1 ^a

Efectos de la inyección intraperitoneal de aloxana y estreptozotocina sobre los niveles séricos de glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol en ratas adultas. Los valores son expresados como media \pm desviación estándar. Cuando se compararon los valores de aloxana vs estreptozotocina * $p < 0.005$ es significativa, ** $p \leq 0.05$ es no significativa. Cuando se compararon los valores de colesterol vs valores control, así como los triglicéridos vs valores control; & $p < 0.005$ is significant, @ $p =$ es no significativa

Gráfica 1. Niveles de Glucosa de ratas inyectadas con STZ.



Gráfica 2. Niveles de Insulina en ratas inyectadas con STZ



Los pesos corporales de las ratas control fueron de 250 ± 44.1 g, y los pesos corporales de las ratas a los 30 minutos no tuvieron variación significativa siendo de 250 ± 35 g. A las 24 horas el peso fue de 248 ± 18 g, a las 48 horas fue de 246 ± 36 , a los 5 días fue de 243 ± 8 g, a los 7 días fue de 240 ± 2.9 g, a los 12 días fue de 225 ± 8.3 , y a los 15 días fue de 216 ± 9.1 g. (Figura 2). Después del día 5 de la inyección de STZ; los pesos fueron diferentes significativamente (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de pesos corporales antes y después de la inyección de STZ

Ratas	Peso Inicial	Peso Final	Control	p
Ratas diabéticas 30 minutos	248 ± 5.5	247 ± 6.0	252 ± 5.2	NS
Ratas Diabéticas 24 horas	292 ± 16	282 ± 12.3	291 ± 11.1	NS
Ratas diabéticas 48 horas	285 ± 6.5	275 ± 5.5	289 ± 10.0	NS
Ratas diabéticas 5 días	289 ± 2.0	275 ± 4.5	292 ± 2.0	< 0.01
Ratas diabéticas 7 días	295 ± 17	273 ± 14.6	297 ± 17	NS
Ratas diabéticas 9 días	283 ± 6.2	269 ± 5.5	282 ± 8.1	NS
Ratas diabéticas 12 días	290 ± 8.0	276 ± 4.3	292 ± 4.3	NS
Ratas diabéticas 15 días	299 ± 10.2	268 ± 16.2	302 ± 11.2	< 0.005
Ratas diabéticas 20 días	292 ± 7.5	264 ± 15	295 ± 6.5	< 0.005



Figura 2. Se observa el aspecto caquéctico de una de las ratas con diabetes después de 20 días de evolución, debido a la pérdida de peso.

8.1.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS

El análisis histológico del páncreas mostró con la microscopía de luz, una gran reducción del número de islotes y una serie de cambios celulares como son, vacuolización intracitoplásmica, picnosis nuclear, hialinización en grados variables, núcleos no esféricos, necrosis focal (figura 3) y en general, una normalidad global alterada, comparados con el páncreas normal (figura 4).

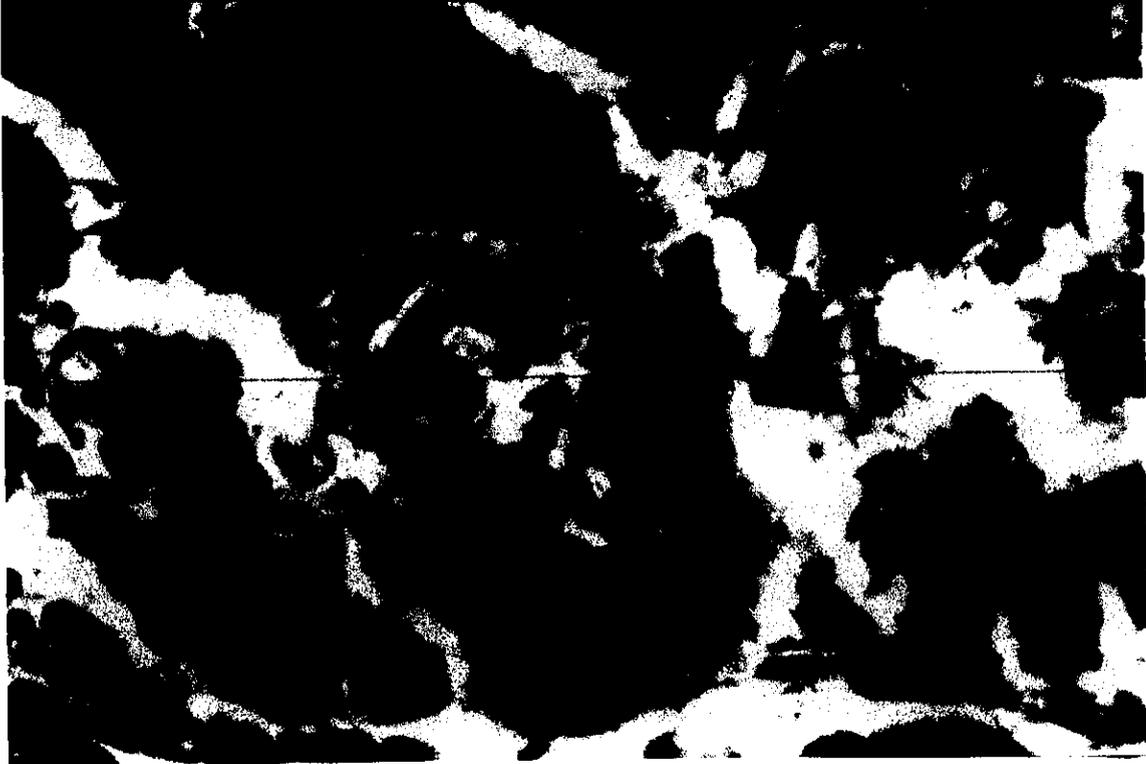


Figura 3. Islote de Langerhans teñido con hematoxilina y eosina, que muestra una arquitectura alterada, desorganización global del acini y necrosis focal, (40x)



Figura 4. Islote de Langerhans normal, teñido con hematoxilina y eosina Se aprecia la distribución normal del islote con los núcleos ovoides, con cromatina prominente, citoplasma poco pálido, (40x).

El análisis histoquímico del páncreas mostró que la reacción de los anticuerpos anti-insulina fue francamente positiva en las ratas control (figura 5). En los animales de 20 días después de la inyección i.p. de STZ, dicha reacción fue apenas positiva (figura 6).

Todos estos cambios contrastan con los vistos en los animales controles.

En general, pérdida de la arquitectura tisular, cambios vasculares. Dichas lesiones se incrementaron después del día 5 de la inducción.

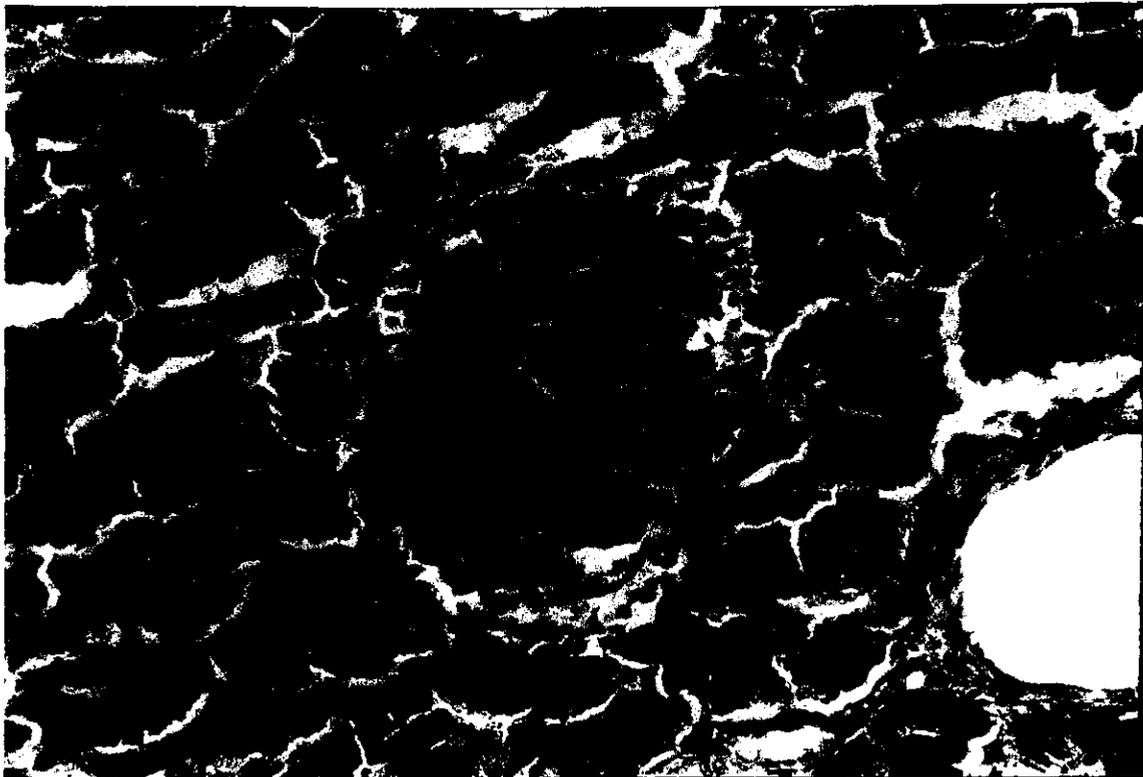


Figura 5. Islote de Langerhans normal, tinción con inmunohistoquímica para demostrar la presencia normal de los anticuerpos contra insulina, en una rata control. Técnica de anticuerpos policlonales de *cuyo* y anti-cerdo, marcados con peroxidasa (40x).

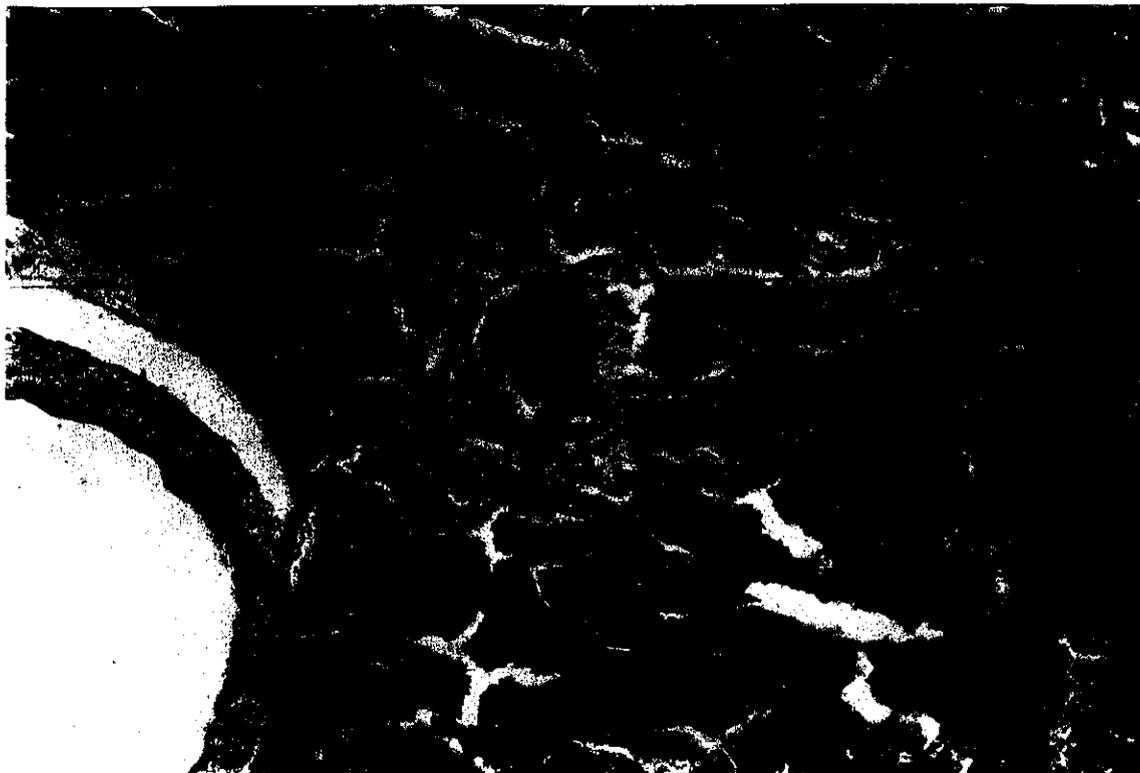


Figura 6. Islote de Langrehaus, tinción con inmunohistoquímica para demostrar la presencia de anticuerpos contra insulina en una rata de 20 días después de la inyección de estreptozotocina; en donde se aprecia una captación muy ligera comparada con el normal de la figura 4. Esto demuestra una destrucción de las células β del islote, (40x).

Tabla 3. Resumen de alteraciones globales pancreáticas observadas en la microscopía de luz

HISTOPATOLOGIA GLOBAL DEL PANCREAS DE RATAS CON DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA EN DIFERENTES TIEMPOS DE EVOLUCION

1. Disminución del número de Islotes
2. Cambios celulares: Vacuolas intracitoplásmicas, hialinización de islotes, picnosis, pérdida de la arquitectura celular.
3. Normalidad global: alterada
4. Pérdida de positividad para anticuerpos contra insulina y contra glucágon

8.3 Análisis morfológico de la Glándula Parótida

8.3.1 Microscopía de luz

Desde el punto de vista de la microscopía de luz, se observó la parótida de ratas control (figuras 7 y 8). Los cambios después de la estreptozotocina en distintos tiempos de evolución, fueron; degeneración grasa (figura 9) y tumefacción turbia en grupos de acini y en grados variables, así como aumento de componentes neuroendócrinos (figura 10) y calcificación de la pared de algunos conductos excretores (figura 11). En la tabla 4, se resumen los hallazgos en diferentes tiempos de evolución.

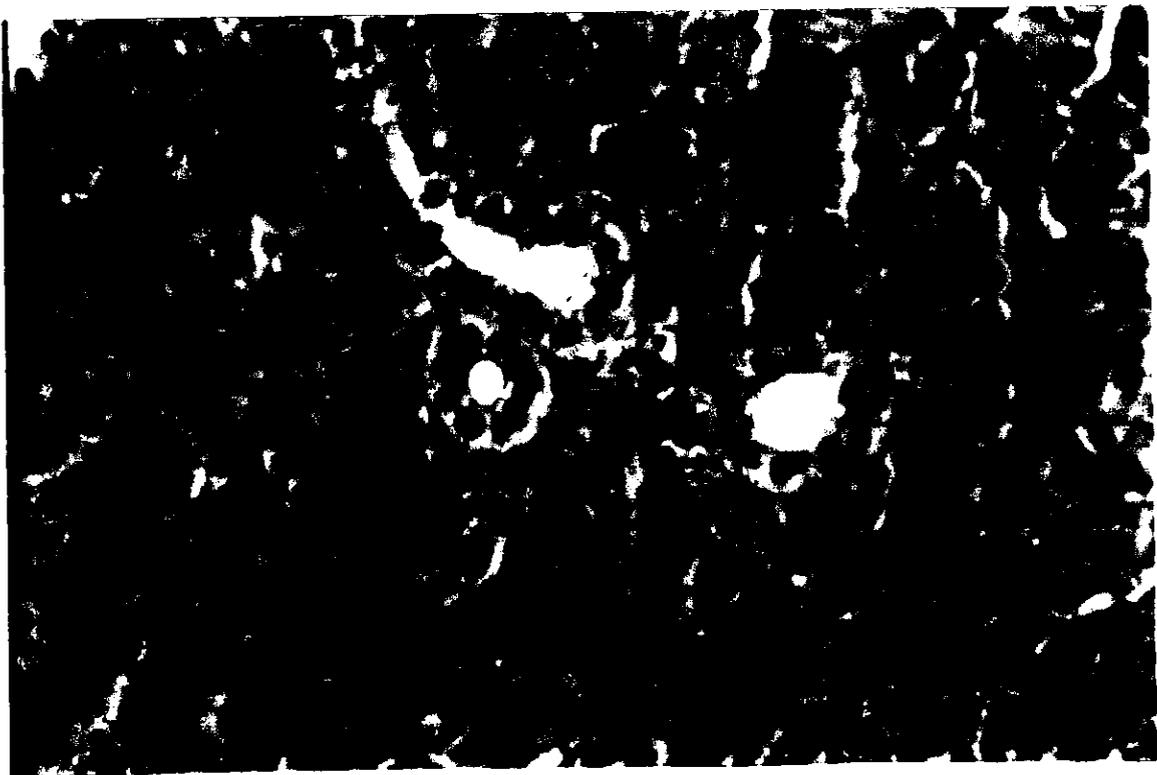


Figura 7. Parótida de rata control. Tinción con hematoxilina y eosina. Se observan las células acinares, con núcleos basales, gránulos de secreción prominentes, citoplasma basofílico. Conductos intercalares normales. Las células de los conductos estriados tienen citoplasma claro. (40x).



Figura 8. Parótida control. Tinción Grimelius. Se aprecian mejor los conductos intercalares y los acini con sus núcleos basales. (40x).

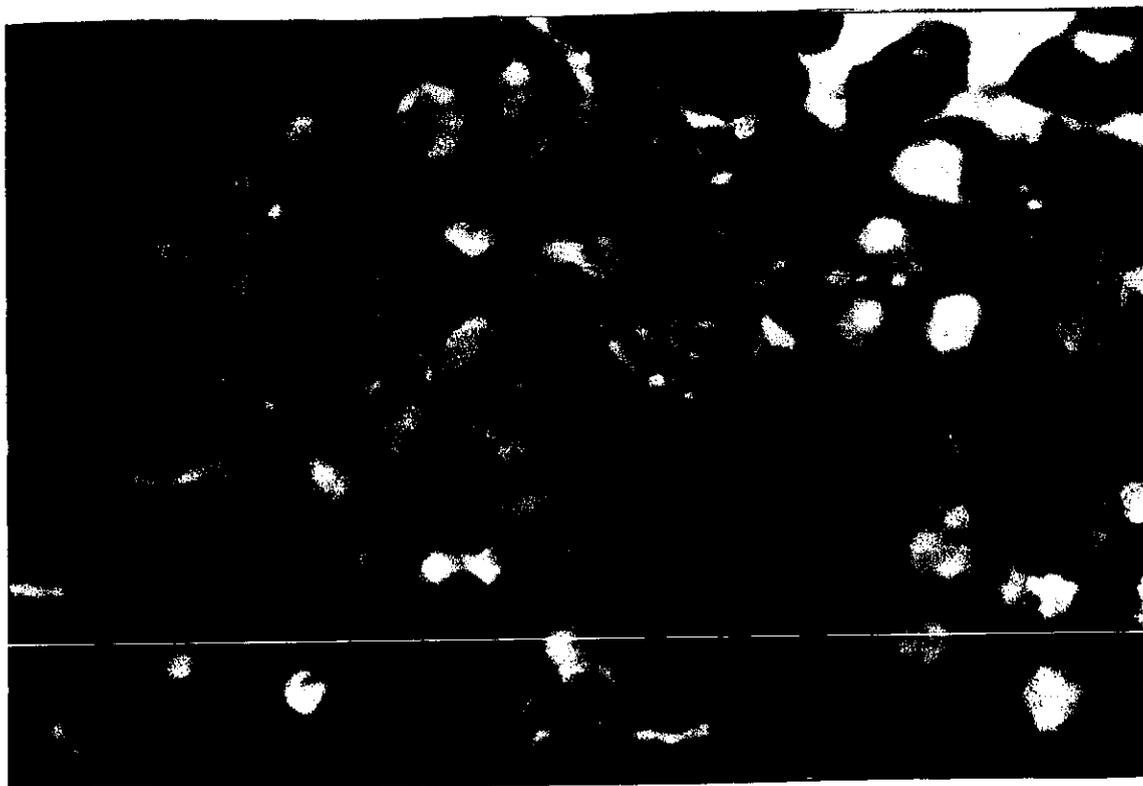


Figura 9. Parótida de rata de 7 días post-inyección de STZ, teñida con hematoxilina y eosina en donde se aprecian, grandes vacuolas grasas, con distorción de la arquitectura normal. (100x)

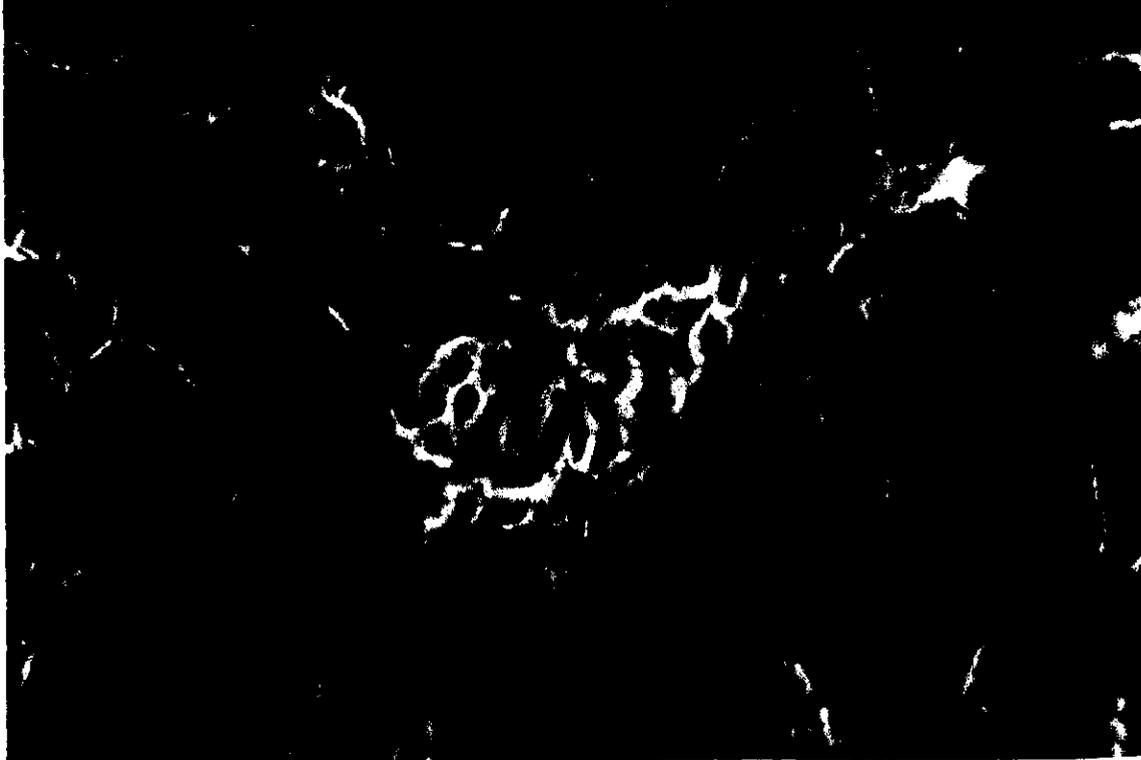


Figura 10. Parótida de rata de 20 día post-inyección de STZ, teñida con hematoxilina y eosina, en donde apreciamos el acini, con su arquitectura distorsionada, y aumento de granulaciones que pueden corresponder a un incremento en los componentes neuroendócrinos. (40x).



Figura 11. Parótida de rata de 20 día post-inyección de STZ, teñida con hematoxilina y eosina, en donde apreciamos calcificaciones en la pared de los conductos excretores. Este hallazgo no se ha informado previamente (40x).

Tabla 4. Resumen global de alteraciones parotídeas observadas con microscopía de luz

HISTOPATOLOGIA GLOBAL DE LA GLANDULA PAROTIDA DE RATAS CON DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA EN DIFERENTES TIEMPOS DE EVOLUCION

- 1. Tumefacción turbia en acini glandulares**
- 2. Degeneración vacuolar**
- 3. Acumulación de grasa en vacuolas confluentes en células acinares**
- 4. Necrosis focal**
- 5. Aumento en componentes del sistema neuroendócrino difuso**
- 6. Calcificación en paredes de conductos excretores**

8.4 Microscopía Electrónica

8.4.1 Animales Testigo.

Cuando se examinaron los cortes de parótida con el microscopio electrónico de transmisión de los animales testigo, se identificaron los acini glandulares, en diferentes planos de corte, los conductos excretores de diferente tamaño así como los componentes del tejido conjuntivo tanto interacinar como los que constituyen los tabiques interlobulillares e interlobulares. Estos componentes estuvieron constituidos por vasos sanguíneos de diferente calibre, fibras nerviosas, vasos linfáticos y elementos del tejido conjuntivo laxo, así como fibras de colágena, fibroblastos, células cebadas y células reticulares primitivas.

Los acini glandulares estuvieron formados en el corte realizado en el máximo diámetro de los mismos por 6 a 8 células acinares las cuáles mostraron su característica forma piramidal o triangular, unidas unas con otras por complejos de unión e interdigitaciones provenientes de la membrana plasmática de las células contiguas; es decir, se identificó un espacio intercelular en donde se proyectaban las formaciones digitiformes de una y otra célula en contacto y hacia la porción luminal se observaron los complejos de unión caracterizados por una *zónula adherens*, una *mácula adherens* o *desmosoma*, y una zona de oclusión entre las células epiteliales en contacto (*zónula ocludens*).

En las siguientes figuras, se incluyen las micrografías más representativas.

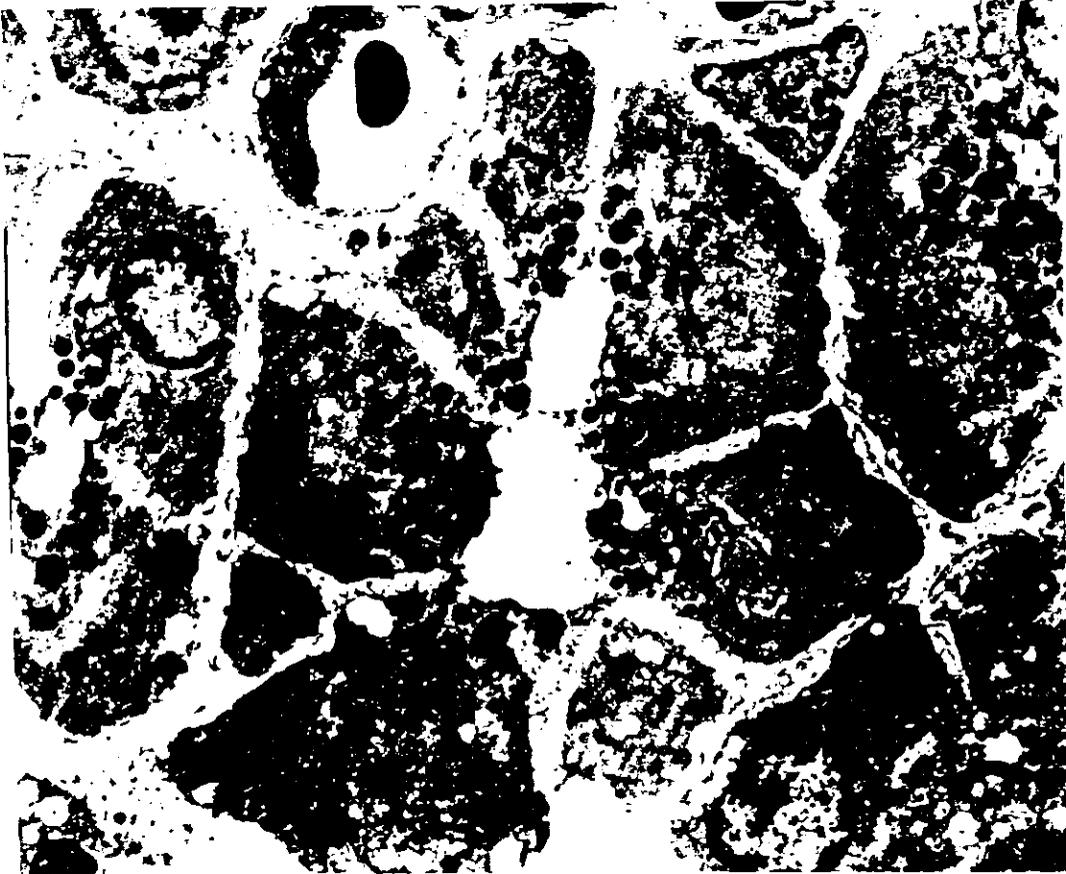


Figura 12. Glándula parótida de rata control. Se observan acini glandulares en diferentes planos de corte, conductos excretores de diferente tamaño, así como los componentes del tejido conjuntivo interacinar como los constituyen los tabiques interlobulillares e interlobulares. (2500x)



Figura 13. Glándula parótida de rata control. Corte realizado en el máximo diámetro de los mismos por 6 a 8 células acinares, que muestran su forma piramidal o triangular, unidas unas con otras por complejos de unión e interdigitaciones provenientes de la membrana plasmática.(2500x).

Hacia la región basal, se observó que estas células acinares estaban rodeadas por una membrana basal que cubría completamente la región externa del acino glandular. Hacia la luz acinar, se identificaron las proyecciones de microvellosidades correspondientes al borde apical de las células acinares.

El núcleo de células acinares fue en general, esférico o ligeramente ovoide, con grumos gruesos de heterocromatina y un aspecto finamente granular en las áreas correspondientes a la eucromatina. Se identificaron numerosos poros nucleares y 1 a 2 nucleolos en el interior del nucleoplasma. La ubicación de los núcleos fue tendiente hacia la región basal de las células pero con una ubicación cercana al centro de las mismas. De

los organelos citoplásmicos, el retículo endoplásmico granular fue muy prominente con una ubicación fundamentalmente basal. La mayor parte de los ribosomas identificados en mayores amplificaciones se encontraron asociados a las membranas de retículo endoplásmico. Sin embargo, numerosos cúmulos de ribosomas libres y polisomas se observaron en la matriz citoplásmica. Otros 2 tipos de organelos que se observaron de manera prominente en las células acinares, fueron las mitocondrias de localización fundamentalmente submembranal aunque también distribuidas entre los diferentes componentes citoplásmicos y el aparato de Golgi caracterizado por las apilaciones de cisternas membranales planas, con numerosas microvesículas en su porción *cis* fundamentalmente y macrovesículas en los extremos de los agregados de cisternas aplanadas. No fue factible diferenciar los lisosomas primarios de los gránulos de secreción pequeños. Esto fundamentalmente por ausencia de subestructura en los lisosomas primarios y por la similitud en la densidad a los electrones entre ambos tipos de estructuras. De manera característica, la principal inclusión celular estuvo representada por los gránulos de secreción de zimógeno en diferentes fases de formación, desde estructuras esféricas pequeñas densas al haz de los electrones en la región cercana al Aparato de Golgi, hasta los gránulos maduros grandes en la región apical de las células.

Los túbulos colectores pequeños estuvieron caracterizados, por células cuboidales de núcleo central, de cromatina moderadamente condensada y con escasos organelos en su citoplasma. Estos representados por moderada cantidad de cisternas del retículo endoplásmico liso y granular, mitocondrias, escasos elementos del aparato de Golgi, ribosomas libres, lisosomas y componentes microfibrilares. Esas células estuvieron unidas unas con otras dejando un espacio intercelular angosto en cuya región apical se identificaron los característicos complejos de unión. En la región basal de las células se observaron invaginaciones escasas de la membrana plasmática y todas esas células epiteliales descansaban sobre una membrana basal de características normales.

Los capilares sanguíneos estuvieron formados por células endoteliales fenestradas que descansaban sobre una membrana basal y parcialmente rodeados por pericitos que también estaban cubiertos por un desdoblamiento de la membrana basal que rodeaba a las células endoteliales. Se identificaron células cebadas caracterizadas por gran cantidad de una población heterogénea de gránulos intracitoplásmicos, mientras que las células plasmáticas se observaron en mucho menor número, mostraron su característico ergastoplasma formado por numerosas cisternas de retículo endoplásmico granular en el citoplasma. Los fibroblastos y las células reticulares se identificaron en moderada cantidad en el tejido conjuntivo entre las fibras colágenas y los primeros mostraron un núcleo irregular u ovoide de cromatina moderadamente condensada, un nucleólo y escasa cantidad de organelos intracitoplásmicos. Las células reticulares mostraron un citoplasma muy abundante con escasas cisternas de retículo endoplásmico, numerosos ribosomas libres y polisomas y un núcleo grande irregular de cromatina poco condensada, con gran cantidad de eucromatina y 1 a 2 nucleolos. En los tabiques conjuntivos interlobulares e

interlobulillares se identificaron algunas fibras mielínicas, mientras que en los interacinares, las fibras fueron principalmente amielínicas. Los vasos linfáticos se observaron como tapizados por células de tipo endotelial, fenestradas y con un material finamente granular en la luz vascular. Las fibras conjuntivas que predominaron en los tabiques interacinares, interlobulillares e interlobulares, fueron fundamentalmente fibras colágenas, y se identificaron escasas fibras elásticas.



Figura 14. Glándula parótida de rata control. Se observa el núcleo de las células acinares esférico o ligeramente ovoide, con grumos gruesos de heterocromatina y aspecto finamente granular en las áreas correspondientes a la eucromatina. Se identifican poros nucleares y 1 a 2 nucleolos con ubicación tendiente a la región basal. Reticulo endoplásmico granular muy prominente. (2500x).

8.4.2 Animales Experimentales

Los cambios más significativos observados con el microscopio electrónico de transmisión en el material correspondiente a los 8 y 30 días después de la inyección ip. de STZ. Las micrografías más representativas, se ilustran en las siguientes figuras.

8 días postinyección ip de STZ:

Se observó en los acini glandulares, cambios morfológicos consistentes principalmente en desorganización parcial de los componentes intracelulares de las células secretoras, una ligera distensión del espacio intercelular, y diferente ubicación de los núcleos en las células acinares. Estos últimos, se observaron no solamente en la porción basal de las células sino también en la región central de las mismas. No se observaron cambios en las microvellosidades ni en el borde luminal de los acini glandulares. Se observó desorganización en la distribución de las cisternas de retículo endoplásmico granular y la presencia de vacuolas claras de diferente tamaño en el citoplasma de las células acinares. Llamó la atención la presencia de numerosos gránulos que contenían un material finamente granular y de aspecto lúcido al haz de los electrones. Estas granulaciones estuvieron presentes en las células acinares mezcladas entre los gránulos de zimógeno característicos de las mismas. No se pudieron identificar lisosomas, por la electrodensidad de los gránulos pequeños de zimógeno y no se observaron componentes fibrilares o filamentosos en las preparaciones examinadas.

Se identificaron algunos citosegresomas, principalmente hacia la región basal de algunas células acinares. No se observaron cambios anatómicos en la membrana basal de las células acinares.

En los conductos excretores se identificaron células de citoplasma denso al haz de los electrones y células con citoplasma claro con moderada cantidad de organelos y muy escasos gránulos esféricos limitados por membrana. Estas células claras fueron más numerosas en algunos conductos de mediano calibre. La membrana basal de los túbulos excretores fue normal y no se observaron cambios en los componentes intercelulares ni en las microvellosidades de la luz de los conductos.

Los componentes interacinares y del tejido conjuntivo, fibras nerviosas, capilares sanguíneos, capilares linfáticos y elementos del tejido conjuntivo fueron de características normales.



Figura 15. Glándula parótida de rata de 8 días después de la inyección de STZ. Se aprecia desorganización en la distribución de las cisternas de retículo endoplásmico granular y la presencia de vacuolas claras de diferente tamaño en el citoplasma de las células acinares. (2500x).



Figura 16. Glándula parótida de rata de 8 días después de la inyección de STZ. En los conductos excretores se identificaron células de citoplasma denso al haz de los electrones y células con citoplasma claro con moderada cantidad de organelos, escasos gránulos esféricos limitados por membrana. La membrana basal de los túbulos excretores fue normal (2500x).

30 días postinyección de STZ

En el material examinado se observó una notoria desorganización de los componentes celulares en numerosos acini glandulares, con una disminución importante en gránulos de zimógeno electrodensos, mezclados con gránulos claros cuyo contenido fue un material finamente granular, semejante al observado a los 8 días de la inyección de STZ. No obstante que la mayoría de las células acinares mostraron regularidad en la distribución de las cisternas del retículo endoplásmico granular y del aparato de Golgi, en varias células acinares se observó distorsión de esos elementos con desorganización estructural de los mismos. Las mitocondrias se observaron lúcidas al haz de los electrones y de localización principalmente submembranaral tanto en la región basal como en las zonas laterales de las células acinares.



Figura 17. Glándula parótida de rata de 30 días después de la inyección de estreptozotocina. Se observa una notoria desorganización de los componentes celulares, con disminución de gránulos de zimógeno electrodensos, mezclados con gránulos claros con material finamente granular. Se aprecia regularidad de en la distribución de las cisternas del retículo endoplásmico granular y del aparato de Golgi. Las mitocondrias se observan lúcidas al haz de los electrones y de localización principalmente submembranal (6000x).

Se observaron cambios nucleares principalmente consistentes en irregularidad de la cisterna perinuclear, aumento de la heterocromatina, y cambios morfológicos semejantes a los observados en células con apoptosis. El nucleolo fue muy prominente en varias de estas células, algunas de las cuales se observaron binucleadas.

Los conductos excretores mostraron cambios semejantes a los observados en el material correspondiente a los 8 días de la inyección de STZ. El resto de las estructuras interacinarias, interlobulares e interlobulillares, no mostraron alteraciones morfológicas.

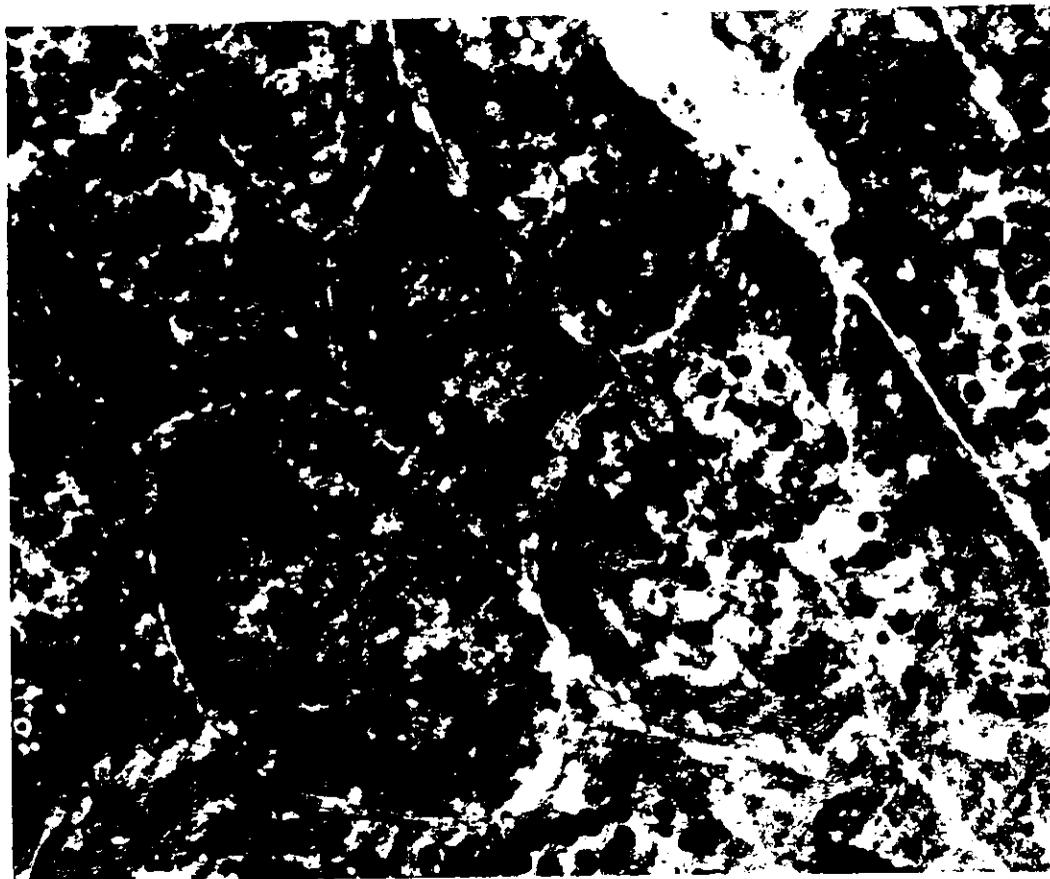


Figura 18. Parótida de rata de 30 días después de la inyección de estreptozotocina. Se aprecian cambios nucleares consistentes en irregularidad de la cisterna perinuclear, aumento de la heterocromatina. Nucleolo de dichas células es prominente y algunas de las cuáles se observan binucleadas (2500x).

9. DISCUSIÓN

El análisis de nuestros resultados indica, que aunque existe una respuesta individual de las ratas para AL y para STZ, el estado de hiperglucemia fue inducido desde el segundo día.

La dosis utilizada de AL como de STZ en nuestro estudio, así como la vía intraperitoneal; fué la misma que se ha informado y utilizado en estudios previos ^{46,56-59}. En el caso de STZ (60mg/kg) el estado diabético manifestado por hiperglucemia fue inducido desde el 2º día después de la inyección de la STZ, con la consiguiente disminución de los niveles de insulina; los niveles de glucosa más elevados fueron detectados al 9º día y los más bajos de insulina al día 20, aunque iniciaron una reducción gradual desde los primeros 30 minutos. Este descenso gradual no reversible de la insulina demuestra daño permanente de los islotes producidos por STZ.

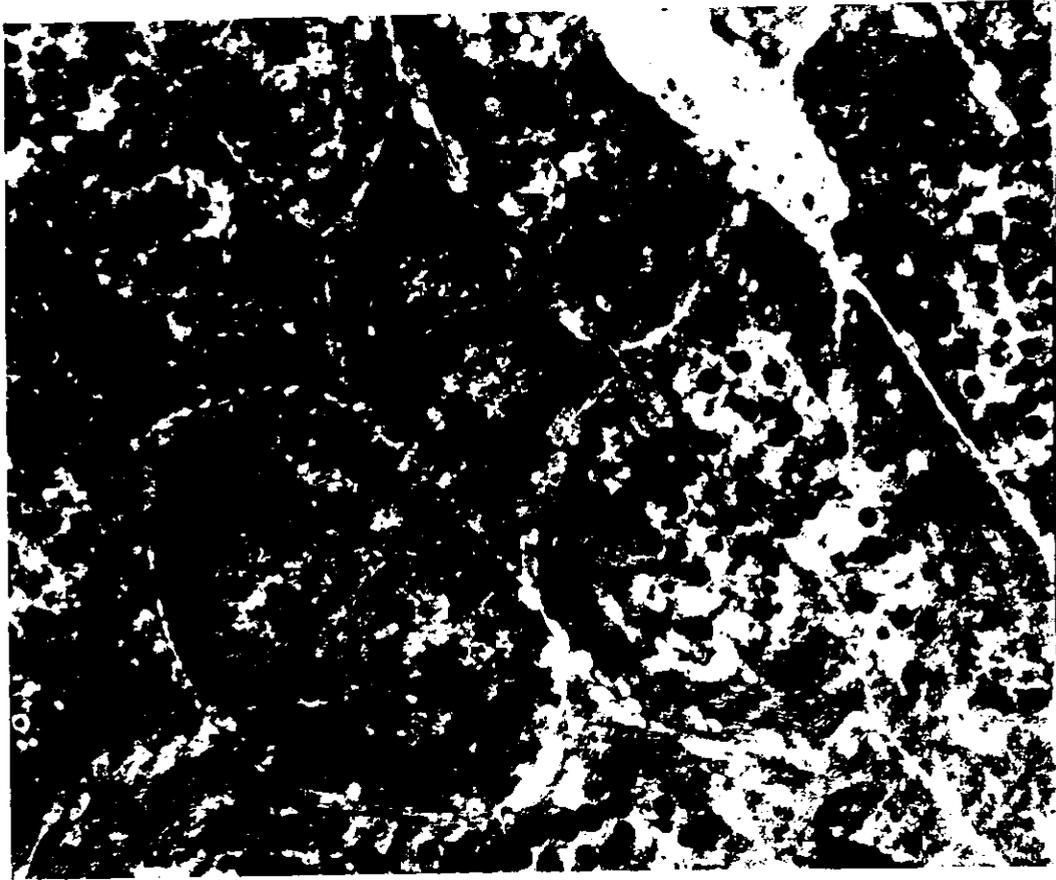


Figura 18. Parótida de rata de 30 días después de la inyección de estreptozotocina. Se aprecian cambios nucleares consistentes en irregularidad de la cisterna perinuclear, aumento de la heterocromatina. Nucleolo de dichas células es prominente y algunas de las cuáles se observan binucleadas (2500x).

9. DISCUSIÓN

El análisis de nuestros resultados indica, que aunque existe una respuesta individual de las ratas para AL y para STZ, el estado de hiperglucemia fue inducido desde el segundo día.

La dosis utilizada de AL como de STZ en nuestro estudio, así como la vía intraperitoneal; fué la misma que se ha informado y utilizado en estudios previos ^{46,56-59}. En el caso de STZ (60mg/kg) el estado diabético manifestado por hiperglucemia fue inducido desde el 2º día después de la inyección de la STZ, con la consiguiente disminución de los niveles de insulina; los niveles de glucosa mas elevados fueron detectados al 9º día y los más bajos de insulina al día 20, aunque iniciaron una reducción gradual desde los primeros 30 minutos. Este descenso gradual no reversible de la insulina demuestra daño permanente de los islotes producidos por STZ.

En condiciones normales, la elevación de la glucosa plasmática, exhibe una elevación rápida con una respuesta bifásica en la secreción de insulina, reflejando una glucoestimulación directa. La hiperglucemia crónica, ocasiona una desaparición casi total de ésta respuesta¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ como resultado de la insuficiencia en la respuesta de la célula, siendo la medición de insulina la mejor manera de definir la severidad de la diabetes^{107,115}. La hiperglucemia crónica, origina una desaparición casi total de esa respuesta³²⁻³³ como resultado de una insuficiente respuesta de la célula β , esto puede observarse claramente en los resultados obtenidos con STZ, en donde la severa hiperglucemia producida se correlaciona con una disminución de la insulina plasmática.

Asimismo, existe un concepto de neogénesis y apoptosis demostrado en ratas a las que se les induce hiperglucemia con estreptozotocina a dosis bajas de 35 mg/kg de peso y luego son sometidas a una infusión continua de glucosa, lo que incrementa la masa de células β , éste incremento se debe al efecto de la glucosa en la neogénesis de nuevas células endocrinas más que un incremento en proliferación celular. Una semana después de suspender la infusión de glucosa, la masa celular regresó al nivel basal y se produjo apoptosis con disminución de la replicación de las células β . En conclusión, esto demuestra la impresionante plasticidad del páncreas endocrino y la pérdida de la relación neogénesis-apoptosis del páncreas dañado por la estreptozotocina¹¹⁰.

En el caso de AL, los niveles más elevados de glucosa coincidieron con los niveles más bajos de insulina en el 5º día después de la inyección. Los niveles de insulina mostraron una disminución relacionada con el incremento de los niveles de glucemia, sin embargo; los animales recuperaron sus valores normales al día 20, lo que correlacionó con una reducción de la hiperglucemia.

Existen múltiples factores que intervienen en el binomio de la secreción de insulina-glucosa en el estado diabético. En el estado diabético, la hiperglucemia crónica se asocia con una inadecuada acción de la insulina. Normalmente, una elevación de la glucosa plasmática, provoca una rápida y bifásica secreción de insulina, que demuestra una glucoestimulación directa.

Se ha demostrado en ratas Sprague-Dawley, que la hiperglucemia crónica afecta a la expresión de varios genes que inducen la liberación progresiva de insulina en respuesta a la glucemia¹⁰⁹, concluyendo que la hiperglucemia induce una hipertrofia de las células β , así como pérdida de su diferenciación celular para producir insulina.

La AL es una sustancia tóxica específica que afecta a las células β y provoca un estado de deficiencia primaria de insulina^{38,103}. La glucocinasa, que tiene la función de reconocer y acoplar la secreción de insulina con la concentración de glucosa; es particularmente sensible a la inhibición por aloxana, al mismo tiempo que el grupo de enzimas sulfhidrilo, pueden ser primariamente blanco intracelular para aloxana y finalmente responsable de la toxicidad para la célula β ¹⁰³⁻¹⁰⁴.

Un hallazgo no informado previamente, fue el que nosotros encontramos en la microscopía de luz, en la glándula parótida de rata a los 20 días postinyección de STZ, y se refiere a las calcificaciones de la pared de los conductos excretores demostrada en la figura 11 y que

nos traduce el gran daño del fármaco sobre la célula β del páncreas y con la acción de la hiperglucemia producida sobre la parótida, o quizá la STZ actuó directamente sobre la glándula salival.

La estructura química de la STZ compromete a la molécula de glucosa con una elevada reactividad a la nitrosourea en su cadena lateral, sitio donde se inicia la acción citotóxica. La glucosa así unida al agente STZ se une al receptor de membrana de la célula β ³⁸⁻³⁹ ocasionando el daño estructural. A nivel intracelular ocurren tres fenómenos principales responsables de la muerte de la célula β ya descritos: Los procesos de metilación, la generación de radicales libres y la producción de óxido nítrico (ON)⁴⁹⁻⁵².

Se ha informado, que dosis entre 25 y 100 mg/kg de peso de STZ, ocasionan resultados variables en cuanto a la severidad de la diabetes, con un incremento en los niveles de glucosa y disminución de los niveles de insulina en las primeras 24 horas.

La relativa severidad en los cambios, también se ha reflejado en los pesos corporales en periodos de 5 semanas con las ratas que recibieron dosis entre 55 y 65 mg/Kg de STZ⁵⁸, como es el caso de nuestros animales que fueron perdiendo peso de manera significativa, conforme se alteraban más los niveles de glucosa.

La mortalidad descrita por otros autores en las ratas que reciben esas dosis de STZ⁵⁸⁻⁵⁹ de uno de seis ratas, también fue confirmada en nuestro estudio.

La hipertrigliceridemia ocurre frecuentemente en la diabetes independientemente de la edad y del peso corporal, y está relacionada, con los niveles de glucosa plasmática^{108,115}. En las ratas de nuestro estudio, los niveles de triglicéridos y colesterol fueron incrementándose gradualmente con diferencias significativas con respecto a los controles, hasta llegar a sus cifras más elevadas en el día 20.

Una de las alteraciones detectables más tempranamente en la estructura acinar de las glándulas parótidas de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina a la dosis de 65 mg/kg de peso, fue la presencia de pequeñas gotas de lípidos en el citoplasma basal desde las 24 horas después de la inducción. La acumulación de lípidos continuó, teniendo su pico máximo a los 4.5 meses después de la administración de la droga, con un contenido de grandes vacuolas lipídicas en las células acinares. Hubo agrandamiento del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico granular fue prominente⁸⁸; hallazgos que también concuerdan con los de nuestro trabajo. Se encontraron macrófagos conteniendo *debris* de células acinares y cristaloides citoplásmicos, asociados con los conductos intercalares. En nuestros resultados, las células acinares contienen numerosos y relativamente homogéneos gránulos secretorios electrodensos de aproximadamente 1 μm de diámetro, un prominente aparato de Golgi asociado con gránulos inmaduros, mitocondrias dispersas y abundante retículo endoplásmico granular.

Se ha demostrado que en ratas a las que se les induce diabetes con STZ tienen depósitos intracelulares de lípidos en las glándulas salivales, siendo más evidentes a las dos semanas de la inducción con estreptozotocina como en nuestro grupo de ratas, y las proporciones de lípidos incrementados fueron iguales para el ácido esteárico, el ácido

linoléico y disminución de los porcentajes de ácido oléico y ácido araquidónico. Se ha informado, que después de 1 semana de tratamiento con insulina, el metabolismo lipídico de las glándulas salivales, mejoró ya que el perfil de ácidos grasos y el contenido de lípidos, disminuyó. Esto revela que el contenido de lípidos aumentado se debe a pérdida de acción de la insulina, más que a la acción de la estreptozotocina¹¹¹

En las células de los ductos estriados de las ratas diabéticas, se encontraron vacuolas electrodensas que traducen captación de proteínas salivales desde la luz y que la endocitosis de alguna de las proteínas secretoras de la saliva⁹², puede ser una función significativa de dichas células en ciertos estados patológicos como la diabetes, que concuerdan con algunos hallazgos de nuestro trabajo.

Las células de los ductos estriados fueron caracterizadas por tener numerosas mitoccondrias y un acumulo de pequeños gránulos secretores frecuentemente localizados en el citoplasma apical, hallazgos que concuerdan con los de Smith¹¹¹ y colaboradores que encontró, células inmuno-reactivas a insulina, localizadas en las parótidas de ratas Sprague-Dawley.

La determinación inmunocitoquímica de anticuerpos anti-insulina efectuada en las muestras de páncreas de nuestros animales, se sustenta en otro estudio, donde se demuestra la evidencia morfológica de la existencia de la enzima, óxido nítrico-sintetasa en las células de los islotes de Langerhans que producen insulina y glucágon inmuno-reactivo, afirmando el papel de la óxido-nítrico sintetasa en todos los tipos celulares de los islotes¹¹²⁻¹¹³

Nuestros hallazgos concuerdan con la hipótesis de Leonora¹¹⁴ y su grupo, quienes en ratas adultas encontraron un efecto insulínico de las parótidas más importante conforme las ratas diabéticas se hacen más longevas, lo que afecta la secreción y la acción de la insulina pancreática.

Todos los hallazgos de nuestro estudio sugieren que las glándulas parótidas de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, tienen alteraciones ultraestructurales que son más importantes conforme avanza el tiempo de evolución de la diabetes y que correlacionan con las alteraciones bioquímicas en los niveles de glucosa, insulina y lípidos. Contrastando los resultados con los animales control, sugieren que el mantenimiento de la estructura y función normales en la glándula parótida de rata, pueden ser parcialmente dependientes de insulina.

De manera alternativa, es plausible pensar también, que los cambios observados en las glándulas parótidas sean causados por el efecto directo de la estreptozotocina; independientemente del efecto sobre los islotes de Langerhans y de las alteraciones metabólicas resultantes de ello. Esto requiere explorarse a futuro con otro diseño experimental.

REFERENCIAS

1. Fajans SS. Clasificación and diagnosis of diabetes. En: Diabetes mellitus. Ellenberg and Rifkkins (ed). Fourth Edition. Elsevier Science Publishing Co, Inc. 1990:346-367.
2. S.Islas Andrade, M.C. Revilla Monsalve. Diabetes Mellitus. Concepto y Nueva Clasificación. En Diabetes Mellitus. S.Islas A, A.Lifshitz (eds). McGraw-Hill Interamericana, 2ª edición 1999: 3-14
3. Fajans SS: Vranic M (ed). Comparison of type I and II diabetes. Advances in experimental medicine and biology. New York. Plenum Publishing Corp., 1985:65.
4. Gómez Pérez FJ, Rull JA. Diabetes Mellitus. Clasificación, diagnóstico, patogenia y tratamiento. En: M. Uribe (ed), Tratado de Medicina Interna, 1a. edición. Panamericana, 1988; capítulo 90, paginas 660-684
5. National Diabetes Data Group. Clasificación and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes, 1979;28:1039-1043
6. Report of a WHO Study Group. Diabetes Mellitus. World Health Organization. Geneva, 1985.
7. Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997; 20:1183-1197-1203
8. Olefsky JM, Kolterman OG, Scarlett JA. Insulin action and resistance in obesity and non-insulindependent type II diabetes mellitus. Am J Physiol 1982; 243: E15-E-30
9. González Villalpando C, Stern M, Haffner S, Arredondo Pérez B, Martínez Díaz S, Islas S. The insulin resistance syndrome in México. Prevalence and clinical characteristics. A population based study. Arch Med Res 1995; 26: S9-S15.
10. Herman WH, Fajans SS, Ortíz FJ, Smith MJ, Sturis J, Bell GI, Polonnsky KS, Halter JB: Abnormal insulin secretion, non-insulin resistance, is the genetic or primary defect of MODY in the RW pedigree. Diabetes 1994;43: 40-46.
11. Baekkeslov S, Neilsen JH, Marner B, Bilde T, Ludbigsson J, Lemmark A: Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children with immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. Nature 1982; 298: 167-169.
12. Atkinson MA, Maclaren NK, Riley WJ, Winter WE, Fisk DD, Spillar RP. Are insulin autoantibodies markers for insulin-dependent diabetes mellitus? Diabetes 1986; 35:894-898.

13. Chrillie MR, Tun RY, Lo SSS, Cassidy D, Brown TJ, Hollands J, Shattock M, Bottazzo GF, Leslie RDG: Autoantibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64K antigen as distinct markers for development of IDDM: Studies with identical twins. *Diabetes* 1992; 41: 782-787.
14. Schott M, Shatz D, Atkinson M, Krischer J, Meththa H, Vold B, Maclaren N: GAD 65 autoantibodies increase the predictability but not the sensitivity of islet cell and insulin autoantibodies for developing insulin dependent diabetes mellitus. *J Autoimmunity* 1994; 7: 873-879.
15. Kolterman OG, Gray RS, Griffin J, Burstein P, Insel J, Scarlett JA, Olefsky JM: Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1981; 68: 957-969.
16. Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DF, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Adam PW: Relationship of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 254-260.
17. Bogardus C, Lillioja S, Mott DM, Hollenbeck C, Reaven G: Relationship between degree of obesity and *in vivo* insulin action in man. *Am J Physiol* 1985; 248: E286-E291.
18. Butkiewics EK, Leibson C, O'Brien PC, Palumbo PJ, Rizza RA: Insulin therapy for diabetic ketoacidosis. *Diabetes Care* 1995; 18: 1187-1190.
19. Banerji MA, Chaiken RL, Huey H, Tuomi T, Norin AJ, Mackay IR, Rowley MJ, Zimmet P, Lebovitz H: GAD antibody negative NIDDM in adult black subjects with diabetic ketoacidosis and increased frequency of human leukocyte antigen DR3 and DR4. *Diabetes* 1994; 43: 741-745.
20. Umpierrez GE, Casals MMC, Gebhart SSP, Mizon PS, Clark WS, Phillips LS: Diabetic ketoacidosis in obese African-Americans. *Diabetes* 1995; 44: 79-85.
21. Harris MI: Impaired glucose tolerance in the U.S. population. *Diabetes Care* 1989; 12: 464-474.
22. Zimmet PZ: Kelly West Lecture 1991: challenges in diabetes epidemiology: from west to the rest. *Diabetes Care* 1992; 15: 232-252.
23. Fujimoto WY, Leonetti DL, Kinyoun JL, Shuman WP, Stolov WC, Wahl PW: Prevalence of complications among second-generation Japanese-American men with diabetes, impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance. *Diabetes* 1987; 36: 730-739.

24. Moss SE, Klein R, Klein BEK, Meuer MS: The association of glycemia and cause-specific mortality in a diabetic population. *Arch Int Med* 1984; 154: 2473-2479.
25. Kuusito J, Mykkinen L, Pyörälä K, Laakso M: NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes* 1994; 43: 960-967.
26. Anderson DK, Svaardsudd K: Long-term glycemic control relates to mortality in type II diabetes. *Diabetes Care* 1995; 18: 1534-1543.
27. Brunzell JD, Robertson RP, Lerner RL, Hazzard WR, Enzik JW, Bierman EL, Porte D Jr: Relationship between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42: 222-229.
28. Fuller HJ, Shipley MJ, Ose G, Jarret RJ, Keen H: Coronary-heart disease risk and impaired glucose tolerance and impaired glucose tolerance: the Whitehall Study. *Lancet* 1980; i:1373-1376.
29. Charles MA, Balkau B, Vauzelle-Kervöeden F, Thibault N, Eschwege E: Revision of diagnostic criteria for diabetes (Letter). *Lancet* 1996; 348: 1657-1658.
30. Jarret RJ, Kahn H: Hyperglycemia and diabetes mellitus. *Lancet* 1976; ii: 1009-1012.
31. Klein R, Comor EB, Blount BA, Wingard DL: Visual impairment and retinopathy in people with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance and newly diagnosed NIDDM. *Diabetes Care* 1991; 14: 914-918.
32. McCartney P, Keen H, Jarret RJ. The Bedford Survey: observations on retina and lens of subjects with impaired glucose tolerance and in controls with normal glucose tolerance. *Diab Metab* 1983; 9: 303-305.
33. Little RR, England JD, Wiedmeyer H-M, McKenzie EM, Pettit DJ, Knowler WC, Goldstein DE: Relationship of glycosylated hemoglobin to oral glucose tolerance: implications for diabetes screening. *Diabetes* 1988; 37: 60-64.
34. Bonnevie-Nielsen, V, Steffes, M.W, Lernmark A, A major loss in islet mass and β -cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes* 1981; 30: 424-430
35. Rodrigues B, Poucheret P, Battel M.L, McNeill J.H, Streptozotocin-Induced diabetes: Induction, Mechanism(s), and Dose Dependency. In *Experimental Models in Diabetes*; McNeill J.H Ed. CRC Press LLC, 1999; Chapter 1, pp 3-17
36. Gepts, W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1965; 14: 619-622.

37. Johanson, E.B, Tjalve H., Studies on the tissue-deposition and fate of [¹⁴C]-streptozotocin with special reference to the pancreatic islets, *Acta Endocrinol*, 1978; 89: 339-342
38. Dunn JS, Mc Letchie NGB. Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet* 1943 ii: 384-387.
39. Tomita T, Lacy PE, Matschinsky FM, McDaniel ML., Effect of alloxan on insulin secretion in isolated rat islets perfused *in vitro*. *Diabetes* 1974;23: 517-524.
40. Epand RM, Stafford AR, Tyers M, Nieboer E, Mechanism of action of diabetogenic zinc-chelating agents. *Mol Pharmacol*, 198; 527: 366-374.
41. Bailey, C. and Flatt, P. Animal syndromes of non-insulin-dependent diabetes mellitus. In: *Textbook of Diabetes*, ed. by John Pickup and Gareth Williams, Blackwell Science. London, 1997, pp 23.1-- 23.5.
42. Okamoto H. Molecular basis of experimental diabetes: degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic β -cells of islets of Langerhans. *Bioassays* 1985; 2: 15-21,
43. Renold AE. Animal models: an aid to the understanding to the etiology and pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Annu* 1988; 4: 592-608.
44. Rudge MVC et al. Diabetes and experimental pregnancy in rats: Course of maternal blood glucose levels and its repercussions on the blood glucose levels and pancreas of new born pups. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 219-225.
45. Alder M. Evidence for direct action of alloxan to induce insulin resistance at the cellular level. *Diabetologia* 1998; 41: 1327-36.
46. Rakieten, N. Rakieten M.L, Nadkarni, M.V, Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37919). *Cancer Chemother* 1963; 29: 91-99.
47. Schnedl, W, Ferber S, Johnson J.H, Newgard, C.B., STZ transport and cytotoxicity, specific enhancement in GLUT2-expressing cells, *Diabetes* 1994; 43: 1326-29
48. Uchigata, Y., Yamamoto, H, Kawamura A, Okamoto H. Protection by superoxide dismutase, catalase and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan-and-streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem* 1982; 257: 6084-88.
49. Gandy, S, Buse, M.G., Crouch, R.K., Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J Clin Invest* 1982; 70: 650-653

50. Papaccio, G, Psanti F.A, Fracatore, S. Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozotocin. *Diabetes* 1986; 35: 470-474
51. Robbins, M.J., Sharp R.A., Slonim, A.E., Burr I.M., Protection against streptozotocin induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia* 1980; 18: 55-58
52. Tanaka Y, Shimizu, H, Sato, N, Mori M, Shimomura, Y. Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. *Pharmacology* 1995; 50: 69-73
53. Bedoya, F.J, Solano, F, M.Lucas, M. *N*-Monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 1996; 52: 344-346
54. Schein P.S, Cooney D.A, McMenamin, M.G, Anderson, T. Streptozotocin diabetes further Studies on the mechanism of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mouse pancreatic islets and liver. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 2625-30
55. Papaccio G, Esposito V., Ultrastructural observations on cytotoxic effector cells infiltrating pancreatic islets of low dose streptozotocin treated mice. *Virchows Arch Pathol Anat* 1992; 420: 5-9
56. Junod A, Lambert A.E, Stauffacher W, Renold A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129-34
57. Hamming N.A, Reynolds, W.A., DNA synthesis in pancreatic islet and acinar cells in rats with Streptozotocin-induced diabetes. *Horm Meab* 1977; 9: 114-118
58. Bar-On, Roheim PS, Eder H.E., Hyperlipoproteinemia in streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 1976; 25: 509-512
59. Ar'Rajab A, Ahrén B, Long-term diabetogenic effect of streptozotocin in rats. *Pancreas* 1993; 8: 50-54
60. Engle, M.J., Perelman R.H., McMahan, K.E., Langan, S.M., Farrel P.M., Relationship between the severity of experimental diabetes and altered lung phospholipid metabolism. *Proc Soc, Exp Biol Med* 1984; 176: 261-264
61. Yogev L., Yavetz H., Gottreich A, Oppenheim D., Hommonnai, Z.T., Paz G. Blood luteinizing hormone and prolactin concentrations in response to naltrexone challenge: studies on rats with diabetes induced by different doses of streptozotocin. *Life Sci* 1994; 54: 261-263

62. Giorgino F, Chen J.H., Smith R.J., Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and a 170,000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin and glucose. *Endocrinology* 1992; 130: 1433-37
63. Whiting, P.H., Bowley,M., Sturton, R.G, Pritchard, P.H., Brindley, D.N., Hawthorne, J.N., The effect of chronic diabetes , induced by streptozotocin, on the activities of some enzymes of glycerolipid synthesis in rat liver. *Biochem J* 1977; 168: 147-152
64. Van Voorhis, K., Said H.M., Abumrad N., Ghishan F.K. Effect of chemically induced diabetes mellitus on glutamine transport in rat intestine. *Gastroenterology* 1990; 98: 862-865
65. Tanaka Y., konno N., Kako K.J., Mitochondrial dysfunction observed *in situ* and cardiomyocytes of rats in experimental diabetes. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 409-411
66. Chandrashekar V., Steger R W., Bartke A., Fadden C.T., Kienast S.G. Influence of diabetes on the gonadotropin response to the negative feedback effect of testosterone and hypothalamic neurotransmitter turnover in adult male rats. *Neuroendocrinology* 1991; 54: 30-35
67. Domingo J.L, Ortega A., Llovet J M., Keen C L., No improvement of glucose homeostasis in diabetic rats by vanadate treatment when given by gavage. *Trace Elem Med* 1991; 8: 181-6
68. Reinilä A. Some advantages and disadvantages of streptozotocin from a morphologist's point of view. In *streptozotocin. Fundamentals and therapy*, Agarwal, M K ed. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 1981; chap. 4
69. Nakhoda A, Wong H A. The induction of diabetes in rats by intramuscular administration of streptozotocin. *Expreientia* 1979; 35: 1679-84
70. Axler, D.A, Stability of the diabetogenic activity of streptozotocin *IRCS Med Sci* 1982; 10: 157-161
71. Povoski, S.P., McCullough, P.J., Zhou, W., Bell R.H.Jr., Induction of diabetes mellitus in Syrian golden hamsters using stored equilibrium solutions of streptozotocin. *Lab Anim Sci* 1993; 43: 310-315
72. Ramanadham, S., Doroudian, A. McNeill, J.H. Myocardial and metabolic abnormalities in streptozotocin-diabetic Wistar and Wistar-Kyoto rats. *Can J Cardiol* 1990; 6: 75-79
73. Rodrigues B, McNeill,J.H., Comparison of cardiac function in male and female diabetic rats.

Gen Pharmacol 1987; 18: 421-424

74. Reaven G.M, Ho.H., Low-dose streptozotocin induced diabetes in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism* 1991; 40: 335-339
75. Guyton A: *Fisiología y Fisiopatología Básica*. Interamericana(Ed). Philadelphia, 1979 p. 500
76. Orban H: *Oral Histology*. Sicher (Ed). Saint Louis 1966, p 266-267.
77. Barka T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 1980; 28: 836-839
78. Vogel R, Trauschold I, Werle E. *Natural Proteinase Inhibitor*. Acad Press, New York, N.Y. 1968
79. Lawrence AM, Kirsteins L, Hojvat S, Rubin L, Palovan V. Salivary gland glucagon: a potent extrapancreatic hyperglucemic factor: *Clin Res* 1975; 23: 536-541
80. Goldowski Z, Calandra JC, Salivary glands as endocrine organs. *J Appl Physiol* 1960; 15: 101-105
81. Hoshino K, Decker RF, Molnar F, Kimy T. Hypoglycaemic effects of salivary ducts ligation upon Diabetes Mellitus in mice. *Arch Oral Biol* 1976; 21: 105-111
82. Goldowski Z, Gadzain R, Ablation of salivary glands as initial step in the management of selected forms of diabetes mellitus. *Laryngoscope* 1971; 81: 1337-1358
83. Lawrence AM, Tan S, Hojvats S. Salivary gland hyperglycemic factor and extrapancreatic source of glucagon-like material. *Science* 1977; 195: 1-72
84. Benitez L, Mendoza M, Freyre R, Vivar G. Células del Sistema APUD en glándulas salivales. *Patol (Mex)* 1978; 16: 253-269
85. Islas Andrade S, Frati Munari A, González Angulo J, Iturralde P, Llanos Vega L.M. Aumento de los gránulos de secreción neuroendócrina en las glándulas submaxilares y parótidas en pacientes con diabetes mellitus no dependiente de insulina. *Gac Med Mex (Mex)* 1992; 128:53-56
86. Godowski Z, Levin R. The role of submaxillary glands in homeostasis of insulin. *Diabetes* 1968; 17: Suppl 1: 325-328
87. Gelato M.C, Effects of growth hormone releasing factor in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 674-677

88. Hand A.R, Weiss RE, Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Lab invest* 1984; 51: 429-440
89. Unger R.H, Orci L, Glucagon and the A cell: Physiology and Pathophysiology. *N Engl J Med* 1981; 304: 1518-1520
90. Lefebvre P.J, Unger R.H, Glucagon molecular physiology clinical and therapeutic implications. 1st ed. Pergamon Press, Oxford 1972; pp 255-319
91. Rentervig C.O, Hagg E, Henriksson R, Holm J: Salivary glands in long-term alloxan-diabetic rats. A quantitative light and electron-microscopic study. *Acta-Pathol-Microbiol-Immunol-Scand-A* 1987; 95: 131-6
92. Lotti-LV, Hand AR: Endocytosis of parotid salivary proteins by striated duct cells in Streptozotocin-diabetic rats. *Anat-Rec* 1988; 221:802-811
93. Konarska L, Tomaszewski L: Human salivary arginase and its deficiency in argininaemia *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23: 337-342.
94. Johnson DA, Alvares OF, Etze KR, Kalu DN. Regulation of salivary proteins *J.Dent Res* 1987; 66: 576-582
95. Bernardier C.D, Diabetes Mellitus. What have we learned from animals? *Prog Food-Nutr-Sci* 1993; 17: 261-285.
96. Wahlefeld, A.W. En H.U. Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen analyse 3a. Ed, Tomo II*, Verlag Chemie, Weinheim 1974, pp 1878.
97. Siedel, J. Hägele, EO, Ziegenhorn, J, Wahlefeld AW. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* 1983; 29: 1075-1079.
98. Katterman, R. Rapid determination of total and free cholesterol in serum. *Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 245-247
99. Frings CS, Fendley, TW, Dunn, RT, Queen, CA. Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem* 1972; 18: 673-676
100. López-Virella MF, Stone P, Ellis S.L., Colwell J.A.: Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977; 23: 882-884
101. Warnick, GR, Knopp, RH, Branson L.: Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of National Recommended Cutpoints. *Clin Chem* 1990; 36: 15-19.

102. Trinder,P: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969; 6: 24-27
103. Goldener MG, Gomori G. Studies on the mechanism of alloxan diabetes. *Endocrinology*. 1964; 35: 241-248.
104. Lenzen S, Panten U. Signal recognition by pancreatic β cells. *BiochemPharmacol* 1988; 37: 371-378.
105. Perley, M.J., Kipnis D.M., Plasma insulin response to oral and intravenous glucose: Studies in normal and diabetic subjects. *J.Clin. Invest*; 1967; 46: 1954-58.
106. Cerasi E., Luft R., The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol*, 1967; 55: 278-81
107. McNeill J. *Experimental Models of Diabetes*. CRC Press LLC, 1999.
108. Chait, A., Brunzell, J.D., Diabetes, Lipids and Atherosclerosis, In *Diabetes Mellitus. A Fundamental and Clinical Text*. Ed by LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J. Lippincott-Raven Philadelphia 1996. pp. 772-780.
109. Sharma J,JC. Hasenkamp W., Ilkova H., Patane G., Laybutt R., Bonner-Weir S., Weir G.C., Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 1999; 274: 14112-21
110. Bernard C, Berthault M.F., Saulnier C., Kroza A. Neogenesis vs apoptosis as main components of pancreatic beta cells ass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *FASEB J* 1999; 13: 1195-205
111. Smith P.H, Leone J.P., Stearns S.B. Immunochemical studies of an insulin-like material in the parotid gland of diabetic BB rats. *Diabetes* 1986; 35: 106-9
112. Morris PA.. Prout R.E, Proctor G.B., Garret J.R., Anderson L.C., Lipid analysis of the major salivary glands in streptozotocin-diabetic rats and the effects of insulin treatment. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 489-94
113. Alm P, Ekstrom P., Henningsson R., Lundquist I. Morphological evidence for the existence of nitric oxide and carbon monoxide pathways in the rat islets of Langerhans: an immunocytochemical and confocal microscopical study. *Diabetologia* 1999; 42: 978-86
114. Leonora J, Tieche J.M.,Cook D.D, Evidence for insulinotropic effect from rat parotid glands. *Diabetes* 1988; 37: 441-5.

115. S. Islas-Andrade, Revilla-Monsalve M.C, J.Escobedo de la Peña, Polanco Ponce A, Palomino Garibay M.A, Feria Velasco A. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes. Comparison of the two models in rats. *Acta Histochemica et Cytochemica* 2000; 33: 201-208.