



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ADMINISTRACIÓN DE SACAROSA A RATAS DIABÉTICAS
(NA-STZ) COMO MODELO ANIMAL DE RESISTENCIA A INSULINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**P R E S E N T A:
NAYELI LAUREANO CRUZ**



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE:** Profesora: Inés Fuentes Noriega
- VOCAL:** Profesora: Natividad García Escamilla
- SECRETARIO:** Profesor: Adolfo Andrade Cetto
- 1er. SUPLENTE:** Profesora: Marlene Osiris Carreón Aguilar
- 2° SUPLENTE:** Profesor: Héctor Javier Pérez Cano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Biología Celular, Edificio "A", Laboratorio de Etnofarmacología, "Facultad de Ciencias", UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. ADOLFO ANDRADE CETTO

SUSTENTANTE:

NAYELI LAUREANO CRUZ



AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Adolfo Andrade Cetto en el laboratorio de etnofarmacología, departamento de Biología Celular, Edificio A, Facultad de Ciencias, Ciudad Universitaria; el proyecto fue apoyado parcialmente por DGAPA PAPIIT (proyectos IN228510 e IN214413) y CONACYT (CB 079910).

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por las oportunidades para estudiar y crecer personal y profesionalmente. A la Facultad de Química por permitirme ser parte de ella y explorar allí la vida con una nueva visión.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto por abrirme las puertas de su laboratorio y conceder integrarme a su equipo de trabajo; por su apoyo, su confianza, sus enseñanzas brindadas y sobre todo por su amistad a lo largo de este y otros proyectos.

A mis sinodales:

La Dra. Inés Fuentes Noriega, por su apoyo en la revisión de mi trabajo y su enorme amabilidad.

La Q.F.B. Natividad García Escamilla, por su gran interés, sus valiosas y acertadas observaciones en este trabajo, además de su cariño.

Al Dr. Héctor Javier Pérez Cano por su gran disponibilidad e interés, por sus sugerencias y aportaciones, así como su enorme cariño y confianza.

También agradezco a la Bióloga Isabel Mejía Luna, por su valiosa ayuda en la revisión de mi trabajo y el apoyo académico/personal, pero sobre todo por la sincera amistad brindada durante todo este tiempo. Gracias Isa!

Al amor de mi vida el Q.F.B. (próximo M. en C.), CARLOS CHÁVEZ CASTAÑEDA por ser la persona que me enamora cada día, por compartir varios sueños y realizar algunos de ellos hasta el momento, por ser el amigo, la pareja y compartir la felicidad de nuestro pequeño "Carlitos Eduardo Chávez Laureano", gracias por cada una de las observaciones, sugerencias y sobre todo por tu *paciencia*. Por ser tú con quien comparto la vida profesional y personal. No habrá mayor dicha que estar juntos toda nuestra vida y así, culminar juntos nuestros logros.

A mi pequeño por dejarme crecer día a día como madre y como persona. Por darme esta nueva experiencia de amor y darme la felicidad con tan solo una sonrisa y un beso... Los amo a los dos.

A la mujer que amo y adoro: Josefina Cruz Cruz, pues cada triunfo lo compartí y comparto con ella, por ser mi motivación e inspiración al ser una guerrera, una gran madre y una fiel amiga. Mi admiración a ti y a mi abuelita Daría Isabel, los dos ejemplos de mi vida. "José de verdad te digo; mejor mamá no me pudo tocar... mujer bonita".



AGRADECIMIENTOS:

A mi padre: José Silvestre Laureano Reyes, gracias por el enorme apoyo durante todos estos años sin el cual no hubiera llegado hasta aquí, por permitirme agradecerles de esta forma y por llenarlos de pequeños logros. Sigo insistiendo que no alcanza la vida para agradecerles y retribuirles todo lo que nos han dado.

A mis hermanas Elvia y Alma por compartir la vida con ustedes y todos los buenos recuerdos, por permitirme seguirlos conociendo, pero sobre todo por estar viviendo con ustedes esta nueva aventura que denomino "la nueva etapa" de nuestras vidas. A ti pequeña, muchas gracias por tu apoyo y amor recibidos durante mi embarazo, sabes que te deseo lo mejor y que en mi tienes una amiga eternamente. Leo y Elvia les deseo muchas bendiciones junto al peque, disfrútenlo cada día. Y sin olvidar al hombre de la casa, mi hermano Uriel a quien admiro por su personalidad y por sus cuidados brindados durante todos estos años, sé que no fue fácil pero siempre fue así. Deseo de corazón que siempre te vaya bien pues "eres un gran hombre".

A mis suegros: Raúl Chávez Laguna y Hortencia Castañeda Calderón, por ser personas muy lindas y porque me han incluido en su familia no como una nuera sino como una hija más, gracias por estar pendiente de los 3 y por enseñarme, guiarme, apoyarme y brindarme su amor. A Lucila (¡Comadre!) por la amistad y la alegría brindada, gracias por adquirir la responsabilidad de cuidar y proteger nuestro tesoro más preciado, además del enorme amor a "titi". Y a Raúl por su apoyo y ayuda que nos ha brindado en este corto tiempo a pesar de la distancia.

Al Sr. Ríos por ser un gran amigo y una gran persona a quien agradezco mucho, por brindarme su apoyo y confianza al igual que Mauricio por tu amistad. Gracias por siempre creer en mí.

A mis amigos y compañeros: Zitlalli, Ale, Alejandro, Jesús, Sr. Mario, Dr. Andrés, Marel, Pao, Paty, Luisa y en especial a los Biólogos Jaz, Anita y Crhis por apoyarme cuando necesite de su ayuda y su amistad, lo más valioso. Gracias por compartir sus alegrías así como sus ideas locas y "descabelladas".

A la Q.F.B. Ma. de Lourdes Flores Téllez por su ayuda y guía en mis primeros pasos en esta hermosa Facultad. A la Q.F.B. Norma A. Castellanos Chávez y todo el departamento de titulación por su amabilidad proporcionada; la atención y la forma lo cambian todo.

Agradezco a todas aquellas personas que de distinta forma me han ayudado a crecer. Gracias por estar en mi vida y formar parte de ella. Y hacer de este viaje no solo un aprendizaje sino una aventura.

"La vida está compuesta de insignificancias;
el año de instantes y las montañas de granos de arena.
Por lo tanto no subestimes nada, por pequeño que te parezca."

Lin Yutang



ÍNDICE

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. ANTECEDENTES.....	7
3.1. HISTORIA DE LA DIABETES MELLITUS (DM DM).....	7
3.2. DEFINICIÓN.....	7
3.3. EPIDEMIOLOGIA EN MÉXICO Y EL MUNDO.....	9
3.4. CLASIFICACIÓN DE LA DM.....	10
3.5. CRITERIOS DE DIAGNOSTICO DE LA DM EN HUMANOS.....	15
3.6. CRITERIOS DE DIAGNOSTICO DE LA DM EN RATAS.....	15
4. PRINCIPIOS BÁSICOS DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.....	16
5. MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO EN CONDICIONES NORMALES.....	18
5.1. LAS CÉLULAS BETA Y LA SECRECIÓN DE INSULINA.....	18
5.2. PRIMERA FASE DE SECRECIÓN DE INSULINA: LA VÍA DE DISPARO.....	19
5.3. SEGUNDA FASE DE SECRECIÓN DE INSULINA: LA VÍA DE AMPLIFICACIÓN.....	20
6. MECANISMOS MOLECULARES DE LA INSULINA.....	22
6.1. RECEPTOR DE INSULINA.....	23
6.2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA MÁS IMPORTANTES.....	23
7. METABOLISMO EN LA DM2.....	26
7.1. RESISTENCIA A LA INSULINA.....	27
8. PRUEBAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA DM.....	31
8.1. HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (HbA1c).....	32
8.2. PERFIL LIPIDICO: COLESTEROL TOTAL, HDL Y TRIGLICERIDOS.....	33
9. MODELOS ANIMALES.....	35
9.1. TIPOS DE MODELOS ANIMALES DE DIABETES.....	35
9.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2 ESPONTANEA.....	35
9.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2 INDUCIDA.....	36
9.3.1. MODELOS DE DM2 INDUCIDA CON DIETA (SACAROSA).....	36
9.3.2. MODELOS DE DM2 INDUCIDA QUÍMICA.....	38
9.3.2.1. ESTREPTOZOTOCINA (STZ).....	38
9.3.2.1.2. HISTORIA DE LA ESTREPTOZOTOCINA.....	39
9.3.2.1.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA.....	39
9.3.2.1.4. USOS DE LA ESTREPTOZOTOCINA.....	40



9.3.2.2 MODELO DE DM2 INDUCIDA NA-STZ (NICOTINAMIDA-ESTREPTOZOTOCINA).....	41
9.3.2.2.1 NICOTINAMIDA.....	42
9.3.2.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA NICOTINAMIDA.....	42
9.3.2.2.3 USOS DE LA NICOTINAMIDA.....	42
9.4 DIABETES MELLITUS TIPO 2 INDUCIDA QUIRÚRGICAMENTE.....	42
9.5 DIABETES MELLITUS TIPO 2 POR MANIPULACIÓN GENÉTICA.....	42
10. JUSTIFICACIÓN.....	43
11. OBJETIVOS.....	44
11.1 OBJETIVO GENERAL.....	44
11.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	44
11.3 HIPOTESIS.....	44
12. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
12.1 MATERIAL.....	45
12.1.1 REACTIVOS.....	45
12.1.2 EQUIPO.....	46
12.1.3 MATERIAL DIVERSO.....	47
12.3 METODOLOGÍA.....	48
12.3.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	48
12.3.2 INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL CON AGENTES QUÍMICOS (STZ-NA).....	49
12.3.3 INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL CON DIETA RICA EN SACAROSA.....	50
12.3.4 CURVAS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA “TTOG” (ORAL GLUCOSETOLERANCE TESTS).....	50
12.3.5 TÉCNICA DE ELISA ((ENZYMELINKED IMMUNO SORBENT ASSAY).....	51
12.3.6 HOMA-IR (HOMEOSTASIS MODEL ASSESSMENT FOR INSULIN RESISTANCE)....	52
12.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
12.5 DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	54
13. RESULTADOS.....	57
14. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	67
15. CONCLUSIONES.....	69
16. BIBLIOGRAFÍA.....	70
17. ANEXOS.....	78



Símbolos y abreviaturas

El significado de los símbolos y abreviaturas utilizadas en presente trabajo es el siguiente:

DNA	Ácido Desoxiribonucleico	NGF	Factor de crecimiento neuronal
cal	Caloría	OMS	Organización Mundial de la Salud
DM	Diabetes Mellitus	%	Por Ciento
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	PCR	Proteína C reactiva
g	Gramo	PDH	Piruvato deshidrogenasa
G6P	Glucosa-6-fosfato	RI	Resistencia a la insulina
GCK	Glucocinasa	SM	Síndrome metabólico
HK	Hexocinasa	Tg	Triglicéridos
HbA1c	Hemoglobina glucosilada	TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
ITG	Intolerancia a la glucosa	P.A.	Presión Arterial
IDF	International Diabetes Foundation	OGTT	Oral Glucose Tolerance Tests
IL	Interleucina	SSA	Secretaria de Salud
kg	Kilogramo	NA	Nicotinamida
LDL	Lipoproteínas de baja densidad	STZ	Estreptozotocina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	Glu	Glucosa
HLA	Human Leucocyte Antigen	ADA	American Diabetes Association
MODY	Maturity Onset Diabetes Of The Young	ECV	Enfermedades Cardiovasculares
<	Menor que	SSA	Secretaria de Salud
>	Mayor que	HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment.
<	Menor o Igual que	ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
>	Mayor o Igual que	GLUT	Transportador de glucosa
mg	Microgramo	IRS	Sustrato de receptor de insulina
μ g/dL	Microgramo por decilitro	Col	colesterol
mmol/l	Milimoles por Litro		
min	Minutos		
NOM	Norma Oficial Mexicana		
UI	Unidades de Insulina		



RESUMEN

Los biomodelos experimentales son herramientas esenciales para comprender la patogénesis y complicaciones de una enfermedad, asimismo son útiles para la evaluación de diferentes agentes terapéuticos. El objetivo de este trabajo fue establecer un modelo animal para el estudio de la diabetes crónica que presente las características de resistencia y alteración a la insulina e hiperglucemia.

Se evaluó el efecto que causa la administración de sacarosa en ratas albinas Wistar normoglucémicas y diabéticas inducidas con nicotinamida (NA) y estreptozotocina (STZ) y sobre los niveles de glucemia circulante. Para ello se monitorearon mensualmente los parámetros bioquímicos de: glucosa (Glu), triglicéridos (Tg), colesterol (Col), lipoproteína de alta densidad (HDL), hemoglobina glucosilada (HbA1c) y el peso de los animales. Además, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa (OGTT) y se cuantificaron los niveles de insulina (ELISA) al terminar el periodo experimental incluyendo el cálculo del índice Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR). Los resultados obtenidos muestran que las ratas administradas con sacarosa aparentan no tener cambios significativos en los parámetros: Peso, Glu, Tg, HDL, HbA1c, con respecto a las ratas control; aunque la respuesta de los niveles de insulina muestra un incremento. Por su parte el modelo inducido “NA-STZ” mostró una concentración elevada de glucosa así como de HbA1c y con anormalidades en las pruebas OGTT y la respuesta a la insulina. Los niveles de Tg en este grupo aumentaron significativamente con respecto al control acompañado de una disminución de HDL. Las ratas “NA-STZ-SUC” mostraron una afección generalizada más aguda que se vio reflejada en una alta concentración de glucosa, HbA1c, Tg, HDL y una disminución de peso. En cuanto a las pruebas de OGTT se ven igualmente afectadas que las ratas “NA-STZ” con un cambio en la respuesta de insulina, equivalente a la acumulación de los grupos sacarosa y NA-STZ en forma aditiva.

De los resultados obtenidos, se demuestra que las ratas administradas con la dieta en sacarosa presentan cambios significativos solo en los niveles de insulina con respecto al control.



2.0 INTRODUCCIÓN:

Dentro de las enfermedades crónico-degenerativas de carácter heterogéneo, actualmente la diabetes constituye uno de los problemas de salud de mayor trascendencia, debido a que demanda mayor atención médica y erogación económica.

La epidemia de la diabetes mellitus (DM) es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial. Se calcula que en el mundo existen más de 220 millones de personas con diabetes y se espera que esta cifra se duplique en los próximos 10 años (OMS, 2011). En México la DM ocupa el primer lugar en número de defunciones por año y alrededor del 8.2% de la población (SSA, 2010) entre 20 y 69 años padece diabetes y, cerca del 30% de los individuos afectados, desconoce que la tiene. Esto significa que en nuestro país existen más de 8 millones de personas enfermas (ENSANUT, 2006), de las cuales poco más de un millón no han sido diagnosticadas. Hasta el momento se han descrito 4 variantes de la enfermedad (ADA, 2010), pero la gran mayoría de los casos presentan DM tipo 2 cuyo rasgo principal es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, debido a defectos en su síntesis por modificaciones de su receptor, alteraciones en los mecanismos intracelulares de acción a esta hormona o porque se produce en bajas concentraciones. El resultado es que se genera un exceso de glucosa en la sangre, lo que ocasiona daños en los vasos sanguíneos y a ciertos órganos.

El avance en la prevención y tratamiento de la misma dependerá en gran parte de la comprensión de estos mecanismos y para ello es imprescindible seguir utilizando modelos animales debido a que es éticamente inaceptable la experimentación en humanos. Aun considerando que el trabajo con animales de experimentación debe cumplir también con las Normas de Bioética requeridas para su manipulación y cuidado como lo establece la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, el uso de modelos animales soslaya algunos de estos problemas, pero, obviamente, la extrapolación de resultados de animales al hombre (y viceversa) conlleva cierto riesgo. No obstante, las ventajas inherentes a la experimentación animal han permitido obtener gran cantidad de información valiosa acerca de la patogénesis de la enfermedad. En 1922, Banting, Best, Collip y colaboradores publicaron su histórico artículo describiendo “la curación de la diabetes mellitus en un perro” (M. Casado, 2007). A partir de entonces se utilizaron ampliamente tanto perros como animales de otras especies para analizar diversos



parámetros biológicos y fisiológicos de la diabetes. Actualmente existe una gran cantidad de modelos animales algunos de ellos son conocidos como espontáneos y otros como inducidos según su mecanismo para producir diabetes, y con ellos dos categorías dentro de los mismos: los modelos análogos que intentan imitar la enfermedad humana y los modelos intrínsecos con los que se pretenden contestar preguntas específicas de la misma enfermedad (Arias J. y Balibrea J., 2007). La decisión acerca del modelo a usar para un experimento en particular es a menudo multifactorial. De modo ideal, los experimentos deberían ser llevados a cabo en varios modelos diferentes, teniendo en cuenta que ninguno de ellos refleja por completo la complejidad de la DM2 humana y que se deben extremar las precauciones a la hora de hacer cualquier tipo de extrapolación a la clínica.

En el presente trabajo se emplean tres modelos experimentales: a) inducción química (Massiello P., 1998) b) modificación de la dieta consistente en ingesta de sacarosa en la bebida de agua (al 20% p/v) y c) una combinación de ambos. El primero de ellos consiste en la destrucción de los islotes pancreáticos con una dosis única de Estreptozotocina (STZ) (Massiello P., 1998, Ress D, et al., 2005, Srinivasan K, et al, 2007, Takada J, 2007) y la aplicación en conjunto con Nicotinamida (NA). La STZ produce insulinismo pancreático por la destrucción progresiva de las células β del páncreas y la NA se emplea para proteger parcialmente a las células β del efecto citotóxico de la STZ, logrando un síndrome similar al de la diabetes tipo 2 en los animales de experimentación (Massiello P., 1998). El segundo modelo se debe a la problemática que ha surgido, sobre el consumo de azúcar en México y el mundo, que es algo que si bien había pasado desapercibido durante muchos años, ahora se va tomando dimensión del gran problema que causa en las poblaciones este “pequeño hecho”. En México el problema de salud es cosa muy seria ya que los niveles de sobrepeso, diabetes e hipertensión han aumentado enormemente en las dos últimas décadas debido a una gran cantidad de factores entre los que se incluyen el aumento del consumo de azúcar refinada en cualquiera de sus formas por lo cual se planteó utilizar en el presente trabajo una dieta rica en azúcar (sacarosa al 20%). Ambos modelos fueron establecidos debido a las ventajas que proporcionó ; bajo costo, tiempo en generar la patología, fácil de establecer, reproducibilidad, bajo número de mortalidad de los animales, daño a células β (no a α y δ) y los valores de referencia de glucosa en plasma semejantes a los humanos (90-115mg/dL). Con respecto a la dieta en sacarosa se debe a su consumo



habitual que se tiene en la población al ser el azúcar más común y al tener un elevado consumo provoca una carga glicémica elevada (González Gil, 2007)

3.0 ANTECEDENTES

3.0 Diabetes Mellitus.

3.1 Historia de la diabetes

En un papiro egipcio que data aproximadamente del año 1500 A.C. se refiere por primera vez una enfermedad con las características de la diabetes. El término “diabetes”, que significa “sifón” en griego, lo utiliza por primera vez Aretaeus de Capadocia en el siglo II A.C. quien describe una condición caracterizada por un aumento en la producción de orina (poliuria). Durante el mismo periodo, Galeno habló de dos casos de una rara enfermedad caracterizada por poliuria y por mucha sed (polidipsia). En los siglos V y VI dos notables médicos en la India, Susruta y Sharuka, describieron por primera vez la asociación de poliuria con la presencia de una sustancia de sabor dulce en la orina y distinguieron dos tipos de pacientes: delgados y obesos (Fernández C., 2006).

Para el siglo XVII, Thomas Willis realizó varias observaciones acerca de la enfermedad, que se mantienen vigentes hoy en día. Él escribió que “la diabetes fue una enfermedad rara en los tiempos clásicos (Galeno), pero en nuestros tiempos disipados y de ingestión desmesurada de vinos destilados, nos encontramos frecuentemente con ejemplos esta enfermedad, se podría decir casi a diario. Resulta difícil establecer proposiciones para su cura debido a que su causa se encuentra profundamente escondida y tiene un origen tan profundo y remoto” (Willis, T., 1990). Desde entonces, numerosos esfuerzos se han hecho para esclarecer las causas profundas de esta frecuente enfermedad.

3.2 Definición.

El termino diabetes procede del latín *diabētes*, y este del griego διαβήτης que deriva del verbo diabaíno (διαβαίνειν) “caminar, atravesar”, formado a partir del prefijo δια (día= a través), βαίνειν (bainein=ir, andar o pasar) y της (tes=agente), es decir “lo que va a través”. Que se refiere a la denominación de diversos trastornos caracterizados por producción excesiva de orina, es decir que todo líquido que tomaba el paciente no se detenía en su cuerpo y pasaba a través de él.

La palabra mellitus (del griego *mellí* (μέλι) = miel) hace referencia a que sabe dulce o a miel debido a que en estas personas se encuentra glucosa en la orina y los médicos en tiempos pasados solían probar la orina de los pacientes para examinarla.

La Diabetes Mellitus (DM) describe un desorden metabólico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglucemia crónica con disturbios en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, que resulta de trastornos en la secreción y/o en la acción de la insulina (OMS, 2010. ADA, 2011).

Los síntomas clásicos de la diabetes son resultado del metabolismo anormal de la glucosa, y son debidos principalmente a la ausencia de actividad insulínica, que produce deficiencia en la transferencia de la glucosa del plasma al interior de las células (ADA, 2011). El cuerpo reacciona como si se encontrara en un estado de iniciación, con la estimulación de la glucogenólisis, gluconeogénesis y lipólisis, con producción de cuerpos cetónicos. La glucosa absorbida durante una comida no se metaboliza a la velocidad normal y por lo tanto, se acumula en la sangre (hiperglucemia) para excretarse en la orina (glucosuria). La glucosa en orina causa diuresis osmótica, lo cual conduce a un aumento en la producción de orina (poliuria). La pérdida de líquido y la hiperglucemia aumentan la osmolaridad del plasma, estimulando el centro de la sed (polidipsia). El desdoblamiento de proteínas para proporcionar aminoácidos para la gluconeogénesis causa desgaste muscular y pérdida de peso, algunas veces con un incremento de la ingesta de alimentos (polifagia) y visión nublada (ADA, 2011). (Figura 1).

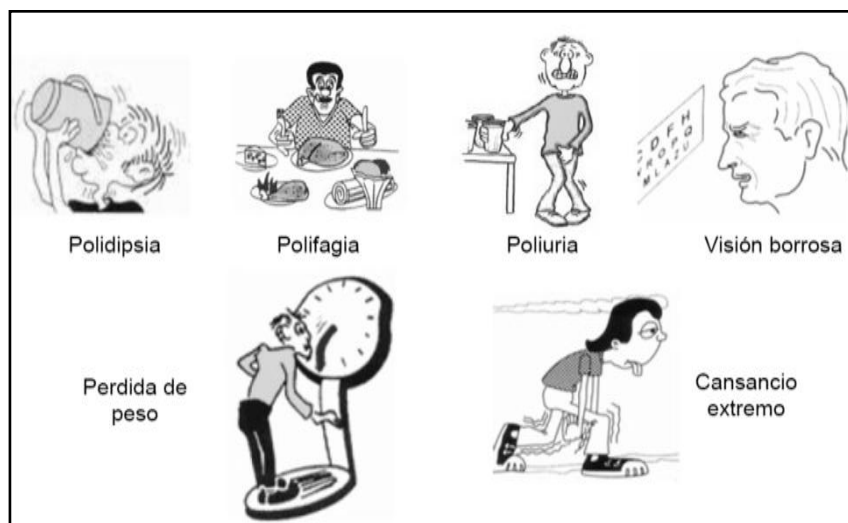


Figura 1. Síntomas de la DM



Muchos procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes. Éstos van desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas con la consecuente producción deficiente de insulina (DM tipo 1), hasta anormalidades que generan disminución de la secreción de insulina y/o resistencia a esta hormona (DM tipo 2). La base de dichas anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en la diabetes es la acción insuficiente de la insulina en los tejidos blanco (ADA, 2011) Durante el periodo prediabético se identifican problemas con la glucosa ingerida y/o problemas con la tolerancia a la glucosa, que son los que llevan a una situación de hiperglucemia: Desafortunadamente la DM no solo consiste en la elevación de glucosa, sino que es un síndrome complejo que debe enfocarse desde un punto de vista integral debido a las repercusiones agudas y crónicas que frecuentemente sufren los sujetos que la padecen.

3.3 Epidemiología.

La DM es un problema de salud a nivel mundial (OMS, 2012). Las poblaciones latinas son más susceptibles, especialmente los mexicanos. En nuestro país, la prevalencia de DM alcanza cifras del 14% en la población de acuerdo con resultados obtenidos en la Secretaría de Salud (SSA), a través del Sistema Nacional de Información de Salud (SINAIS) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006).

Esta enfermedad afecta a millones de personas de ambos sexos, de todas las edades y condición socioeconómica y cultural. Crea repercusiones importantes para quienes la padecen, sus familiares y las autoridades sanitarias, tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. Se calcula que más de 220 millones de personas en el mundo tienen DM y se espera que alcance a 333 millones en el 2025 (FMD, 2010) (Figura 2). La prevalencia de diabetes en mujeres es mayor que en hombres (OMS, 2011). En México la DM corresponde al 55% en mujeres y 45% en varones. Desde hace 5 años es la principal causa de muerte en mujeres y la segunda en varones (SSA, 2010). Y ocupa el primer lugar en número de defunciones por año; las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos sexos, con más de 60 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales (SSA, 2010).

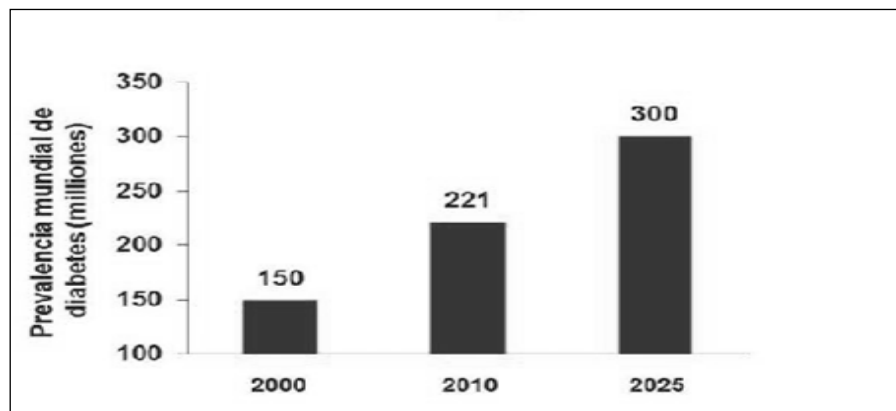


Figura 2. Pandemia de la diabetes mellitus tipo 2. (Tomado de la Federación Internacional de Diabetes *IDF Diabetes Atlas*, 2000. <http://www.idf.org/diabetesatlas>)

3.4 Clasificación de la DM

Una herramienta útil para la investigación, el diagnóstico y la terapéutica de una enfermedad es una clasificación adecuada de la misma ya que permite determinar la etiología y evolución de la patología en especial si existen diversos tipos como es el caso de la DM.

Se han tenido diversas clasificaciones a lo largo del tiempo, en la actualidad dos instancias internacionales son las de mayor atención a esta enfermedad. Y en nuestro país existe la NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención tratamiento y control de la diabetes mellitus (Figura 3).



Figura 3. Instituciones responsables en la epidemiología y evolución de la DM.



Una de ellas generada por la OMS es la que clasifica en tres tipos que son: tipo 1, tipo 2 y gestacional. La segunda clasificación fue propuesta por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) en 1997 vigente aun, en la que su comité la divide en 4 grupos diferentes.

- a) DM tipo 1
- b) DM tipo 2
- c) Diabetes gestacional
- d) Otros tipos de DM

La clasificación de esta enfermedad es muy extensa, hasta puede resultar confusa, debido a que los diferentes organismos la dividen en diferentes categorías; además, cada tipo tiene causas y orígenes distintos, aunque, sus efectos patológicos son muy similares una vez que comienza. Sin embargo, la mayor parte de los casos puede ubicarse en las categorías más conocidas que son la tipo 1 también llamada insulino dependiente y la tipo 2 o diabetes mellitus no insulino dependiente (OMS Y ADA, 2011).

- a) DM tipo 1, se debe a una destrucción autoinmune de las células-beta pancreáticas, ocasionando deficiencia de insulina. Los pacientes con diabetes tipo 1 requieren insulina exógena para sobrevivir. Su frecuencia es cerca al 10% de todos los casos de diabetes. Existe una variación geográfica muy marcada en su prevalencia, siendo los países Escandinavos los que muestran los índices más altos de este padecimiento.

Se distinguen dos sub-grupos:

Diabetes autoinmune: con marcadores positivos en un 85-95% de los casos, anticuerpos antiislotos (ICAs), antiGADs (decarboxilasa del ácido glutámico) y anti tirosina fosfatasa IA2 e IA2 β . Esta forma también se asocia a genes HLA (Human Leucocyte Antigen).

Diabetes idiopática: Con igual comportamiento metabólico, pero sin asociación con marcadores de autoinmunidad ni de HLA.



- b) DM tipo 2, este tipo es el más común y afecta del 90 al 95% del total de pacientes que presentan esta enfermedad, anteriormente conocida como No insulinodependiente (NIDDM), diabetes tipo 2 o diabetes del adulto. Comprende los individuos que tienen resistencia a la insulina y por lo general tienen relativa la deficiencia de insulina al menos en un principio, y muchas veces a lo largo de su vida, estas personas no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir. Se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física.
- c) Diabetes gestacional, se caracteriza por hiperglucemia, que aparece en el curso del embarazo. Se asocia a mayor riesgo en el embarazo y parto La diabetes gestacional puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes clínica.
- d) Otros tipos de DM, incluyen pacientes con defectos genéticos en la función de la célula beta como las formas llamadas MODY (maturity onset diabetes of the young); otros con defectos genéticos de la acción de la insulina; otros con patologías pancreáticas (pancreatectomía, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, neoplasia del páncreas, hemocromatosis); endocrinopatías (Cushing, acromegalia, glucagonoma, feocromocitoma). También algunos fármacos o tóxicos pueden producir diabetes secundaria (corticoides, ácido nicotínico, paragina, interferón alfa, pentamidina); agentes infecciosos (rubeola congénita, coxsachie B, citomegalovirus, parotiditis) y por último, algunas otras enfermedades como los Síndromes de Down, Klinefelter, Turner, enfermedad de Stiff-man y Lipoatrofias.

En estos casos se habla de diabetes secundaria, mientras los tipo 1 y 2 son primarias.

Tabla1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.

<u>Clasificación de la diabetes mellitus</u>	
I. Diabetes tipo 1 (β destrucción de las células, por lo general conduce a una deficiencia absoluta de insulina) A. Mediada por inmunidad B. Idiopática	
II. Diabetes tipo 2 (rango posible de resistencia a la insulina predominante con deficiencia relativa de insulina a un defecto secretor predominante con resistencia a la insulina)	
III. Otros tipos específicos	
A. defectos genéticos de la función de células β <ol style="list-style-type: none">1. Cromosoma 12, HNF-1a (MODY3)2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY2)3. Cromosoma 20, HNF-4a (MODY1)4. Cromosoma 13, factor promotor de insulina -1 (IPF-1; MODY4)5. Cromosoma 17, HNF-1b (MODY5)6. Cromosoma 2, NeuroD1 (MODY6)7. ADN mitocondrial8. Otros	E. Inducida por fármacos o sustancias químicas <ol style="list-style-type: none">1. Vacor2. Pentamidina3. Ácido nicotínico4. Glucocorticoides5. Hormona tiroidea6. Diazóxido7. β-adrenérgicos8. Tiazidas9. Dilantin10. interferón-γ11. Otros
B. Defectos genéticos en la acción de la insulina <ol style="list-style-type: none">1. Resistencia a la insulina tipo A2. Leprechaunismo3. Síndrome de Rabson-Mendenhall4. Diabetes lipoatrófica5. Otros	F. Infecciones <ol style="list-style-type: none">1. Rubéola congénita2. Citomegalovirus3. Otros
C. Enfermedades del páncreas exocrino <ol style="list-style-type: none">1. Pancreatitis2. Trauma/pancreatectomía3. Neoplasia4. Fibrosis quística5. Hemocromatosis6. Pancreatopatía fibrocalculosa7. Otros	G. Formas poco frecuentes de diabetes mediada por inmunidad <ol style="list-style-type: none">1. Síndrome del "hombre rígido"2. Anticuerpos anti receptores de Insulina3. Otros
D. Endocrinopatías <ol style="list-style-type: none">1. Acromegalia2. Síndrome de Cushing3. Glucagonoma4. Feocromocitoma5. Hipertiroidismo6. Somatostatinaoma7. Aldosteronoma8. Otros	H. Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con la diabetes <ol style="list-style-type: none">1. Síndrome de Down2. Síndrome de Klinefelter3. Síndrome de Turner4. Síndrome de Wolfram5. Ataxia de Friedreich6. Corea de Huntington7. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl8. Distrofia miotónica9. Porfiria10. Síndrome de Prader-Willi11. Otros
IV. Diabetes mellitus gestacional	

(Tomado de la American Diabetes Association, DIABETES CARE, 2012. care.diabetesjournals.org)

3.5 Criterios de diagnóstico para la DM en humano.

Para el diagnóstico definitivo de diabetes mellitus y otras categorías de la regulación de la glucosa, se usa la determinación de glucosa en plasma o suero. En ayuno de 10 a 12 horas, las glicemias normales son < 100 mg/dL (70-100mg/dL).

En un test de sobrecarga oral a la glucosa (75 g), las glicemias normales son:

Basal < 100 , a los 30, 60 y 90 minutos < 200 y los 120 minutos post sobrecarga < 140 mg/dL

Diabetes Mellitus: El paciente debe cumplir con alguno de estos 3 criterios lo que debe ser confirmado en otra oportunidad para asegurar el diagnóstico.

1. Glicemia (en cualquier momento) ≥ 200 mg/dL, asociada a síntomas clásicos (poliuria, polidipsia, baja de peso)
2. Dos o más glicemias ≥ 126 mg/ dL.
- 3.-Respuesta a la sobrecarga a la glucosa alterada con una glicemia a los 120 minutos post sobrecarga ≥ 200 mg/dL.

Intolerancia a la glucosa: Se diagnostica cuando el sujeto presenta una glicemia de ayuno < 126 mg/dl y a los 120 minutos post sobrecarga oral de glucosa entre 140 y 199 mg/dL.

Glicemia de ayuno alterada: Una persona tiene una glicemia de ayunas alterada si tiene valores entre 100 y 125 mg/dL. Será conveniente estudiarla con una sobrecarga oral a la glucosa. Esto de acuerdo con la ADA y con la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.

3.6 Criterios de diagnóstico para la DM en ratas.

En estudios previos, se ha reportado que cifras iguales o superiores a 243 mg/dL de glucosa en ayuno sugieren la presencia de DM en ratones(Han et al. 2008) Sin embargo, no existe un parámetro de cifras que determinan la presencia de diabetes en ratas Wistar, por lo que se decido trabajar con valores de glicemia basal ya obtenidos en años de investigación en el laboratorio de Etnofarmacología en la Facultad de Ciencias “UNAM” con el grupo de trabajo del Dr. Adolfo Andrade Cetto quien tiene como eje central la línea de investigación en diabetes. Los resultados obtenidos mediante la OGTT (curva de tolerancia a la glucosa en sus siglas en inglés, Oral Glucose Tolerance Tests) fueron determinados mediante un ayuno previo de 12 horas, obteniendo la siguiente tabla de valores de referencia (Tabla 3).



Tabla 3. Niveles de glucosa en ratas Wistar mediante la OGTT

Diagnóstico.	Niveles de glucosa sanguínea.
Normoglucémicas.	80-120 mg/dL
Glicemia basal alterada.	≥126 pero <140 mg/dL
Intolerancia a la glucosa.	≥140 pero <200 mg/dL
Diabetes Mellitus	≥200 mg/dL

Estos valores son repetibles con datos reportados en la Universidad de Colima (Urzúa G.;2011).Y de acuerdo con estudios reportados por investigador Masiello(1998), en general las ratas son consideradas diabéticas si la concentración de glucosa en plasma en ayuno es mayor a 160 mg/dL(160-180 mg/dL) aunque otros autores señalan una cifra de corte mayor de 200 mg/dL(en ayuno) para considerar las ratas diabéticas en las 24 horas siguientes a la administración de STZ (Frode y Medeiros, 2008).

4.0 PRINCIPIOS BÁSICOS DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.

El cuerpo humano tiene un requerimiento constante de energía, parte de la comida que ingerimos es utilizada para nuestros requerimientos inmediatos y otra gran parte de ella, es almacenada en el organismo principalmente en forma de glucógeno en el hígado y en el músculo, y en forma de triglicéridos en el tejido adiposo. Estos nutrimentos almacenados son utilizados posteriormente para la obtención de energía en los períodos de ayuno. El almacenamiento y la utilización de estas sustancias se encuentran controlados por mensajes hormonales. En el estado posprandial, la coordinación entre la secreción de insulina por las células beta pancreáticas y la respuesta a la insulina de los principales tejidos que almacenan a la glucosa como el músculo, el hígado y el tejido adiposo, controlan las concentraciones de glucosa en plasma. La insulina promueve la captación de glucosa al interior de las células, la síntesis de glucógeno en el hígado y músculo, la formación de lípidos que se almacenan en el tejido adiposo, y la síntesis de proteínas en la mayoría de las células. El transporte de glucosa hacia el interior de las células del músculo esquelético, representa más del 75% de la captación total de glucosa de todo el organismo (Klip, A. and M.R. Paque, 1990). Paralelo al efecto estimulante de la insulina sobre la síntesis de reservas energéticas, en el estado posprandial, la hormona tiene funciones restrictivas sobre la

producción de glucosa y la lipólisis (Barthel A., 2003 y Shakur Y., 2001) (Fig.4). En el estado de ayuno, la disminución en la concentración plasmática de insulina y el aumento de hormonas que contrarrestan la acción de la insulina, como el glucagón, los glucocorticoides y las catecolaminas, contribuyen a la liberación al torrente sanguíneo de glucosa por medio de la degradación del glucógeno y la gluconeogénesis. Estas hormonas también favorecen la lipólisis, así como la disminución en síntesis de proteínas y el aumento en la degradación de las mismas.

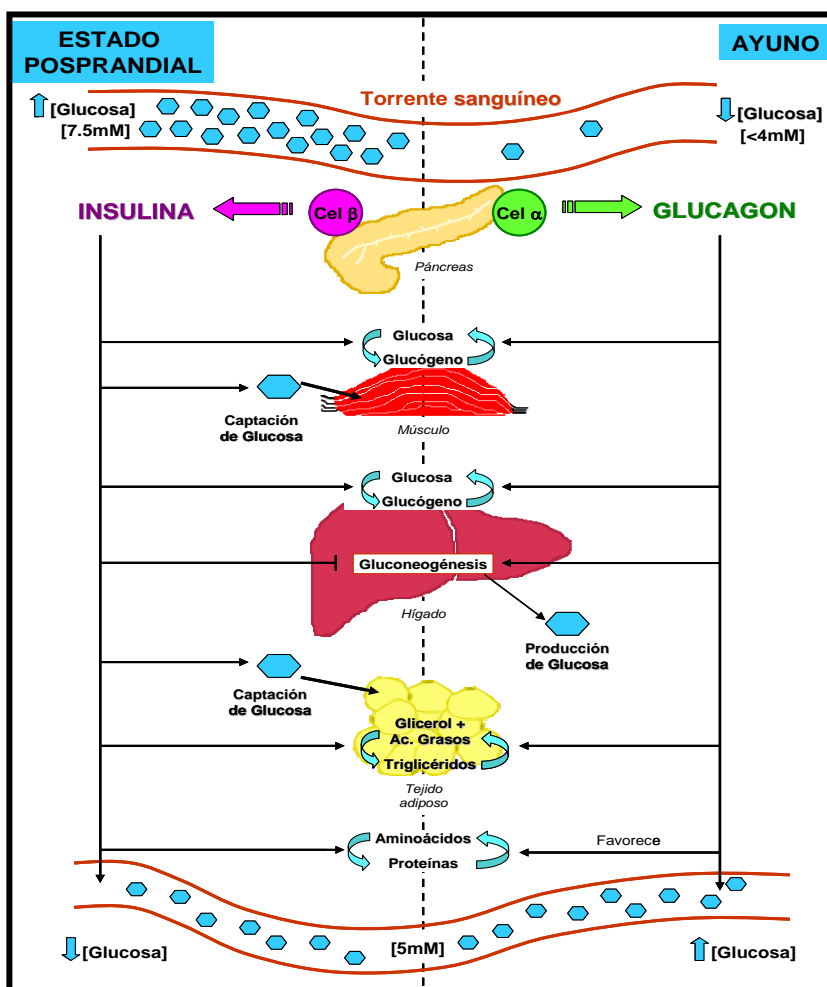


Figura 4. Integración del metabolismo en estados de ayuno y posprandio. En el estado posprandial, la coordinación entre la secreción de insulina por las células beta pancreáticas y la respuesta a la insulina de los principales tejidos que almacenan a la glucosa como el músculo, el hígado y el tejido adiposo, controlan las concentraciones de glucosa en plasma. La insulina promueve la captación de glucosa al interior de las células, la síntesis de glucógeno en el hígado y músculo, la formación de lípidos que se almacenan en el tejido adiposo, y la síntesis de proteínas en la mayoría de las células. En el estado posprandial, la hormona tiene funciones restrictivas sobre la producción de glucosa y la lipólisis. En el estado de ayuno, la disminución en la concentración plasmática de insulina y el aumento de glucagón contribuyen a la liberación de glucosa por medio de la degradación del glucógeno y la gluconeogénesis. Esta hormona también favorece la lipólisis, así como la disminución en síntesis de proteínas y el aumento en la degradación de las mismas. (Tomado de Molecular Endocrinology, 2006: Molecular basis of type-2 diabetes).



Además de las clásicas hormonas reguladoras, existe evidencia considerable de que las hormonas del tejido adiposo o adipocinas, así como los ácidos grasos libres, influyen el metabolismo y el gasto de energía.

A continuación se describe el conocimiento básico de los mecanismos moleculares que participan en la secreción de insulina y en la respuesta a la insulina en condiciones normales. Asimismo, el papel del tejido adiposo en el metabolismo energético.

5.0 MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO EN CONDICIONES NORMALES.

Las células beta y la secreción de insulina

Las células beta son un tipo celular altamente especializado que se encarga de controlar la producción, procesamiento, almacenamiento y modulación de la secreción de insulina en respuesta a incrementos en las concentraciones de nutrientes en sangre durante el estado posprandial, principalmente a las concentraciones de glucosa. Esta especialización radica en la capacidad de las células beta para sentir la cantidad de glucosa en sangre, para lo cual participa el metabolismo de la glucosa dentro de la célula beta. En el establecimiento y mantenimiento del fenotipo altamente especializado de las células beta participan un grupo de factores transcripcionales que en su conjunto modulan la expresión tanto de la insulina como de otros componentes claves en el proceso de acoplar la síntesis y secreción de esta hormona a las demandas metabólicas del organismo (Hellerstrom C., 1984 y Weir, G.C., et al., 1997).

La glucosa es el nutriente más importante para la secreción de insulina. El mecanismo por el cual la glucosa promueve la secreción de insulina depende de las concentraciones de glucosa en sangre y el metabolismo de esta dentro de la célula beta, un proceso conocido como secreción de insulina en respuesta a glucosa.

La secreción de insulina en respuesta a glucosa es pulsátil y bifásica (Stagner, J.I., 1980). Los pulsos secretorios de la célula beta están asociados a oscilaciones sincrónicas de calcio (Ca^{2+}) en respuesta a los estímulos de glucosa (Bergsten, P., et al., 1994) y se ha sugerido que estas oscilaciones están acopladas a oscilaciones en la glucólisis dentro de la célula beta (Kar, S. and D.Shankar, 2005). Los pulsos secretorios también están regulados y sincronizados con los otros tipos celulares del islote. La insulina y el glucagón tienen patrones de secreción asincrónicos, mientras que los pulsos de somatostatina están



sincronizados con la secreción de insulina (Stagner, J.I, 1980).

La secreción de insulina en respuesta a glucosa también muestra un patrón bifásico. Poco después de que la célula beta recibe el estímulo de glucosa hay un primer pico de secreción de insulina, seguido de una disminución en la secreción. Una segunda fase sostenida de secreción de insulina sigue a este decremento, la cual puede continuar durante horas hasta que se alcance la euglicemia (Fig. 5) (Curry D.,1968) A pesar de que los mecanismos que participan en la primera fase de secreción de la insulina, (o fase de disparo) son bien conocidos, los mecanismos que regulan la segunda fase de secreción sostenida (o fase de amplificación) no han sido elucidados por completo, y se ha sugerido la participación de diversos agentes en esta fase. La mayoría de estos agentes se relacionan con el metabolismo de la glucosa al interior de la célula beta (Henquin, J.C, 2009).

Primera fase de secreción de insulina: la vía de disparo

La primera fase de secreción de insulina en respuesta a glucosa es un proceso complejo de múltiples pasos que requiere de: el transporte y la oxidación de la glucosa, cambios electrofisiológicos y la fusión de gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática de la célula beta (Fig. 5). La glucosa entra a la célula por difusión facilitada mediada por un grupo de proteínas transportadoras de glucosa relacionadas, caracterizadas por 12 dominios hidrofóbicos tipo hélice. Hasta la fecha, se han descrito al menos 12 GLUTs (Joost, H., 2002). En la célula beta pancreática, la glucosa se transporta por la isoforma 2 del transportador de glucosa (GLUT2) en los roedores, y por la isoforma 1 en humanos. La glucosa es fosforilada para formar glucosa-6-fosfato por la glucocinasa. Esta enzima juega un papel crítico en la secreción de insulina en respuesta a glucosa y es considerada el sensor de glucosa de la célula beta pancreática. Debido a sus características cinéticas, la glucocinasa es un factor determinante para la fosforilación de la glucosa (Matschinsky, F., 1996) y por lo tanto para su metabolismo a través de la glucólisis y la oxidación.

La generación de ATP por la glucólisis y el ciclo de Krebs provoca el cierre del canal de potasio sensible a ATP (K_{ATP}) un hetero-octámero formado por cuatro subunidades de receptor a sulfonilurea 1 (SUR1) y cuatro unidades del canal rectificador de entrada de K^+ Kir6.2 (Aguilar-Bryan L., et al.,1998). El cierre de estos canales inhibe la salida de potasio (K^+), y permite la entrada de sodio (Na^+). Estos dos eventos ocasionan la despolarización de la membrana a un rango que permite la apertura de los canales de calcio (Ca^{2+}) tipo T



dependientes de voltaje y de los canales de sodio (Na^+). La entrada de sodio y calcio despolariza aún más la membrana, ocasionando que se abran los canales de calcio tipo L y otros canales de calcio dependientes de voltaje. Su activación desencadena potenciales de acción que incrementan el calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Hiriart, M. and L. Aguilar, 2008). Junto con el calcio movilizado de las reservas intracelulares, este proceso lleva a la fusión de los gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática y a la liberación de la insulina hacia la circulación (Rorsman, P. and E. Renstrom, 2003). Posterior al metabolismo de la glucosa, el paso limitante para la primera fase se encuentra en la cascada de transducción de señales que se encuentra entre la detección de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la excitación de los gránulos de liberación inmediata (Straub, S.G. and G.W. Sharp., 2002).

Segunda fase de secreción de insulina: la vía de amplificación

La existencia de una segunda fase de secreción de insulina fue reportada por primera vez en los años 60. Observaron que al perfundir el páncreas total con glucosa, la secreción de insulina se incrementaba rápidamente a partir de los 2 minutos posteriores a la infusión con glucosa, y alcanzaba su pico máximo a los 4 min. Una segunda fase, más lenta, seguía a este incremento y se sostenía durante todo el periodo de infusión con glucosa (Curry D., 1968). Por otro lado, cuando el páncreas se perfundía con tolbutamida, una sulfonilurea que bloquea los canales de potasio, sólo se observaba el primer pico de liberación rápida de insulina, sugiriendo que la secreción bifásica de insulina sólo se genera en respuesta a glucosa (Curry D., 1968). Durante los años 90 se encontraron mecanismos de secreción de insulina independientes de la acción iónica (activación de los K_{ATP}) (Aizawa, T. et al., 1998 y Gembal, M., 1992). A partir de entonces, se sabe que la secreción de insulina en respuesta a glucosa comprende una primera fase rápida de secreción, ocasionada por una vía de disparo (o un mecanismo independiente de K_{ATP}), seguida de una segunda fase sostenida que depende de una vía de amplificación (o un mecanismo independiente de K_{ATP}) (Henquin, J.C., 2000 y Aizawa, T., 2002).

La naturaleza bifásica de la secreción de insulina ha sido explicada por la existencia de diversas pozas de gránulos de insulina al interior de la célula beta (Aizawa, T. and M. Komatsu, 2005 y Straub, S.G. and G.W. Sharp, 2004). Existe una poza de gránulos de reserva que se localiza en el citoplasma, la cual corresponde alrededor del 94% del total de los gránulos, y otra poza de gránulos liberables que se encuentran anclados a la membrana

plasmática. Se ha sugerido que estos gránulos anclados poseen diferente habilidad para ser liberados, por lo que se dividen en dos grupos: los gránulos listos para la liberación (LL), y los gránulos de liberación inmediata (LI). Los gránulos de liberación inmediata son los primeros en secretar insulina en respuesta al incremento del $[Ca^{2+}]_i$ durante la fase de disparo, ocasionando la primera fase de secreción de insulina. En el punto más bajo de secreción, encontrado entre las dos fases, los gránulos LL se convierten en gránulos LI, un proceso dependiente de ATP que se denomina preparación o “priming”. Se ha sugerido que esta preparación es el paso limitante para la exocitosis, y el proceso regulado por las señales que participan en la fase de amplificación que provoca la segunda fase de secreción de insulina (Fig. 5) (Straub, S.G. and G.W. Sharp, 2004). Se ha sugerido que la mayoría de estas señales se derivan del metabolismo de la glucosa.

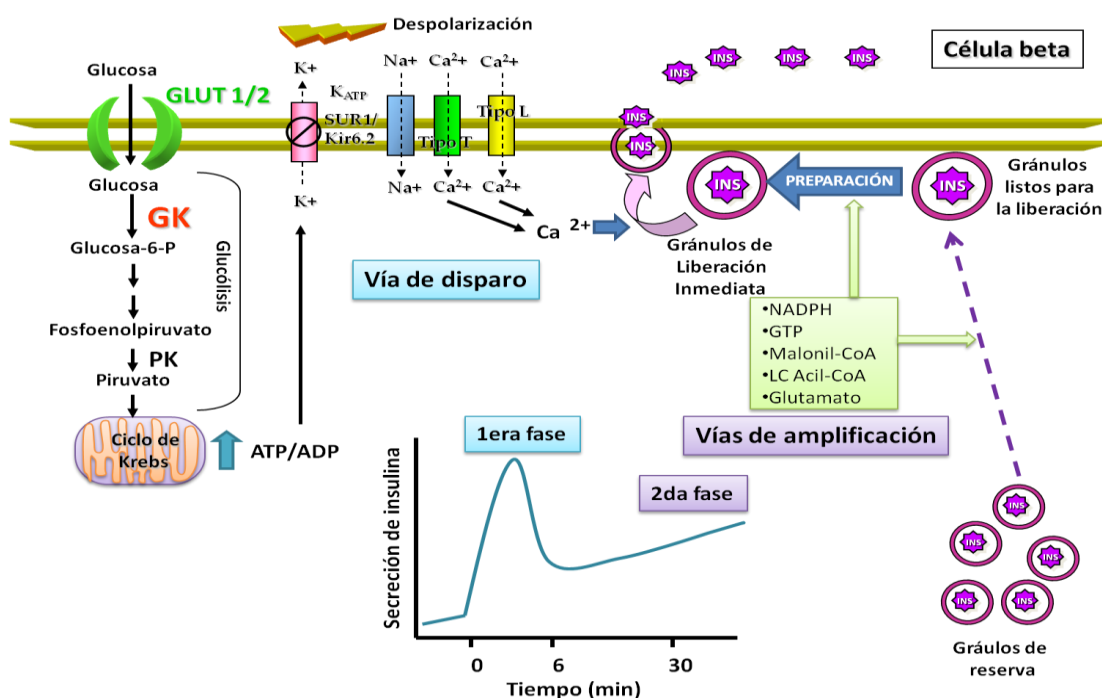


Figura 5. Mecanismo de la secreción bifásica de la insulina en respuesta a glucosa.

La glucosa entra a la célula beta por los transportadores de glucosa GLUT2 en roedores y GLUT1 en humanos, y es fosforilada para su metabolismo a través de la glucólisis y la oxidación. La generación de ATP por estos dos procesos cierra los canales de K^+ sensibles a ATP, inhibiendo la salida de K^+ y permitiendo la entrada de Na^+ , lo cual despolariza a la membrana y abre canales de Ca^{2+} tipo T y canales de Na^+ . Estos eventos despolarizan aún más la membrana y abren los canales de Ca^{2+} tipo L, incrementando el calcio intracelular, lo que ocasiona la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática, y la primera fase de secreción de insulina. La segunda fase sostenida de secreción de insulina ocurre cuando los gránulos listos para la liberación se convierten en gránulos de liberación inmediata, proceso dependiente de ATP conocido como preparación o “priming”. La mayoría de las señales que participan en el “priming” se derivan del metabolismo mitocondrial derivado del metabolismo de la glucosa (Tomado de Molecular Endocrinology, 2011: Molecular basis of type-2 diabetes).

La secreción de insulina inducida por glucosa puede ser aumentada o disminuida por neurotransmisores y hormonas por medio de la activación de receptores en la célula beta pancreática. Por ejemplo, la acetilcolina, a través del receptor muscarínico tipo 3, activa la proteína cinasa C; de manera similar, el péptido similar a glucagón-1 (Glucagon-like peptide-1 ó GLP-1) promueve un incremento en el AMP cíclico y por lo tanto una activación de la proteína cinasa A, cascadas de señalización que aumentan la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

6.0 MECANISMOS MOLECULARES DE LA INSULINA.

La insulina comienza su función uniéndose a su receptor, provocando una cascada de eventos en la que participan la fosforilación de proteínas y de fosfolípidos de membrana y la actividad del citoesqueleto (Fig. 6).

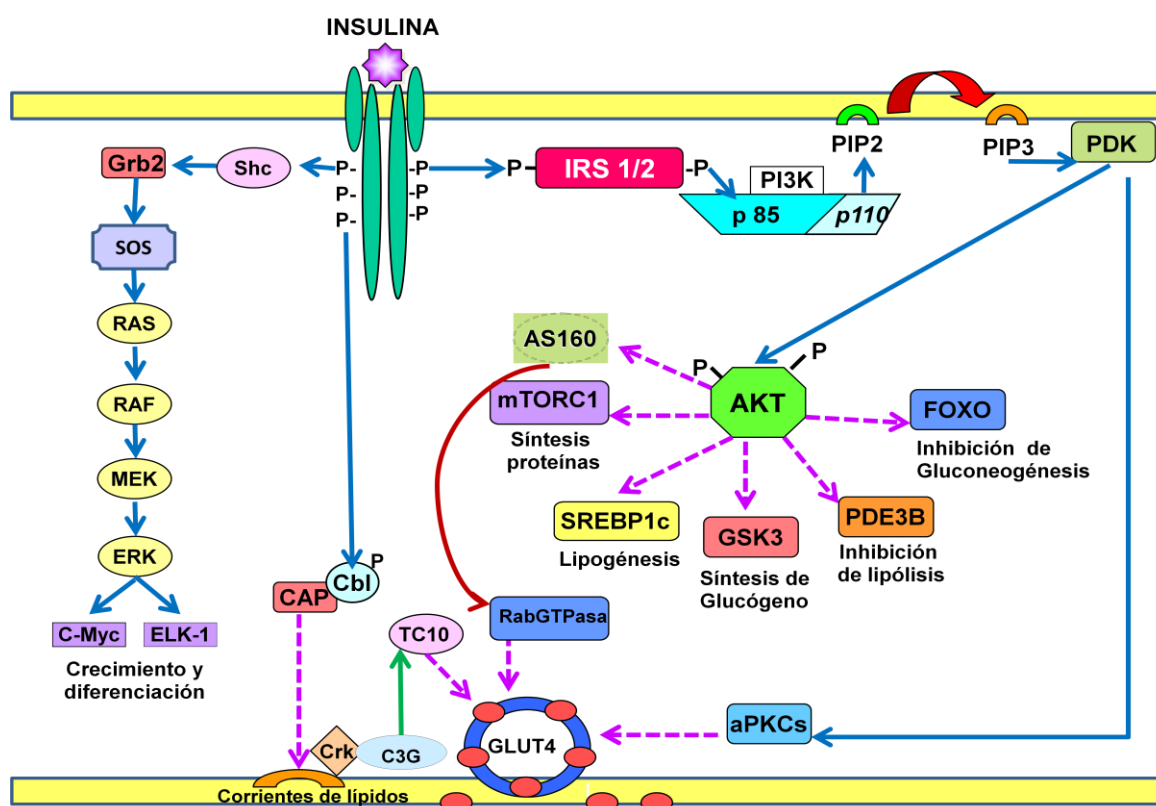


Figura 6. Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina. La interacción de la insulina con su receptor promueve su autofosforilación, y cataliza la fosforilación de proteínas celulares como los miembros de la familia de IRS y familias de Cbl. Posterior a la fosforilación de tirosina, estas proteínas interactúan con moléculas de señalización, lo que resulta en una serie de diversas vías de señalización, incluyendo la activación de PI3K y la activación de TC10. Estas vías actúan de forma concertada para coordinar la regulación del tráfico de vesículas que contienen la isoforma 4 del transportador de glucosa (GLUT4), la síntesis de proteínas, la activación e inactivación enzimática y la expresión de genes, lo cual resulta en la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas. (Tomado de Molecular Endocrinology, 2011: Molecular basis of type-2 diabetes).



Receptor de insulina.

El receptor de insulina es una proteína de membrana que pertenece a una subfamilia de receptores con una actividad de tirosina cinasa de proteínas. El receptor está formado por dos subunidades alfa, que se localizan extracelularmente, cuya función es la de unirse a la insulina; y dos subunidades beta, de localización intracelular que tienen actividad de proteína cinasas. La insulina se une a las subunidades alfa e induce un cambio en su conformación que lleva a reacciones de auto-fosforilación rápida en las subunidades intracelulares beta. El receptor fosforilado produce el reclutamiento de proteínas de señalización intracelulares que inician, a su vez, una cascada de reacciones de fosforilación de proteínas de diferentes vías. De esta manera se provocan los amplios efectos de la insulina sobre el metabolismo y el crecimiento celular (Bjornholm, 2005 y Withers, D.J., et al., 1998).

Las vías de señalización de la insulina más importantes son:

- 1)** La vía que se inicia con la fosforilación de las proteínas sustrato del receptor de la insulina (IRS, del inglés insulin receptor substrate). Esta produce las acciones metabólicas de la insulina sobre el transporte de glucosa por el transportador de glucosa GLUT4, la síntesis de glucógeno, de lípidos y de proteínas, así como la inhibición de la lipólisis y la gluconeogénesis.
- 2)** La vía de señalización mediada por la fosforilación de la proteína Cbl, la cual induce la actividad del citoesqueleto de actina para facilitar, junto con la vía de IRS, el movimiento del transportador de glucosa GLUT4 del interior de la célula hacia la membrana celular.
- 3)** La vía que participa en la regulación de la insulina sobre la proliferación y la diferenciación celular.

Señalización de la insulina vía IRS.

Se han identificado al menos seis proteínas sustratos del receptor de insulina, siendo IRS-1 e IRS-2 de las que se conoce mejor su función. Estudios en ratones knockout han sugerido que las proteínas IRS funcionan de manera complementaria, más que redundante, dentro de la señalización de la insulina. La fosforilación de los IRS facilita la interacción de las dos subunidades que constituyen la forma activa de la enzima fosfoinositol-3-fosfato cinasa, una cinasa de lípidos heterodimérica que juega un papel crítico en las acciones de la insulina (De Camilli, P., et al., 1996). La fosfoinositol-3-fosfato cinasa consiste de una subunidad reguladora (p85) que se asocia a la subunidad catalítica (p110).



La subunidad reguladora une a los IRSs, mientras que la subunidad catalítica fosforila los fosfatidilinosoles en la membrana para generar un segundo mensajero lipídico: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Éste producto promueve la activación de cinasas dependientes de fosfoinosítidos (PDK, del inglés Phosphoinositide-dependent kinase). En consecuencia, la activación de PDK fosforila a una proteína muy importante en la señalización de la insulina: la AKT, también conocida como PKB o proteína cinasa B. Se han identificado tres isoformas de Akt, que se expresan de manera ubicua: Akt1, Akt2 y Akt3. Akt1 y Akt2 participan en la transducción de señales de la insulina en el músculo esquelético y el tejido adiposo. En contraste, Akt3 no se activa por insulina en el hígado, el músculo o el tejido adiposo (Walker, K.S., et al. 1998). Las formas fosforiladas de AKT/PKB regulan a su vez la fosforilación de diversas proteínas que participan en las múltiples acciones metabólicas de la insulina.

Mediante la fosforilación de la proteína AS160 por AKT/PKB se induce el movimiento del transportador de azúcares GLUT4 desde el citoplasma a la membrana plasmática, generando un mayor transporte de glucosa hacia el interior de la célula. La fosforilación de la glucogeno sintasa cinasa-3 (GSK3, del inglés glycogen synthase kinase 3) que produce AKT/PKB, desencadena a su vez una serie de fosforilaciones que incrementan la síntesis de glucógeno. Las acciones positivas de la activación de AKT/PKB sobre la lipogénesis se producen a través del factor de transcripción SREBP-1c, proteína que aumenta la síntesis de las enzimas de esta vía. Por otro lado, la fosforilación mediada por AKT/PKB sobre el factor de transcripción FOXO-1 (del inglés Forkhead box protein O1) provoca la inhibición de la síntesis de enzimas de la gluconeogénesis, en tanto que la fosforilación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) produce la inhibición de la lipólisis.

Proteín cinasa C atípica (aPKC).

Además de Akt, la aPKC ζ y λ participan también en la señalización de la insulina. Contrario a las PKCs convencionales, las aPKCs no son activadas por su agonista clásico: el 1,2-diacilglicerol. Las proteína cinasas atípicas se activan por el inositol 3,4,5-trifosfato (Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, 2001).



Señalización mediada por la fosforilación de la proteína Cbl.

En esta vía participan fosforilaciones de proteínas como Cbl, CAP Crk, C3G y TC10. Estas fosforilaciones aunadas a la acción de secciones de la membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y de esfingolípidos conocidas como dominios de *lipid rafts*, y con la actividad del citoesqueleto de actina, actúan de manera coordinada con la vía de IRS, vía AS160 y RabGTPasa, facilitando el movimiento del transportador de glucosa GLUT4 del interior de la célula hacia la membrana celular (Zick, Y., 2004).

Vía de señalización de la insulina sobre la proliferación y la diferenciación celular.

La insulina estimula también la proliferación y la diferenciación celular, por la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP) y la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Esta vía involucra la fosforilación en tirosina de las proteínas IRS y/o Shc, las cuales interactúan con la proteína adaptadora Grb2, reclutando la proteína de intercambio Son-of-sevenless (SOS) hacia la membrana plasmática para la activación de Ras. Una vez activada, Ras funciona como un interruptor, estimulando una cascada de fosforilación de serín-cinasas a través de la activación de Raf, MEK y ERK. La ERK fosforilada activa a factores de transcripción que llevan a la proliferación celular o la diferenciación (Klip, A. and M.R. Paquet, 1990 y Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, 2001).

Inhibición de la señalización de la insulina

Así como la fosforilación de las proteínas de la cascada de señalización de la insulina activa a esta vía, la desfosforilación la inhibe. Varias fosfatasas como: la proteína-tirosina fosfatasa-1B (PTP1B), la enzima homóloga de fosfatasa y tensina (PTEN), la tirosin-protein fosfatasa (SHP2) y la proteína supresora de la señal de citocinas-3 (SOCS-3), desfosforilan y apagan la señalización (Zick, Y., 2004).

Alteraciones en la vía de la transducción de señales de la insulina, sean por ineficiente fosforilación y/o por aumento de la actividad de las fosfatasas, provocan una disminución en la acción de esta hormona. Este es el mecanismo molecular que da origen a la resistencia a la insulina, también conocida como insensibilidad a la insulina. La disminución en la acción de la insulina es uno de los componentes que participan en el desarrollo de la diabetes.



7.0 METABOLISMO EN LA DIABETES TIPO 2

La diabetes tipo 2 se caracteriza por un defecto en la acción y/o secreción de la insulina. Una anomalía temprana de la enfermedad es la resistencia a la insulina; un estado anormal en el cual la insulina no es capaz de ejercer sus efectos biológicos en concentraciones plasmáticas que resultan efectivas en sujetos normales. La resistencia a la insulina ha sido propuesta como el factor de unión clave en el síndrome metabólico para la intolerancia a la glucosa, la hipertensión y la dislipidemia.

La resistencia a la insulina lleva a una profunda disminución en la captación de la glucosa y la síntesis de glucógeno en los tejidos periféricos. También se han observado defectos en el almacenamiento de glucógeno hepático y la actividad de la glucógeno sintasa asociados a la resistencia a la insulina (Shulman, G.I., 2000 y DeFronzo, R.A., 1988). La resistencia a la insulina causa supresión defectuosa de la producción hepática de glucosa, tanto en estados de ayuno como posprandiales (Barthel, A. and D. Schmoll, 2003). La resistencia a la acción antilipolítica de la insulina también favorece el rompimiento de los triglicéridos en el tejido adiposo y la generación de ácidos grasos libres, los cuales inhiben el transporte de glucosa estimulada por insulina y el metabolismo en el músculo esquelético, estimulan la gluconeogénesis hepática (Boden, G. and G.I. Shulman., 2002 y Shulman, G.I. 2000) e interfieren con la señalización del receptor de insulina (Saltiel, A.R. and C.R. Kahn., 2001). Los cambios en las concentraciones séricas de adipocinas también son parte del estado de resistencia a la insulina.

Previo a la aparición de la diabetes tipo 2, la resistencia a la acción hipoglucémica de la insulina tiende a ocasionar un ligero aumento de la glucosa en sangre, lo cual estimula la secreción de insulina y causa hiperinsulinemia. Inicialmente, la hiperinsulinemia es capaz de contrarrestar la resistencia a la insulina. El estado diabético se desarrolla cuando la secreción de insulina es incapaz de sostenerse para compensar la resistencia a la insulina, y es en esta etapa que se hace aparente la hiperglucemia en ayuno y en el estado posprandial. (Fig.7)

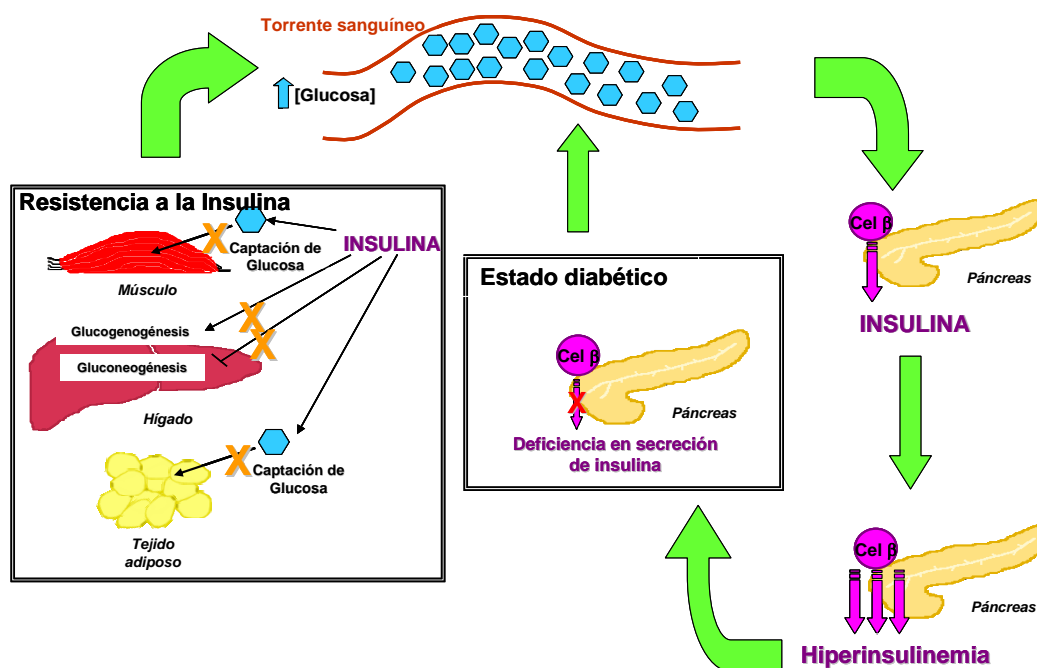


Figura 7. Desarrollo del estado diabético. Previo a la aparición de la diabetes tipo 2, la resistencia a la acción hipoglucémica de la insulina tiende a ocasionar un ligero aumento de la glucosa en sangre, lo cual estimula la secreción de insulina y causa hiperinsulinemia. Inicialmente, la hiperinsulinemia es capaz de contrarrestar la resistencia a la insulina. Cuando la secreción de insulina es incapaz de sostenerse para compensar la resistencia a la insulina, se hace aparente la hiperglucemia en ayuno y en el estado posprandial desarrollándose el estado diabético. (Tomado de Molecular Endocrinology, 2011: Molecular basis of type-2 diabetes).

Resistencia a la insulina

En la actualidad es aceptado que la señalización defectuosa post-receptor del receptor de insulina es el mecanismo causal de la resistencia a la insulina presente en la diabetes tipo 2. Como consecuencia, las acciones metabólicas de la insulina se ven alteradas. Varios mecanismos, como la desfosforilación de proteínas de la vía de señalización por fosfatasa como PTEN, PTP1B, SHP2 tirosina, el desequilibrio de fosforilación serina/treonina, o la internalización del receptor de insulina dañan la señalización de la insulina (Zick, Y., 2004). Diversas moléculas que afectan a estos mecanismos se han asociado con la resistencia a la insulina, la mayoría de ellas son citocinas que se producen en el tejido adiposo y moléculas derivadas de los ácidos grasos como la ceramidas o el diacil-glicerol (Mullen, K.L., et al., 2009).

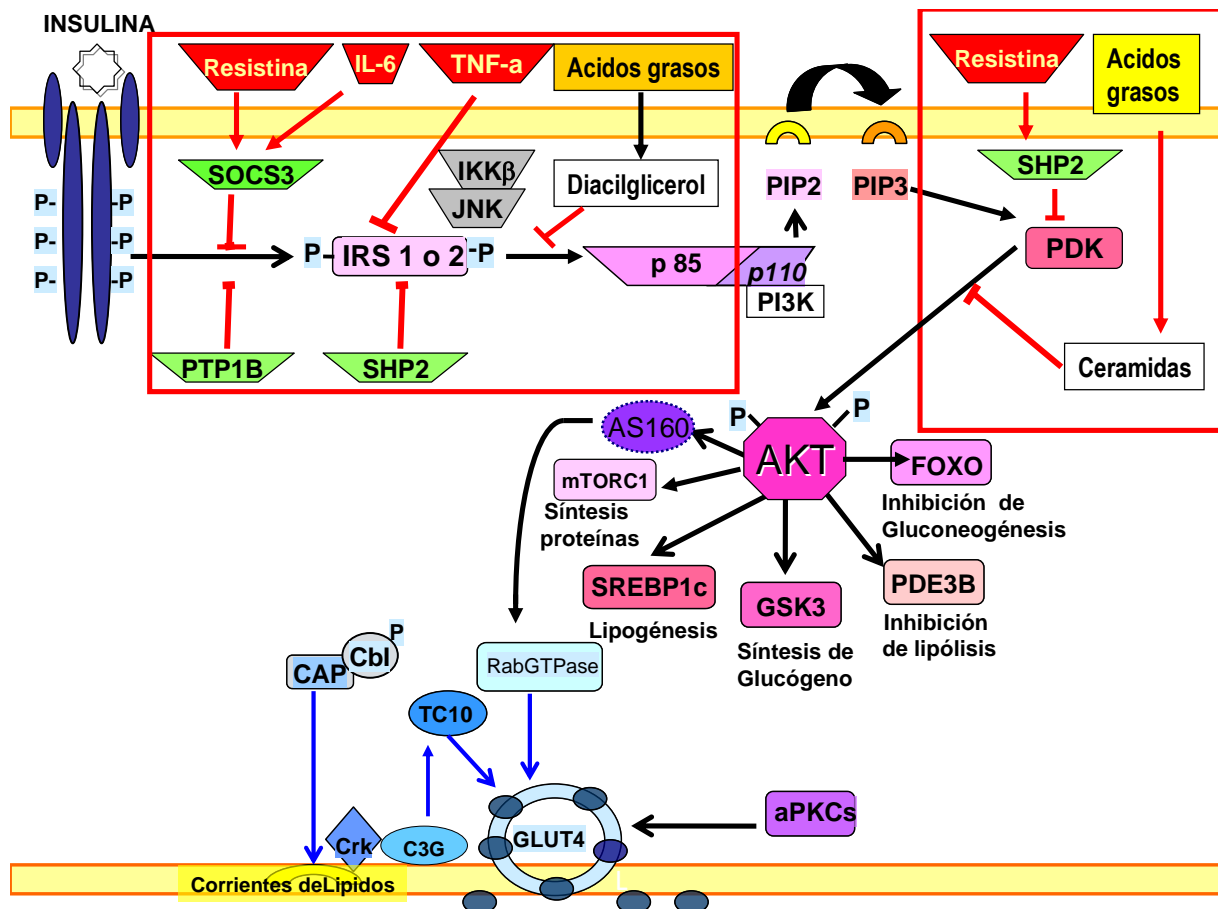


Figura 8. Mecanismos moleculares que participan en la resistencia a la insulina. Varios mecanismos, como la desfosforilación de proteínas de la vía de señalización por fosfatasa como PTEN, PTP1B, SHP2 tirosina, el desequilibrio de fosforilación serina/treonina, o la internalización del receptor de insulina que daña la señalización de la insulina, se han asociado con la resistencia a la insulina. La mayoría de las moléculas que participan en este daño son citocinas que se producen en el tejido adiposo, como TNF-alfa, IL-6 y resistina, así como moléculas derivadas de los ácidos grasos como las ceramidas o el diacil-glicerol. (Tomado de Molecular Endocrinology, 2011: Molecular basis of type-2 diabetes).

Tejido adiposo. La disfunción del tejido adiposo juega un papel crucial en el desarrollo de la resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2. Tanto la obesidad como la lipodistrofia ocasionan resistencia a la insulina en el músculo. Datos recientes sugieren que las moléculas liberadas por los adipocitos, como los ácidos grasos libres, el TNF-alfa, la resistina y la interleucina 6 (IL-6) inhiben la señalización de la insulina e inducen resistencia a insulina (Schinner, S., et al.,2005) (Fig.8).



Ácidos grasos libres. Los ácidos grasos afectan la señalización de la insulina al transformarse en compuestos como el diacil-glicerol y las ceramidas. Se cree que el mecanismo de interferencia del diacil-glicerol con las proteínas PKC convencionales y/o atípicas interfiere con la interacción de IRS-1 con la subunidad p85 de la fosfoinositol-3-cinasa y es de esta manera que interfiere con la señal de la insulina (Turban, S. and E. Hajdуч,). En cuanto a las ceramidas se han propuesto diferentes acciones que afectan la señalización, una de ellas es el aumento de la interacción entre las PKC atípicas con Akt, lo que disminuye la posibilidad de Akt de interactuar con PDK1 y por ende la disminución de la vía de señalización.

Interleucina 6 (IL-6). En los estados de resistencia a la insulina, se ha observado un aumento de dos a tres veces mayor en la IL-6 circulante. La IL-6 a través de la proteína SOCS (Senn, J.J., et al., 2003) disminuye la fosforilación de la tirosina de IRS-1 y disminuye la asociación de la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3-cinasa con IRS-1 (Senn, J.J., et al., 2002).

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). El TNF-alfa es una citocina producida por los adipocitos que ha sido ampliamente relacionada con un factor causante de la resistencia a la insulina asociada a obesidad y de la patogénesis de la diabetes tipo 2 (Hotamisligil, G.S., 2000). Se han encontrado varios mecanismos mediante los cuales el TNF-alfa produce resistencia a la insulina, estos incluyen la regulación negativa de la expresión de PPARgamma, la disminución en la expresión de genes requeridos para la acción normal de la insulina, como GLUT4, la interferencia con la vía de señalización de la insulina mediante la inducción de fosforilaciones de serinas en la proteína IRS, así como la elevación de los ácidos grasos libres por la estimulación de la lipólisis (Hotamisligil, G.S., 2000).



Receptor gamma activado de proliferación de peroxisomas (PPARgamma). Los PPARs son receptores nucleares que regulan la transcripción de diversos genes. En particular, PPARgamma se encuentra involucrado en la regulación de genes que participan en la acción de la insulina. Además, la activación de PPAR inhibe la expresión del gen de la leptina, así como la expresión de TNF-alfa, el cual, a su vez, es un inhibidor de la expresión de PPAR. La idea de que los PPARs juegan un papel importante en la diabetes tipo 2 está fundamentada por el reciente reporte de familias en las cuales mutaciones en PPARs causaron resistencia a la insulina severa y diabetes (Barroso, I., et al., 1999).

Oxidación de combustibles. Diversas investigaciones han encontrado que la función mitocondrial podría estar involucrada en la patogénesis de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. Estudios de microarreglos en sujetos obesos y diabéticos tipo 2 encontraron un decremento en la expresión de genes regulados por el coactivador-1 alfa del receptor gamma activado de proliferación de los peroxisomas (PGC-1 alpha) (Mootha, V.K., et al. 2003) un factor transcripcional que juega un papel importante en la biogénesis de la mitocondria. Además, se ha encontrado menor actividad de las enzimas oxidativas mitocondriales en los pacientes diabéticos tipo 2. Estos datos apoyan el concepto de que la resistencia a la insulina surge a partir de defectos en la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, lo cual, a su vez, conlleva a un incremento en los metabolitos de los ácidos grasos (como acilCoAs y diacilglicerol) que interrumpen la señalización de la insulina (Lowell, B.B. and G.I. Shulman, 2005). Evidencia adicional de la importancia de PGC-1 en la regulación metabólica es su papel en la regulación de genes que participan en la gluconeogénesis hepática, como PEPCK y glucosa-6-fosfatasa, y su interacción molecular con agentes diabéticos como los glucocorticoides (Barthel, A. and D. Schmolli, 2003 y Puigserver, P. and B.M. Spiegelman, 2003). Los defectos en la oxidación de combustibles también están involucrados en la secreción afectada de insulina y en los defectos genéticos que causan diabetes.



8.0 PRUEBAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA DM.

Los pacientes con DM2 y con un pobre control glicémico, exhiben incrementos en la glucosilación de las lipoproteínas y de otras proteínas séricas (Lopes-Virella *et al.*, 1996) La diabetes mellitus tipo 2 se asocia con un elevado riesgo cardiovascular, razón por la que ha sido considerada como un equivalente de enfermedad coronaria. En estos pacientes se encuentran comúnmente alteraciones en el perfil de lípidos y lipoproteínas lo que confiere un riesgo cardiovascular excesivo, que puede explicar, junto con la hipertensión arterial, la elevada tasa de mortalidad y morbilidad coronaria.

Proteínas Glucosiladas.

Las proteínas reaccionan espontáneamente en sangre con la glucosa para formar derivados glucosilados. Esta reacción se produce lentamente en condiciones fisiológicas y sin la participación de enzimas. El alcance de la glucosilación de las proteínas está controlado por la concentración de la glucosa en sangre y por el número de grupos amino reactivos presentes en la proteína que están accesibles para que reaccione la glucosa. Todas las proteínas con lugares reactivos pueden estar glucosiladas y la concentración de las proteínas glucadas que pueden medirse en sangre es un marcador de la fluctuación de las concentraciones de la glucosa en la sangre durante cierto período. Desde el punto de vista del diagnóstico clínico tienen interés al tener una vida más prolongada en la sangre, ya que reflejan la exposición de estas proteínas a la glucosa durante períodos más prolongados.

Glucosilación no enzimática de proteínas. Productos finales de glucosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés)

Desde el punto de vista químico la glucosilación se define como: Reacción de grupos amino primarios de aminoácidos, péptidos y proteínas con el grupo carbonilo de los azúcares reductores.

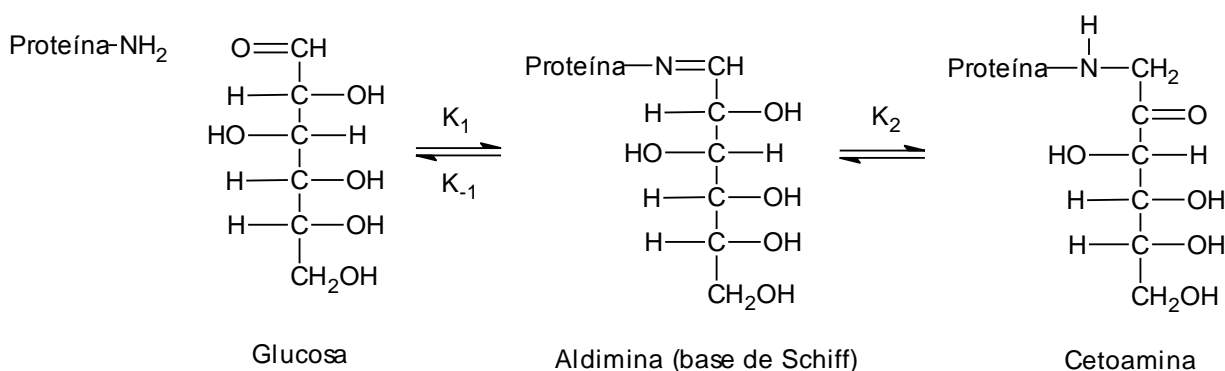
A lo largo de esta reacción se pueden distinguir tres etapas:

- Asociación del azúcar con la proteína, formando una base de Schiff
- La estructura se reordena hacia una forma más estable (denominada producto de Amadori)

- Posteriormente complejas transformaciones hasta la formación de compuestos complejos conocidos como AGEs. Los AGEs son compuestos estables, no se degradan cuando los niveles de glucosa disminuyen

La aparición de estos compuestos está determinada por la concentración de azúcares reductores y el tiempo de exposición de la proteína (vida media de la proteína). En proteínas de recambio rápido, el proceso de glucosilación no enzimática no supera, las etapas iniciales (formación de la base de Schiff y eventualmente del producto de Amadori), mientras que las de vida media larga llegan a formar los productos de glucosilación avanzada.

La relación de la glucosilación no enzimática de proteínas es la siguiente:



8.1 Hemoglobina Glucosilada.

La hemoglobina glucosilada (HbA1c ó A1c) se utiliza para el seguimiento de los pacientes afectados de diabetes, se realiza de 2 a 4 veces por año de una muestra de sangre venosa o por punción de un dedo. En esta prueba se evalúan los niveles de glucosa en sangre de los últimos 2-3 meses pues como se sabe la glucosa puede unirse de manera espontánea a la hemoglobina, sin embargo a una mayor concentración de glucosa en sangre la recurrencia de este proceso será mayor y esta se mantiene unida durante el resto de vida de la hemoglobina (aproximadamente 120 días). La vida de la hemoglobina *in vivo* alcanza una media de 90 a 120 días tiempo durante el cual se forma hemoglobina glicada A y el compuesto cetoamina a partir de la combinación de hemoglobina A y glucosa. Se han aislado varias subfracciones de hemoglobina glucosiladas. De ellas, la fracción HbA1c de la hemoglobina glicada A tiene el máximo interés al actuar como indicador retrospectivo de la concentración media de glucosa en las 8-10 semanas anteriores.

La relación entre la concentración media de glucosa y HbA1c se muestra en la tabla 4.

<u>Prueba de hemoglobina glucosilada</u>	<u>Promedio de glicemias</u>	<u>Calificación</u>
5-6%	80-120 mg/dL.	Excelente
6-7%	120-150 mg/dL.	Muy bueno
7-8%	150-180 mg/dL.	Bueno
8-9%	180-210 mg/dL.	Regular
9-10%	210-240 mg/dL.	Problemático
10-11%	240-270 mg/dL.	Malo

Tabla 4. Promedio de glucemias de acuerdo con el resultado de hemoglobina glucosilada según la Federación Mexicana de Diabetes (FDM).

La hemoglobina glucosilada se expresa como porcentaje, y ADA recomendaba a los pacientes diabéticos mantener unos niveles de HbA1c inferiores al 7%.

No obstante en la DM2 ocurren también alteraciones en el metabolismo de los lípidos (dislipidemia) que se manifiestan por elevaciones en la concentración de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), reducciones en la concentración en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y, elevaciones modestas, aunque en ocasiones marcadas, en la fracción de baja densidad (LDL). También ocurren cambios en la composición de las lipoproteínas características que pueden conferir mayor aterogenicidad a estas partículas. Por lo cual se tiene que llevar un control de estos parámetros mediante un estudio de laboratorio denominado perfil lipídico.

8.2 Perfil lipídico

También denominado lipidograma, es un grupo de pruebas de laboratorio, solicitadas generalmente de manera conjunta, para determinar el estado del metabolismo de los lípidos corporales, comúnmente en suero sanguíneo. La glucosilación de las LDL y formación de LDL modificada u oxidada hace que se disminuya su afinidad por el receptor LDL y se aumente su captación por el receptor (scavenger) en los macrófagos lo que ocasiona un incremento en la síntesis de ésteres de colesterol y su posterior acumulación originándose así, células espumosas con desarrollo de la estría grasa, lo cual inicia el proceso de aterosclerosis a causa del desencadenamiento de una serie de reacciones tales



como: aumento de la quimiotaxis, secreción de citocinas y factores de crecimiento (Lyons, 1992). Las HDL también pueden experimentar glucosilación lo que permite que pierdan su habilidad de captar el colesterol de los tejidos periféricos por deterioro de su capacidad para unirse a receptores y/o de depurar los ésteres de colesterol de los macrófagos (Duell et al., 1991).

El perfil lipídico mide lo siguiente:

- El **colesterol** total, que es la suma de los diferentes tipos de colesterol.
- Las **lipoproteínas de alta densidad (HDL)** colesterol, que suelen recibir el nombre de colesterol "bueno". Las lipoproteínas de alta densidad transportan colesterol al hígado para su eliminación.
- Las **lipoproteínas de baja densidad (LDL)** colesterol, generalmente conocidas como colesterol "malo". Las lipoproteínas LDL que se acumulan en el torrente sanguíneo pueden iniciar el proceso de la formación de ateromas e incrementar el riesgo de afecciones cardíacas.
- Los **triglicéridos (Tg)**, que almacenan energía hasta que el organismo la necesita. Si el cuerpo acumula demasiados triglicéridos, se tiene un factor de riesgo más para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Tabla 5. Rangos normales del perfil químico en ratas.

PERFIL QUIMICO	RATA
Bilirrubina total	0.2-0.6(mg/dl)
Calcio	5.3-13.0(mg/dl)
Colesterol	40-130(mg/dl)
Glucosa	50-135(mg/dl)
Potasio	5.9(mEq/L)
Proteínas totales	5.6-7.6(g/dl)
Albumina	3.8-4.8(g/dl)
Sodio	135-155(mEq/L)
Triglicéridos	26-145(mg/dl)

Tomado de Anatomía Veterinaria: Básica, Comparativa y Clínica, 1993. Ed. El Manual Moderno.



9.0 MODELOS ANIMALES DE DIABETES.

Debido a la compleja interacción entre los múltiples genes susceptibles y entre los factores genéticos y ambientales que intervienen en el desarrollo de la diabetes, el análisis de esta enfermedad es difícil, los modelos animales de diabetes son muy útiles y ofrecen múltiples ventajas en la investigación (Srinivasan K, et al. ,2007).

Los modelos experimentales son herramientas esenciales para comprender la patogénesis, complicaciones y las influencias genéticas y ambientales que incrementan los riesgos de la diabetes además de la evaluación de varios agentes terapéuticos. Muchos de los modelos disponibles se realizan en roedores por su pequeño tamaño, cortos periodos de generación, fácil disponibilidad y consideraciones económicas; sin embargo se requieren modelos en otros animales por razones prácticas y fisiológicas con respecto a los humanos (Srinivasan K, et al. ,2007).

Estos modelos animales exhiben características similares como hiperglucemia, incluyendo los síntomas de esta enfermedad en cada uno de ellos y las alteraciones metabólicas comúnmente observadas en pacientes diabéticos. Además exhiben muchas de las complicaciones de la diabetes en humanos (Srinivasan K, et al. ,2007).

9.1 Tipos de Modelos de DM

En la actualidad existen diferentes modelos animales para el estudio de la DM:

- 1) Animales que *espontáneamente* desarrollan diabetes.
- 2) La dieta con alto contenido en grasas (30-45%), azúcares (sacarosa) u hormonas (e.g. glucagón, hormona del crecimiento, glucocorticoides).
- 3) Los animales en que se *induce la diabetes* de forma química (e.g. STZ o aloxana).
- 4) Animales en los que se *induce la diabetes* por medio de cirugía, reduciendo el tamaño del páncreas.
- 5) Y Manipulación genética: animales transgénicos (Knock-out, el ratón *ob/ob*)(Anexo1).

9.2 Diabetes mellitus tipo 2 espontánea.

Estos modelos se pueden obtener de animales con una o varias mutaciones transmitidas de generación en generación o por selección de entrecruzamiento de animales no diabéticos. Las peculiaridades metabólicas resultan de un sólo gen defectuoso (recesivo o



dominante) o por un origen poligénico. Los animales poligénicos representan más la condición humana porque solo algunos subtipos de diabetes tienen una causa definida (e.g. MODY) lo que es un sólo gen defectuoso lo que representa muy pocos casos (Srinivasan K, et al. ,2007).

9.3 Diabetes mellitus tipo 2 inducida.

La inducción de la DM se ha logrado por medio de diversas técnicas experimentales, tales como manipulaciones dietéticas o nutricionales o quirúrgicas, además de tratamientos con agentes químicos.

9.3.1 Modelos de DM2 inducida con dieta (Sacarosa al 20%)

Como se mencionó anteriormente se empleó una dieta rica en azúcar, debido al elevado consumo de este carbohidrato en todo el mundo.

La sacarosa se usa en los alimentos por su poder endulzante. Al llegar al estómago sufre una hidrólisis ácida y una parte se desdobra en sus componentes glucosa y fructosa (Fig. 9). El resto de sacarosa pasa al intestino delgado, donde la ya mencionada enzima sacarasa la convierte en los dos azúcares. Existen muchas controversias sobre el daño que ocasiona el consumo de sacarosa. Este se relaciona con caries, diabetes, obesidad, aterosclerosis, etc. En realidad la sacarosa es uno de los mejores nutrientes disponibles para el organismo humano. Tiene gran facilidad para su digestión, no genera productos tóxicos durante su metabolismo y además tiene bastante bajo su índice glicémico, lo que significa que al consumir la sacarosa, el nivel de glucosa en la sangre sube de manera relativamente lenta. Pero debido a su sabor agradable el ser humano tiende a un consumo exagerado, lo que raramente se da en la naturaleza. Sin embargo, en la sociedad industrializada, su disponibilidad es alta y su precio bajo, por lo que se sobrepasan con gran facilidad los límites razonables de su consumo. Debido a ello, la sacarosa es limitada en la dieta por razones de salud, ya que a pesar de su índice glicémico bajo, un consumo descontroladamente alto produce una carga glicémica elevada.

Metabolismo de la sacarosa: En los humanos y otros mamíferos, la sacarosa se desdobra en sus dos azúcares monosacáridos constitutivos, glucosa y fructosa, por la acción de las enzimas sacarasa o la isomaltasa (glucosidasas), las cuales están ubicadas en la membrana celular de los microvilli del duodeno (Aguilera A., 2004, y Fukuchi S., 2004). Como resultado, las moléculas de glucosa y fructosa son absorbidas hacia el torrente sanguíneo.

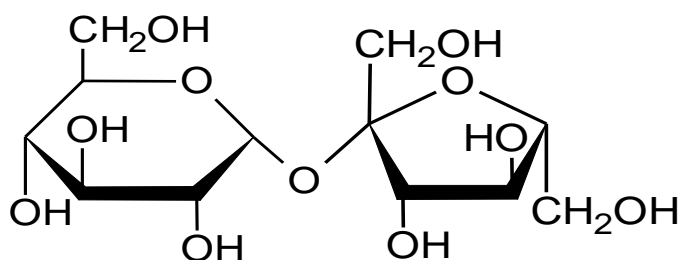


Figura 9. Estructura química de sacarosa o sucrosa.

La sacarosa, como carbohidrato puro contiene 3.94 kilocalorías por gramo, o 17 kilojulios por gramo. Cuando se consumen grandes cantidades de alimentos con sacarosa, nutrientes benéficos pueden desplazarse de la dieta, lo cual contribuye a problemas de salud. Se ha sugerido que la sacarosa contenida en las bebidas (como los refrescos) está relacionada con la obesidad y podría estarlo en la resistencia a la insulina (Aguilera A., 2004). La sacarosa puede contribuir a desarrollar el síndrome metabólico (Fukuchi S., 2004). En un experimento con ratas que fueron alimentadas con una dieta en la que un tercio de su alimento era sacarosa mostraron primero elevados niveles de triglicéridos, lo que generó grasa visceral seguido de resistencia a la insulina (Aguilera A., 2004). Otro estudio en ratas encontró que una dieta rica en sacarosa desarrolló hipertrigliceridemia, hiperglucemia y resistencia a la insulina (Lombardo YB., 1996).

Además del daño provocado por la fructosa (componente de la sacarosa) el cual es un azúcar altamente lipogénica que tiene profundos efectos metabólicos en el hígado y se ha asociado con muchos de los componentes del síndrome metabólico (resistencia a la insulina, la circunferencia de cintura elevada, dislipidemia e hipertensión). La evidencia reciente también ha descubierto efectos de la fructosa en otros tejidos, incluyendo el tejido adiposo, el



cerebro y el sistema gastrointestinal, que puede proporcionar una nueva visión de las consecuencias metabólicas de concentraciones altas de fructosa en dietas (Lombardo YB., 2004).

Un flujo elevado de fructosa en el hígado, el principal órgano capaz de metabolizar este hidrato de carbono simple, perturba el metabolismo de la glucosa y las vías de captación de glucosa, y conduce a una tasa significativamente mayor *de novo* lipogénesis y de la síntesis de triglicéridos (TG), impulsado por el alto flujo de glicerol y las porciones de acilo de moléculas de TG del catabolismo de la fructosa. Estos trastornos metabólicos parecen subyacer a la inducción de la resistencia a la insulina se observa comúnmente con la alimentación de alta fructosa en humanos y en modelos animales. La fructosa en estados inducidos resistentes a la insulina se caracteriza comúnmente por un dislipidemia metabólica profunda, que parece resultar de la sobreproducción hepática e intestinal de las partículas de lipoproteínas aterogénicas. Así, la evidencia emergente de recientes estudios epidemiológicos y bioquímicos sugiere claramente que la alta ingesta de fructosa se ha convertido rápidamente en un importante factor causal en el desarrollo del síndrome metabólico (Fukuchi S, 2004).

9.3.2 Modelos de DM2 inducida químicamente.

Estos modelos son comunes en la aclaración del posible papel de los factores ambientales relacionados en la destrucción del páncreas endocrino y el subsecuente desarrollo de la diabetes, durante y después de la inducción (Esquivel J, 2007 ; Srinivasan K, et al. ,2007). Los agentes más usados son el aloxana, y estreptozotocina (STZ) (Ress D, et al.,2005; Esquivel J, 2007; Srinivasan K, et al. ,2007). (Fig.10), otros agentes son vaxor, ditizona y 8-hidroxiquinolina.

La STZ como agente inductor de la DM en animales se explica a continuación.

9.3.2.1 Estreptozotocina (STZ)

La STZ, 2-deoxi-2-(((metilnitrosoamino)carbonil)amino)-D.glucopiranos, es un antibiótico N-metilnitrosamino) extraído de *Streptomyces achromogenes* (Herr R, et al., 1959; Lewis R.,2000; Srivastava L, et al , 1982). La STZ al igual que la aloxana, produce hiperglucemia por citotoxicidad directa sobre las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans (Sax I, et al., 1998).



de glucosa (GLUT2) (Takada J, et al.,2007).La fracción nitrosourea es la responsable de la toxicidad de las células β pancreáticas (Srinivasan K, et al. ,2007). Se sabe que el fármaco inhibe la síntesis de ADN, interfiere al igual que enzimas que participan en la gluconeogénesis (Redpoll, 2012), además produce un incremento de la actividad de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (Takada J, et al., 2007) que produce una disminución del NAD conduciendo a una falta de energía celular. Parte de su actividad se debe a la formación de iones metilcarbonio, que alquilan o se unen con algunas moléculas intracelulares incluyendo ácidos nucleicos inhibiendo la síntesis de ADN (Srinivasan K, et al. ,2007 ;Takada J, et al.,2007).La STZ produce tres fases en los niveles de azúcar en la sangre: un incremento inicial, alcanzando valores de 150-200 mg/dL después de 3h, posiblemente debido a la glucogenólisis o a un incremento en los ácidos grasos libres, secundarios a la reducción en la insulina circulante. Seis a ocho horas después se presenta una profunda hipoglucemia resultado de una liberación endógena de insulina por la degeneración de las células β , y finalmente un estado diabético irreversible de 24 horas después de la inyección (Srinivasan K, et al. ,2007). Además presenta algunas ventajas con respecto al aloxana tales como vida media relativamente mayor, sosteniendo la hiperglucemia por más tiempo y el desarrollo bien caracterizado de las complicaciones de la diabetes con pocas incidencias a cetosis así como mortalidad (Srinivasan K, et al. ,2007). La dosis para la inducción a la diabetes depende de la especie. Se ha observado una variación en la dosis de 25 a 200 mg/kg, aunque una sola dosis i.v. de 50 mg/kg reporta 100% de inducción en muchos animales. En ratas la dosis para inducir diabetes puede ser de 35 a 65 mg/kg (i.v. o i.p.)(Srinivasan K, et al. ,2007). Una dosis de 50 mg/kg de STZ produce severa hiperglucemia sin cetosis y altas dosis (75-150 mg/kg) produce diabetes con cetosis (Herr R, et al. 1959).

9.3.2.1.4 Usos de STZ

La STZ posee cuatro tipos distintos de actividad biológica: antibiótico, antitumoral, productor de cáncer y agente diabetogénico (Herr R, et al. 1959; Esquivel J., 2007;Srinivasan K, et al. ,2007).

9.3.2.2. **Modelo de DM2 inducida con NA-STZ (Nicotinamida-Estreptozotocina)**

El modelo animal de DM2 inducida químicamente con STZ (60mg) y 230 mg de NA fue descrito por Masiello *et al.* (1998) y es útil para el estudio del tratamiento de DM2, debido a que comparte varias características con esta enfermedad; produce una hiperglucemia moderada estable, intolerancia a la glucosa, secreción de insulina estimulada por glucosa.

Las ventajas de este modelo que nosotros empleamos fueron las siguientes: 1) Lesiona solamente a las células β pancreáticas quedando intactas las células pancreáticas α y δ . La secreción residual de insulina (40%) hace que el animal no requiera de manera exógena la insulina. 3) La mortalidad de las ratas relativamente escasa (alto porcentaje de animales vivos con diabetes como resultado). Y comparativamente con otros, este modelo es más económico, fácil de establecer y es el más utilizado para inducir diabetes (Srinivasan y Ramarao, 2007). 4) Los valores normales de glucosa en plasma son semejantes a los humanos (90-115mg/dL). 5) Es el modelo animal más común de diabetes y los resultados pueden ser comparados con muchos otros estudios (Masiello *et al.* 1998). Por todas estas ventajas este modelo es base del presente proyecto de tesis, ya que en él se logra obtener el modelo animal de rata hiperglucémica. Y su fundamento consiste en la protección de las células beta del páncreas con nicotinamida (NA) (Fig.11) y la posterior destrucción química de las mismas con STZ. La NA se emplea para evitar destrucción total de células beta, ya que la STZ produce insulinitis pancreática por la destrucción progresiva de las células beta en la rata (Amaya-Chávez *et al.*, 2007).

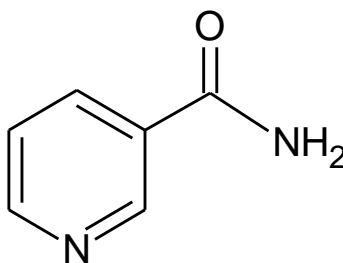


Figura 11. Estructura química de la nicotinamida (piridina-3-carboxamida)
Otros nombres: niacinamida, nicotinamida, nicotínico de amida de ácido y vitamina PP.



9.3.2.2.1 NICOTINAMIDA y

9.3.2.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN

La nicotinamida (NA) posee una estructura molecular que le brinda propiedades semejantes a los antioxidantes dado que actúa como agente secuestrante de radicales libres, por lo tanto, en este modelo se pretende que la STZ sea responsable del deterioro de las células beta de la rata, es decir, de su condición de hiperglucemia, mientras que la nicotinamida, impida la destrucción de las células beta, alcanzando una hiperglucemia moderada, y de ese modo, ayudando al estudio de diabetes mellitus (Amaya-Chávez et al., 2007).

El modelo que usamos fue validado por Masiello et al. (1998), quienes probaron diferentes dosis de NA (200-350 mg/kg) en ratas Wistar de 3 meses de edad (250-300g). Estudios implementados en el grupo de trabajo del Dr. Andrade-Cetto en el laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias, han comprobado que la aplicación de 150mg/Kg de NA administrada intraperitonealmente 15 minutos antes de la administración de STZ (65 mg/Kg), proporcionan una hiperglucemia en ayuno moderado, óptimo para la implementación en un modelo crónico en las condiciones del bioterio de la Facultad de Ciencias.

9.3.2.2.3 Usos de NA

La NA se emplea en la ansiedad, Alzheimer y Cáncer. Además de ser usado como aditivo alimentario, en cosméticos y medicamentos (Masiello *et al.*, 1998 y Fu-Li Xiang, 2010).

9.4 Diabetes Mellitus tipo 2 inducida quirúrgicamente.

Consiste en una pancreotomía completa o parcial para la inducción de la diabetes tipo 1 o tipo 2 respectivamente (Srinivasan K, et al., 2007).

9.5 Diabetes Mellitus tipo 2 por manipulación genética:

Al modificar genes específicos con técnicas de biología molecular permite generar modelos de animales útiles para el estudio de la DM y producir ratones que sobreexpresen o carezcan de una proteína determinada que se sospeche juegue algún papel importante en el metabolismo de la glucosa (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).



10.0 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

La evidencia clínica de estudios llevados a cabo en animales con dietas ricas en carbohidratos, específicamente de altas concentraciones de azúcares refinados, se ha encontrado asociado al aumento de factores de riesgo para el desarrollo de Resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus. Aguilera G. y colaboradores (2004) reportaron que en una dieta rica en sacarosa produce un síndrome metabólico acompañado de incremento de peso, insulina sérica, triglicéridos y colesterol en una dieta al 30%. Por otra parte, también existen reportes que citan, que dietas menores al 10% de sacarosa (Nichidai, 1990) generan alteración en la presión arterial.

Los antecedentes nos motivan promover el desarrollo de un modelo experimental con sacarosa tanto en ejemplares sanos como inducidos químicamente por NA-STZ a una concentración de sacarosa del 20%.

Planteamiento del problema:

La DM como entidad fisiopatológica tiene como consecuencia una elevación anormal de glucemia aún después de cargas de glucosa en ayuno, lo que deriva en la secreción de insulina en forma compensatoria en mayor demanda (Myers, 2003). Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo elevado de sacarosa (30%) y moderado (10%) aumenta el riesgo de padecer diabetes. El presente estudio tiene la finalidad de obtener un modelo experimental de DM en ratas, factible de reproducir en el laboratorio, mediante el empleo de ratas normoglucémicas e inducidas que consuman una dieta rica en azúcar (sacarosa) y que presente las características de hiperglucemia crónica, resistencia y falta de producción de insulina.

Pregunta de investigación:

¿La administración crónica de sacarosa al 20% en ratas Wistar sanas y con Diabetes Mellitus experimental, puede aumentar los niveles de glucosa e insulina?

11.0 OBJETIVOS

11.1 *Objetivo general:*

Establecer un modelo experimental animal para el estudio de diabetes crónica, que presente las características de resistencia y alteración de a la insulina además de hiperglucemia moderada.

11.2 *Objetivos Particulares:*

1. Generar un modelo experimental de DM2, inducido químicamente por NA-STZ en ratas Wistar.
2. Evaluar si el consumo crónico de sacarosa (al 20%) modifica los valores de glucosa en ayuno en ratas normoglucémicas y ratas diabéticas inducidas químicamente (NA-STZ)
3. Evaluar si la administración crónica de sacarosa modifica las curvas de tolerancia de glucosa en ayuno en ratas tratadas con sacarosa e inducidas químicamente.
4. Evaluar los niveles de insulina como respuesta a la tolerancia a la glucosa en ratas tratadas con sacarosa e inducidas por NA-STZ.
5. Comparar los parámetros bioquímicos de Hemoglobina glucosilada (HbA1c), glucosa, triglicéridos (tg), colesterol y lipoproteína de alta densidad (LDH), tanto en animales control, como animales experimentales tratados con sacarosa e inducidos químicamente.
6. Comparar el peso en relación a la ingesta de sacarosa en ratas sin inducción química e inducida por NA-STZ.

11.3 Hipótesis: La administración crónica de la sacarosa aumenta los niveles de glucosa en la sangre por lo que se espera que modifique también los niveles de insulina en ratas normoglucémicas y con diabetes mellitus experimental (NA-STZ).



12.0 MATERIAL Y METODOLOGÍA

12.1 Material

MATERIAL BIOLÓGICO: Animales de experimentación (material biológico):

- Ratas de la cepa Wistar, machos y hembras, de 30 días de nacidas provistas por el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Mantenido en condiciones controladas de temperatura (25°C) y humedad (55%), en un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (12:12) y acceso a alimento (Purina; Rodent Laboratory Chow 5001) y agua *ad libitum*. Cada animal se colocó en cajas de plástico (25x 30x 35cm) con cama de aserrín, las cuales fueron etiquetadas de acuerdo al grupo de experimentación.

12.1.1 Reactivos

- Agua desionizada.
- Agua destilada
- Amortiguador de acetatos 0.1 M pH=4.5
- Ácido cítrico (J.T. Baker)
- Acetato de sodio (J.T. Baker Lot. Y19C33)
- Estreptozotocina (STZ), (Sigma Life Science SO130-1G Lot. #031MI287V.)
- Glucosa Anhidra. (TeciQuim CAS#50-99-7)
- Nicotinamida (NAD)(Sigma, Aldrich, Co. 3050, Batch # 018K0107 N3376-100G)
- Metanol (J.T. Baker B30 C58)
- Rat/Mouse insulin ELISA kit (Millipore corporation cat#. EZRMI-13K)
- Solución salina 0.9 % (Pisa® D082886)
- Sacarosa(TeciQuim CAS# CAS 57-50-1)



- Kit de Elisa
 - a. Plato de ELISA Rat/Mouse Insulin(Anticuerpo de Ratón monoclonal anti-rat insulin)
 - b. Sellador adhesivo para el plato (Sealer Adhesive Plate)
 - c. Buffer concentrado (10X HRP 50nM de Tris Buffered Salina y Tween 20)
 - d. Rat/ Mouse Insulin Standards (estándares de insulina 0.2,0.5,1,2,5 y 10 ng/mL)
 - e. Rat/ Mouse Insulin Quality Control 1 and 2 (Control 1: QC1 RMI-113 0.71-1.48 ng/mL y Control 2: QC RMI 213 2.3-4.8 ng/mL)
 - f. Matrix Solution (Charcoal stripped pooled mouse serum: carbon desnudo combinado con suero de ratón)
 - g. Assay Buffer (Buffer 1: 0.05M fosfatos, pH 7.4 con 0.025M EDTA, 0.08% azida de sodio y 1% BSA)
 - h. Rat/ Mouse Insulin Deteccion Antibody (Anticuerpo de insulina pretitulado)
 - i. Enzyme Solución (pretitulado destreptavidin- peroxidasa de rábano)
 - j. Substrate (Sensible a la luz: 3,3',5,5'- tetrametilbencidina)
 - k. Stop solution (0.3 M HCl)

12.1.2 Equipo e instrumentos:

- Agitador magnético con placa de calentamiento (Bande, C-MAG HS 4 IKA®MAG)
- Balanza Analítica
- Balanza Granataria
- CardioChek™ analizador(Polymer Technology Systems, Inc.)
- Microcentrífuga (Microfuge 18, Beckman Coulter)
- Glucómetro Accutrend® (Roche)
- Potenciómetro
- Siemens/Bayer DCA2000+Analyzer
- Stat Fax 3200® Microplate Reader (Awareness Technology, Inc.)
- Stat Fax 2600® Plus Microplate Washer (Awareness Technology, Inc.)
- Stat Fax 2200® Incubator/ Shaker (Awareness Technology, Inc.)
- Refrigerador y ultracongelador (REVCO)

**12.1.3 Material diverso:**

- Agitador magnético
- Bata
- 20 Bebederos con punta de acero inoxidable.
- Capilares para toma de muestra y aplicadores.
- Campo (tela de algodón)
- Cronómetro
- Espátula de metal
- Guantes de nitrilo
- Tijeras
- Tijeras de disección.
- Micropipetas con puntas de 10 μ L - 100 μ L.
- Micropipeta multicanal: 50 μ L ~ 300 μ L
- Mertiolate
- Desinfectante
- Nave de pesado (Pyrex®)
- 20 Cajas contenedoras de acrílico con rejilla (Tecniplast)
- 1 Sonda pequeña para administración esofágica miltex
- 1 Jeringa de 1mL
- Jeringas para insulina 0.3mL
- Tiras reactivas para la determinación de glucosa (Accutrend, Roche)
- Tiras reactivas PST PANELS Glucosa Test Strips(CardioCheck™ Brand Analyzers)
- 30 Tubos eppendorf
- 1 Frascos ámbar de 250 mL
- 1 Frasco ámbar de 15mL
- 4 Vasos de precipitado de 10mL (Pyrex)
- Pipeta graduada de 5mL
- Pipeta volumétrica de 0.1mL
- Pipeta volumétrica de 1mL
- Recipientes para reactivos.

12.3 Metodología.

Se emplearon 20 ratas Wistar hembras y macho debido a que actualmente las ratas son uno de los animales de mayor preferencia para las intervenciones experimentales en la DM, porque es fácilmente manipulable por su alta capacidad de reproducción. Además, dicho mamífero comparte los niveles de glucemia similares al del humano (Shafrir, 1999).

Se formaron 4 grupos integrados por 5 animales cada uno: Grupo Control, Grupo Sucrosa, Grupo NA-STZ y Grupo NA-STZ-SUC. Mensualmente se llevó a cabo la toma de los valores de glucosa (glu) y peso, los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c), colesterol (Col), lipoproteína de alta densidad (HDL) y triglicéridos (Tg) se monitorearon cada dos meses por un periodo de 5 meses. A continuación se presenta la descripción de los grupos de experimentación propuestos en el diseño experimental (Tabla 6).

Tabla 6. Manejo de los 4 grupos de experimentación.

Grupo de experimentación:	Características ¹ :
1. Grupo Control	Ratas normoglucémicas con dieta normal y acceso libre agua simple.
2. Grupo Sucrosa	Ratas con dieta normal y acceso al agua con dosis de sacarosa al 20%.
3. Grupo NA-STZ.	Ratas con dieta normal y acceso libre al agua e inyectadas después de 2 meses de nacidas con una dosis de NA (150mg/Kg) vía i.p. y 15 minutos después STZ (65mg/Kg) i.p.
4. Grupo NA-STZ-SUC.	Ratas con dieta normal y acceso al agua con dosis de sacarosa al 20% e inyectadas después de 2 meses de nacidas con una dosis de NA (150mg/Kg) vía i.p. y 15 minutos después STZ (65mg/Kg) vía i.p.

¹Ratas de la cepa Wistar proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM, mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad.

12.3.1 Criterios de selección:

12.3.1.1 Criterios de inclusión:

Los animales utilizados para el desarrollo del presente trabajo fueron ratas hembras y machos de la variedad Wistar, normoglucémicas y con un peso en el rango de 150-200 gramos; con acceso *ad libitum* de agua y alimento, con un fotoperiodo de bioterio 12:12 luz y oscuridad.



12.3.1.2 Criterios de exclusión.

Peso inferior a 150 gramos.

Peso superior a 200 gramos.

Ratas pertenecientes a otra variedad.

Ratas estresadas durante las pruebas a realizar.

12.3.1.3 Criterios de eliminación.

Presencia de otitis, neumonía u otra enfermedad concomitante que afecte los niveles de glucemia.

12.3.2 Inducción de diabetes experimental con agentes químicos (NA-STZ):

Para inducir hiperglucemia moderada en las ratas, se utilizó el modelo NA-STZ propuesto por Masiello *et al.* (1998). Se emplearon 20 ratas de 2 meses de edad, (entre 150-200 mg/kg de peso corporal) y se dejaron en ayuno de 10 horas; posteriormente se les midió la concentración de glucosa en sangre. Que se considera el nivel basal en ratas sanas y se aplicó una dosis de 150 mg/kg de nicotinamida (NA) diluida en 0.1 mL de solución salina 0.9% , vía i.p. Transcurridos 15 minutos se administró una dosis de 65 mg/kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en buffer de citratos con un pH de 4.5 para la inducción del modelo vía i.p. Después de inyectarlas se dejaron 1 hora a observación y posteriormente se llevaron al bioterio dejándolas con libre acceso a agua y alimento. Transcurridas 24 horas posteriores a la inyección, se determinaron los niveles de glucosa plasmática durante 7 días para saber cómo reaccionaban ante la inducción y las ratas que mostraron niveles de glucosa en plasma ≥ 170 mg/dl, se consideraron diabéticas y fueron incluidas dentro del diseño experimental para el modelo diabético.

Al finalizar la agrupación de los 4 grupos de experimentación y llevar sus respectivos tratamientos y parámetros obtenidos por un periodo de 5 meses, se realizaron Curvas de tolerancia a la glucosa y Elisa en sándwich (Diagrama 1).

12.3.3 Inducción de diabetes experimental con dieta rica en Sacarosa.

El modelo establecido a partir de la administración de una dieta rica en sacarosa. Fue inducido en 2 de los grupos de experimentación los cuales corresponden al grupo 2 (Sucrosa) y al grupo 4 (NA-STZ-SUC). La dieta rica en sacarosa al 20% consiste en pesar 40 gramos del azúcar disuelto en 200 mL de agua depositada en los respectivos bebederos durante un periodo de inducción de 5 meses.

La razón por la cual la dieta en sacarosa estuvo en forma líquida se debe principalmente a simular las bebidas azucaradas que consume el humano en grandes cantidades, y a las cuales se les han asociado con la obesidad (Isharwal S. et al., 2009); además de asegurar que el animal ingiera la dieta de sacarosa de manera constante.

12.3.4 Curvas de tolerancia a la glucosa (Oral Glucose Tolerance Tests “OGTT”).

Es una prueba dinámica que sirve para diagnosticar intolerancia a la glucosa y DM2. La prueba refleja la capacidad que tiene el organismo para eliminar el exceso de glucosa en sangre, y en el caso particular de los organismos con DM2 ésta capacidad se encuentra disminuida por lo tanto, los niveles de glucosa en sangre son más altos respecto a las ratas normales. Así la prueba proporciona información adecuada acerca de la tolerancia a la glucosa.

Obtención de los niveles de glucemia.

Con un ayuno de 10- 12 horas se obtiene de las ratas Wistar una muestra de sangre de la vena caudal, la cual no posee muchas terminaciones nerviosas (para evitar el sufrimiento del animal.) con el fin de determinar los niveles de glucemia (concentración de glucosa en la sangre). Se registran los valores de glucosa medidos con el glucómetro (equipo semiclínico) Accutrent® y Cardio Chek® (tiempo 0, antes de la carga de glucosa) a continuación se les administra una carga de glucosa anhidra (2g/Kg) diluida en 1.5 mL de Solución salina (NaCl 0.9%) vía oral, mediante una sonda gastroesofágica, para asegurar que el líquido llegue hasta el tracto digestivo de la rata. Y 30 minutos posterior a la carga de glucosa se toma la segunda muestra de sangre, se repite el mismo paso hasta llegar al minuto 120. Con los datos de ésta prueba se construye la curva de tolerancia a la glucosa en ratas, que consiste en la cuantificación de la glucosa basal y a los 30, 60,90 y 120 minutos. En todo momento evitar estresar a las ratas.



Finalmente se obtiene la media de cada tiempo en cada grupo y se grafican los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) vs tiempo (min) los cuales representan una curva de tolerancia a la glucosa. Posteriormente se cuantificaron los niveles de insulina mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas conocido como ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

12.3.5 Técnica de ELISA.

Fundamento de la técnica: el ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. En el presente trabajo se realizó ELISA en sándwich de los 4 tipos de ELISA (ver anexo 3) debido a que presenta una gran especificidad y alta sensibilidad (esto se debe a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo).

Procedimiento: Al realizar las OGTT se extrae una muestra de sangre de cada tiempo (aprox. 40µL) se etiqueta el contenedor con el número de muestra, el grupo de experimentación y la fecha en un tubo eppendorf, se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min al finalizar se guardan las muestras en REVCO para posteriormente realizar dicha técnica.

Procedimiento:

Sacar del refrigerador el Kit de ELISA y las muestras previamente almacenadas, abrir y dejar a temperatura ambiente 15 minutos de empezar.

1. Diluir los dos frascos de buffer concentrado (10X HRP 50nM de Tris Buffered Salina y Tween 20) en 900mL de Agua deionizada. Y vaciar en la botella que indica Buffer de Lavado del equipo Stat Fax 2600 ® Plus Microplate Washer.
2. Lavar 3 veces los pozos de la placa con 300mL de buffer de lavado, decantar y eliminar la cantidad residual de todos los pozos (No dejar secar los pocillos antes de proceder al siguiente paso).



3. Añadir 10 μ L de Buffer de Ensayo (Buffer 1) en los pozos de blanco (A1 y B1) y cada uno de las muestras (C3-H12). Como indica el diagrama 2.
4. Añadir 10 μ L de solución matriz a los pozos, blancos, estándares y control.
5. Añadir por duplicado 10 μ L los estándares de insulina de rata en el orden ascendente de concentración a los pocillos apropiados.
6. Añadir 10 μ L QC1 y 10 μ L QC2 en los pocillos correspondientes.
7. Añadir secuencialmente 10 μ L de suero de las muestras por duplicado a los pocillos restantes.
8. Añadir 80 μ L de anticuerpos de detección a todos los pocillos. Para obtener el mejor resultado las adiciones no deben de tardarse. Cubrir la placa con el sellador e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas en el Stat Fax 2200® Incubator/ Shaker.
9. Quitar sellador de placas y decantar las soluciones de la placa.
10. Lavar los pocillos 3 veces con buffer de lavado diluido, 300 μ L por pozo y lavado. Decantar después de cada lavado para eliminar buffer residual.
11. Añadir 100 μ L de solución de enzima a cada pocillo. Cubrir la placa con el sellador e incube con agitación moderada a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre la placa de microtitulación.
12. Quitar el sellador y decantar las soluciones de la placa.
13. Lavar los pozos 6 veces con buffer de lavado diluido, 300 μ L por pocillo y por lavado. Decantar.
14. Apagar las luces del cuarto y evitar cualquier exposición de la misma durante este paso. Añadir 100 μ L de solución de sustrato a cada pocillo, cubrir la placa con el sellador y agitar en el agitador de placas de 5 a 20 minutos. Se observara el color azul el cual es proporcional al incremento de la concentración de insulina presente.
15. Retirar el sellador y añadir 100 μ L de solución stop y agitar la placa. El color azul debe convertirse en amarillo después de la acidificación. Leer la absorbancia en el lector de microplatos Stat Fax 3200® a 450 nm y 590 nm dentro de 5 minutos y asegurarse que no hay burbujas de aire. Anotar las absorbancia. (Diagrama 4)

Todo se realizó como indica el manual del Kit ELISA Rat/ Mouse Insulin (MILLIPORE® cat.# EZRMI-13K) . Ver diagrama 3 y 4.

12.3.6 HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance).

El índice HOMA descrito por Turner y perfeccionado por Matthews et al. En 1985, se emplea como medida de RI (resistencia a la insulina) y simplifica el procedimiento matemático asumiendo una relación simple en el feedback glucosa-insulina.

La evaluación del modelo homeostático (HOMA) es un método utilizado para cuantificar la RI además de ser el método más utilizado para diagnosticarla en la población. Se deriva de la interacción entre la función celular β y la sensibilidad a la insulina en un modelo matemático donde se utilizan las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno. El modelo se calibra con una función celular β de 100% y una resistencia a la insulina normal de 1 de acuerdo con la siguiente fórmula:

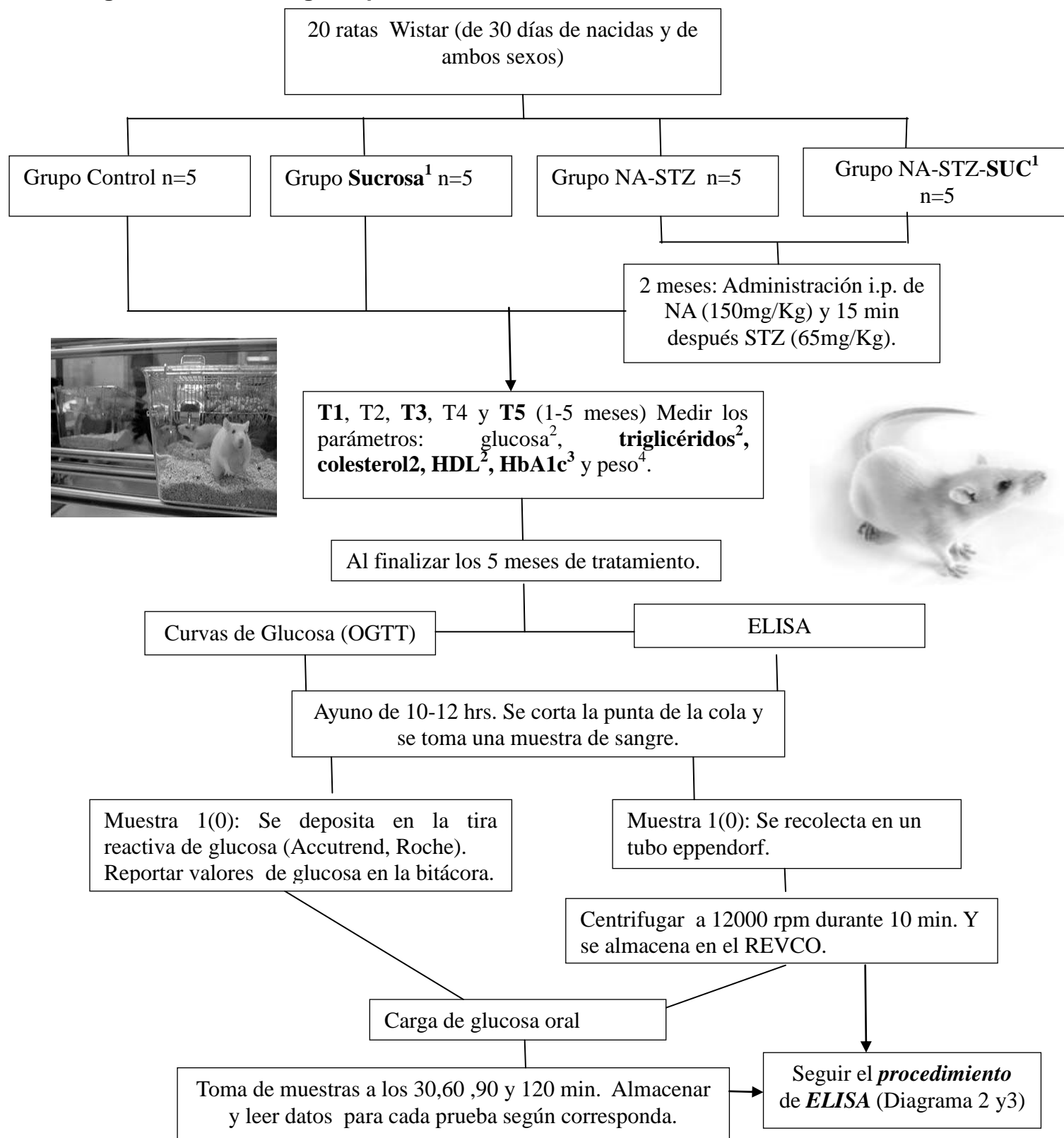
$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina plasmática } (\mu\text{U}/\text{ml}) * \text{glucosa plasmática } (\text{mmol}/\text{L})] / 22.5$$

El índice HOMA-IR es un procedimiento simple, poco invasivo, y que permite, mediante una fórmula validada y bien establecida, precisar un valor numérico expresivo de resistencia insulínica (RI).

Los valores superiores a 3 del índice HOMA-IR indican el 90% de presentar resistencia a la insulina.

12.4 Análisis estadístico

El número de animales fue de 5 por grupo (20 animales en total) para este estudio y los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de cada mes durante un lapso de 5 meses con respecto a los parámetros de Glucosa (Glu), Triglicéridos (Tg), Colesterol, Lipoproteína de alta densidad (HDL), Hemoglobina glucosilada (HbA1c) y peso. Posteriormente se realizaron las pruebas de tolerancia a glucosa oral (OGTT), y la cuantificación de los niveles de insulina (ELISA) al terminar el periodo experimental incluyendo el índice HOMA-IR. Se aplicó la prueba estadística t de "Student" para comparar las muestras en los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 contra el control. Para todos los resultados obtenidos se tomó como nivel de significancia estadística un valor de $p \leq 0.05$.

Diagrama 1. Metodología experimental.

¹Administración de Sacarosa al 20% en su bebedero (vía oral).

² Cardio Check © y Accutrend, Roche

³ Siemens/Bayer DCA2000-Analizer

Diagrama 2. Esquema general de ELISA en sándwich.

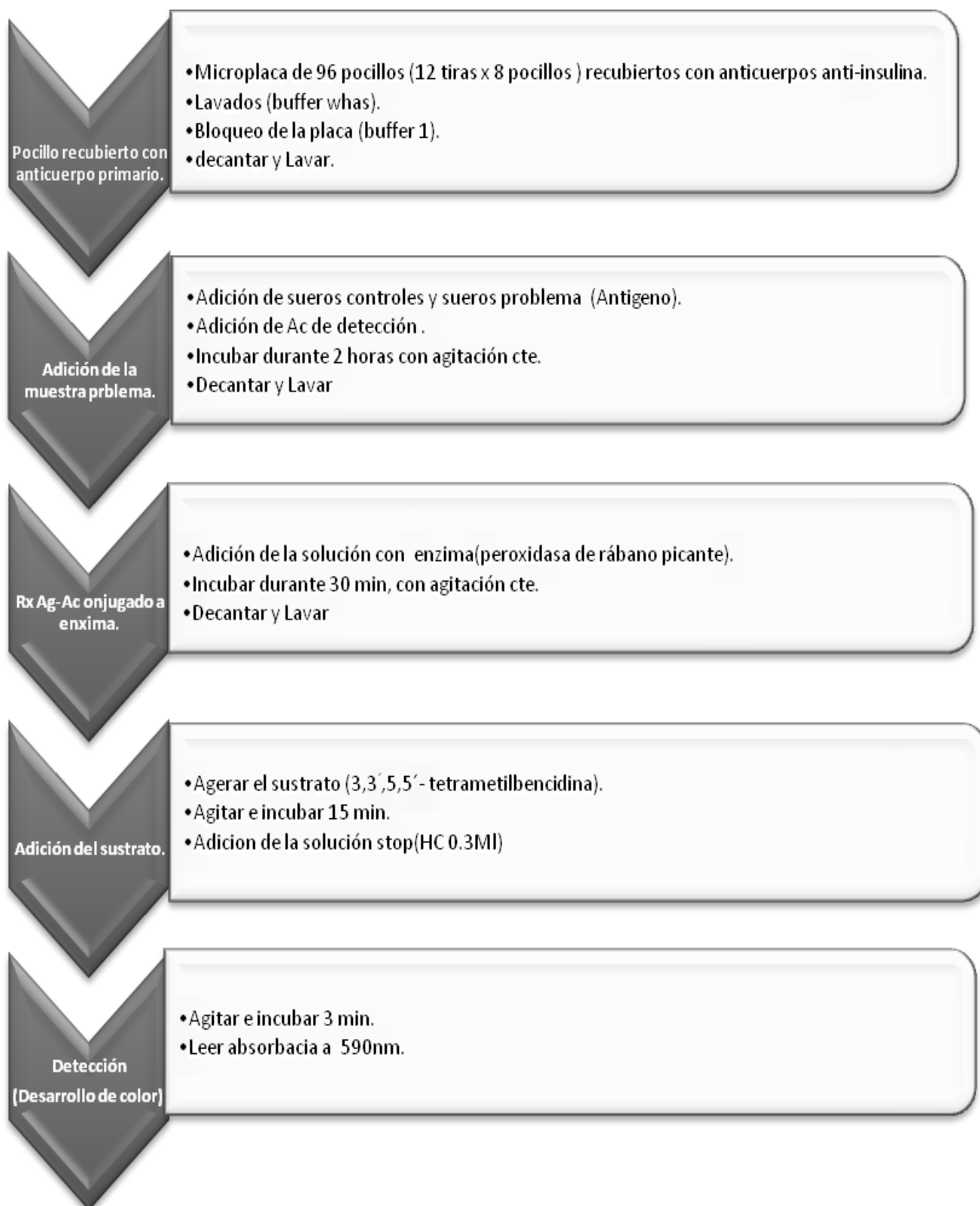




Diagrama 3. Llenado del Plato de ELISA (Placa de microtitulación)

↑	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	2 ng/mL	QC2	Control1 T90	Control2 T60	Control3 T30	Sucrosa1 T0	Sucrosa1 T120	Sucrosa2 T90	Sucrosa3 T60	STZNAD1 T30	STZSUC1 T0
B	Blanco	2 ng/mL	QC2	Control1 T90	Control2 T60	Control3 T30	Sucrosa1 T0	Sucrosa1 T120	Sucrosa2 T90	Sucrosa3 T60	STZNAD1 T30	STZSUC1 T0
C	0.2 ng/mL	5 ng/mL	Control1 T0	Control1 T120	Control2 T90	Control3 T60	Sucrosa1 T30	Sucrosa2 T0	Sucrosa2 T120	Sucrosa3 T90	STZNAD1 T60	STZSUC1 T30
D	0.2 ng/mL	5 ng/mL	Control1 T0	Control1 T120	Control2 T90	Control3 T60	Sucrosa1 T30	Sucrosa2 T0	Sucrosa2 T120	Sucrosa3 T90	STZNAD1 T60	STZSUC1 T30
E	0.5 ng/mL	10 ng/mL	Control1 T30	Control2 T0	Control2 T120	Control3 T90	Sucrosa1 T60	Sucrosa2 T30	Sucrosa3 T0	Sucrosa3 T120	STZNAD1 T90	STZSUC1 T60
F	0.5 ng/mL	10 ng/mL	Control1 T30	Control2 T0	Control2 T120	Control3 T90	Sucrosa1 T60	Sucrosa2 T30	Sucrosa3 T0	Sucrosa3 T120	STZNAD1 T90	STZSUC1 T60
G	1 ng/mL	QC1	Control1 T60	Control2 T30	Control3 T0	Control3 T120	Sucrosa1 T90	Sucrosa2 T60	Sucrosa3 T30	STZNAD1 T0	STZNAD1 T120	STZSUC1 T90
H	1 ng/mL	QC1	Control1 T60	Control2 T30	Control3 T0	Control3 T120	Sucrosa1 T90	Sucrosa2 T60	Sucrosa3 T30	STZNAD1 T0	STZNAD1 T120	Etc.....

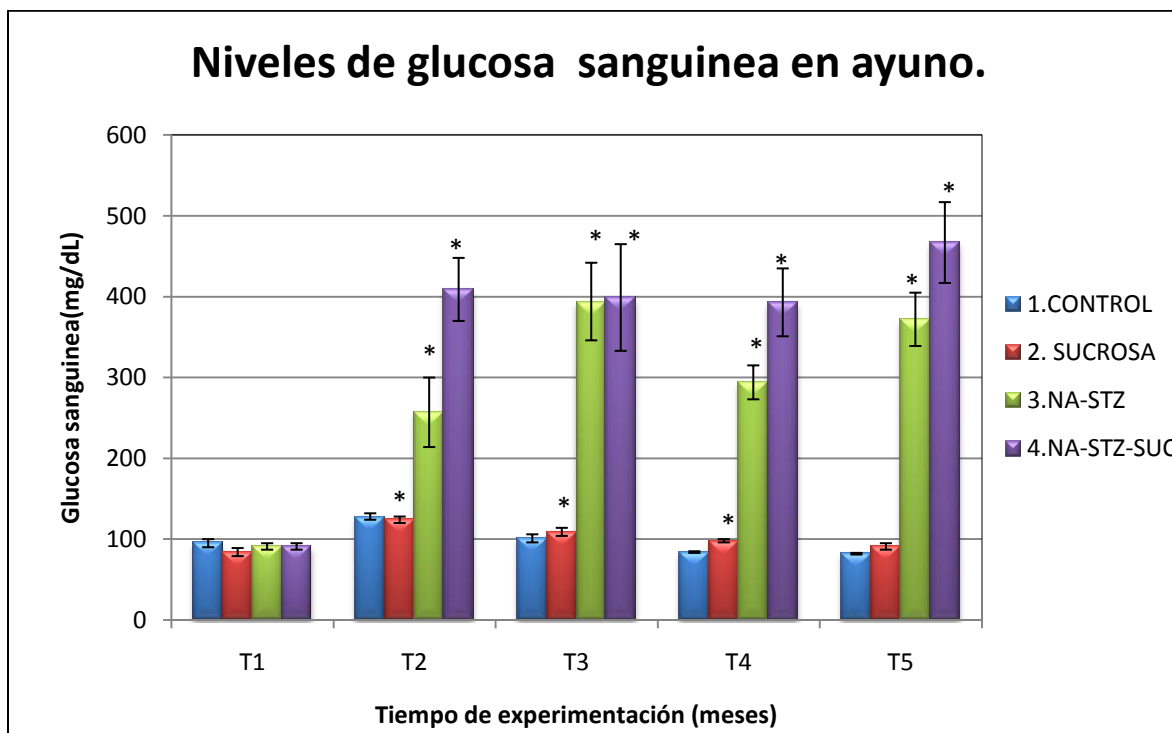
Diagrama 4. Procedimiento para detectar los niveles de insulina mediante el kit de ELISA (cat#. EZRMI-13K)

No. Pozo	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5-7	Paso 8	Paso 8-10	Paso 11	Paso 11-13	Paso 14	Paso 14	Paso 15	Paso 15	
A1,B1	Diluir cada buffer de lavado (50mL) En 450mL en agua ionizada (1:9)	Lavar 3 veces cada pozo del kit con 300 µL de buffer 1 (preparado) y secar.	Buffer 1.	Solución matriz	Estándares/ Controles/ Muestras.	Detección Ab (anticuerpo)	Agitar e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente .Después lavar 3 veces con 300 µL de Buffer 2.	Solución con enzima.	Agitar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar 6 veces con 300 µL de Buffer 2.	Sustrato.	Agitar e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.	Solución Stop	Leer absorbancia a 450 nm y 590 nm.	
C1,D1			10µL	10µL	-----	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL
E1,F1			-----	10µL	10µL de estándar 0.2 ng/mL	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL
G1,H1			-----	10µL	10µL de estándar 0.5 ng/mL	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL
A2,B2			-----	10µL	10µL de estándar 1 ng/mL	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL
C2,D2			-----	10µL	10µL de estándar 2 ng/mL	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL
E2,F2			-----	10µL	10µL de estándar 5 ng/mL	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL
G2,H2			-----	10µL	10µL de estándar 10 ng/mL	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL
A3,B3			-----	10µL	10µL de QC1 (Control 1)	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL
C3,D3			10µL	-----	10µL de muestra.	80µL		100 µL		100 µL		100 µL		100 µL

13.0 RESULTADOS.

Glucosa sanguínea en ayuno.

Se determinaron los niveles de glucosa en ayuno de los cuatro grupos de experimentación: Control (1), Sucrosa (2), NA-STZ (3) y NA-STZ-SUC (4) durante un lapso de 5 meses (T1-T5).



Grafica 1. Promedio de los niveles de glucosa sanguínea en ayuno (mg/dL+ error estándar) de los grupos Control (1) Sucrosa (2), NA-STZ (3) y NA-STZ-SUC(4). Durante los 5 meses de experimentación ((T1-T5). * $p < 0.05$ vs control.

En la gráfica 1 se observan los valores promedio de concentración de glucosa sanguínea (mg/dL) en los 4 grupos de animales, así como las diferencias significativas entre el grupo control y los demás grupos. Al inicio del tratamiento (T1) los valores de glucosa se encuentran por debajo de los 100 mg/dL de glucosa en los 4 grupos (valores no significativos), lo que indica que los animales son normoglucémicos y en el transcurso del segundo mes de experimentación (T2) el grupo Sucrosa, NA-STZ y NA-STZ-SUC presentan diferencias significativas con respecto al grupo Control, sin embargo el grupo Sucrosa no aumenta demasiado sus valores de glucosa. Como se observa en los grupos NA-STZ y NA-STZ-SUC obteniendo valores 257 ± 43 y 409 ± 39 de glucosa (mg/dL) respectivamente y con un valor de $P < 0.05$, demostrando que la inducción de la enfermedad con los químicos

administrados de NA y STZ se llevo a cabo y que son ratas diabéticas, al presentar altos niveles de glucosa, estables durante los 4 meses de experimentación.

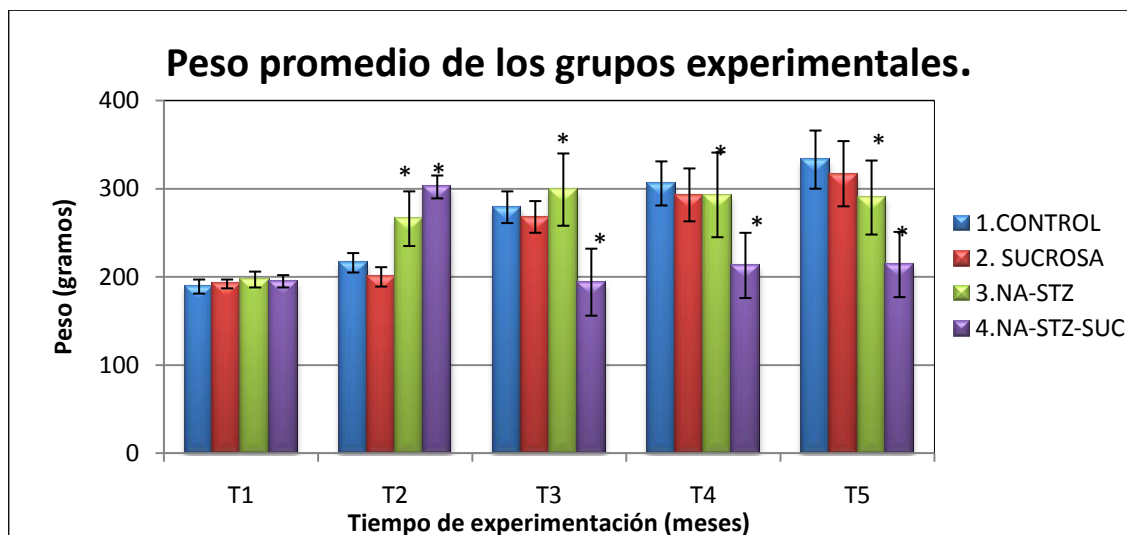
En el tercer mes de experimentación (T3) los grupos NA-STZ y NA-STZ-SUC mostraron valores cercanos entre sí: 394 ± 48 y $399\pm 66^*$ mg/dL de glucosa (Tabla 7) y con diferencias significativas con respecto al grupo Control. Y en el cuarto mes de experimentación (T4) los niveles de glucosa descienden cien unidades en el grupo NA-STZ pero en el grupo NA-STZ-SUC se mantiene altos, mostrándose superiores a los 350 mg/dL de glucosa en el T2 y T3 del mismo grupo. Por último en el quinto mes de experimentación (T5) y fin del tratamiento, el grupo Sucrosa no mostro diferencia significativa ya que sus valores de glucosa fueron semejantes a los del grupo Control, lo que sugiere que la sacarosa no mostro un estado de hiperglucemia como se esperaba pero en el grupo NA-STZ-SUC, donde también se dio la ingesta de sacarosa al 20% adicional a la inducción química se obtienen los valores más altos de glucosa durante todo el tratamiento y también con respecto a los demás grupos de experimentación, lo que indica su elevado estado de hiperglucemia crónico, generado por los 2 factores de tratamiento.

Tabla 7. Valores de glucosa en ayuno de los grupos de experimentación en cada mes de tratamiento.

Tiempo de experimentación	Grupo Control	Grupo Sucrosa	Grupo NA-STZ	Grupo NA-STZ-SUC
T1	95 ± 5 mg/dL	84 ± 5 mg/dL	91 ± 4 mg/dL	91 ± 4 mg/dL
T2	$128\pm 4^*$ mg/dL	$124\pm 4^*$ mg/dL	$257\pm 43^*$ mg/dL	$409\pm 39^*$ mg/dL
T3	101 ± 5 mg/dL	$109\pm 5^*$ mg/dL	$394\pm 48^*$ mg/dL	$399\pm 66^*$ mg/dL
T4	84 ± 1 mg/dL	$98\pm 2^*$ mg/dL	$294\pm 21^*$ mg/dL	$363\pm 42^*$ mg/dL
T5	$82\pm 1^*$ mg/dL	91 ± 4 mg/dL	$372\pm 33^*$ mg/dL	$467\pm 50^*$ mg/dL

Promedio de los valores de glucosa ($X\pm EE$) de los 4 grupos de experimentación durante T1-T5. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control.

Determinación del peso promedio durante los 5 meses de experimentación de los cuatro grupos de animales.



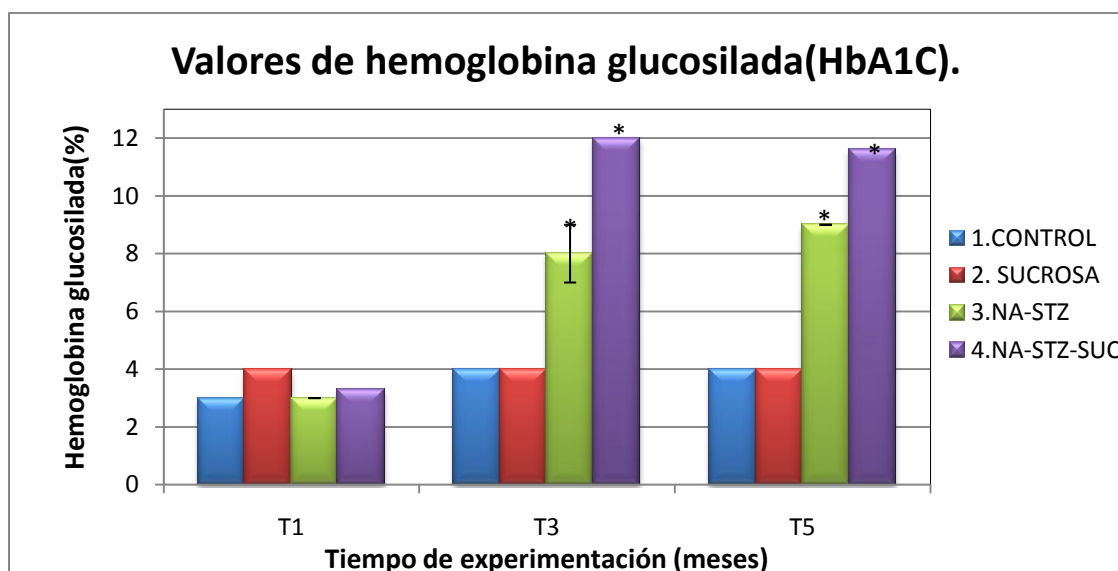
Grafica 2. Promedio del peso (gr + EE) de los grupos control (1) sucrosa (2), NA-STZ (3) y NA-STZ –SUC (4). Durante los 5 meses de experimentación (T1-T5). * $p < 0.05$ vs control).

Como ya se mencionó otros síntomas de la diabetes son la polifagia y polidipsia los cuales se ven reflejados en 2 de los 4 grupos; NA-STZ y NA-STZ-SUC al aumentar en el primer mes de tratamiento los valores de su peso, lo que sugiere que el consumo de sacarosa en la dieta presenta los síntomas de obesidad (Larque *et al.*, 2011; Martínez B., 2011), debido a en estos grupos se eleva la ingesta del agua de beber que contiene la sacarosa (20%p/v) lo cual nos ayuda a comprender ambos síntomas, sin embargo la razón por la cual el grupo Sucrosa(2) no presenta una ganancia de peso como los grupos inducidos se debe a que estos grupos al presentar la enfermedad (diabetes experimental) durante el primer mes de tratamiento su metabolismo está alterado y permite tales síntomas (Canizales, 2008) en comparación con los grupos Control y Sucrosa. Posteriormente ocurre una caída de peso en el grupo NA-STZ-SUC (4) al presentarse los síntomas de la enfermedad generándose el daño en los diferentes órganos (ADA, 2011). Este daño se observó en el transcurso de los 5 meses de experimentación donde se observaron a las ratas obesas al principio y luego del paso de los meses presentaron una baja de peso mostrando glaucoma, polidipsia, poliuria, caída de pelo y daño en la cola de las ratas (esto último posiblemente asociado a neuropatías y daños periféricos a nivel microvascular), sin embargo el otro grupo en donde se indujo la diabetes no presenta este descenso en su peso debido a que no está asociado

el daño con la ingesta de azúcar. Los grupos control y sucrosa no mostraron dichos síntomas solo un incremento de peso el cual está relacionado con el crecimiento normal de los animales.

Hemoglobina glucosilada (HbA1c).

La cuantificación sanguínea de glucosa, nos indica los niveles de la misma en el instante en el que se realiza la prueba, pero esta no ofrece la posibilidad de conocer su evolución a mediano plazo por lo que se emplea la hemoglobina glucosilada(HbA1c), ya que ésta presenta características especiales para unirse a la glucosa, y en concreto la hemoglobina A1 la cual tiene tres fracciones a, b y c; esta última tiene la característica de tener una unión con la glucosa mucho más fija y específica lo que la convierte en un excelente indicador de los niveles de glucosa.



Gráfica 3. Se muestran los niveles de HbA1c (%) encontrados en las ratas sometidas a los diferentes tratamientos, en donde se pudo observar que en 2 de los grupos experimentales grupos 3 y 4(verde y amarillo respectivamente), se ve un aumento en la hemoglobina glucosilada con respecto al tiempo inicial (T1), lo cual nos indica que hubo una alteración en las concentraciones de glucosa plasmática en los últimos dos o tres meses, ya que esta tiene un sitio de unión con glucosa.

Como se observa el incremento de los porcentajes de HbA1c está relacionado con el daño ocasionado por la elevación de glucosa, mostrando que la evaluación de la HbA1c es un parámetro que permite un correcto monitoreo de los pacientes diabéticos al proporcionar información sobre el daño ocasionado de la glucosa.

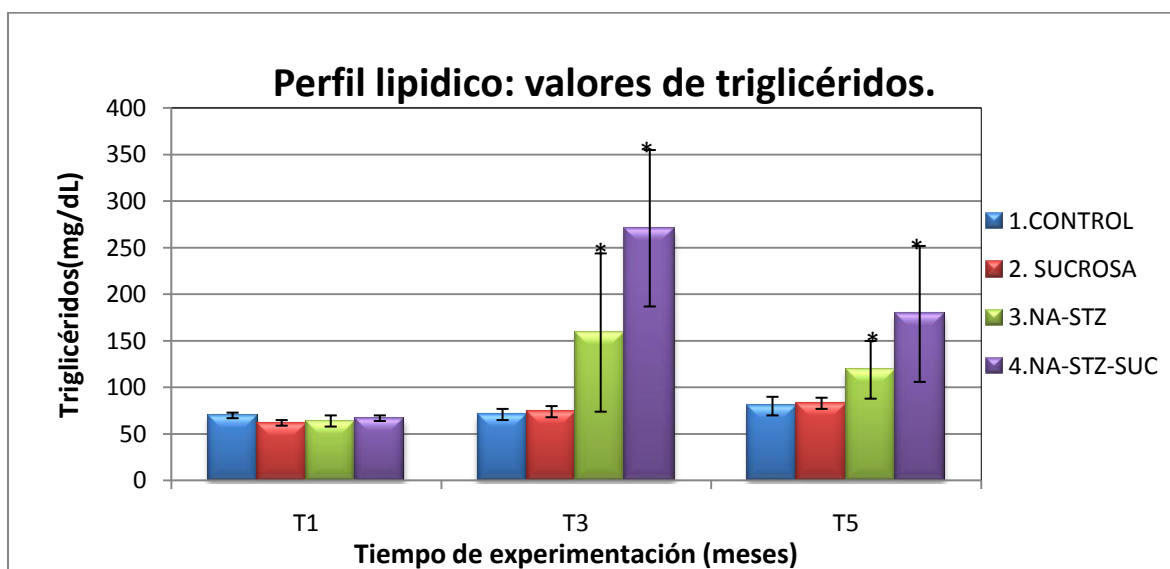
Nuevamente los grupos que presentan niveles superiores al 8% de HbA1c son los grupos diabéticos con y sin dieta en sucrosa, NA-STZ-SUC y NA-STZ respectivamente los cuales

nos indican que no son normales sus valores ($\leq 7\%$) y que hay un daño grave al presentar valores superiores a 11% de HbA1c en el grupo NA-STZ-SUC en T3 y T5. Lo que indica el daño generado, al presentar elevados niveles de glucosa en sangre como lo muestra el gráfico 1 y la glucosilación de la misma como se muestran en los niveles de HbA1c (%) en la gráfica 3.

Perfil lipídico.

Como ya mencionamos la insulina juega un papel importante en el metabolismo de los lípidos entre estos los Tg, colesterol y HDL, por lo que las alteraciones generadas en la insulina repercuten en estos parámetros provocando un estado de hipertrigliceridemia, razón por la cual se estudia el comportamiento de estos parámetros.

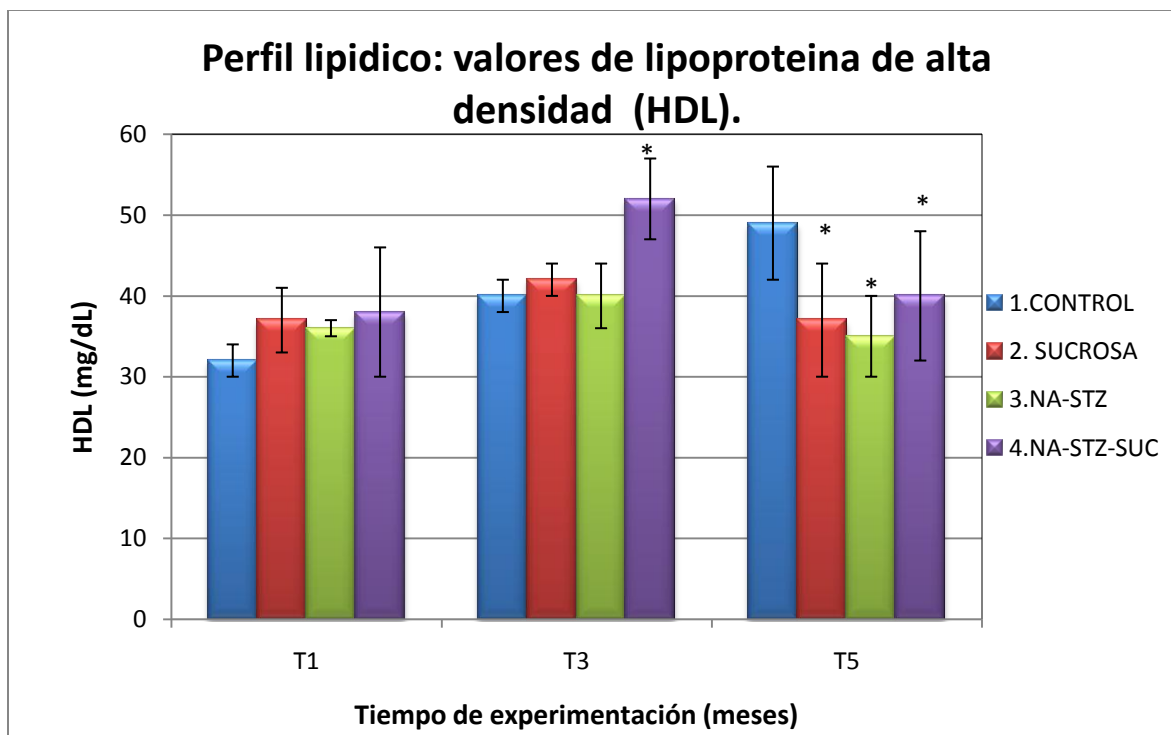
En la gráfica 4 se presentan los niveles de triglicéridos correspondientes a los 4 grupos de experimentación, monitoreados cada dos meses y el gráfico 5 corresponde a los valores de HDL. En el gráfico 4 se muestra que existe una elevación de los valores de Tg en los grupos NA-STZ y NA-STZ-SUC con respecto al control, sin embargo no hay cambios en el grupo sucrosa se comporta igual al grupo control (misma tendencia). De acuerdo con la tabla 1, estos valores son suficientemente altos (mayores a 145 mg/dl), para considerarse como irregulares y por consiguiente la presencia de dislipidemia en ambos grupos.



Grafica 4. Promedio de los niveles de triglicéridos (mg/dL) vs. Tiempo de los 4 grupos de experimentación, monitoreados cada dos meses.

Corroborando que las dislipidemia son un trastorno que se presentan en sujetos con DM.

Con respecto a los niveles de Colesterol Total y HDL, el primer parámetro no presentó cambios ya que los valores siempre fueron inferiores a los 200mg/dL. Sin embargo los valores de HDL-colesterol si presento cambios mismos que se aprecian en el grafico 5, pero no hay reportes de estudios en donde indique un rango de valores de HDL que sugieran una alteración de los mismos, por lo cual no se puede decir si dicho parámetro esta alterado debido a la enfermedad.



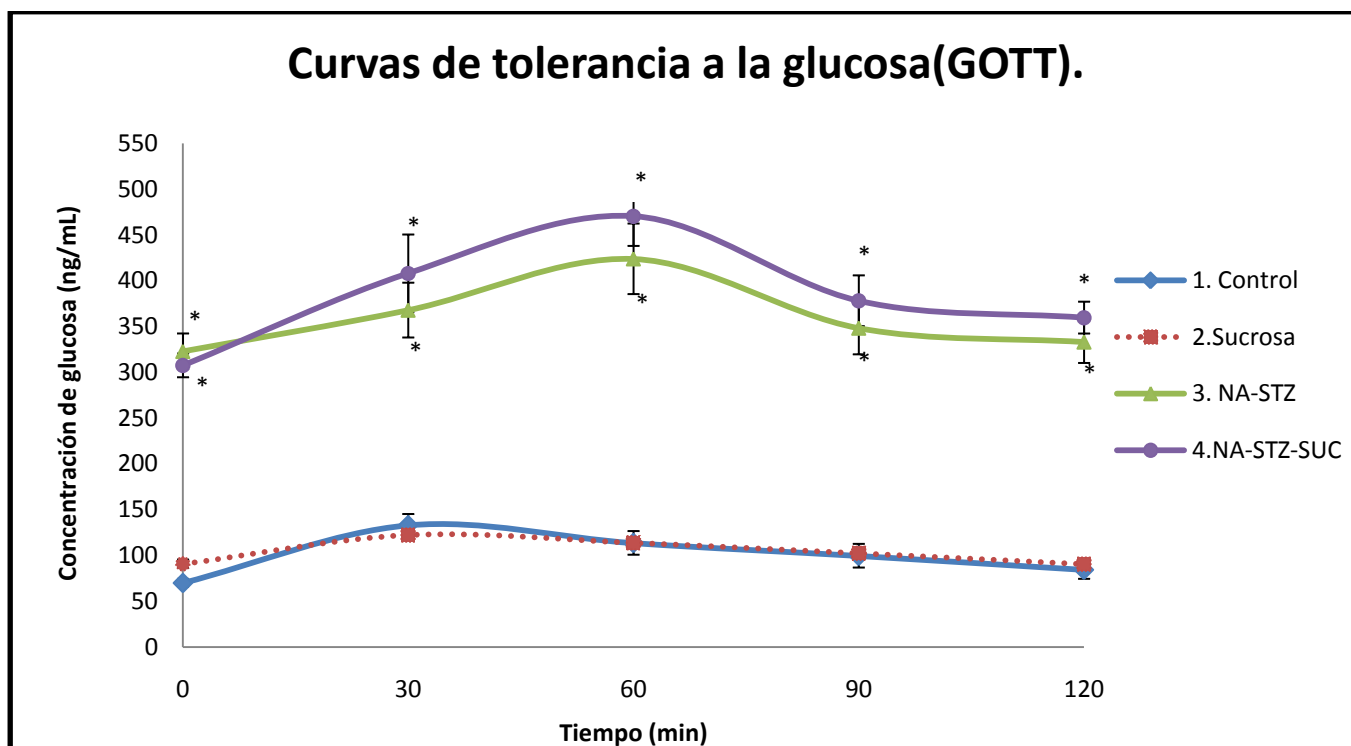
Grafica 5. Promedio de los niveles de HDL-Colesterol (mg/dL) vs. Tiempo de los 4 grupos de experimentación, monitoreados cada dos meses

Pero se aprecia que existe una alteración en los valores de HDL en el grupo NA-STZ-SUC durante el T3 y T5 ya que muestra diferencias significativas ($*p < 0.05$ vs control) lo mismo ocurre para los grupos sucrosa y NA-STZ en el último mes de experimentación donde descienden estos valores al compararlos con nuestro grupo control.

Al finalizar los 5 meses de los respectivos tratamientos se realizaron 2 pruebas: la OGTT y la medición de insulina (ELISA) incluyendo el HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment).

Pruebas de tolerancia a la glucosa (OGTT).

En las OGTT se obtuvieron los resultados mostrados en la gráfica 6 donde se observa la similitud de la tendencia del grupo control y sucrosa, indicando que la dieta por si sola de sacarosa no presenta el estado de hiperglucemia que se buscaba. Sin embargo la inducción de la diabetes con STZ proporciona hiperglucemia pero la adición de la dieta de sacarosa a este factor incrementa los niveles de glucosa lo que genera un estado de hiperglucemia.

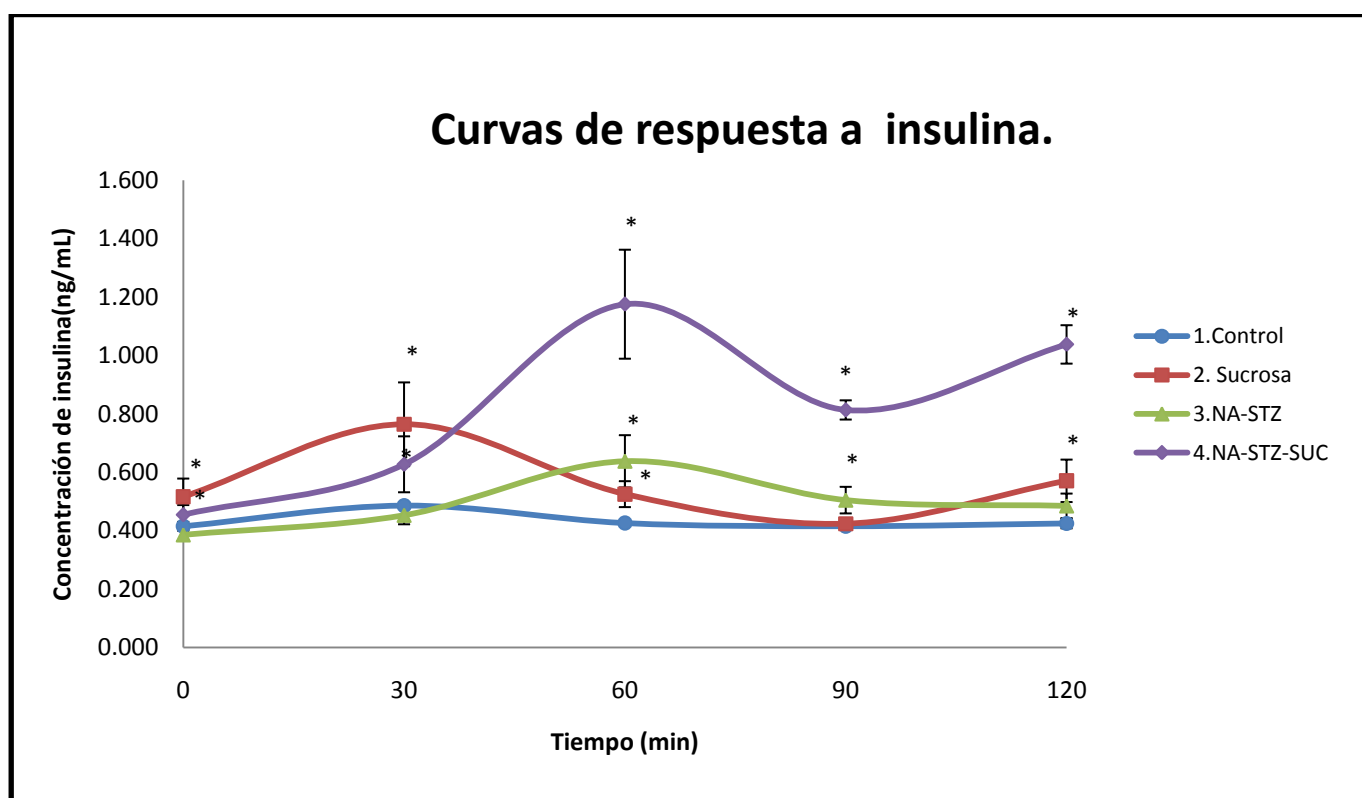


Grafica 6. Curvas de tolerancia a la glucosa. Promedio de la concentración de glucosa (mg/mL) vs tiempo de los cuatro grupos de experimentación.

Niveles de insulina.

La respuesta de insulina ante la glucosa se determinó mediante cuantificación de la insulina, mediante la técnica de ELISA en sándwich donde se obtuvo las curvas de insulina para cada grupo de experimentación.

Esta es una de las dos pruebas más contundentes en el presente trabajo debido a que anteriormente podríamos decir que el modelo de la administración de sacarosa el 20% no genera un estado de DM al no presentar alteración en los niveles de glucosa en ayunas y tolerancia a la glucosa, pero si alteración en los niveles de insulina ya que no presenta la misma tendencia el grupo Sucrosa al grupo Control (Grafico 7).



Grafica 7. Respuesta de la insulina: Promedio de la concentración e insulina (ng/mL) vs tiempo de los grupos control (1), sucrosa (2), STZ-NA (3) y STZ-NA-SUC (4).

El grupo Sucrosa presente un pico superior a los 30 min de la carga de glucosa para posteriormente disminuir y finalmente mantener los niveles de insulina similares al inicial lo que indica que tiene una respuesta casi normal al realizar la curva que incrementa y descende los niveles ante tal estímulo, marcando una diferencia al presentar niveles superiores de insulina en el pico(a los 30 min) lo que indica una respuesta alterada de la



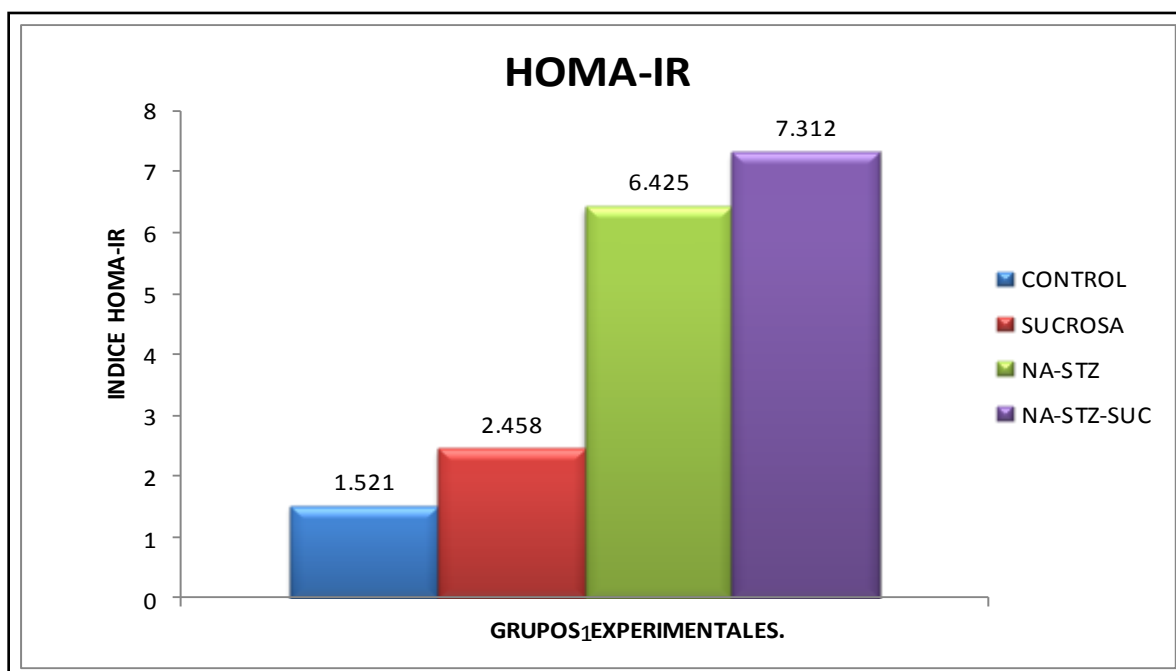
misma debido al continuo estímulo de la dieta rica en sacarosa. Los grupos NA-STZ y NA-STZ-SUC presentan este pico desfasado (60min) simulando una respuesta tardía. Lo interesante de estas curvas se aprecia en los dos grupos con la dieta de sacarosa (grupo 2 y 4) los cuales presentan niveles superiores de insulina y mayormente el grupo NA-STZ-SUC quien tiene elevados estos valores aun después de las 2 horas de la carga generando una posible resistencia de insulina, pues no regresa a tener valores cercanos a sus valores basales, ya que como se alcanza a observar se presenta un ligero coqueo descendente al final en la curva de ambos grupos. Esta última curva (NA-STZ-SUC) pareciera ser la adición del grupo sucrosa (2) y NA-STZ (3), manifestando dichos tratamientos.

HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance).

En la tabla 8 se aprecian los valores de glucosa plasmática e insulina plasmática, al multiplicarlos y dividirlos en el factor 22.5 se obtiene el índice HOMA-IR, este valor obtenido permite demostrar la resistencia de insulina al tener un valor superior a las 3 unidades.

Grupo experimental	Glucosa plasmática (mmol/L)	Insulina plasmática (μU/mL)	HOMA-IR
1. Control	3.889	8.798	1.521
2. Sucrosa	5.056	10.939	2.458
3.NA-STZ	17.944	8.056	6.425
4. NA-STZ-SUC	17.056	9.646	7.312

En la gráfica 8 se presentan los valores del índice HOMA-IR en cada grupo experimental.



Como se observa los niveles más altos los presentan el grupo NA-STZ y NA-STZ-SUC (6.425 y 7.312 respectivamente) mostrando que si hay RI al tener valores superiores a las tres unidades el cual indicaba un 90% de presentar resistencia a la misma. Con respecto al grupo Sucrosa se observa que el índice HOMA-IR es más alto que el control lo que sugiere una alteración en la insulina pero no corrobora la resistencia a la misma al no presentar valores superiores a las 3 unidades, lo que indica que si se continua con el modelo experimental por más meses se pudiera generar la resistencia a la insulina (RI) con la dieta al 20% de sacarosa ya que como se observa si aumenta los niveles de insulina y el índice HOMA-RI.



14.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La finalidad de este estudio, fue analizar el efecto crónico de la sacarosa mediante una dieta al 20%, en ratas sanas y durante la diabetes mellitus temprana en un modelo experimental inducido con NA-STZ. Mediante la evaluación de los niveles de glucosa (en ayuno y tolerancia a la misma), insulina (ELISA Y HOMA-IR), HbA1c y perfil lipídico.

Los resultados obtenidos muestran que las ratas administradas con sacarosa aparentan no tener cambios significativos en los parámetros determinados con respecto a las ratas control, aunque la respuesta de los niveles de insulina tras una carga de glucosa muestran un incremento en la respuesta biológica (en la curva de respuesta a la insulina y el índice HOMA-IR), lo cual puede ser producto de un condicionamiento sistémico debido a una dieta rica en azúcar. Parte de los resultados contrastan con los obtenidos por la Dra. Hiriart y colaboradores donde reportan que en la dieta rica en sacarosa produce un síndrome metabólico acompañado de incremento de; peso, IMC, presión arterial, triglicéridos, insulina y glucosa. Sin embargo, cabe resaltar que este daño se observó solo en ratas Wistar machos, sin inducción química y que el periodo de administración de sacarosa al 20% se dio durante 2 meses, por lo cual se decidió en este proyecto analizar una dieta al 20% tanto en hembras como machos y en un periodo mayor.

Por su parte las ratas inyectadas con STZ mostraron una concentración elevada de glucosa en sangre congruente con el porcentaje elevado de hemoglobina glucosilada y con anormalidades en la regulación de glucosa en las pruebas OGTT junto con la respuesta a insulina y altos valores del índice HOMA-RI, lo cual era de esperarse pues la STZ confiere una sintomatología diabética aparente del tipo 2, debido al daño pancreático que produce (Masiello *et al.* 1998). Los niveles de triglicéridos en este grupo aumentaron significativamente con respecto al control y esto puede ser debido a la movilización de ácidos grasos para compensar la falta de glucosa y por tanto de energía brindada por la ruta de la glucólisis y el ciclo de Krebs. Esto concuerda con una disminución de HDL la cual está compuesta en su mayoría por proteínas y lípidos que pueden estar siendo degradados para su asimilación metabólica.

Por último, las ratas STZ/Sucrosa mostraron una afección generalizada más aguda que las ratas administradas únicamente con STZ, esto se vio reflejado en una alta concentración de glucosa, así como de hemoglobina glucosilada y el índice HOMA-RI. Con respecto al peso



se puede observar un aumento inicial al primer mes de experimentación con una subsecuente caída, esto puede deberse a la asimilación de fructosa inicial presente en la sucrosa de la dieta, que posteriormente debió ser afectada por un daño metabólico generalizado que se ve reflejado en el decaimiento drástico en el peso de la rata. Por su parte los triglicéridos se ven incluso más aumentados que en las ratas STZ dado que la compensación metabólica inicial es más drástica, sin embargo a los 4 meses se puede observar un decaimiento en su concentración seguramente por la asimilación de los mismos; mismo caso que presenta el HDL. En cuanto a las pruebas de OGTT se ven igualmente afectadas que las ratas STZ con un cambio en la respuesta de insulina, en donde se puede observar una afección aditiva de los cambios producidos por la administración de sucrosa y de STZ.



15.0 CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos, no fue posible concretar un modelo experimental de diabetes con la administración de sacarosa al 20%, pues en general los parámetros analizados muestran similitud ordinaria con los controles. Sin embargo, las curvas de insulina para este grupo mostraron una anomalía significativa que puede estar indicando un límite en la dosis a la cual las ratas pueden pasar de un metabolismo normal a un metabolismo alterado, que sugiere obtener un modelo experimental de diabetes como respuesta a una resistencia a la insulina. Por lo tanto se sugiere realizar ensayos en donde se prueben concentraciones de 25% de sacarosa para determinar los efectos que se pudiesen generar, tratando de no llegar al síndrome metabólico ya reportado a concentraciones más elevadas (30%).

Por otra parte se probó por primera vez una dosis de 150 mg/Kg de NA-STZ que aparenta tener una afección más controlada en la generación de diabetes tipo 2 como modelo experimental, confiriendo un lapso de vida más prolongado; esto resulta conveniente para el estudio de los nuevos agentes terapéuticos.

Para finalizar, fue posible observar una afección aguda en ratas administradas con NA y STZ bajo una dieta de sacarosa 20%, en donde se pudo observar que la sacarosa no modifica los niveles de glucosa basal ni tolerancia a la misma en ratas normoglucémicas; sin embargo, se observó que en ratas administradas con NA-STZ-SUC si presentan un aumento en los niveles de glucosa basal y tolerancia a la misma además de presentar los niveles más altos en la cuantificación de insulina e índice HOMA-IR, lo cual indica resistencia a insulina.



16.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Bryan, L., et al. **Toward understanding the assembly and structure of KATP channels.** *Physiol Rev.*1998; 78(1): 227-45.
2. Aguilera A., Díaz G., Barcelata M. y Guerrero O. **Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome.** *The Journal Nutritiona Biochemistry.* 2004; 15(6): 350–57.
3. Amaya Chávez A. et al. **Assessment of diabetes type 2 model to study the hypoglucemic activity of glibenclamide.** *Revista de Mexicana de Ciencias Farmaceuticas.*2007; 38(3): 5-11
4. American Diabetes Association (ADA).**Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** *Diabetes Care.* 2010; 28:37-42.
5. Aizawa, T., et al., **Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell.** *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19(12): 496-9.
6. Aizawa, T., Y. Sato, and M. Komatsu, **Importance of nonionic signals for glucose-induced biphasic insulin secretion.** *Diabetes.* 2002; 51(1): S96-8.
7. Arias J. y J. Balibrea. **Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2.** *Nutr Hosp.* 2007; 22 (2):160-68.
8. Barthel, A. and D. Schmoll, **Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis.** *Am J Physiol Endocrinol Metab;* 2003:285(4): E685-92.
9. Bergsten, P., et al. **Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets.** *J Biol Chem.* 1994;269(12):8749-53.



10. Bjornholm, M. and J.R. Zierath. **Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes.** Biochem Soc Trans. 2005; 33(2): 354-7.
11. Brasier AR, Li J, Copland A. **Transcription factors modulating angiotensinogen gene expression in hepatocytes.** Kidney Int. 1994;46: 1564-1566.
12. Butler A. E., Jang J., Gurlo T., Carty M., Butler P.C. **Diabetes due to progressive defect in β -cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP rat). A new model for type 2 diabetes.** Diabetes. 2004; 53:1509-1516.
13. Casado M. **Animal models in diabetes research.** Av Diabetol. 2007; 23(6): 432-438
14. Canizales S. **Aspectos genéticos de la obesidad humana.** Revista de Endocrinología y Nutrición. 2008;16 (1): 9-15.
15. Curry, D.L., L.L. Bennett, and G.M. Grodsky, **Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas.** Endocrinology. 1968; 83(3): 572-84.
17. De Camilli, P., et al. **Phosphoinositides as regulators in membrane traffic.** Science. 1996; 271(5255): 1533-9.
18. Díaz R. J. **El término diabetes: aspectos históricos y lexicográficos.** Panacea. 2004; 5:30-36 15.
19. Diccionario enciclomédico de Laboratorio clínico. Editorial Panamericana. Argentina (1991).
20. Esquivel J. **Actividad antidiabética y toxicidad del extracto acuoso percolado de Tamarindos indica Linn (TiL) en ratones.** Tesis de licenciatura. México (2007).
21. Fernández-Mejía C. y Lazo de la Vega-Monroy M. **Molecular basis of type-2 diabetes.** 6ª ed. Mexico: Molecular Endocrinology; 2006 : 87-108



22. Gembal, M., P. Gilon y J.C. Henquin, **Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells.** J Clin Invest. 1992; 89(4): 1288-95.
23. Green KN, Steffan JS, et al. **Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau.** Journal of Neuroscience. 2008; 28(45):11500-10.
24. Griendling K. K., Lassegue B. y Alexander R. W. **Angiotensin receptors and their therapeutic implications.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (1996). 36; 281-306.
25. Gray GM . **Intestinal Digestion and Maldigestion of Dietary Carbohydrate.** Annual Review of Medicine. 1971; 22:391-404
26. González Gil A, González Madariaga Y, et al. **Daño oxidativo en un modelo experimental de hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas wistar.** Rev Méd Electrón .2012;.34(4).
27. Heather B., Federico Lisa y Khosrow Adeli . **Fructosa, resistencia a la insulina y dislipidemia metabólica.** Nutrition & Metabolism. 2005; 2: 5
28. Henquin, J.C., **Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation.** Diabetologia. 2009; 52(5): 739-51.
29. Henquin, J.C., **Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose.** Diabetes. 2009; 49(11): 1751-60.
30. Hellerstrom, C., **The life story of the pancreatic B cell.** Diabetologia, 1984. 26(6): p. 393-400.



31. Herr R, et al. **Isolation and caracterizacion of streptozotocin.** *Antibiot Annu.* 1959; 60(7): 263-40.
32. Hiriart, M. and L. Aguilar-Bryan, **Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008; 295(6):. E1298-306.
33. Hojas de seguridad. Disponible en URLs: <http://www.fichasdeseguridad.com/>
http://www.quimica.unam.mx/cont_espe2.php?id_rubrique=23&id_article=1341&color=E6AD04 y <http://www.sigmaaldrich.com/safety-center.html>, Consultado Marzo 08, 2013.
34. Jarret, J.R., **The epidemiology of diabetes mellitus. Insulin-dependent diabetes mellitus.** *Textbook of diabetes*, ed. G.W. Pickup J., Oxford: Blackwell Science. 1991; 47-5.
35. Joost, H.G., et al. **Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282(4): E974-6.
36. Kamesaki H. **TGF- β 1 induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip mRNA and protein in murine B cells.** *Journal Immunol.* 1998; 160: 770-777
37. Kaneko JJ. **Carbohydrate metabolism and its diseases.** In Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, San Diego, CA: Academic Press. 2008; 46.
38. Kar, S. y D. Shankar Ray, **Sustained simultaneous glycolytic and insulin oscillations in beta-cells.** *J Theor Bio.* 2005; 237(1): 58-66.
39. Klip, A. and M.R. Paquet. **Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation.** *Diabetes Care.* 1990; 13(3): 228-43.
40. Larqué C, Velasco M, et al. **Early Endocrine and Molecular Changes in Metabolic Syndrome Models.** 2011.



41. Lewis R. **Dictionary of toxicology.** Lewis publishers. USA (2000).
42. Lombardo YB, Drago S, Chicco A, et al. **Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas.** *Metabolism* .1996; 45(12): 1527–32.
43. Mark J. Dekker, Qiaozhu Su, Chris Baker, et al. **Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299(5): 685-94
44. Matschinsky, F.M., Banting Lecture. **A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm.** *Diabetes*, 1996; 45(2): 223-41.
45. M. Casado. **Animal models in diabetes research.** *Av. Diabetol.* 2007; 23(6): 432-438.
46. Morley JE. **Diabetes and aging: epidemiologic overview.** *Clin Geriatr Med.* 2008; 24(3):395-405.
47. Matthews DR, Turner RC, et al. **Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.** *Diabetologia.* 1985; 28:412-419.
48. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, et al. **Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide.** *Diabetes.*1998; 47 (2):224-9.
49. Organización Mundial de la Salud. **Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud.** Ginebra: OMS 2004.



50. Fukuchi S, Hamaguchi K, Seike M, Himeno K, et al. **Role of Fatty Acid Composition in the Development of Metabolic Disorders in Sucrose-Induced Obese Rats** .Exp. Biol. Med. 2004; 229 (6): 486–93.
51. Redpoll. Drug Bank. Disponible en: URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB02701>
Consultado diciembre 27, 2012.
52. Ress D, et al. **Animal models of diabetes mellitus**. Diabet Med. 2005; 22:359-70
53. Riss J, et al. **Phycobiliprotein C- phycocyanin from Spirulina paltensis is powerfully responsible for reduccing oxídate stress and NADPH oxidative expression induced by an atherigenic diet in hamsters**. J. Agric Food Chem. 2007; 55: 7962-7967 .
54. Saltiel, A.R. y C.R. Kahn, **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism**. Nature, 2001. 414(6865): 799-806.
55. Sax I, et al. **Diccionario de de química y productos químicos**. España: Ediciones Omega ;1998.
56. Shakur, Y., et al. **Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family**. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001;66: 241-77.
57. Secretaría de Salud. **Estadísticas de mortalidad. Sistema Nacional de Información en salud**. 2005. Disponible en: URL: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
Consultado Agosto 11, 2012
58. Secretaría de Salud. **Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la Diabetes**. 2010.



59. Stagner, J.I., E. Samols, y G.C. Weir, **Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration.** J Clin Invest. 1980; 65(4): 939-42.
60. Straub, S.G. y G.W. Sharp, **Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion.** Diabetes Metab Res Rev. 2002; 18(6): 451-63.
61. Fu-Li Xiang, Xiangru Lu, Qingping Feng, et al. **NOX2 Deficiency Protects Against Streptozotocin-Induced β -Cell Destruction and Development of Diabetes in Mice.** Diabetes. 2010;59(10): 2603–2611
62. Sharp W., Weir O. **Streptozotocin-induced diabetes in the mouse. Evidence for simulation of a cytotoxic cellular immune response against and insulin-producing beta cell line.** Journal of Clinical Investigation. 2010;73(3):715-722.
63. Svetlana T.y Maclaren. **Insulin resistance syndrome in children.**J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004.;89(6):2526–39.
64. Srinivasan K, et al. **Animal models in type 2 diabetes research: an overview.** Inidan J Med Res. 125:451-472(2007).
65. Srivastava L, et al. **Diabetogenic avtion of streptocozotocin.** TIPS (1982).
66. Straub, S.G. y G.W. Sharp, **Hypothesis: one rate-limiting step controls the magnitude of both phases of glucose-stimulated insulin secretion.** Am J Physiol Cell Physiol. 2004; 287(3): C565-71.
67. Shulman, G.I. **Cellular mechanisms of insulin resistance.** J Clin Invest. 2000; 106(2): 171-6.
68. Rorsman, P. y E. Renstrom, **Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells.** Diabetologia. 2003; 46(8): 1029-45.



69. Takada J, et al. **Neonatal streptozotocin induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass.** *Metabolism.* 2007; 56:997-984.
70. Villalpando S, De la Cruz V, Rojas R, et al. **Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey.** *Salud Publica Mex.* 2010; 52 Suppl 1:S19-26.
71. Weir, G.C., et al. **Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: a hypothesis.** *Acta Diabetol.* 1997;34(3): 177-84.
72. Willis, T. **Pharmaceutica rationalis sive diatriba de medicamentorum operationibus in humano corpore.** London. 1990:1674-1675.
73. World Health Organization(WHO), Department of Noncommunicable Disease Surveillance. **Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications.** Geneva: WHO; 1999.
74. Yamamoto Y. y Oue E. **Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a**
75. **high-fat high-sucrose diet.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006; 70 (4): 933-939.
76. Zick, Y. **Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance.** *Biochem Soc Trans.* 2004; 32(5):812-816.

17.0 ANEXOS

ANEXO 1. CLASIFICACIÓN DE MODELOS ANIMALES.

Tabla 1. Clasificación de los modelos animales de diabetes mellitus tipo 2

1. Modelos espontáneos	2. Modelos inducidos
1.1 Modelos análogos	2.1 Inducción hormonal
– La rata Goto-Kakizaki (GK)	2.2 Administración de fármacos
– El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)	2.3 Manipulación genética
– El ratón KK	2.4 Inducción Quirúrgica
– <i>Psammomys obesus</i> (rata israelí de la arena)	
– La rata OLETF (<i>Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat</i>)	
1.2. Modelos intrínsecos	
– El ratón <i>db/db</i>	
– El ratón <i>ob/ob</i>	
– El ratón <i>Agouti</i>	
– La rata Zucker (<i>fa/fa</i>)	

ANEXO 2. Tablas de valores promedio por mes de todos los grupos experimentales

T1.		Parámetros				
Grupos experimentales	Glucosa (mg/dL)	Peso (gr)	HbA1c (%)	Colesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
1. Control	95±5	189±8	3.0	<100	32±2	70±3
2. Sucrosa	84±5	192±5	4.0	<100	37±4	62±3
3. NA+STZ	91±4	197±9	3.0	<100	36±1	64±6
4. NA+STZ+SUC	91±4	195±7	3.3	<100	38±8	67±3

Tabla 1. Media de los parámetros de los 4 grupos de experimentación en el primer mes (T1). *p<0.05 vs T1.

T2.		Parámetros	
Grupos experimentales	Glucosa (mg/dL)	Peso (gr)	
1. Control	128±4*	216±11	
2. Sucrosa	124±4*	200±11	
3. NA+STZ	257±43*	266±31	
4. NA+STZ+SUC	409±39*	302±13	

Tabla 2. Media de los parámetros de los 4 grupos de experimentación en el segundo mes (T2). *p<0.05 vs T1.

T3.		Parámetros				
Grupos experimentales	Glucosa (mg/dL)	Peso (gr)	HbA1c (%)	Colesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
1. Control	101±5	279±18	4.0	<100	40±2*	71±6
2. Sucrosa	109±5*	268±18	4.0	<100	42±2*	74±6
3. NA+STZ	394±48*	299±41	8.0±1*	<100	40±4*	159±85
4. NA+STZ+SUC	399±66*	194±38	12.0*	<100	52±5*	271±84

Tabla 3. Media de los parámetros de los 4 grupos de experimentación en el tercer mes (T3). *p<0.05 vs T1

T4. Parámetros		
Grupos experimentales	Glucosa (mg/dL)	Peso (gr)
1.Control	84±1	306±25*
2.Sucrosa	98±2*	293±30*
3.NA+STZ	294±21*	293±48
4.NA+STZ+SUC	363±42*	213±37

Tabla 4. Media de los parámetros de los 4 grupos de experimentación en el cuarto mes (T4). *p<0.05 vs T1.

T5. Parámetros						
Grupos experimentales	Glucosa (mg/dL)	Peso (gr)	HbA1c (%)	Colesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
1.Control	82±1*	333±33*	4.0	<100	49±7*	80±10
2.Sucrosa	91±4	317±37*	4.0	<100	37±7*	83±6*
3.NA+STZ	372±33*	290±42	9.0*	<100	35±5	119±31
3.NA+STZ+SUC	467±50*	214±37	11.6*	<100	40±8	179±73

Tabla 5. Media de los parámetros de los 4 grupos de experimentación en el quinto mes (T5). *p<0.05 vs T1.



ANEXO 3. Fundamentos y Tipos de ELISAS.

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

• **Anticuerpos marcados:**

- ELISA Directo
- ELISA Indirecto
- ELISA sándwich
 - Doble (DAS)
 - Heterólogo (HADAS)

• **Antígeno marcado:**

- ELISA competitivo

Pasos generales de un ELISA.

1. Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo.
2. Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
3. Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo
4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
5. Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima
6. Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo
7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
8. Adición del sustrato
9. Unión del sustrato a la enzima
10. Desarrollo del color.

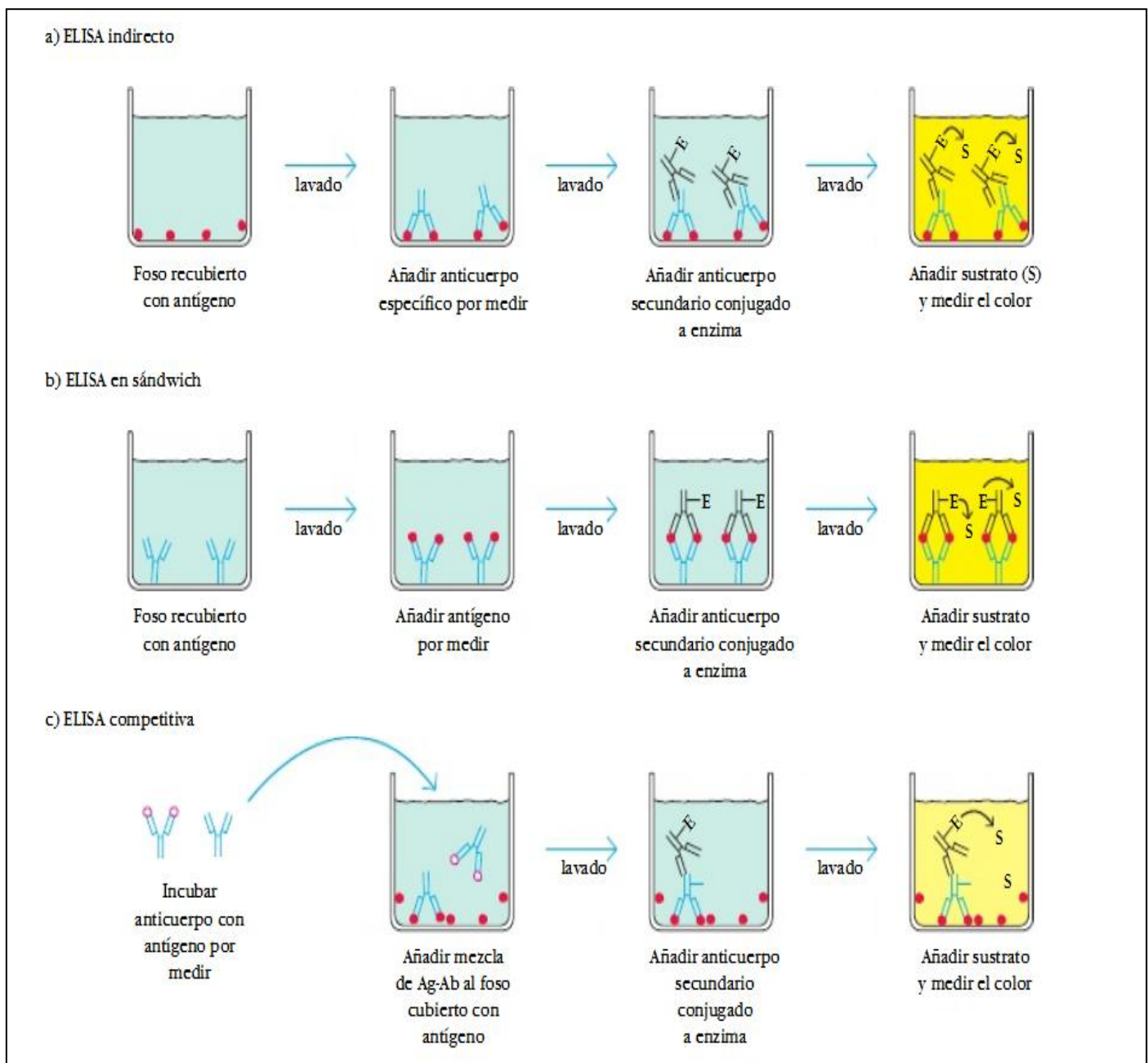


Figura 2. Las variaciones en la técnica del ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) permite determinar anticuerpo o antígeno. Cada prueba puede utilizarse de manera cuantitativa mediante la comparación con curvas estándar elaboradas con concentraciones conocidas de anticuerpo o antígeno. El anticuerpo puede determinarse con ELISA indirecto (a), en tanto que el antígeno puede determinarse por ELISA en sándwich (b) o ELISA competitivo (c). En este último, que es un ensayo tipo inhibición, la concentración de antígenos es inversamente proporcional al del color que lo produce. <http://es.scribd.com/doc/77680373/Inmunologia-Kuby-6th-espanol>.



ANEXO 4.HOJAS DE SEGURIDAD

• ACETATO DE SODIO

IDENTIFICACION DEL PRODUCTO	
Nombre Químico: ACETATO DE SODIO - $C_2H_3NaO_2$	
Número CAS: 127-09-3	Sinónimos: Acetato de sodio anhidro; Ácido acético; Sal de sodio.
PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS	
Estado físico: Cristales blancos e higroscópicos. Olor: leve olor a ácido acético Densidad: 1.53 Solubilidad: 1190 g / l (20° C)	Congelación / Punto de fusión: 324 ° C Temperatura de autoignición: 607 ° C (1,124.60 °F) Peso molecular: 82,03
ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD	
Estabilidad: Estable bajo condiciones normales de uso y almacenamiento. Polvo higroscópico. Productos de descomposición peligrosos: Emite gases de ácido acético en la combustión y en contacto con ácidos fuertes.	Incompatibilidades: El ácido nítrico, el fluoruro, nitrato de potasio, oxidantes fuertes. Condiciones a evitar: Calor, llamas, fuentes de ignición e incompatibles.
INFORMACION TOXICOLOGICA	
LD50 oral en ratas: 3530 mg / kg LD50 piel de conejos:> 10 gm / kg, CL50 inhalación rata:> 30 gm/m3	Test Irritación, Draize estándar: ojos de conejo 10 mg, leve. Ha sido investigado como un mutagénico.
Test Sensibilización, Draize estándar: piel de conejos 500 mg/24 h, leve.	
INFORMACION ECOLOGICA	
Toxicidad Ambiental: Dato de pulga de: 18 horas EC50 Pseudomonas putida: 7200 mg / L Pescados de agua dulce: 24 Hr LC50 Lepomis macrochirus: 5000 mg / L	Medio ambiente: Este producto químico es fácilmente biodegradable y no es probable que presente bioconcentración. Este producto químico tiene un bajo potencial de riesgo para los organismos acuáticos.
Otros: Este producto químico tiene una alta demanda biológica de oxígeno, y se espera que cause el agotamiento del oxígeno, significativo en los sistemas acuáticos.	
IDENTIFICACION DE PELIGROS	
Efectos potenciales para la salud. Ingestión: Las grandes dosis pueden producir dolor abdominal, náuseas y vómitos Contacto con los ojos: Puede causar irritación, enrojecimiento y dolor.	Inhalación: Puede causar irritación en el tracto respiratorio. Los síntomas pueden incluir tos, dolor de garganta, dificultad para respirar y dolor torácico. Contacto con la piel: Puede causar irritación con enrojecimiento y dolor.
MANEJO Y ALMACENAMIENTO	
Mantener en un recipiente cerrado herméticamente, almacene en un lugar fresco, seco y ventilado. Proteger contra daño físico. Aislar de cualquier fuente de calor o ignición. Los envases de este material pueden ser peligrosos cuando están vacíos ya que retienen residuos del producto (polvo, sólidos); observar todas las advertencias y precauciones indicadas para el producto.	
PROTECCION PERSONAL	
Sistema de Ventilación: Un sistema de ventilación local y/o general es recomendado para las exposiciones de empleados. Protección de la piel: Usar guantes de protección y ropa limpia que cubra el cuerpo. Protección de los ojos: Utilice gafas protectoras contra productos químicos. Mantenga una fuente de lavado de ojos y regaderas de emergencia en el área de trabajo.	



• **ACIDO CITRICO**

Nombre Químico: Ácido Cítrico Citrus	Registro CAS: 77-92-9
Sinónimos: Acido 2- hidroxí-1, 2, 3-propanotricarboxílico; 1, 2, 3 Acido propanetricarboxílico; Acido beta hidroxítricarboxílico; Acido beta-hidroxítricarbalílico; Hidrocerol.	
Formula: $H_3C_6H_5O_7$	Familia Química: Ácidos Orgánicos
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	
Peso molecular: 192,13 (anhídrido) 210,14 (monohidratado). Punto de fusión 153 –154 c (anhídrido) Densidad relativa 1,665 a 20 c (anhídrido) PH (2,2) (solución 1%); 1,7 (solución 10%); 1,2 (solución 30%)	Punto de Ebullición Descompone a 175C Solubilidad en Agua Muy soluble (59,2 g/100g a 20C) Solubilidad en Líquidos Etanol, Acetato de amilo, Dietil éter
REACTIVIDAD Y ESTABILIDAD	
Estabilidad: Estable en condiciones ordinarias de uso y almacenamiento. Incompatibilidades: Oxidante Fuerte.	Productos Peligrosos de Descomposición: Cuando se calienta hasta la descomposición puede formar dióxido y monóxido de carbono.
Condiciones a evitar: Calor, llamas, fuentes de ignición, polvo e incompatibles.	
INFORMACIÓN TOXICA	
LDLo (oral, conejo) = 7 g/kg DL50 (oral, ratón) = 5 g/kg DL50 (oral, rata) = 11.7 g/kg Irritante para los ojos y el tracto respiratorio.	Probablemente no carcinógeno, no es teratógeno, no tiene efectos embriotóxicos, mutágenicos y probablemente no tiene toxicidad reproductiva.
IDENTIFICACION DE PELIGROS	
Inhalación: Causa irritación del tracto respiratorio con síntomas como tos, falta de respiración. Ingestión: Causa irritación del tracto gastrointestinal. Los síntomas pueden ser náuseas, vómitos y diarrea. Dosis orales extremadamente altas pueden producir malestar gastrointestinal. Contacto con la Piel: Causa irritación de la piel. Los síntomas incluyen enrojecimiento, prurito y dolor. Contacto Ocular: Altamente irritante; puede ser también abrasivo. Almacenamiento: Lugares ventilados, frescos y secos separados de las zonas de trabajo. Lejos de fuentes de calor e ignición (y de la acción directa de los rayos solares). Separado de materiales incompatibles. Rotular los recipientes adecuadamente. Usar equipo de protección personal. Ventile el área. No permita que caiga en fuentes de agua y alcantarillas. Manipulación: Usar siempre protección personal así sea corta la exposición o la actividad que realice con el producto.	Leer las instrucciones de la etiqueta antes de usar el producto. Debe disponerse de duchas y estaciones de lavajos. El contacto continuo y prolongado puede producir dermatitis. Por ingestión crónica o de grandes dosis produce erosión dental e irritación del sistema digestivo. Peligros de incendio y/o explosión: El producto no enciende por sí mismo pero puede arder con dificultad. Bajo ciertas condiciones una nube de polvo de este material puede explotar por chispa o llama. Productos de la combustión: Monóxido de carbono y dióxido de carbono Procedimientos en caso de incendio y/o explosión: Evacuar o aislar el área de peligro. Restringir el acceso a personas innecesarias y sin la debida protección. Ubicarse a favor del viento. Usar equipo de protección personal. Extinguir el fuego con un agente adecuado. Agentes extintores del fuego: Polvo químico seco, agua, espuma o dióxido de carbono



• **ACIDO CLORHÍDRICO**

Nombre de la Sustancia N° CAS SARA 313	Fórmula HCL
Sinónimos Acide chlorhydrique (French) * Acido cloridrico (Italian) * Anhydrous hydrochloric acid * Chloorwaterstof (Dutch) * Chlorohydric acid * Chlorowodor (Polish) * Chlorwasserstoff (German) * Hydrochloride * Hydrogen chloride (ACGIH:OSHA)	
PROPIEDADES FÍSICO/QUÍMICAS	
Aspecto Estado Físico: Líquido. Estabilidad y Reactividad: Estable: Estable. Materiales a Evitar: Bases, Aminas, Metales alcalinos, Metales.	Productos de Descomposición Peligrosos: Gas clorhídrico. Peso Molecular 36,4600 AMU
INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA	
VÍA DE EXPOSICIÓN Contacto con la Piel: Puede provocar irritación de la piel. Absorción Cutánea: Puede ser nocivo en caso de absorción por la piel Contacto con los Ojos: Puede provocar irritación de los ojos. Inhalación: El producto puede ser irritante para las membranas mucosas y el tracto respiratorio superior. Puede ser nocivo en caso de inhalación. Ingestión: Puede ser nocivo en caso de ingestión. SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA EXPOSICIÓN Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas. CONTRA INCENDIOS Equipo de Protección: Usar un aparato respiratorio autónomo y ropa protectora para evitar el contacto con la piel y los ojos. Riesgos Específicos: Emite humos tóxicos en caso de incendio.	EXPOSICIÓN ORAL En caso de ingestión, lavar la boca con agua si el sujeto está consciente. Llamar al médico. INHALACIÓN En caso de inhalación, sacar al sujeto al aire libre. Si no respira, administrar respiración artificial. Si respira con dificultad, administrar oxígeno. EXPOSICIÓN DÉRMICA En caso de contacto con la piel, lavar con abundante cantidad de agua durante 15 minutos por lo menos. Quitar la ropa y el calzado contaminados. Llamar al médico. EXPOSICIÓN OCULAR En caso de contacto con los ojos, enjuagar con abundante cantidad de agua durante 15 minutos por lo menos. Separar los párpados con los dedos para asegurar el buen enjuague de los ojos. Llamar al médico. MEDIOS DE EXTINCIÓN Adecuado: Agua pulverizada. Dióxido de carbono, polvo químico seco o espuma apropiada.
MANIPULACIÓN	
Exposición del Usuario: No inhalar el vapor. No permitir el contacto con los ojos, la piel o la ropa.	
ALMACENAMIENTO	
Adecuado: Mantener herméticamente cerrado. REQUISITOS ESPECIALES Puede producir presión. Abra con cuidado	



• **AZIDA DE SODIO**

No.-CAS: 26628-22-8 P.M. 65.01 g/mol	Fórmula molecular: N_3Na (Según Hill) Fórmula química: NaN_3
PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS.	
Estado físico: sólido Color: blanco Olor: inodoro Punto de fusión 275 °C (descomposición) Punto de ebullición 300 °C (descomposición violenta)	Temperatura de ignición no disponible Punto de inflamación no disponible Límite de explosión bajo no disponible alto no disponible Densidad (20 °C) 1.85 g/cm ³ Solubilidad en Agua (17 °C) 420 g/l Descomposición térmica > 275 °C
ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD	
Condiciones a evitar: Calentamiento fuerte. Información complementaria: Reacciona con facilidad. Test de martinete en caída: negativo. Descomposición explosiva.	Materias a evitar: agua. Con las siguientes sustancias existe peligro de explosión y/o de formación de gases tóxicos: ácidos, metales pesados, sales metálicas, bromo, sulfato de dimetilo / ácidos, cobre, diclorometano, carbono sulfuro, ácido sulfúrico.
INFORMACION TOXICOLOGICA	
Toxicidad aguda: LD50 (dérmica, conejo): 20 mg/kg. LD50 (oral, rata): 27 mg/kg. Toxicidad subaguda a crónica: No teratógeno en experimentos con animales. Informaciones adicionales sobre toxicidad: Tras inhalación de polvo/aerosoles: Fuerte irritación en: mucosas, vías respiratorias. Consecuencias posibles: edema pulmonar. Efecto latente. Tras contacto con la piel: leves irritaciones. Riesgo de absorción por la piel. Tras contacto con los ojos: leves irritaciones.	Tras ingestión: Irritaciones de las mucosas en la boca, garganta, esófago y tracto estomago-intestinal. Efectos sistémicos: efectos sobre el sistema nervioso central, paro cardiovascular, taquicardia, descenso de la tensión sanguínea, tos, dificultades respiratorias, espasmos, cefaleas, vértigo, náuseas, vómito, colapso, pérdida de conocimiento. Información complementaria: El producto debe manejarse con especial cuidado.
INFORMACIONES ECOLOGICAS	
Efectos ecotóxicos: Muy tóxico para organismos acuáticos. Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático. A pesar de la dilución, el compuesto produce mezclas tóxicas con el agua. Efecto herbicida. Actividad nematocida. Toxicidad para los peces: <i>L. macrochirus</i> LC50: 0.7 mg/l /96h	Toxicidad de dafnia: <i>Daphnia pulex</i> CE50: 4.2mg/l /96 h Toxicidad para las algas: cultivo mixto de algas verdes CI50: 272mg/l Toxicidad de bacterias: <i>Photobacterium phosphoreum</i> CE50: 38.5 mg/l <i>Pseudomonas fluorescens</i> CE5: 2.6 mg/l
IDENTIFICACION DE LOS PELIGROS	
Muy tóxico por ingestión. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Muy tóxico para los Organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.	
MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO.	
Manipulación: Mantener seco el lugar de trabajo. La sustancia no debe entrar en contacto con agua. Almacenaje: Bien cerrado, en lugar bien ventilado. Lugar seco de +15°C a +25°C.	

**CONTROLES DE EXPOSICION /PROTECCION PERSONAL.**

<p>Nombre Sodio azida Valores: 0.1 mg/m³ Resorción cutánea H (peligro de resorción cutánea) Protección respiratoria: necesaria en presencia de polvo. Protección de los ojos: precisa Protección de las manos: Para contacto pleno: Guantes: Caucho nitrilo Espesor: 0.11 mm</p>	<p>Tiempo de penetración: > 480 Min. En caso de salpicaduras: Guantes: Caucho nitrilo Espesor: 0.11 mm Tiempo de penetración: > 480 Min. Medidas de higiene particulares: Sustituir inmediatamente la ropa contaminada. Protección preventiva de la piel. Lavar cara y manos al término del trabajo. No comer ni beber en el lugar de trabajo bajo ninguna circunstancia. Trabajar bajo vitrina extractora. No inhalar la sustancia.</p>
--	---

• **EDTA**

<p>Nombre Comercial: E.D.T.A. Acida Nombre Químico: Acido Tetracético Etilen Diamina Peso Molecular: 292,12</p>	<p>Sinónimos: Edatamil, Acido Edético, Endrate, Acido Tétrino, Ácido etilendiaminotetraacético. EDTA Formula: ((HOCOCH₂)₂NCH₂)₂ Nº CAS: 60-00-4</p>
--	--

CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS.

<p>PROPIEDADES FÍSICAS Temperatura de fusión: 220 °C Temperatura de ebullición: 247 °C Presión de vapor, mm Hg a 20°C: Insignificante Densidad relativa: 0,86 a 20 °C Solubilidad en agua, g/ml: 0.5 g/L a 25 °C Reactividad en agua: Ninguna Estado físico, color y olor: Polvo blanco cristalino, sin olor</p>	<p>Velocidad de evaporación (butil acetato=1): Insignificante Punto de inflamación: No combustible Temperatura de autoignición (°C): No aplica Volatilidad, %: No se dispone de información Límites de inflamabilidad (%): No aplica Esta sustancia puede ser peligrosa para el ambiente; debería prestarse atención especial al agua.</p>
--	---

ESTABILIDAD E IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS (TOXICOLOGÍA)

<p>Algunos pueden arder, pero no incendiarse inmediatamente. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. La inhalación del material puede ser dañina. El contacto puede causar quemaduras en la piel y los ojos.</p>	<p>La inhalación de polvo de Asbesto puede tener un efecto dañino en los pulmones. El fuego puede producir gases irritantes, corrosivos y/o tóxicos. Las fugas resultantes del control del incendio pueden causar contaminación.</p>
--	--

MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO

Separado de oxidantes fuertes, bases fuertes, cobre y sus aleaciones, níquel; herméticamente cerrado; mantener en lugar frío, seco.

PRIMEROS AUXILIOS

Mover a la víctima donde se respire aire fresco. Aplicar la respiración artificial si la víctima no respira. Suministrar oxígeno si respira con dificultad. Quitar y aislar la ropa y el calzado contaminados. En caso de contacto con la sustancia, enjuagar inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente por lo menos durante 20 minutos

• **METANOL**

FORMULA: CH ₄ O, CH ₃ OH PESO MOLECULAR: 32.04 g/mol CAS: 67-56-1 UN: 1230	COMPOSICION: C: 37.48 %, H: 12.58 % y O: 49.93 %
GENERALIDADES:	
<p>Es un líquido incoloro, venenoso, con olor a etanol y cuando está puro puede tener un olor repulsivo. Arde con flama no luminosa. Es utilizado industrialmente como disolvente y como materia prima en la obtención de formaldehído, metil-ter-butíl éter, ésteres metílicos de ácidos orgánicos e inorgánicos. También es utilizado como anticongelante en radiadores automovilísticos; en gasolinas y diesel; en la extracción de aceites de animales y vegetales y agua de combustibles de automóviles y aviones; en la desnaturalización de etanol; como agente suavizante de plásticos de piroxilina y otros polímeros y como disolvente en la síntesis de fármacos, pinturas y plásticos.</p> <p>Durante mucho tiempo se obtuvo por destilación destructiva de madera a altas temperaturas, en la actualidad se produce por hidrogenación catalítica de monóxido de carbono a presiones y temperaturas altas, con catalizadores de cobre-óxido de cinc; por oxidación de hidrocarburos y como subproducto en la síntesis de Fischer-Tropsch.</p>	
MARCAJE: Líquido inflamable, venenoso. SINONIMOS: En inglés: Otros idiomas: alcohol metílico methanol alcool methylique (frances) hidrato de metilo methyl alcohol methylalkohol (aleman)	metilol bieleski's solution metanolo (italiano) carbinol colonial spirit alcool metílico (italiano) alcohol de madera columbian spirit pyroxylic spirit wood naphtha hidroxido de metilo wood spirit metylowy alkohol (polaco)
PROPIEDADES FISICAS Y TERMODINAMICAS:	
Densidad (g/ml): 0.81 g/ml (0/4 oC), 0.7960 (15/4 oC), 0.7915 (20/4 oC), 0.7866 (25/4 oC) Punto de fusión: -97.8 oC Punto de ebullición (oC): 64.7 (760 mm de Hg), 34.8 (400 mm de Hg), 34.8 (200 mm de Hg), 21.2 (100 mm de Hg), 12.2 (60 mm de Hg), 5 (40 mm de Hg), -6 (20 mm de Hg), -16.2 (10 mm de Hg), -25.3 (5 mm de Hg), -44 (1 mm de Hg) Índice de refracción a 20 oC: 1.3292 Densidad de vapor (aire = 1): 1.11 Temperatura de autoignición: 380 oC Tensión superficial (din/cm): 22.6 Calor específico (J/g K): 1.37 (vapor a 25 oC) y 2.533 (líquido a 25 oC) Presión de vapor (mm de Hg): 127.2 (a 25 oC) Punto de inflamación en copa cerrada (Flash point): 12 oC Calor de vaporización en el punto de ebullición (J/g): 1129 Calor de combustión (J/g): 22 662 (a 25 oC) Punto de congelación: -97.68 oC Temperatura de ignición: 470 oC Límites de explosividad (% en volumen en el aire): 6-36.5	Temperatura crítica: 240 oC Presión crítica: 78.5 atm Volumen crítico: 118 ml/mol Calor de formación (kJ/mol): -239.03 (líquido a 25 oC). Energía libre de formación (kJ/mol): -166.81 (líquido a 25 oC). Calor de fusión (J/g): 103 Viscosidad (cP): 0.541 (líquido a 25 oC) Momento dipolar: 1.69 Constante dieléctrica: 32.7 (a 25 oC) Conductividad térmica (W/m K): 0.202 (a 25 oC) Forma azeótropos con muchos compuestos Solubilidad: miscible con agua, etanol, éter, benceno, cetonas y muchos otros disolventes orgánicos. Disuelve una gran variedad de sales inorgánicas por ejemplo 43 % de yoduro de sodio, 22 % de cloruro de calcio, 4 % de nitrato de plata, 3.2 % de cloruro de amonio y 1.4 % de cloruro de sodio

**PROPIEDADES QUIMICAS:**

Este producto reacciona violentamente con bromo, hipoclorito de sodio, dietil-cinc, disoluciones de compuestos de alquil-aluminio, trióxido de fósforo, cloruro cianúrico, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, sodio, ter-butóxido de potasio y perclorato de plomo.
En general, es incompatible con ácidos, cloruros de ácido, anhídridos, agentes oxidantes, agentes reductores y metales alcalinos.

NIVELES DE TOXICIDAD:

RQ: 5000 IDLH: 25000 ppm LDLo (oral en humanos): 4.28 mg/Kg LD50 (oral en ratas): 5628 mg/kg LC50 (inhalado en ratas): 64000 ppm/4h LD50 (en piel con conejos): 15800 mg/kg	Niveles de irritación a piel de conejos: 500 mg/24 h, moderada. Niveles de irritación a ojos de conejos: 40 mg, moderada. México: CPT (en piel): 260 mg/m ³ (200 ppm) CCT (en piel): 310 mg/m ³ (250 ppm)
--	---

MANEJO:

<p>El manejo de este producto debe hacerse en un lugar bien ventilado, utilizando bata, lentes de seguridad y, si el uso es prolongado, guantes. No deben usarse lentes de contacto al utilizar este producto. Al trasvasar pequeñas cantidades con pipeta, utilizar propipetas, NUNCA ASPIRAR CON LA BOCA.</p> <p>Riesgos de fuego y explosión: Es un producto inflamable.</p> <p>El envenenamiento puede efectuarse por ingestión, inhalación o absorción cutánea. Y se debe, posiblemente, a su oxidación a ácido fórmico o formaldehído, esta oxidación se sabe que puede ser inhibida por etanol, pues el etanol es metabolizado de manera muy específica y desintoxica al organismo de metanol por medio de la respiración.</p> <p>Inhalación: La exposición a una concentración mayor de 200 ppm produce dolor de cabeza, náusea, vómito e irritación de membranas mucosas. Concentraciones muy altas pueden dañar el sistema nervioso central y causar problemas en la visión. Los metabolitos de este producto (ácido fórmico y formaldehído) son metabolizados lentamente por el organismo, por lo que los efectos del metanol son acumulativos y una exposición constante aún a bajos niveles, puede causar muchos de los efectos mencionados arriba.</p>	<p>Contacto con ojos: Tanto los vapores como el líquido son muy peligrosos, pues se ha observado que el metanol tiene un efecto específico sobre el nervio óptico y la retina.</p> <p>Contacto con la piel: El contacto directo produce dermatitis y los efectos típicos de los vapores de metanol que se absorben por la piel.</p> <p>Ingestión: El envenenamiento por este medio se lleva a cabo frecuentemente por etanol adulterado y sus efectos dependen de la cantidad ingerida, pues, como se mencionó arriba, el etanol afecta el metabolismo del metanol.</p> <p>Carcinogenicidad: No se ha observado un incremento en los casos de cáncer en trabajadores expuestos a metanol, en estudios epidemiológicos.</p> <p>Mutagenicidad: Resultó ser no mutagénico en estudios con Salmonella typhimurium y no indujo el intercambio de cromátida hermana.</p> <p>Peligros reproductivos: En estudios con concentraciones altas de vapor (10000 ppm) se incrementan las malformaciones congénitas las cuales incluyen órganos urinarios y cardiovasculares. A concentraciones de 5000 ppm no se observaron estos efectos</p>
--	--

ALMACENAMIENTO:

El metanol debe almacenarse en recipientes de acero al carbón, rodeado de un dique y con sistema de extinguidores de fuego a base de polvo químico seco o dióxido de carbono, cuando se trata de cantidades grandes. En el caso de cantidades pequeñas, puede manejarse en recipientes de vidrio. En todos los casos debe mantenerse alejado de fuentes de ignición y protegido de la luz directa del sol.

• **NICOTINAMIDA**

IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO.	
Nombre del producto : Nicotinamida Sinónimos: Vitamin PP, Vitamin B3, Nicotinic acid amide, Pyridine-3-carboxylic acid amide, Niacinamide	Marca : Sigma Formula : C ₆ H ₆ N ₂ O Peso molecular: 122.12 g/mol
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	
Aspecto Forma polvo Color blanco	Datos de Seguridad Punto/intervalo de fusión: 128 - 131 °C (262 - 268 °F) - lit. Punto de inflamación 150 °C (302 °F) - copa cerrada
ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD	
Estabilidad química Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Materias que deben evitarse Agentes oxidantes fuertes Productos de descomposición peligrosos Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx)	
INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA	
Toxicidad aguda DL50 Oral - rata - 3,500 mg/kg	
IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS	
Peligros OSHA Efecto del órgano de blanco, Irritante Órganos diana Riñón, Ojos, Hígado Clasificación SGA Toxicidad aguda, Oral (Categoría 5) Irritación cutáneas (Categoría 2) Irritación ocular (Categoría 2A) Toxicidad específica en determinados órganos -	exposición única (Categoría 3) Efectos potenciales para la Salud Inhalación Puede ser nocivo si se inhala. Provoca una irritación del tracto respiratorio. Piel Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Provoca irritaciones de la piel. Ojos Provoca una irritación en los ojos. Ingestión Puede ser nocivo si es tragado.
PRIMEROS AUXILIOS	
Si es inhalado. Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial. Consultar a un médico. En caso de contacto con la piel. Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Consultar a un médico. En caso de contacto con los ojos. Lávese a fondo con agua abundante durante 15 minutos por lo menos y consulte al médico. Si es tragado. Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua. Consultar a un médico.	
MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO	
Precauciones para una manipulación segura Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evítese la formación de polvo y aerosoles. Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares en los que se forma polvo. Disposiciones normales de protección preventivas de incendio. Condiciones para el almacenaje seguro Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Conservar en un lugar seco.	



• ESTREPTOZOTOCINA

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Aspecto Forma cristalino Color amarillo claro	Datos de Seguridad Punto/intervalo de fusión: 121 °C (250 °F) Solubilidad en agua soluble
--	--

ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Estabilidad química Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. Materias que deben evitarse Agentes oxidantes fuertes, Ácidos fuertes, Bases fuertes	Productos de descomposición peligrosos Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx) Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles
--	---

INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

Toxicidad aguda Oral DL50 DL50 Oral - rata - 5,150 mg/kg Se han observado efectos mutagénicos en experimentos de laboratorio. Genotoxicidad in vitro - Humanos – Riñón daño en ADN Genotoxicidad in vitro - rata – Hígado síntesis no prevista de ADN Genotoxicidad in vitro - Hamster – Pulmones intercambio de cromátides Genotoxicidad in vivo - rata – Oral daño en ADN Genotoxicidad in vivo - rata – Intraperitoneal síntesis no prevista de ADN. Carcinogenicidad. Posible agente carcinógeno para el humano	Lavarse abundantemente los ojos con agua como medida de precaución. Si es tragado Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua. Consultar a un médico. Medios de extinción apropiados Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono. Equipo de protección especial para el personal de lucha contra incendios Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego. Productos de combustión peligrosos Productos de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio. - Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx)
---	---

MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

Precauciones personales Utilícese equipo de protección individual. Evite la formación de polvo. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada. Evacuar el personal a zonas seguras. Evitar respirar el polvo. Precauciones relativas al medio ambiente Impedir nuevos escapes o derrames si puede hacerse sin riesgos.	No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado. Métodos y material de contención y de limpieza Recoger y preparar la eliminación sin originar polvo. Limpiar y traspalar. Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.
--	---

MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Precauciones para una manipulación segura Evítese la formación de polvo y aerosoles. Condiciones para el almacenaje seguro Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Higroscópico. Almacenar en atmósfera inerte. Sensible a la humedad.	Protección de la piel y del cuerpo. Indumentaria impermeable, El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.
---	--