

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**INDUCCIÓN DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 POR
ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE ESTREPTOZOTOCINA**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
DAMARIS REYES GONZALEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARTIN PALOMAR MORALES**

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

2005



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.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Papa: porque me has enseñado que en este mundo hemos de trabajar a cada instante por lo que deseamos. Mama: Porque conociéndote he aprendido que el amor es la guía de la vida, y porque sin sus consejos, apoyo y corazón yo no hubiera llegado hasta aquí. Para los dos con todo el amor del mundo.

A mis hermanos y hermanas:

normis, eru, guerito, omar, eloy, zoris y esme: cada cual con su historia, siempre estarán conmigo con sus “espantosos defectos y nunca bien ponderadas virtudes” (jja!). Todos saben lo que son en mi vida. Los quiero. También va para ustedes con cariño.

A mis sobrinos:

karina, omar, dany, beto, oscar, román, gaby y wendy (aunque aun no sepan leer) A veces son un amor, a veces Espero que esto alguna vez llegue alguna vez a sus manos y los inspire al menos un poquito..... Los quiero mucho y siempre contarán conmigo.

G R A C I A S

Al Dr. Palomar, por su paciencia e incondicional apoyo.

A la familia Rendón-Martínez y anexos: sr. esteban, sra. martha, marce, lety, laura, ale, luís, malu, kay, marco, mari, ara, roro, marco (Jr.), ale y luís mario, por los buenos momentos, por su cariño, confianza y sobretodo por abrirme las puertas de su casa y de su corazón..... Donde quiera que este, los llevo conmigo por siempre.

A mis compañeros de laboratorio: Juan y Cinthia, por esas eternas charlas y esos jueves de billar salud!!

A mis compañeros y amigos (si omití a alguien de antemano, perdón): Maesse, Yemo, gutí, Paty, Alix, Mónica, Chibo, Fer, Vero, Paco, Flor, Laura, More y Nacho, por los excelentes momentos juntos y porque sigamos compartiendo los triunfos y fracasos.....ojala y sean mas triunfos!!!

A Antalya, Oscar y Víctor, por su amistad.

Y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIORREGULACIÓN (L-511), BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. MARTÍN PALOMAR MORALES. SE TUVO APOYO ECONÓMICO DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO Y DE LA UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LA FES IZTACALA.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	38

RESUMEN

Los modelos espontáneos de diabetes mellitus tipo 2 que se han descrito son incompletos, y a decir de otros autores, son modelos de obesidad. Además, en nuestra facultad no se cuenta con dichos modelos, por lo cual nos planteamos la necesidad de implementar, para estudios futuros, un modelo de diabetes tipo 2 que pueda desarrollarse rápido, fácilmente y a un bajo costo y que presente las características más parecidas a la condición humana de la enfermedad. Se utilizaron 40 ratas hembra de la cepa *Wistar*, las cuales se aparearon con machos sanos de la misma cepa, y se tomó como día cero la presencia de espermatozoides. Las ratas preñadas se monitorearon hasta el nacimiento de las crías. Al día 1 de vida se eliminaron las hembras y se ajustó a ocho el número de crías por rata. A las crías macho se les administró por vía intraperitoneal, estreptozotocina en dosis de 60, 80, 100 ó 120 mg/kg al día 2 ó 4 de vida o únicamente solución salina, en el caso de los controles. A las 10 semanas (70 días de edad), las ratas se pesaron, se anestesiaron y se obtuvo la sangre por medio de punción cardiaca. Se determinaron la glucosa, los triglicéridos, el colesterol y la insulina plasmáticos, además del β -hidroxibutirato en sangre. Adicionalmente, se evaluó el índice de supervivencia hasta el momento de sacrificio. En ninguno de los parámetros evaluados, se encontró diferencia significativa entre los controles, pero en respuesta a la administración de STZ, a todas las dosis, sin importar el día de administración, se encontró pérdida de peso, hiperglucemia e hipoinsulinemia. La administración de STZ al día 2 de vida produce elevación de triglicéridos en todas las dosis usadas, pero al día 4, únicamente en la dosis de 80 y 100 mg/kg. El colesterol se incrementó en los tratamientos con dosis de 100 y 120 mg/kg al día 2 y en la dosis de 100 mg/kg al día 4. No existe ninguna diferencia entre los valores de β -HB en ninguna dosis. Se encontró una correlación negativa entre las dosis administradas y la tasa de supervivencia. El mejor modelo es la administración de 100 mg/kg de STZ al día 2 de vida, ya que produce la sintomatología deseada: hiperglucemia, hipoinsulinemia,

hipertrigliceridemia, hipercolesteremia sin cetosis y una mejor tasa de supervivencia que la dosis más elevada.

INTRODUCCIÓN

El término Diabetes Mellitus (DM) no se refiere a una sola condición, más bien engloba una variedad de características con diferentes etiologías. La DM se describe como un síndrome caracterizado por hiperglucemia y asociado a un desequilibrio en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, ocasionado por una relativa o absoluta deficiencia de insulina o por la resistencia a la acción de la insulina a nivel celular (Debra, 1996). Se calcula que la DM afecta aproximadamente a 250 millones de personas en el mundo (Zimmet, 1994).

La Diabetes Mellitus y otras categorías de la intolerancia a la glucosa se clasificaron y publicaron en 1979 por el National Data Group (NDG). En 1980 el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación en la cual se abandonaban terminologías previas como diabetes química, limítrofe, subclínica y asintomática. Sin embargo, tampoco se consideraba el aspecto dinámico de la enfermedad y en el caso de la diabetes tipo 2 no se consideraba la relación entre resistencia a la insulina y su secreción. En 1997, tomando en cuenta lo anterior, el Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes propuso una nueva clasificación etiológica de la DM (cuadro 1). La DM se subdivide en 4 grupos diferentes. El primer grupo, o DM tipo 1 (DM1), es el antes conocido como diabetes juvenil; mientras que el segundo grupo, la DM tipo 2 (DM2), es el conocido como diabetes del adulto. El tercer grupo comprende otras entidades que, en contraste con la diabetes primaria o esencial, son secundarias o asociadas a ciertos síndromes genéticos. El cuarto grupo se refiere a la diabetes gestacional, el tipo de DM que da exclusivamente a las mujeres gestantes (Mayer, 1998; The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997).

Cuadro 1. Clasificación etiológica de la diabetes. Traducida del artículo original del Comité de Expertos de American Diabetes Association (1997).

<p align="center">I. Diabetes tipo 1</p> <p>Destrucción de células β que conduce a una deficiencia absoluta de insulina.</p> <p>A.-Mediación de mecanismos inmunológicos. B.-Idiopática.</p>	<p align="center">II. Diabetes tipo 2</p> <p>Existen variaciones que van desde el predominio de la resistencia a la insulina con relativa deficiencia de ésta, hasta el defecto predominante en la secreción con resistencia a la acción de la hormona.</p>
--	--

III. Otros tipos específicos	
<p>A. Defectos genéticos de la función de la célula β.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- En cromosoma 12, HNF-1^a (MODY3). 2.- En cromosoma 7, glucocinasa (MODY2). 3.- En cromosoma 20, HNF-4 α (MODY1) 4.- En ADN mitocondrial. 5.- Otros. <p>B. Defectos genéticos en la acción de la insulina.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Resistencia a la insulina tipo A. 2.- Leprechaunismo. 3.- Síndrome de Rabson-Mendehall. 4.- Diabetes lipoatrófica. 5.- Otros. <p>C. Enfermedades del páncreas exócrino.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Pancreatitis. 2.- Traumatismo / pancreatectomía. 3.- Neoplasia. 4.- Fibrosis quística. 5.- Hemocromatosis. 6.- Pancreatopatía fibrocalculosa. 7.- Otras. <p>D. Endocrinopatías.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Acromegalia. 2.- Síndrome de Cushing. 3.- Glucagonoma. 4.- Feocromocitoma. 5.- Hipertiroidismo. 6.- Somatostatinaoma. 7.- Aldosterona. 8.- Otras. 	<p>E. Sustancias químicas o drogas capaces de inducir diabetes.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Pentamidina. 2.- Acido nicotínico. 3.- Glucocorticoides. 4.- Hormona tiroidea. 5.- Diazóxido. 6.- Agonistas β adrenérgicos. 7.- Tiazidas. 8.- Difenilhidantoina. 9.- α-interferon. 10.- Otras. <p>F. Infecciones.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Rubéola congénita. 2.- Citomegalovirus. 3.- Otras. <p>G. Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Síndrome del hombre rígido. 2.- Anticuerpos contra el receptor de insulina. 3.- Otras. <p>H. Otros síndromes que algunas veces se asocian con diabetes.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Síndrome de Down. 2.- Síndrome de Klinefelter. 3.- Síndrome de Turner. 4.- Síndrome de Wolfram. 5.- Ataxia de Friedreich. 6.- Corea de Huntington. 7.- Síndrome de Lawrence Moon Beidel. 8.- Distrofia Miotónica. 9.- Porfiria. 10.- Síndrome de Prader Willi 11.- Otras.

IV. Diabetes mellitus gestacional

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) representa cerca del 10% de todos los casos del mundo occidental (Zimmet, 1994). Se puede manifestar a cualquier edad, aunque es más común en niños y adultos jóvenes; el 90% de los casos se presenta entre los 9 y 12 años de edad y se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células- β pancreáticas. El cuadro clínico tiene una variedad de signos, siendo los más evidentes la poliuria, que se debe a la hiperglucemia, y glucosuria. La evolución clínica varía de individuo a individuo, y en mucho depende de la prontitud con que se establezca el diagnóstico y se proporcione al paciente el manejo integral del padecimiento mediante la administración de insulina, planes de alimentación y actividad física, entrenamiento para automedicación y apoyo psicológico familiar (Mayer, 1998).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) representa casi el 90% de todos los pacientes diabéticos del mundo occidental. Se caracteriza clínicamente por los siguientes rasgos: alta frecuencia familiar, aparición clínica relativamente tardía, por lo general en la edad adulta y una fuerte asociación con la obesidad e hipertensión arterial. Sus características incluyen hiperglucemia, niveles de insulina normales o cercanos a la normalidad, ligera elevación del glucagon y ausencia de cetoacidosis (King *et al*, 1998).

A diferencia de la DM1 en donde se integraron en una sola hipótesis todos los hechos relacionados con el mecanismo patógeno de la enfermedad, en la DM2 aún no es posible proponer un esquema unitario que considere todos los hechos conocidos para explicar el desarrollo de la enfermedad (Méndez y Ramos, 1994). Las causas principales de la DM2 pueden ser un defecto en la síntesis y secreción de insulina o un defecto en su acción a nivel celular. Quienes proponen que el problema inicial es una resistencia a la insulina en las células, buscan factores genéticos en relación con este defecto mientras que otros investigan los argumentos moleculares de la secreción deficiente (Taylor *et al*, 1994).

Las complicaciones de la diabetes tienen un alto impacto socioeconómico, debido a los grados de incapacidad que se presentan en los individuos afectados. Entre las complicaciones agudas se encuentran principalmente la cetoacidosis diabética y con menor frecuencia la hipoglucemia y la acidosis láctica. Las complicaciones crónicas con mayor incidencia entre los pacientes diabéticos son la enfermedad coronaria arterial, la disfunción renal, la ceguera, las cataratas y las disfunciones motoras y sensoriales, que incluyen la impotencia en pacientes masculinos. La expectativa de vida de los diabéticos en promedio, es de sólo dos terceras partes que el de la población general (Escobedo-de la Peña y Rico-Verdín, 1996).

La diabetes en México

En México, la diabetes representa uno de los principales problemas de salud pública. En 1998 fue la séptima causa de morbilidad, con 336 mil 967 casos diagnosticados y para 1999 se notificaron cerca de 239 mil casos nuevos (Rascon-Pacheco *et al*, 2000). De acuerdo con la información disponible, el país ocupaba el décimo lugar mundial en 1995, con 4 millones de enfermos y se estima que para el 2025 ocupará el séptimo lugar con 12 millones. La tasa de mortalidad por 100 mil habitantes fue del 33.4 en 1993, pero llegó hasta el 43.5 en 1998 y aproximadamente, cada hora se diagnostican 38 nuevos casos de diabetes. (Boletín de Salubridad 591, 2004).

En la actualidad, este síndrome ocupa el tercer lugar como causa de muerte general y es la primera en personas entre los 45 y los 65 años de edad. El 96 % de los nuevos casos que se diagnostican en nuestro país presentan diabetes tipo 2 y es muy frecuente que muchos de los pacientes con este padecimiento no se den cuenta de su hiperglucemia durante varios años. Esta elevación persistente e inadvertida de la glucosa favorece la presencia de las complicaciones ya que retarda el tratamiento y el daño se origina entre cuatro y cinco años antes de que aparezcan los síntomas, con lo cual se incrementa el

riesgo de complicaciones crónicas y con ellas la muerte temprana (Kuri *et al*, 2001).

La DM2 es un grave problema de salud no solo por el deterioro a la salud que causa, si no también por el alto costo que representa su tratamiento. Tan sólo en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) el gasto promedio anual de la atención de pacientes que padecen diabetes superó los 2 mil millones de pesos durante el periodo comprendido entre 1992 y 1997. Se estima que los costos directos e indirectos de la diabetes oscilan entre los 100 y 330 millones de dólares por año. En lo individual, se calcula que el costo de atención por cada enfermo de diabetes es de alrededor de 52 mil dólares como consecuencia de la enfermedad, de los cuales entre un 30 y 65 por ciento corresponde a gastos de hospitalización por complicaciones agudas, pero esta cifra puede aumentar hasta 3.5 veces en el caso de las complicaciones crónicas. Es evidente que las manifestaciones de la enfermedad y sus complicaciones impactan negativamente en la autonomía y calidad de vida de los enfermos, e imponen una enorme carga económica al enfermo, su familia y al sistema de salud; por estos motivos, la Secretaría de Salud promovió la actualización de la Norma Oficial Mexicana NOM-015-55A2-1994 para la prevención, control y tratamiento de la diabetes, con el propósito de asegurar la aplicación de los procedimientos de detección, diagnóstico y control del paciente diabético (Rascón-Pacheco *et al*, 2000).

Modelos animales en el estudio de la diabetes

Para poder entender el desarrollo de la DM así como los efectos de nuevos tratamientos se han desarrollado diversos modelos animales. Entre estos, están incluidos animales comunes de laboratorio como ratones, ratas, otros roedores y perros, y también animales no tan comunes como el hámster chino, el cerdo y primates no humanos (Peterson y Shaw, 1990). A pesar de esto, no existe un sólo modelo que proporcione las respuestas a todas las preguntas relacionadas con la enfermedad.

En la actualidad, el avance de la manipulación genética ha permitido establecer modelos animales que presentan diabetes en forma espontánea (cuadro 2). Entre los modelos de roedores más conocidos están la rata Zucker, el ratón ob/ob, la rata WKY, el ratón KK, el ratón NZO y la rata cp, los cuales, aunque inicialmente se describen como modelos de DM2, son normoglicémicos, indicando con esto que son más apropiados como modelos de obesidad que de diabetes (Janssen *et al*, 1999). Existen dos modelos de ratón usados frecuentemente como modelos de DM2 y que poseen los genes *db* y *ob*. Recientemente se han desarrollado modelos de rata para DM2 usando cepas que contenían los genes *fa* y *cp*. El gen *fa* fue descrito por primera vez en ratas Zucker en 1961 y el gen *cp* apareció espontáneamente en una colonia producida como resultado de la cruce entre la cepa SHR/N y SD en 1973 (Hugues *et al*, 2002).

Cuadro 2. Algunos modelos animales para el estudio de la DM. Tomado de Hugues	
*DM2 e hiperglucemia severa.	
Ratón	db/db (mutante), C57BL/KsJ
Rata	Sand, fa/fa, OLEFT, Obesa BBZ/wor
Mono	Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)
Hamster	H. Chino (<i>Cricetulus griseus</i>)
*DM2 e hiperglicemia moderada	
Rata	Cohen diabética, GK (Goto-Kakisaki), SHR/Ncp, machos WBN/Kob, Wky, Ess, ZDF
Ratón	Japones KK, NZO, C57BL/6J, Machos Bristol CBA/Ca, Wellesley
*DM2, obesidad e intolerancia a la glucosa	
Rata	Fa, Cp
Ratones	Ob, Db, Tub, Fat, A ^y

También se han descrito modelos que reúnen la hiperglucemia y el desarrollo de obesidad, como son el ratón C57BKS db/db, y la rata de arena (*Psammomys obesus*), en los cuales aparentemente un defecto en la capacidad proliferativa de las células β juega el papel más importante en el desarrollo de la diabetes. Se han descrito dos nuevos modelos de roedores genéticamente DM2 y no obesos: la rata GK y la rata BHE, en ambas cepas una disminución de la masa de células β precede el inicio de la hiperglucemia (Peterson y Shaw, 1990).

La diabetes también puede ser inducida experimentalmente, ya sea por medios quirúrgicos como la pancreatectomía, o por medios químicos como la administración de fármacos diabetogénicos. Los dos fármacos más utilizados son el aloxan y la estreptozotocina (STZ). El aloxan, (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracilo) fue descrito por Brugnatelli en 1818; Wohler y Liebig usaron el nombre de “aloxan” y describieron su síntesis causada por la oxidación de ácido úrico. Sus propiedades diabetogénicas se describieron por el grupo de Duna en 1943, quienes estudiaron los efectos de su administración en conejos y reportaron necrosis específica de los islotes pancreáticos. Desde entonces es comúnmente utilizado para inducir DM1 (Szkudelski, 2001). La dosis requerida para inducir diabetes depende de la especie, de la ruta de administración y del estado nutricional del animal. En ratas la dosis más utilizada para inducir diabetes es de 65 mg/kg por vía intravenosa, para administración intraperitoneal o subcutánea se requiere de una dosis dos o tres veces más alta. La diabetogenicidad de la aloxana está en relación con su reducción en las células β y con la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), la cual precede la reducción de la aloxana y la posterior formación de ácido dialúrico, que es re-oxidado hacia el aloxana estableciendo así un ciclo redox con la formación de radicales superóxido, que sufren dismutación hacia peróxido de hidrógeno. Uno de los blancos de las EROs es el DNA de los islotes pancreáticos el cual es fragmentado (Yamamoto *et al*, 1981).

La estreptozotocina (STZ, N-(metilnitrosocarbamocil)-D-glucosamina) es un antibiótico de amplio espectro que posee propiedades antitumorales y se ha descrito como un agente antileucémico y productor de neoplasias benignas en riñón y páncreas de rata. Se aisló en 1960 a partir de *Streptomyces achromogenes*. Frecuentemente se usa para inducir DM1 en una dosis única de 40 a 60 mg/kg por vía intravenosa en ratas adultas, sin embargo, se pueden utilizar dosis más altas. La dosis de inducción varía entre las especies y puede ir desde 50 mg/kg vía I.V. en los perros, hasta 200 mg/kg vía I.V. en ratones (Zhang *et al*, 2003). La STZ también puede ser administrada en dosis múltiples por vía intraperitoneal, tratamiento comúnmente utilizado en ratones. Los daños histológicos que produce la administración del fármaco son la degranulación de las células beta y la destrucción de los islotes pancreáticos.

Se sabe que una dosis vía intraperitoneal o intravenosa de 100 mg/kg puede inducir DM2 en neonatos de rata, sin embargo, es común encontrar muchas variaciones en la dosis diabetogénica de la STZ. En 1974 se reportó el modelo de DM2 inducida por la administración de STZ a crías de rata durante su primer día de vida (Portha *et al*, 1974). A partir de esta situación se han desarrollado numerosas modificaciones a este modelo que dependen del sujeto en estudio, de las condiciones del laboratorio, así como de la severidad de los síntomas que se quieran obtener, sin embargo todas están basadas en la misma premisa: las ratas son tratadas con STZ (80-100 mg/kg) al día 0 de nacimiento o bien dentro de los siguientes 5 días y experimentan una severa destrucción de células- β acompañada de un decremento en la insulina pancreática y un aumento del nivel de glucosa plasmática. En contraste con las ratas adultas tratadas con STZ, los neonatos regeneran parcialmente las células β , lo cual permite la baja producción de insulina, característica importante de la DM2 (McNeil, 1999).

La mayor ventaja de los modelos genéticos no obesos de DM2 y del modelo neonatal-STZ es la existencia de la DM2 sin las complicaciones de la obesidad. Aunque todos los modelos mencionados anteriormente son capaces de

proporcionar información valiosa acerca de la DM2, el modelo de STZ es el más caracterizado. Por esto, se ha vuelto de valor incalculable para el estudio de la DM2 y continúa siendo una fuente de información de sus causas y complicaciones (Zhang *et al*, 2003).

La acción de la STZ sobre las células β puede detectarse dos horas después de su administración: se observa hiperglucemia con un ligero aumento de la insulina sérica, seis horas después ocurre hipoglucemia con altos niveles de insulina y finalmente, se desarrolla hiperglucemia con una disminución de los niveles de insulina. Estos cambios en los niveles de glucosa e insulina reflejan las anomalías en la función de las células β .

Se han propuesto distintos mecanismos por los cuales la STZ induce daño en las células β . Estudios recientes indican que la STZ induce la alquilación del DNA de las células β , actividad relacionada principalmente con la parte nitrosocarbamocil y específicamente con la guanina en posición O⁶. Por otra parte, se cree que cuando la STZ es metabolizada dentro de la célula, se libera óxido nítrico (NO), una molécula altamente citotóxica que contribuye al daño originado en el DNA por la administración de STZ. También se ha encontrado que, como resultado de la acción de la STZ sobre las mitocondrias se producen aniones superóxido, una especie reactiva de oxígeno y se incrementa la actividad de la xantina oxidasa, contribuyendo a la fragmentación del DNA.

Aunque se cree que sus fuertes propiedades alquilantes son la principal razón de su toxicidad, tanto la acción del NO como de las EROs contribuyen a la fragmentación del DNA. El NO y las EROs pueden actuar de forma separada o formando peroxinitrato, altamente tóxico (ONOO⁻; fig. 1).

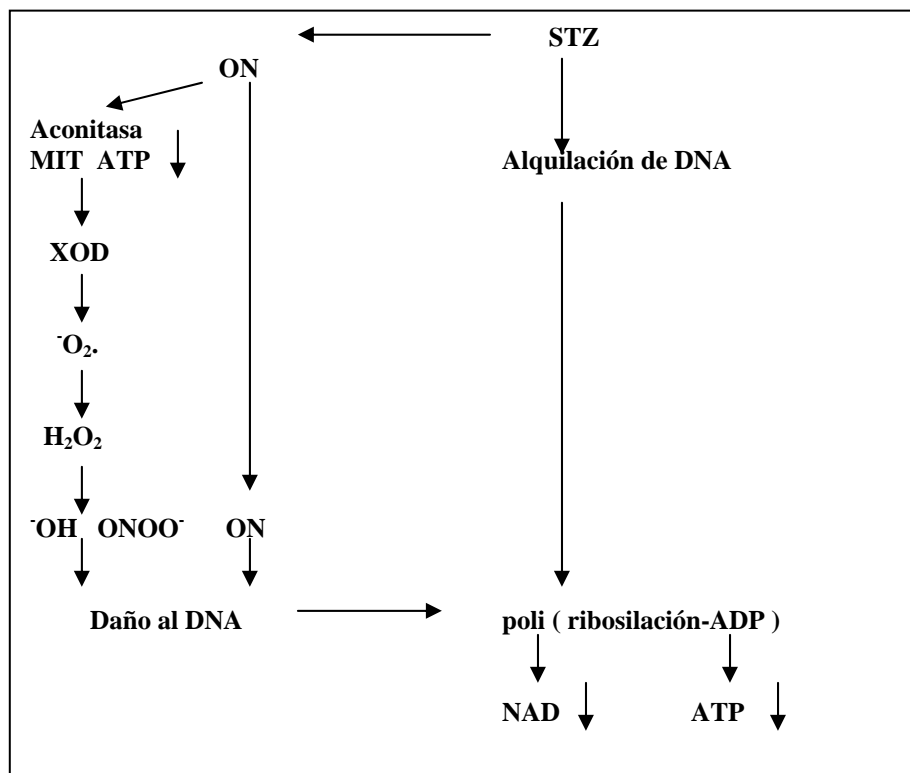


Fig. 1. Mecanismo de acción de la STZ. Tomado de Szkudelski y Skudelska, 2002. MIT – Mitocondria, XOD – Xantina-oxidasa.

ANTECEDENTES

Los mayores avances en la investigación de la diabetes se han hecho en modelos animales, contribuyendo enormemente al entendimiento de la etiopatología de la enfermedad, sus complicaciones crónicas y los posibles tratamientos.

El primer animal diabético que se conoció fue un mono reportado por Leblanc en 1851; más tarde Minkowski demostró que la ablación del páncreas en el perro ocasiona aparición de la DM (Mordes y Rossini, 1981). En 1915 Kleiner, fisiólogo del instituto Rockefeller descubrió los efectos hipoglucemiantes de emulsiones de páncreas inyectados a perros hiperglucémicos y en 1919 trabajó con extractos de páncreas frescos: propuso la existencia de una secreción interna del páncreas capaz de tener un efecto antidiabético (Perlemuter y L'Hortet, 1989).

En agosto de 1921, Banting y Best ligaron los conductos pancreáticos de perros provocando la necrosis enzimática aguda de la parte exocrina de este órgano, y dejando intacto el tejido insular, de este extrajeron al principio activo, llamado por ellos "isletin" y luego "insulin" (insulina), capaz de disminuir los niveles de glucosa (Arellin, 1990).

En 1943, Dunn, Sheehan y McLethie describen las propiedades diabetogénicas del aloxan, después de administrarlo a conejos y reportar la necrosis de los islotes pancreáticos. En 1974, Portha *et al* describen por primera vez el modelo de DM2 inducido por STZ, también conocido como n0-STZ (en donde n es el tiempo de administración de la STZ), a partir del cual se han descrito muchas variables.

Hemmings y Spafford (2000) trabajaron con ratas Fischer 344 para obtener un modelo de DM2 utilizando diferentes dosis de STZ a distintos tiempos, e indujeron diabetes con una dosis de 80 mg/kg a las 36 h de vida. Straczkowski

et al (2000) utilizaron una dosis de 45 mg/kg en neonatos *Wistar* de 48 h de vida.

Por otro lado, Cuman *et al* (2001) reportaron la inducción de diabetes en neonatos de rata *Wistar* de 48 h de vida con una dosis de 160 mg/kg, mientras que Murali y Ramesh (2001) usaron una dosis de 70 mg/kg en neonatos *Wistar* de 5 días de vida. Kuntz *et al* (2002), indujeron DM2 en ratas *Wistar* con una dosis optima de 65 mg/kg, por último, Zhang *et al* (2003) describieron un modelo de DM2 para ratas *Sprague-Dawley*, utilizando machos adultos (10 semanas de edad) y la combinación de dosis bajas de STZ (15 mg/kg) con una dieta alta en grasas. El mismo grupo, reportó la inducción de diabetes en ratas *Wistar* de 4 días de vida con una dosis de 50 mg/kg. También en ratas *Sprague-Dawley* adultas (8 semanas de edad), Lee *et al* (2003) obtuvieron el estado diabético con una dosis de 60 mg/kg.

JUSTIFICACIÓN

Para el estudio de la DM2 es necesario contar con modelos animales adecuados. Con el fin de obtener un modelo estable de DM2 que no deteriore a DM1 o se recupere gradualmente, es necesario determinar la dosis de STZ apropiada, así como el día de administración. Dado que no es posible contar con modelos espontáneos en nuestra Facultad, surge la necesidad de implementar, para estudios futuros, un modelo de DM2 que pueda desarrollarse rápido, de manera fácil y a un bajo costo. Sin embargo, a pesar de encontrar numerosa bibliografía sobre este modelo existen ciertas fuentes de variación (Arellin, 1990):

- 1.- La variación causada por la sensibilidad entre especies.
- 2.- La variación por la sensibilidad intraespecie, entre cepas o individuos provenientes de distintos laboratorios.
- 3.- La variación por la sensibilidad entre individuos de la misma especie o laboratorio.

Tomando en cuenta lo anterior y sumando como factor de variación la edad y el sexo, sólo hay que agregar el hecho de que es común encontrar reportes controversiales en la literatura, en donde las dosis diabetogénicas van desde 45 mg/kg hasta 160 mg/kg administrados desde el primer día de vida, hasta el día 5 (Cuadro 3), por todo esto, se hace necesario encontrar las condiciones óptimas para obtener un modelo animal que presente las características más parecidas a la condición humana de la enfermedad.

Cuadro 3. Comparación de algunos esquemas utilizados para inducir neonatalmente DM2 con STZ.		
Autor	Dosis	Día de administración
Cuman <i>et al</i> (2001)	160 mg/kg	48 h vida
Giroix <i>et al</i> (2002)	120 mg/kg	24 h de vida
Portha <i>et al.</i> (1974)	100 mg/kg	Al nacimiento
Garofano <i>et al</i> (2000)	100 mg/kg	12 h de vida
Murali y Ramesh (2001)	70 mg/kg	120 h de vida
Zhang <i>et al</i> (2003)	50 mg/kg	96 h de vida
Straczkowski <i>et al</i> (2000)	45 mg/kg	48 h de vida

HIPÓTESIS

Por lo anteriormente revisado, se propone que la administración de dosis altas de estreptozotocina (100 y 120 mg/kg) inducirá DM2 en por lo menos un 80% de los machos tratados neonatalmente.

OBJETIVO GENERAL

Establecer un modelo animal de DM2 que presente las características observadas en la condición humana, mediante la determinación de la dosis óptima de estreptozotocina y del día adecuado para su administración en neonatos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar las concentraciones séricas de glucosa, colesterol y triglicéridos en ratas sometidas neonatalmente a distintas dosis de STZ

Cuantificar la concentración sanguínea de β -hidroxibutirato, en ratas adultas, por efecto de la administración de distintas dosis de STZ, en los primeros días de vida.

Determinar los niveles séricos de insulina en ratas tratadas neonatalmente con STZ.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos. La STZ y los reactivos para la determinación de β -HB se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El estuche para la determinación de insulina (DSL-10-1600) se obtuvo de Diagnostic Systems Laboratories Inc. (Webster, TX). Los estuches para la determinación de glucosa (Spinreact #1001190), triglicéridos (Bioxon # 527) y colesterol (Bioxon # 528) se compraron a distribuidores locales. Otros reactivos utilizados fueron de la más alta calidad analítica.

Sujetos experimentales. Los animales utilizados se mantuvieron en condiciones de bioterio: 22°C, 60% de humedad relativa, ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs., comida y agua *ad libitum*. Se utilizaron un total de 40 ratas *Wistar* hembra, no apareadas, con peso promedio de 250 g las cuales se aparearon durante la noche con machos sanos de la misma cepa. Por la mañana se realizó un frotis vaginal y se consideró como día cero la presencia de espermatozoides. Las ratas preñadas se monitorearon hasta el nacimiento de las crías.

Diseño experimental. Al día 1 de vida se eliminaron las hembras y se ajustó a ocho el número de crías macho por rata. Las crías se pesaron individualmente y se les administró, en un volumen de 50 μ L por vía intraperitoneal, con una jeringa de insulina con aguja 31g o 29g, la STZ previamente disuelta en solución salina (NaCl 0.9%) o únicamente solución salina según el cuadro 4.

Cuadro 4. Distribución de grupos control y experimentales.		
Grupo I (n2-STZ)	Control	50 µL de sol. salina
	Experimental 1	60 mg/kg de STZ
	Experimental 2	80 mg/kg de STZ
	Experimental 3	100 mg/kg de STZ
	Experimental 4	120 mg/kg de STZ
Grupo II (n4-STZ)	Control	50 µL de sol. salina
	Experimental 1	60 mg/kg de STZ
	Experimental 2	80 mg/kg de STZ
	Experimental 3	100 mg/kg de STZ
	Experimental 4	120 mg/kg de STZ

Las crías permanecieron con la madre hasta su destete a las 4 semanas de edad. A las 10 semanas (70 días), en condiciones basales (ayuno de 12 h) las ratas se pesaron, se anestesiaron con pentobarbital sódico (100 mg/Kg), y se obtuvo la mayor cantidad posible de sangre por medio de punción cardiaca. Se separó 1.0 mL de sangre, la cual fue tratada con 0.1 mL de heparina (1000 U/mL) y luego desproteínizada con HClO₄ al 10% en frío, para posteriormente ser centrifugada. El sobrenadante se neutralizó a pH de 6.0 a 7.0, y se determinó el β-hidroxibutirato (β-HB). El resto de la sangre se centrifugó a baja velocidad sin anticoagulante y el suero obtenido se empleó para la cuantificación de glucosa, colesterol, triglicéridos e insulina.

Determinaciones bioquímicas. Se utilizaron estuches comerciales, y reactivos analíticos de la más alta calidad disponible. Las lecturas de la densidad óptica se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Jenway modelo 6305, con excepción de la insulina, que se leyó en un lector de placas de ELISA Micro Reader 550 de Bio-Rad.

La glucosa se determinó de acuerdo al método de Trinder (1969), que se basa en la oxidación de la glucosa catalizada por peróxido de hidrógeno, el cual, por una peroxidasa, reacciona con fenol y 4-amino-fenazona para producir una quinona, que absorbe luz a 505 nm.

Los triglicéridos se cuantificaron con el método de Soloni (1971), que consiste en la saponificación con etóxido de sodio y posteriormente con ácido peryodico en medio ácido, para producir formaldehído y un complejo cetónico que absorbe a 410 nm.

El colesterol se estimó mediante el principio de Lieberman-Burchard (Verley, 1967), cuyo fundamento es la esterificación del colesterol con anhídrido acético en la posición 3-OH, produciendo el éster correspondiente. Una insaturación en delta cinco causa una epimerización y deshidratación, lo que en medio ácido produce un color verde característico el cual es medido fotocolorimétricamente a 520 nm.

El β -hidroxibutirato se midió por la técnica de Kientsch-Engel y Siess (1981) la cual consiste en la conversión de β -hidroxibutirato a acetoacetato y formación de NaOH desde NAD^+ . El NAD^+ de manera no enzimática reacciona con batofenantrolina -disulfónico (BPS) -ferroso y la reduce a BPS-férrico en presencia de Fenazina metosulfato, lo cual se observa como cambio en absorbancia a 546 nm.

Por último, la insulina fue medida con un estuche de Diagnostic System Laboratorios (DSL-10-1600) por una prueba de ELISA, en la cual dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra determinantes antigénicos separados de la molécula de insulina; durante la incubación, la insulina reacciona contra los anticuerpos anti-insulina, el anticuerpo se detecta por la reacción 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y el punto final colorimétrico se lee por espectrofotometría.

Análisis Estadístico. Los resultados de los niveles sanguíneos de insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol, β -HB y peso se analizaron mediante la prueba de ANOVA bifactorial, seguida por Tukey, cuando fue necesario. La tasa de supervivencia de los animales sujetos al experimento se analizó por la prueba exacta de Fischer. Se utilizó el paquete estadístico Sigma Stat 3.2 para Windows.

RESULTADOS

De ninguno de los parámetros evaluados, hubo diferencia significativa entre los controles. Sin embargo, para el análisis se compara cada grupo experimental contra su respectivo control.

Peso. Al día de sacrificio, el peso de los animales tratados con STZ al día 2 o 4 es menor que el de los controles, de manera estadísticamente diferente (Fig. 2).

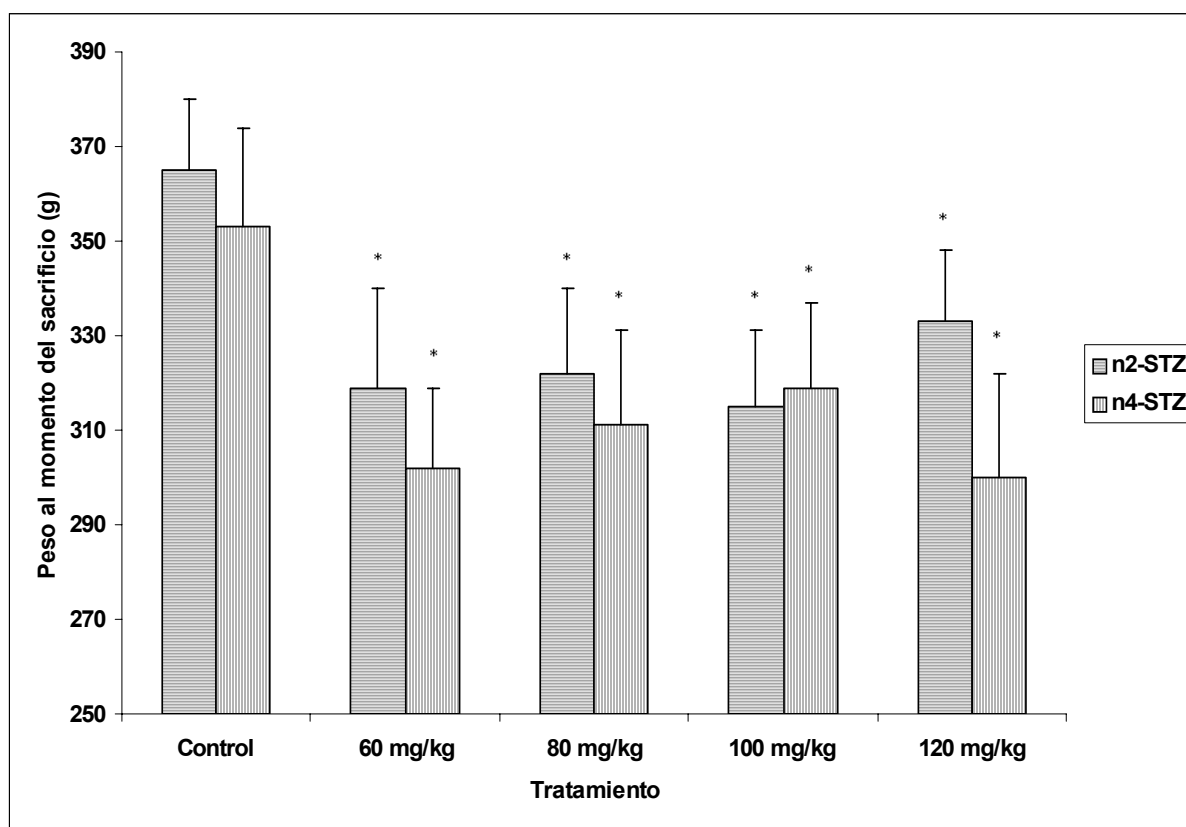


Fig. 2. Peso de las ratas al momento del sacrificio. Promedio \pm D.E. (n=10-12).

*p<0.05 con respecto al control respectivo.

Glucosa. Como se puede observar en la figura 3, se encontraron diferencias en los valores de glucosa sanguínea entre los sujetos sometidos a STZ y su respectivo control. El análisis estadístico determinó diferencias significativas en respuesta al tratamiento con STZ en el día 2. Por otra parte, el inducir DM el día 4 causa diferencias significativas a dosis de 80, 100 y 120 mg/kg, pero no a 60 mg/kg.

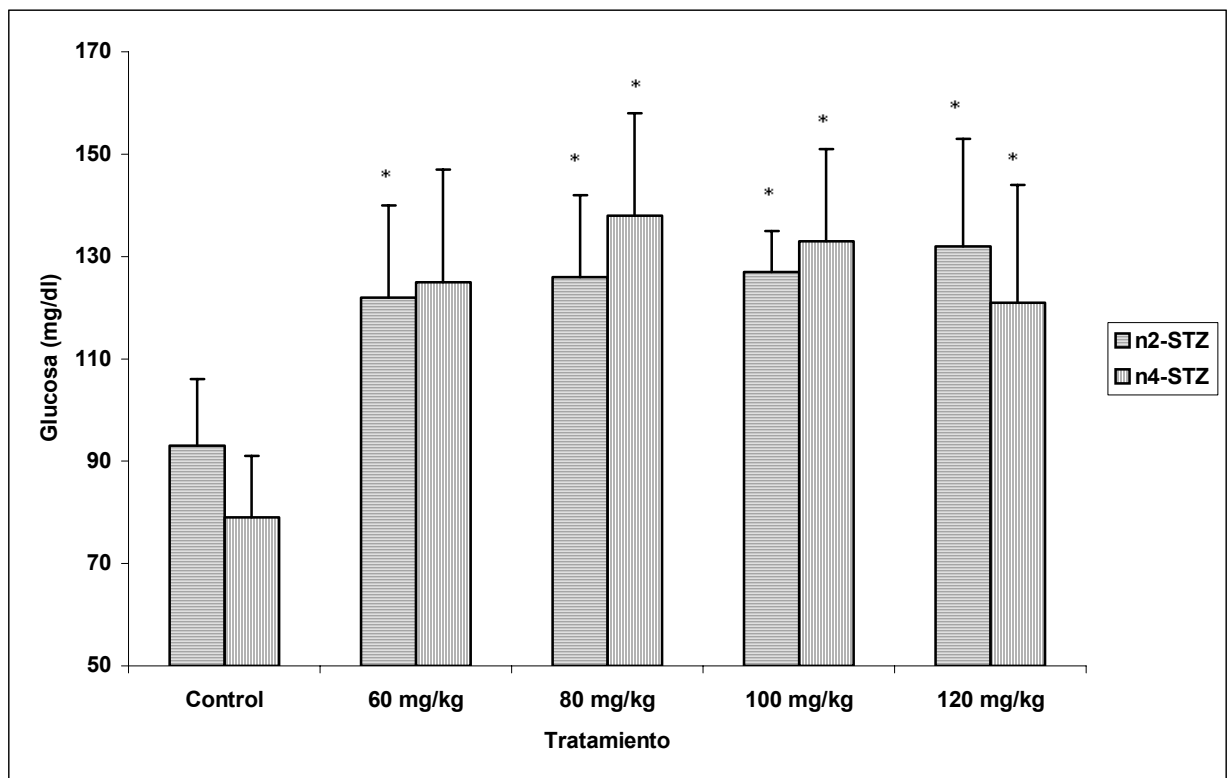


Fig. 3. Concentración de glucosa sérica. Promedio \pm D.E. (n= 10-12). *p<0.05 con respecto al control respectivo.

Triglicéridos. Cuando las ratas se trataron con STZ el día 2, se observó que al sacrificio los triglicéridos son estadísticamente diferentes entre los sujetos tratados con STZ y sus respectivos controles, no así cuando se tratan al día 4, ya que las diferencias estadísticas únicamente se presentan en las dosis de 80 y 100 mg/kg con respecto al control (fig. 4).

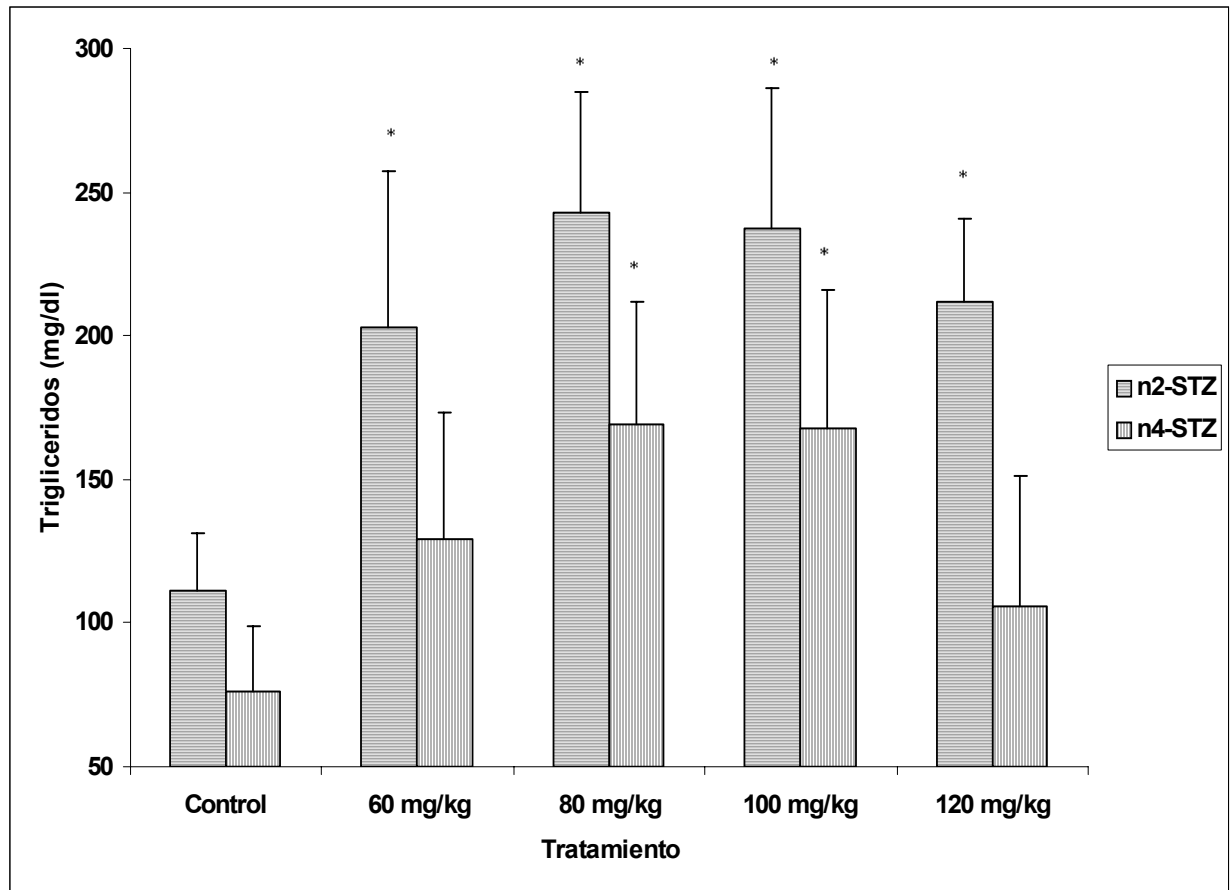


Fig. 4. Concentración de triglicéridos en suero. Promedio \pm D.E. (n= 10-12).

*p<0.05 con respecto al control respectivo.

Colesterol. Cuando se trató con STZ al día 2 de edad, se encontró que al momento del sacrificio existían diferencias entre el control y los individuos tratados con dosis de 100 y 120 mg/kg de peso. Cuando se trataron los individuos al día 4, solo existieron diferencias notables entre el grupo control y la dosis de 100 mg/kg (fig. 5).

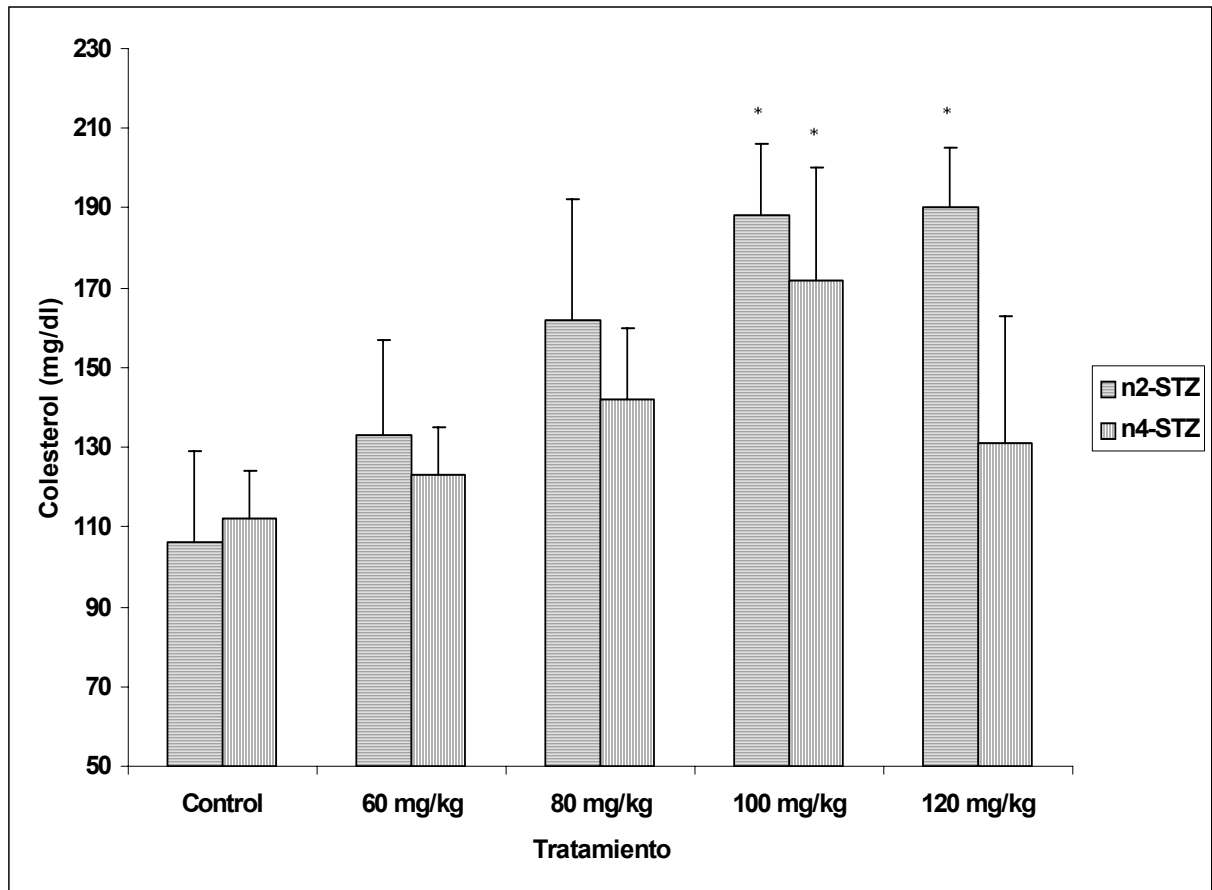


Fig. 5. Concentración de colesterol. Promedio \pm D.E. (n= 10-12). *p<0.05 con respecto al control.

β -Hidroxibutirato. En ningún grupo tratado con STZ se presentaron diferencias significativas con respecto al control (fig. 6).

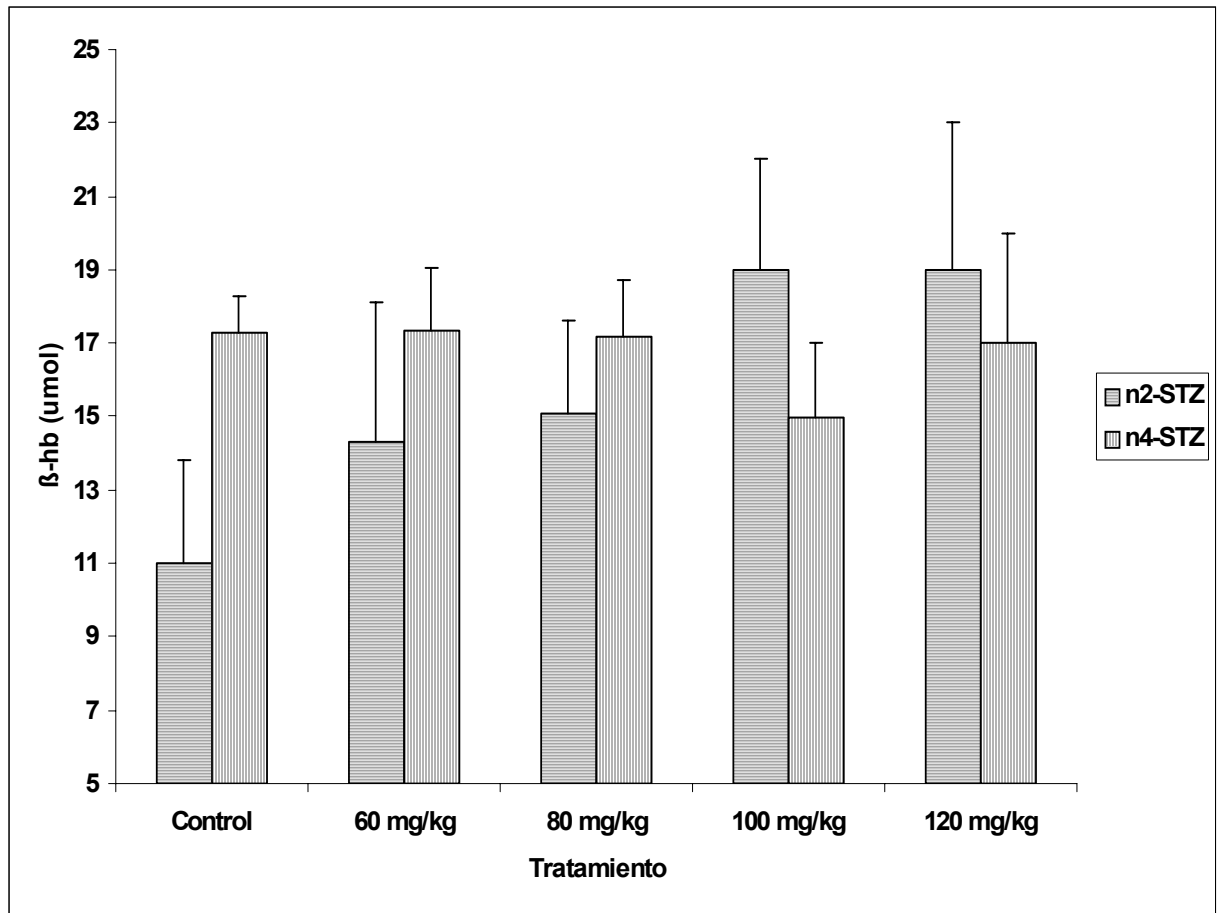


Fig. 6. Concentración de β -HB. Promedio \pm D.E. (n= 10-12).

Insulina. Los valores promedio de los grupos experimentales son diferentes con respecto a los controles en todas las dosis para ambos días de inducción y en la fig. 7 se puede observar una correlación evidente entre el decremento en la insulina sanguínea de los grupos experimentales y las dosis de STZ.

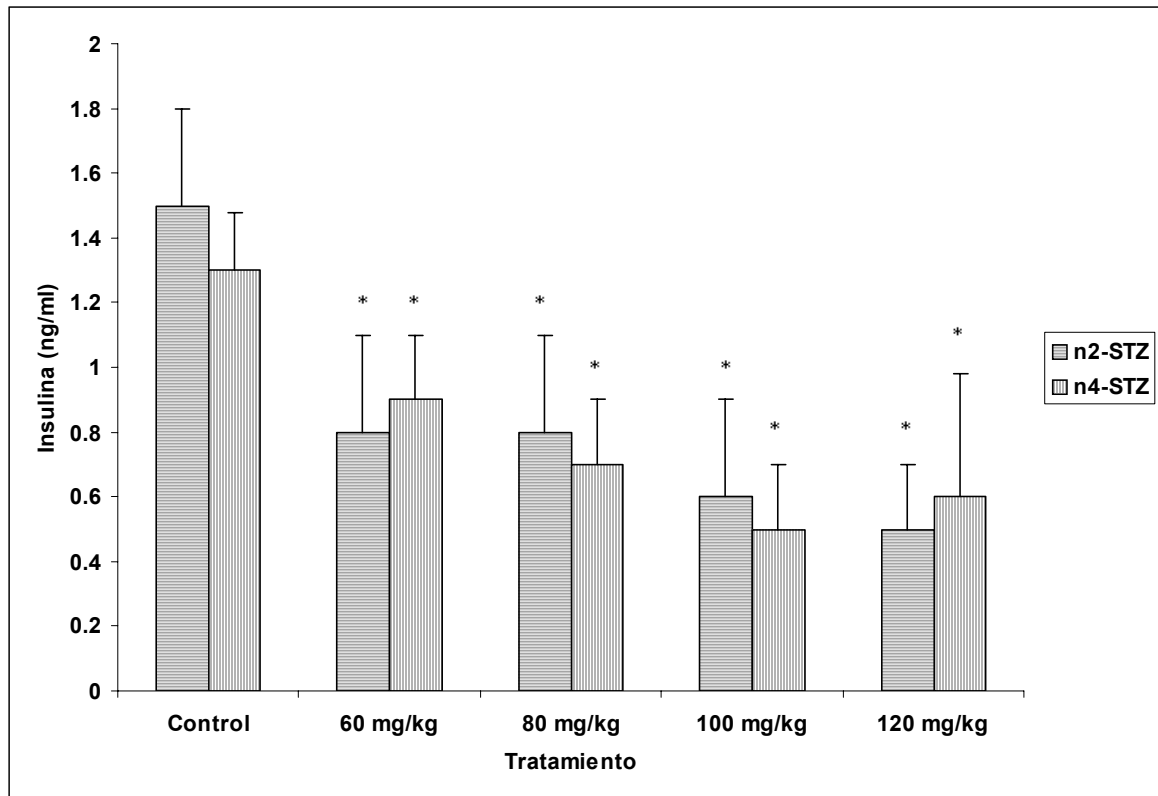


Fig. 7. Concentración de Insulina. Promedio \pm D.E. (n= 10-12). *p<0.05 con respecto al control.

Tasa de Supervivencia. En los grupos controles, la supervivencia es mayor al 50%, a lo largo de las 10 semanas de vida. Para los grupos tratados con 60

mg/kg de peso, independientemente del día de tratamiento, se observó que la mortalidad es igual a la del control; no así los grupos tratados con 80, 100 y 120 mg/kg, en los cuales la mortalidad llega hasta cerca del 80%, como se ve en la fig. 8. Es importante señalar que la mortalidad de los grupos control se produjo durante el transcurso de las 10 semanas de vida, mientras que en las ratas tratadas con STZ la mortalidad se dio principalmente en las dos semanas siguientes a la administración de la STZ (Fig. 8).

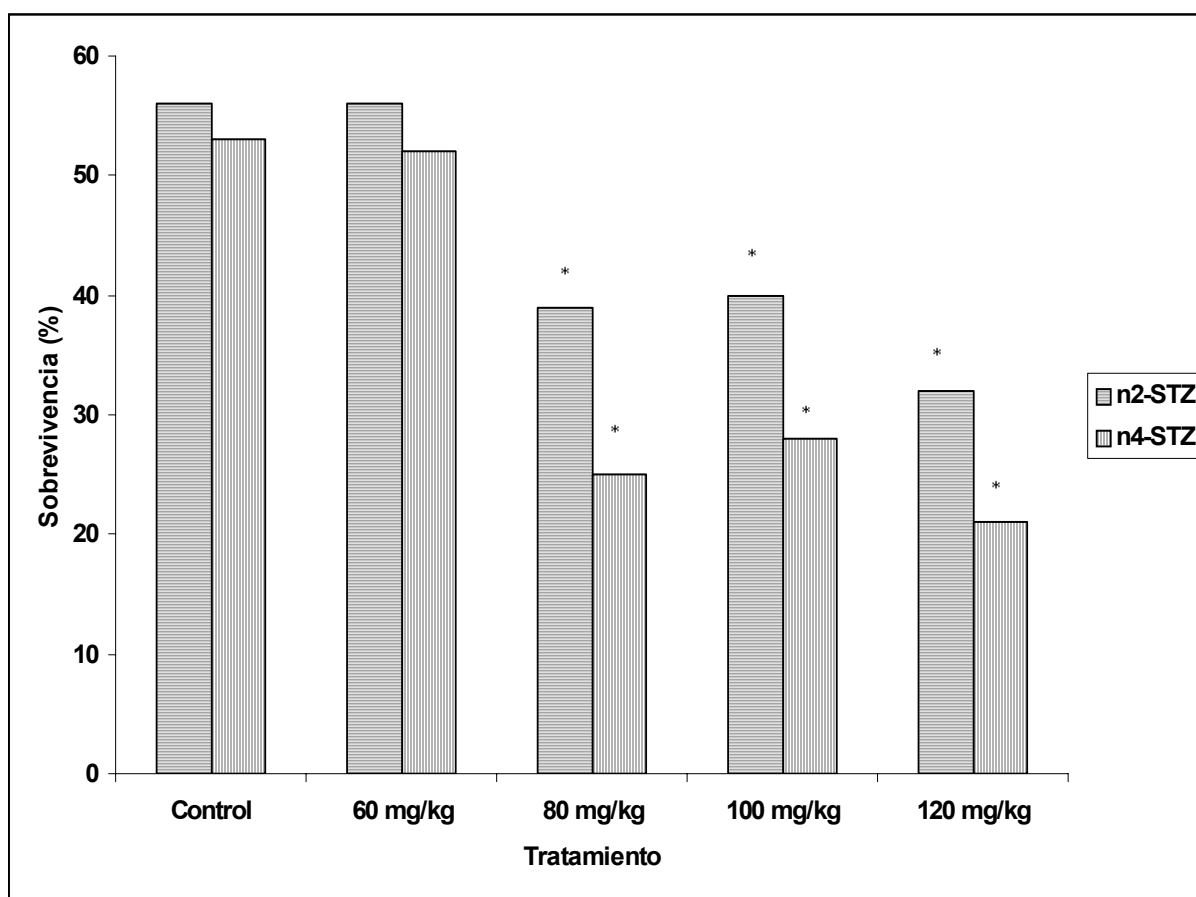


Fig. 8. Porcentaje de supervivencia. * $p < 0.05$ con respecto al control.

DISCUSIÓN

En 1974, Portha *et al* establecieron el modelo de DM2 en ratas Wistar mediante la administración intraperitoneal de una dosis única de 100 mg/kg de STZ el día del nacimiento (n0-STZ). El estado diabético se caracterizó por hiperglucemia, poliuria, polidipsia y glucosuria. A pesar de la efectividad mostrada por la STZ, existen diferencias en la susceptibilidad a desarrollar DM2 debido a las características y condiciones del animal, así como a la severidad de los síntomas que se pretenden obtener, motivos por los cuales se han desarrollado múltiples variables de dicho modelo.

La obesidad tiene una fuerte asociación con la DM2. A diferencia de la condición humana, en donde el 80% de los pacientes con DM2 presentan obesidad, en el modelo neonatal existe una ligera pérdida de peso. Portha *et al* (1974), reportan que como consecuencia de la administración de dosis altas de STZ (100 mg/kg o más) existe una disminución en el peso de las ratas, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las dosis de 60 y 80 mg/kg de STZ administradas al día 2 y 4 de vida también producen pérdida significativa de peso en las ratas adultas, resultado que coincide con lo reportado por Murali (2001), Ota *et al* (1994), Cuman *et al* (2001) y Zhang (2003). A pesar de que se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual se genera esta pérdida de peso, una explicación es que presumiblemente, las dosis altas de STZ producen una deficiencia de la hormona tiroidea y como consecuencia de esto, se produce un retardo del crecimiento, lo cual concuerda con lo reportado por Kuntz *et al* (2002), quien determinó los niveles de T₃ y T₄ en ratas con DM2 por inducción con STZ, encontrando diferencias significativas con respecto a ratas sanas; Kuntz afirma que estas alteraciones pueden influenciar el balance de la glucosa y del crecimiento, con lo que se complica la interpretación de los efectos diabetogénicos de la STZ. Las ventajas de desarrollar un modelo de DM2 no obeso es que se pueden observar las

complicaciones de la diabetes sin las complicaciones propias de la obesidad, ya que la obesidad por si sola, causa cierto grado de resistencia a la insulina (The Expert Committee, 2002).

La administración neonatal de STZ produce destrucción de aproximadamente el 80% de las células β pancreáticas. La formación de nuevas células β en el páncreas es el resultado de un doble proceso: la diferenciación de células precursoras, o neogenesis; y la proliferación de células β pre-existentes (Guz *et al*, 2001). La regeneración en ratas tratadas con STZ es aproximadamente del 50% y la mayor parte de este proceso es realizado principalmente por neogenesis activa durante los primeros 21 días de vida (Georgia y Bhushan, 2004).

Las ratas tratadas con STZ al momento del nacimiento presentan una elevación de la glucosa plasmática, una disminución de la insulina y un aumento del glucagon en los siguientes 3-5 días de vida. Durante las siguientes 3 semanas de vida, se produce un incremento en el número de las células β y esta situación tiende a normalizarse. A pesar de esta regeneración parcial, después de 6 semanas de vida los sujetos tratados con STZ presentan un estado hiperglucémico (Arulmozhi *et al*, 2004). En ratas tratadas con STZ se han observado trastornos en los estadios iniciales de los procesos de secreción, así como alteraciones a nivel de la membrana de las células β o en la permeabilidad del potasio, entre otros (Hugues *et al*, 2002).

En el presente estudio, no se evaluó la glucemia inmediatamente posterior al tratamiento con STZ, ni a lo largo de la vida de los individuos, pero pudimos observar que, al momento del sacrificio, la concentración de glucosa fue mayor por efecto de STZ, lo cual coincide con otros reportes: Murali y Ramesh (2001) reportan valores de 93.3 mg/dL para ratas controles y 135 mg/dL para ratas tratadas con STZ, y Kuntz *et al* (2002) indican un valor de 99 mg/dL para sus controles y 144 mg/dL para sus grupos experimentales.

Los niveles de glucosa sérica encontrados en los grupos tratados con STZ coinciden con los reportados en estudios previos que indican una hiperglucemia moderada: Zhang *et al* (2003) reportaron que una dosis de 50 mg/kg de STZ administrada al cuarto día de vida produce hiperglucemia moderada, resultado que contrasta con los datos obtenidos para la dosis de 60 mg/Kg n4-STZ, que aunque es una dosis ligeramente mas alta no produjo elevación significativa de la glucosa sérica, sin embargo, la misma dosis administrada al día 2 tuvo los efectos esperados; de igual forma, Straczkowski (2000), con una dosis de 45 mg/Kg administrada al día 2 de vida, obtuvo valores significativamente mas altos en la glucosa sanguínea, lo cual indica que la edad de administración de la STZ es factor crítico para el efecto del tratamiento.

En modelos *in vivo*, se ha demostrado que la exposición crónica a la hiperglucemia produce toxicidad en las células β , contribuyendo al defecto en la secreción de la insulina (Hugues *et al*, 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a los niveles de insulina presentan similitudes con numerosos reportes. Blondel *et al* (1989) reportan un decremento significativo en la insulina de ratas diabéticas de 10 semanas de edad mientras que Straczkowski (2000) observó hipoinsulinemia en ratas Wistar utilizando una dosis de 45 mg/kg de STZ; Portha *et al* (1974) también reportan una deficiencia en la secreción de insulina en ratas tratadas con STZ. Además, es importante señalar la evidente relación entre las dosis de STZ utilizadas y la disminución de insulina presente al momento del sacrificio, esto debido a que la administración de STZ a dosis altas, produce una severa hipoinsulinemia acompañada generalmente de cetosis (Arulmozhi *et al*, 2004).

Generalmente en la diabetes el metabolismo de los ácidos grasos libres se encuentra alterado. En condiciones normales los ácidos grasos provienen de dos vías: una es la de los quilomicrones resultantes de la digestión y absorción de los triglicéridos de los alimentos y la otra es la síntesis *de novo* de ácidos grasos (lipogenesis) en el hígado (Felig, 1981).

Antes de su oxidación final a CO₂, los ácidos grasos pueden recorrer varios caminos en la circulación, como ácidos grasos libres o ser esterificados. Tanto la lipólisis como la esterificación pueden llevarse a cabo en el mismo tejido en forma equilibrada y determinar así la proporción de liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo (Carley y Severson, 2005).

En este sistema, interviene la glucosa ya que es utilizada para formar ácidos grasos de cadena larga y también formar acilglicerol por medio de la formación previa de glicerol-3-fosfato. Así, cuando la cantidad de glucosa es grande, es oxidada o usada para la esterificación de ácidos grasos libres; por otro lado, cuando es escasa, el tejido adiposo la conserva para la esterificación y utiliza los ácidos grasos como fuente de energía (Carley y Severson, 2005).

En la diabetes descompensada, la lipogénesis está inhibida y el hígado produce cantidades considerables de cuerpos cetónicos (acetoacetato y β-hidroxibutirato) que pasan por difusión a la sangre. Cuando la cantidad de insulina es muy baja, se produce acumulación de cuerpos cetónicos por la movilización de ácidos grasos libres como única vía para obtención de energía y por la disminución del uso de cetonas por el músculo (Felig, 1981).

No obstante lo antes mencionado, Mansford y Opie (1978) determinaron que la hiperglucemia en ratas tratadas con STZ no produce cuerpos cetónicos ni elevación de ácidos grasos en el plasma. En el presente estudio, encontramos que a pesar de los bajos niveles de insulina en plasma, no existe un aumento significativo en los valores de β-hidroxibutirato, es decir, no hay presencia de cetosis, condición común en la DM1 pero infrecuente en la DM2, en donde la lenta evolución de la enfermedad y la presencia constante de insulina aunque sea en cantidades reducidas difícilmente permite esta situación que, generalmente ocurre con asociación a estrés o a otras enfermedades, como infecciones (Expert Committee, 2002). De igual forma, McNeil (1999) afirma que estudios realizados en corazones perfundidos de ratas tratadas

neonatalmente con STZ demuestran que el metabolismo de los ácidos grasos no se altera, aunque es frecuente encontrar ligeras elevaciones en sus niveles en plasma, pero estas no son significativas. Estos resultados contrastan con lo encontrado por Hemmings y Spafford (2000), quienes reportan un incremento en los niveles de β -hidroxibutirato como posible consecuencia de una hiperglucagonemia, al igual que Portha *et al* (1974).

Estos autores también reportan una elevación de los niveles de triglicéridos y colesterol como parte fundamental del estado diabético en el animal. En el presente estudio, los valores de los triglicéridos se incrementaron en todas las dosis experimentales del grupo n2-STZ, en contraste con n4-STZ, en donde únicamente las dosis de 80 y 100 mg/kg presentaron diferencias significativas. Straczkowski *et al* (2000) reportan un incremento en la concentración de triglicéridos en el músculo e hígado después de la administración de STZ, aunque el mecanismo por el cual sucede esto aun no está claro, una posible explicación es que el incremento de la disponibilidad de ácidos grasos libres incrementa la síntesis de triglicéridos y una dieta alta en grasas contribuye. Perseghin *et al* (1997), reportan el incremento de ácidos grasos libres en relación inversa a la sensibilidad a la insulina, en crías no obesas, no diabéticas, hijas de progenitores diabéticos. Apoyando lo anterior, Ota *et al* (1994) determinaron que una dosis baja de STZ (40 mg/kg) no produce elevación de los niveles de triglicéridos, para lo cual es necesario combinar el uso de dosis bajas de STZ con una dieta rica en grasas.

La hiperlipidemia, especialmente el incremento de triglicéridos y colesterol, es uno de los principales factores para inducir resistencia a la insulina (Roche, 1998). La oxidación de los ácidos grasos inhibe tanto la oxidación de la glucosa como su habilidad para entrar a las células, la hiperglucemia prolongada induce daño en la acción de la insulina y como consecuencia, se genera la resistencia a la insulina (Taylor *et al*, 1994). Zhang *et al* (2003) reportan incremento en los niveles de colesterol en ratas tratadas con dosis de STZ de 50 mg/Kg resultados que contrastan con lo obtenido en este estudio, en donde

únicamente las dosis de 100 y 120 mg/Kg del modelo n2-STZ y la dosis de 100 mg/Kg de n4-STZ causaron aumento del colesterol sérico.

Los niveles altos de glucosa sanguínea ponen en riesgo la vida de los animales. La relación entre administración de STZ y tasas de supervivencia y mortalidad se ha comprobado y reportado ampliamente aunque existe una variabilidad importante debido a las condiciones propias del bioterio y de la cepa utilizada (Arellin, 1990). Gajdosik *et al* (2005) reportan como dosis letal 170 mg/kg de STZ en ratas Wistar administradas al día 7 de vida. Por otra parte, Hemmings y Spafford (2000) reportaron que dosis de 40, 60, 80 y 100 mg/kg de STZ administradas al día 6 de vida ocasionan un 100% de mortalidad. Maeda *et al* (2004) reportan una tasa de mortalidad del 60% con una dosis de 65 mg/kg de STZ administrada al 5to día de vida.

La tasa de supervivencia obtenida en este trabajo es similar a otras reportadas y coincide con lo reportado por Portha *et al* (1974): a mayor dosis de STZ y a mayor edad de administración, menor tasa de supervivencia; en el presente estudio la misma dosis administrada a tiempos diferentes produce distintas tasas de supervivencia, siendo mejor el modelo n2-STZ. El hecho de que las ratas controles fallecieran poco a poco en el transcurso de las 10 semanas de vida, mientras que casi la totalidad de las ratas tratadas con STZ murieran en las 2 semanas posteriores al tratamiento, indica que la administración de STZ tiene un efecto directo sobre la mortalidad. Esta situación ha sido reportada por otros autores, como Garofano *et al* (2000), quienes sorprendentemente reportan una tasa de mortalidad muy semejante entre las ratas tratadas con STZ y las ratas control, con la diferencia de que las ratas tratadas con STZ fallecen durante la primera semana de vida. Esta situación de muerte temprana de las crías puede ser atribuible a la severidad de la diabetes inducida, que resulta incompatible con la vida.

Al igual que en los humanos, en el modelo n-STZ es común encontrar complicaciones propias de la diabetes (neuropatías, cardiopatías, nefropatías,

etc.). A pesar de que en este estudio no se evaluaron las complicaciones generadas a largo plazo por la administración neonatal de STZ, es importante señalarlas como una ventaja más del modelo. Existen numerosos reportes que confirman la presencia de complicaciones y se cree que la hiperglucemia e hiperlipidemia son las causas principales de éstas. Las complicaciones más frecuentes son las renales y cardíacas. Ocho meses después de la administración de la STZ a ratas neonatos, se ha encontrado deterioro de la función contráctil y 12-14 meses después, miocardiopatías, caracterizadas por daño cardíaco y cambios en la presión sistólica. Los daños renales pueden observarse a los 6-8 meses con albuminuria, proteinuria y engrosamiento de la membrana basal glomerular (Yagihashi, 1994).

Recientemente, se han reportado nuevos modelos de DM2 en distintas cepas, utilizando ratas adultas y administrando nicotinamida para contrarrestar los efectos citotóxicos de la STZ. Este modelo produce síntomas comparables con las características observadas en pacientes con DM2. Este modelo ha sido validado en cerdos miniatura, sin embargo, su mayor desventaja es la necesidad de determinar la dosis óptima de nicotinamida para causar una hiperglucemia estable. También se ha propuesto la combinación de dosis bajas de STZ (15 mg/Kg) y una dieta alta en grasas, en ratas adultas obteniendo sintomatología muy semejante (Arulmozhi et al, 2004).

Los modelos animales son típicamente modelos de diabetes aguda no tratada, originan complicaciones en pocos meses, a diferencia de los pacientes con DM2 que desarrollan complicaciones gradualmente y generalmente en un proceso que dura años; su ayuda es limitada por el hecho de que los roedores son especies de vida corta y en la DM2 los procesos se dan de forma lenta.

Aunque el modelo n-STZ es el modelo mas ampliamente usado para el estudio de la DM2 y sus complicaciones, tiene algunas desventajas entre las que se encuentran la alta mortalidad y la perdida de peso de las ratas tratadas; sin embargo, al evaluar los beneficios podemos entender el porque su uso es tan

común. Al modificar la dosis y el día de administración de la STZ, el modelo n-STZ exhibe varios estados de la DM2: hiperglucemia moderada o severa, intolerancia a la glucosa, disminución de los niveles de insulina en plasma, disminución de la insulina pancreática y la secreción de insulina de las células β es muy semejante a la observada en pacientes con DM2. Es claro que ningún modelo animal representa completamente las características de los síndromes en humanos y esto es aplicable a la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, el modelo de n-STZ tiene muchas ventajas sobre otros modelos y quizá las mas importantes sean el bajo costo y la relativa facilidad para obtenerlo.

CONCLUSIONES

- 1. La administración de STZ a todas las dosis utilizadas en neonatos de 2 y 4 días de vida provoca hiperglucemia, hipoinsulinemia y pérdida de peso.**
- 2. En las dosis de 60 y 80 mg/kg de STZ, no se observaron todos los efectos deseados sin importar el día de su administración.**
- 3. La administración de STZ en dosis de 100 y 120 mg/kg al día 2 y 4 de vida, produce efectos severos sobre las ratas y disminuye considerablemente la tasa de supervivencia.**
- 4. A pesar de requerir mayor destreza, el mejor modelo es la administración de 100 mg/kg de STZ al día 2 de vida, ya que produce la sintomatología deseada: hiperglucemia, hipoinsulinemia, hipertriglicemia, hipercolesteremia sin cetosis y una mejor tasa de supervivencia que la dosis más elevada.**

REFERENCIAS

Arellin R.G. 1990. Programa integral de producción, adquisición y mantenimiento de animales de laboratorio destinados a la investigación científica. Tesis de licenciatura. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Arulmozhi, DK., A. Veeranjanyulu y Bodhankar SL. 2004. Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: a glance. *Indian J. Pharmacol.* **36** (4) 217-221.

Blondel, O., D. Bailbe and Portha B. 1989. Relation of insulin deficiency to impaired insulin action in NIDDM rats given streptozotocin as neonates. *Diabetes*: **38**: 610-617.

Boletín de Salubridad 591, 2004. Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática. <http://www.inegi.gob.mx>.

Carley, A. y Severson D. 2005. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts. *Biochimica Bio.* 1734: 112-126

Cuman, R., A. Bersani-Amado and Fortes B. 2001. Influence of type 2 diabetes on the inflammatory response in rats. *Inflamm. Res.* **50**: 460-465.

Debra, H-J. 1996. Management of Diabetes Mellitus. Mosby. 2da. New York, EUA. pp 893.

Escobedo-de la Peña, J. y Rico-Verdín B. 1996. Incidencia y letalidad de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus en México. *Salud Publica Mex.*, **38**: 236-242.

Felig P. 1981. The endocrine pancreas: Diabetes mellitus. En *Endocrinology and Metabolism*. New York. Ed. McGraw-Hill. 761 pp

Garofano, A., P. Czernichow y Breant B. 2000. Impaired β -cell regeneration in perinatally malnourished rats: a study with STZ. *J. Faseb*: **14**: 2611-2617.

Georgia S. y Bhushan A. 2004. β cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal β cell mass. *J. Clin Inv*: **114** (7): 964-968.

Giroix M.H., A. Bakkali, A. Sener, B. Portha y Malaisse W. 2002. Metabolism of D-[3-³H]glucose, D[5-³H]glucose, D-[1-¹⁴C]glucose and D-[6-¹⁴C]glucose in pancreatic islets in an animal model of type-2 diabetes. *Int J Mol Med*, **9**: 381-384.

Gajdosik, A., Kyselova Z., Garcia S. y Stefek M. 2005. Temporal relationship between lens protein oxidation and cataract development in streptozotocin-induced diabetic rats. *Physiol Res*. **54**(1):49-56.

Guz, Y., Nasir I. y Teitelan G. 2001. Regeneration of pancreatic β cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology*: **142**: 4956-4968.

Hemmings, J. y Spafford D. 2000. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **32**: 905-919.

Hugues, B, J. Rodríguez, J. Rodríguez-González y Marrero M. 2002. Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Cub Endocrinol*: **13** (2): 160-168.

Janssen, U., A. Phillips y Floedge J. 1999. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes. *J. Nephrol*: **12** (3): 159-172.

Kientsch-Engel RI y Siess EA. 1981. D-(-)-3-hydroxybutyrate and acetoacetate. En: Bergmeyer, HU (editor). *Methods of enzymatic analysis*. 3a Ed. Vol. 8 VCH Publishers. Weinheim, FR Germany.

Kuntz, E; M. Pinget y Damge Ch. 2002. Effects of Cholecystokinin octapeptide on exocrine pancreas in a new rat model of type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol*, **448**: 253-261.

Kuri M, C. Vargas, H. Zarate y Juárez V. 2001. *La diabetes en México*. ed. ID. Prensa. Mexico. 237 pp.

Lee, J-J; H-Y. Yi; J-W Yang; J-S Shin; J-H Kwon y Kim C-W. 2003. Characterization of Streptozotocin-induced Diabetic Rats and Pharmacodynamics of Insulin Formulations. *Biosci, Biotechnol. Biochem*: **67** (11): 2396-24001.

Maeda, C., B. Shaan, P. Dall, E. Ferlin, T. Fernandez y H. Schimdt. 2004. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in STZ-induced diabetic in rats. *Braz J Med Biol Res*: **37** (12) 1895-1902.

Mansford, K. y Opie L. 1978. Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or alloxan. *Lancet*: 670-671

Mayer, B. 1998. Diabetes Mellitus. Ed. W.B. Saunders Company. 4ta. EUA. Pp 442.

McNeil H. J. 1999. Experimental Models of Diabetes. CRC Press. Boca Ratón Florida.

Méndez, J.D. y Ramos H.G. 1994. Animal models in diabetes research. *Arch. Med. Res.* **25**: 367-375.

Murali, B. and Ramesh K. 2001. Improvement insulin sensitivity by Losartan in non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) rats. *Pharmacological Research*: **44** (5): 385-389.

Mordes, P. and Rossini A. 1981. Animal models of diabetes. *Am. J. Med*: **70**: 353-360.

Ota, H. K. Utsunomiya, H. Kurata, N. Tajima y Isogai Y. 1994. The effect of hyperlipidemia on diabetic nephropathy of streptozotocin-diabetic rats. *E Science*: **1**: 465-469.

Perlemuter, L. y L'Hortet C. 1998. Manual de diabetología. Ed. Masson. Barcelona.

Perseghin, G. P., Scifo, F. De Cobelli, E. Pagliato, A. Battezzati, C. Arcelloni, A. Vanzulli, G. Testolin, G. Pozza y Luzi L. 1997. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans. *Diabetes*: **48**: 1600-1606.

Peterson, R. y Shaw W. 1990. New rat models of obesity and type II diabetes. *ILAR Journal*: **32** (3): 1-6.

Portha, B., Levacher, C., Picon, L. y Rosselin G. 1974. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes*: **23**: 889-895.

Rascón-Pacheco, R., Rivera-Iceda B., Santillana-Macedo, M. y Romero Tellez M. 2000. Mortalidad en México. *Salud Pública*. 41: 376-381.

Roche, H. 1998. Dietary carbohydrates and triacylglycerol metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* **58**: 201-207.

Soloni F. G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 1971;17:529-534.

Straczkowski, M., I. Kowalska, J. Gorski y Kinalska I. 2000. The effect of a single bout of exhaustive exercise on muscle carbohydrate and lipid metabolism in rat model of type 2 diabetes mellitus. *Acta diabetol* : **37**: 47-53.

Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* **50**: 536-546.

Szkudelski, T. y Szkudelska K. 2002. Streptozotocin Induces Lipolysis in Rat Adipocytes *In Vitro*. *Physiol. Res.* **51**: 255-259.

Taylor, I., D. Accili y Imai Y. 1994. Insulin Resistance o Insulin Deficiency: Which Is the Primary Cause of DMT2?. *Diabetes*: **43**:735-740.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*: 20 (7): 1183-1197.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2002. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*: 25: s5-s20.

Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Am. Clin. Biochem.* 6: 24-27.

Verley, H. 1967. Blood sugar determination and lipids. En: Practical Clinical Biochemistry. Heinemann Medical Books, LTD. New York, UA. pp. 309-310.

Yagihashi, S., Sigimoto, K. y Wada, R. 1994. Different neuropathic patterns between type I and type II diabetic animal models. *E. Science* : 401-405.

Yamamoto, H, Y. Uchigata y H. Okamoto. 1981. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* **294**: 284-286.

Yang, H. y Wright R. 2002. Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin *in vivo*. *Endocrinology*: **143** (7): 2491-2495.

Zhang F, Ch. Ye , G. Li, W. Ding, W. Zhou, H. Zhu, G. Chen, T. Luo, M. Guang, Y. Liu, D. Zang, S. Zheng, J. Yang, Y. Gu, X. Xie y Luo M. 2003. The Rat Model of Type Diabetes Mellitus and Its Glycometabolism Characters. *Exp Anim.* **52** (5), 401-407.

Zimmet P. 1994. The genetics, prevalence and incidence of diabetes mellitus. En: Chronic complication in diabetes, A.F. Sima (editor). 3-27. Ed. Harwood Academic Publishers. Amsterdam.