



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“PROTECCIÓN CONTRA LA APOPTOSIS PRODUCIDA
POR ESTREPTOZOTOCINA EN CELULAS BETA
PANCREATICAS POR TRATAMIENTO CON
DERIVADOS ANDROGÉNICOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA:

**BRISA MARCELA SANCHEZ
CAMACHO**



DIRECTOR DE TESIS: DR. MARTIN PALOMAR MORALES

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO 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.

Este trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en el Laboratorio de Bioregulación, bajo la asesoría del Doctor Martín Palomar Morales.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AB	Complejo Avidina-Biotina
ADA	Asociación America de Diabetes (por sus siglas en ingles)
ADP	Adenosin Difosfato
AIF	Factor de inducción de apoptosis
BSA	Albumina de Suero de Bovino
CBG	Globulina Fijadora de Corticoesteroides
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Cu/Zn-SOD	Super Oxido Dismutasa dependiente de Cobre y Zinc
DC-β	Deficiencia de Células β
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-s	Sulfato de dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
Fas-L	Ligando de Fas
G6PDH	Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
GPX	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation reducido
HDL	Lipoproteinas de Alta Densidad
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogeno
KCl	Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potasio
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
LH	Hormona Luteinizante
LHRH	Hormona Liberadora de la Hormona Leuteinizante
LSD	Mínima diferencia significativa
LT-α	Limfocitos derivados de citoquinas linfotoxina alfa

Mn-SOD	Super Óxido Dismutasa dependiente de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
NAD	Dinucleótido de Adenosina y Nicotinamida
NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de sodio
NGF	Factor de Crecimiento Neural
NO	Óxido Nítrico
NOD	Diabéticos No Obesos
ONOO·	Peroxinitrito
PBS	Salina amortiguada con fosfato
PV	Próstata Ventral
RE	Retículo Endoplásmico
REL	Retículo Endoplásmico Liso
RI	Resistencia a Insulina
RL	Radicales Libres
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SHBG	Globulina fijadora de Hormonas Sexuales
STZ	Estreptozotocina
TESTO	Testosterona
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Tx	Triton X-100
VEH	Vehículo (aceite de maíz)

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Antecedentes.....	6
1.2 Planteamiento del problema.....	7
1.3 Objetivo general.....	8
1.3.1 Objetivos particulares.....	8
2. FUNDAMENTOS.....	9
2.1 Diabetes Mellitus.....	9
2.2 Diabetes Mellitus tipo 1 o Insulinodependiente.....	10
2.3 Diabetes Mellitus tipo 2 o No insulinodependiente.....	12
2.4 Estrés Oxidativo.....	12
2.5 Especies Reactivas de Oxígeno.....	13
2.6 Mecanismo de defensa antioxidante.....	14
2.6.1 Superóxido Dismutasa.....	15
2.6.1.1 Cu/Zn SOD.....	16
2.6.1.2 Mn-SOD.....	16
2.6.2 Catalasa.....	17
2.7 Apoptosis.....	17
2.8 Apoptosis en tejido pancreático.....	19
2.9 Hormonas Esteroides Sexuales.....	20
2.10 Andrógenos.....	21
2.10.1 Testosterona.....	23
2.10.2 Dihidrotestosterona.....	23
2.10.3 Dehidroepiandrosterona.....	24
2.11 Estreptozotocina.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 Diseño experimental.....	28
3.2 Inclusión del tejido pancreática.....	28
3.3 Técnica Inmunohistoquímica.....	28
3.4 Tinción de Túnel.....	30
3.5 Análisis de resultados.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Inmunoexpresión de Catalasa.....	32
4.2 Inmunoexpresión de Cu/Zn-SOD.....	35
4.3 Inmunoexpresión de Mn-SOD.....	38
4.4 Porcentaje de apoptosis en células β pancreáticas.....	42
5. DISCUSIÓN.....	47
6. CONCLUSIONES.....	50
7. LITERATURA CITADA.....	51

1. INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus (DM) es un trastorno metabólico con diferentes características genofenotípicas y en el que intervienen múltiples factores (Islas *et al*, 2004; Gomis *et al*, 2007). Se ha demostrado que durante la aparición de la Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) existe delección inapropiada de las células β pancreáticas por apoptosis (Mandrup-Poulsen, 2001).

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo de fundamental importancia y que ocurre durante el desarrollo normal del organismo. Su función principal es la remoción selectiva de células durante la remodelación, involución y renovación de ciertos órganos y tejidos. Este mecanismo puede ser desencadenado por una gran variedad de estímulos, en los cuales se incluyen las caspasas, las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y el Óxido Nítrico (NO), entre otros (Chandra *et al*, 2001; Mandrup-Poulsen, 2001).

En estados patológicos como la DM, se han demostrado múltiples efectores de la apoptosis; ya que la muerte celular cobra fundamental importancia (Gomis *et al*, 2007). En modelos de diabetes experimental, inducida por Estreptozotocina o de desarrollo espontáneo, como los ratones Diabéticos No Obesos (NOD), se ha observado que la apoptosis es la responsable de la muerte de células β pancreáticas productoras de insulina (O'Brien *et al*, 1996, 1997).

La estreptozotocina (STZ) es un agente metilante que daña al DNA; su mecanismo de acción en las células β de roedores fue descrito por Skudelski (2001). Durante el metabolismo de la STZ se producen intermediarios tóxicos, tales como ROS y NO.

Se sabe que las enzimas antioxidantes pueden prevenir el daño en modelos experimentales de diabetes; ya que los antioxidantes reducen los niveles de ROS en células beta (Kajimoto *et al*, 2004). Actualmente, se sabe que las hormonas esteroides sexuales tienen propiedades antioxidantes y anti-apoptóticas en diferentes células y tejidos (Ahlbom *et al*, 2001; Deroo *et al*, 2004; Miyake *et al*, 2004; Tam *et al*, 2003).

1.1 ANTECEDENTES

Estudios realizados sobre la capacidad anti-apoptótica de la testosterona, la dihidrotestosterona (DHT) y dehidroepiandrosterona (DHEA), sobre diversas células y tejidos, han aportado evidencia que demuestra que estos andrógenos participan en contra del daño generado por apoptosis. En células de Sertoli inmaduras tratadas se observó que el tratamiento *in vitro* con 17β -estradiol y 5α -dihidrotestosterona, reducen los niveles de proteína AIF (Factor Inductor de Apoptosis), caspasa-3 y -9, Bax y el mRNA de p53; además, la fragmentación del DNA también disminuye después del tratamiento hormonal; lo cual demuestra que el 17β -estradiol y la 5α -

dihidrotestosterona, actúan como moduladores de la apoptosis. También sugiere que los andrógenos y estrógenos, pueden ser capaces de vías independientes de modulación de la muerte celular mediante la regulación de diferentes factores pro-apoptóticos (Simões *et al*, 2003).

Se sabe que durante la aparición de la DM1 existe apoptosis de células β mediada por diversos factores. Por este motivo, diversas investigaciones se han propuesto estudiar el efecto de los andrógenos contra el daño provocado durante diabetes experimental inducida por STZ sobre esta línea celular.

Morimoto *et al* (2005) demostraron que el daño apoptótico temprano producido por STZ en ratas macho castradas fue revertido con testosterona; sugieren también que esta hormona ejerce un efecto protector natural en el páncreas de rata. De igual forma, Palomar-Morales *et al* (2010) demostraron que la testosterona tiene un efecto citoprotector en contra del daño por apoptosis inducida con STZ y que este efecto es específico en los machos, y que no es llevado a cabo por el 17β -estradiol o la progesterona. Además relacionan el efecto protector con la inmuexpresión de las enzimas antioxidantes en células β pancreáticas.

Se ha propuesto que la apoptosis esta mediada a través del estrés oxidativo. En la literatura se sugiere que los andrógenos tienen capacidad antioxidante, esto concuerda con lo reportado por Tam *et al* (2003) que demostraron que la deprivación de andrógenos induce estrés oxidativo en próstata ventral de rata, debido a la elevación del anabolismo de ROS y la disminución de la detoxificación antioxidante.

La capacidad antioxidante de los andrógenos en tejidos con daño por estrés oxidativo ha sido demostrada por Alhbom *et al* (2001), en donde la testosterona protege a las células granulo-cerebelares del estrés oxidativo; Boccuzzi *et al* (1997) sugieren que la DHEA podría proteger diversos tejidos del daño por estrés oxidativo; Aragno *et al* (1999) demostraron que la DHEA reduce claramente el estrés oxidativo en tejidos tratados con STZ.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los andrógenos participan en la protección del daño provocado por estrés oxidativo en diferentes órganos y tejidos, tales como en la próstata ventral, el cerebro, los cardiomiocitos y células β pancreáticas. Este daño se debe a la activación de la muerte celular programada; la cual, genera desregulación de la apoptosis fisiológica, eliminando células funcionales. En el caso particular del páncreas, la deleción inapropiada de células β da origen a la Diabetes Mellitus. Por este motivo, es importante conocer cuál de los derivados androgénicos: dihidrotestosterona y dehidroepiandrosterona, ejerce una mayor citoprotección comparados con la que manifiesta la testosterona.

1.3 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el efecto protector de derivados androgénicos sobre la apoptosis producida por estreptozotocina en células β pancreáticas de rata.

1.3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el efecto de los andrógenos (testosterona, 5 α -dihidrotestosterona y dehidroepiandrosterona) sobre la apoptosis producida por estreptozotocina, en células β pancreáticas de rata.
- Evaluar la presencia de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa I y II) por efecto de los diferentes andrógenos durante la apoptosis inducida por estreptozotocina en células β pancreáticas de rata.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Diabetes Mellitus

Actualmente, la Diabetes Mellitus (DM) se distribuye por todo el mundo. Estudios recientes han determinado que uno de cada 3 nacidos en el año 2000, desarrollará DM a lo largo de su vida; motivo por el cual, se cree que la enfermedad ha llegado a proporciones epidémicas. En la actualidad, existen alrededor de 177 millones de enfermos a nivel mundial, de los cuales, más del 90% de los casos presentan DM tipo 2, y el 10% restante, presenta DM tipo 1; sin embargo, esta última continuará aumentando su prevalencia (Delgado, 2008).

La Diabetes Mellitus (DM) representa un grupo de enfermedades o síndromes metabólicos, caracterizados por hiperglucemia, con características genofenotípicas diferentes y donde intervienen múltiples factores (Escobar & Tébar, 2009; Gomis *et al.*, 2007).

La variación en el desarrollo y en el tipo de DM es una consecuencia de diversos mecanismos patogénicos, que incluyen desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, con déficit absoluto de insulina, hasta anormalidades en la acción o resistencia a la misma (Rosas *et al.* 2004).

En la DM la duración de la hiperglucemia implica una afectación universal del organismo; sin embargo, las complicaciones más evidentes son: retinopatía, nefropatía, neuropatía (periférica y autonómica), enfermedades aterotrombóticas; sin olvidar la triada clásica de síntomas: poliuria, polidipsia y polifagia.

En mayo de 1995 se estableció el Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus para revisar, determinar y clasificar la nomenclatura de la enfermedad, dando como resultado un reporte sobre esta, en el cual se detalla la diagnosis, tratamiento y clasificación de la patología. En este último caso el Expert Committee clasifica la DM en Tipo 1, Tipo 2, DM gestacional y otros tipos específicos (Expert Committee, 2002).

Table 1—Etiologic classification of diabetes mellitus	
I. Type 1 diabetes* (β -cell destruction, usually leading to absolute insulin deficiency)	
A. Immune mediated	
B. Idiopathic	
II. Type 2 diabetes* (may range from predominantly insulin resistance with relative insulin deficiency to a predominantly secretory defect with insulin resistance)	
III. Other specific types	
A. Genetic defects of β -cell function	
1. Chromosome 12, HNF-1 α (MODY3)	
2. Chromosome 7, glucokinase (MODY2)	
3. Chromosome 20, HNF-4 α (MODY1)	
4. Mitochondrial DNA	
5. Others	
B. Genetic defects in insulin action	
1. Type A insulin resistance	
2. Leprechaunism	
3. Rabson-Mendenhall syndrome	
4. Lipotrophic diabetes	
5. Others	
C. Diseases of the exocrine pancreas	
1. Pancreatitis	
2. Trauma/pancreatectomy	
3. Neoplasia	
4. Cystic fibrosis	
5. Hemochromatosis	
6. Fibrocalculous pancreatopathy	
7. Others	
D. Endocrinopathies	
1. Acromegaly	
2. Cushing's syndrome	
3. Glucagonoma	
4. Pheochromocytoma	
5. Hyperthyroidism	
6. Somatostatinoma	
7. Aldosteronoma	
8. Others	
E. Drug- or chemical-induced	
1. Vacor	
2. Pentamidine	
3. Nicotinic acid	
4. Glucocorticoids	
5. Thyroid hormone	
6. Diazoxide	
7. β -adrenergic agonists	
8. Thiazides	
9. Dilantin	
10. α -Interferon	
11. Others	
F. Infections	
1. Congenital rubella	
2. Cytomegalovirus	
3. Others	
G. Uncommon forms of immune-mediated diabetes	
1. "Stiff-man" syndrome	
2. Anti-insulin receptor antibodies	
3. Others	
H. Other genetic syndromes sometimes associated with diabetes	
1. Down's syndrome	
2. Klinefelter's syndrome	
3. Turner's syndrome	
4. Wolfram's syndrome	
5. Friedreich's ataxia	
6. Huntington's chorea	
7. Laurence-Moon-Biedl syndrome	
8. Myotonic dystrophy	
9. Porphyria	
10. Prader-Willi syndrome	
11. Others	
IV. Gestational diabetes mellitus (GDM)	

Figura 1. Clasificación de la Diabetes Mellitus (Expert Committee, 2002)

2.2 Diabetes Mellitus Tipo 1 o Insulinodependiente

La Diabetes Mellitus tipo1 (DM1) antes llamada insulinodependiente o juvenil, es una forma muy heterogénea en su historia natural y clínica (Escobar y Tébar, 2009). Es causada por destrucción de las células β pancreáticas, resultando una deficiencia en la producción de insulina y una eventual dependencia a la misma (Davidson, 2000).

La American Diabetes Association (ADA), propuso clasificar la DM1 en Diabetes 1A, para la diabetes mediada por procesos inmunitarios con destrucción de células β pancreáticas, y Diabetes 1B, para la que no está mediada por procesos inmunitarios y se acompaña de una grave deficiencia de insulina. Por tanto, existen tres componentes esenciales en la aparición de la DM: la susceptibilidad genética de base, la incidencia de factores ambientales y el desencadenamiento de autoinmunidad (ADA, 2008).

Los principales determinantes genéticos en la DM1 se encuentran en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), además de su asociación a los *locus* para antígenos de Histocompatibilidad (*Human Leukocyte Antigen* o *HLA*), específicamente los de clase II, ubicados en el cromosoma 6p21,3 (Islas y Revilla, 2004; Rosas *et al.*, 2004). La clase II contiene los genes A y B que codifican las cadenas α y β que constituyen la estructura de las moléculas de esta clase en los *loci* HLADR, DQA y DQB. Los *loci* DR y DQ tienen una especial significancia en la etiopatogenia de enfermedades autoinmunes, específicamente, en la DM 1. Otros genes relevantes son los denominados DOA, DMA, DMB que regulan el procesado de moléculas HLAI (Escobar y Tébar, 2009; Sperling, 2003).

La DM1 también es asociada con la clase I, HLA A, B8, B1 y C. Otros elementos genéticos en el CMH que pueden contribuir en el desarrollo de DM1, son los genes HLA que codifican a una variedad de proteínas que desempeñan diversos papeles en la inmunidad; tal como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), proteínas de shock térmico y factores del complemento C2 y C4 (Davidson, 2000).

Si bien los genes del CMH tienen un importante papel en la susceptibilidad a DM, su presencia no es suficiente para inducir la aparición de la enfermedad; otro componente importante se localiza en ciertos genes no CMH que sólo ejercen su efecto en presencia de los genes CMH adecuados. En concreto, los polimorfismos del promotor del gen de la insulina y el cambio en un aminoácido de la tirosina-fosfatasa específica de linfocitos (*lyp*, PTPN22) se han asociado a la DM (Gomis *et al.*, 2007).

Los factores ambientales pueden actuar a uno o varios niveles del suceso dinámico de la autodestrucción de las células β como iniciadores, participantes o aceleradores del comienzo de la larga historia de la autoagresión a la célula β . Se conoce con certeza que la DM1 se origina como consecuencia de una respuesta autoinmunitaria contra las células β pancreáticas (mediada por células T). El término autoinmunidad se define como “la ruptura de la (auto) tolerancia”, lo que significa que las células inmunocompetentes comienzan a atacar los tejidos y las células del propio organismo. En el caso de la DM 1 dicha definición postula que “las células T específicas para moléculas propias de las células β pancreáticas (auto antígenos) existen normalmente pero están reprimidas por mecanismos de autocontrol” (Escobar y Tébar, 2009).

2.3 Diabetes Mellitus tipo 2 o No Insulinodependiente

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es conocida también como No insulinodependiente o de aparición tardía. Es la forma más frecuente de Diabetes (representa cerca del 90% de los casos), caracterizada clínicamente por elevada frecuencia familiar, aparición clínica tardía, asociada a obesidad e hipertensión arterial, tendencia baja a la cetosis y una mayor tendencia a la hiperosmolaridad no cetósica (Islas y Revilla, 2004).

En este trastorno metabólico se dan dos hechos fundamentales, por una parte: la resistencia de tejidos como el músculo, hígado y tejido adiposo a la acción de la insulina y, por otra, una disfunción que también puede ser progresiva de las células β pancreáticas (DC- β), que desde el punto de vista metabólico puede evolucionar como prediabetes (glucemia en ayunas alterada, intolerancia a la glucosa) o diabetes franca, situación que se hará dependiente de insulina cuando el fracaso de la células β sea completo.

Como se mencionó anteriormente, una característica de la DM2 es que, a pesar de que evoluciona con niveles normales o elevados de insulina plasmática, sus defectos a nivel celular no se manifiestan en forma proporcional, lo que se conoce como resistencia a la insulina (RI). Los mecanismos que desencadenan la RI no son bien conocidos aunque pueden darse a nivel pre-receptor, receptor o post-receptor; y se han descrito alteraciones en transmisión de señales que en definitiva interfieren en la captación, transporte y utilización de glucosa. Además, la disfunción endotelial que acompaña a la obesidad y DM2 ocasiona estrés oxidativo que puede inhibir la señalización del receptor de insulina y potenciar la RI. Sin embargo, esta puede desempeñar también un papel determinante en la DC- β ; además de algunos otros factores como la glucotoxicidad y la lipotoxicidad, pueden desencadenar la disfunción de células β (Escobar y Tébar, 2009; Islas y Revilla, 2004; Gomis *et al.*, 2007).

2.4 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo es provocado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente y/o reparar el daño; es decir, cada vez se generan más y más ROS, los sistemas antioxidantes disminuyen su actividad y no pueden controlar la generación de ROS. Esto sugiere que la disfunción mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo podría contribuir a la apoptosis, debido a la fuerte reducción en el suministro de energía celular (Kannan *et al.*, 2000; Mayor-Oxilia, 2010).

2.5 Especies Reactivas de Oxígeno

El oxígeno (O_2) es indispensable para la vida; sin embargo, en determinadas condiciones, ya sea por reacciones químicas, acciones enzimáticas, por efecto de radiaciones ionizantes entre otras; se pueden producir ROS, las cuales son capaces de reaccionar con otros compuestos y/o moléculas presentes en el organismo, provocando daño celular.

Un radical libre (RL) es un átomo o molécula que contiene en su último orbital, uno o más electrones desapareados; la presencia de este electrón desapareado provoca que sean altamente reactivos e inespecíficos. Las ROS son moléculas muy inestables, por lo que tienen una vida media muy corta. Se producen en el metabolismo del O_2 en todos los sistemas biológicos aerobios y reaccionan con todas las moléculas que se encuentran a su alrededor: lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos; la reacción de una ROS con alguna de estas moléculas, genera un segundo radical, que a su vez reacciona con una segunda molécula, y así sucesivamente, generando una reacción en cadena. Entre las ROS se incluyen al radical hidroxilo ($OH\cdot$), el superóxido ($O_2\cdot^-$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), considerando también al NO y $ONOO\cdot$ (peroxinitrito) (Balz, 1994; Kannan *et al*, 2000)

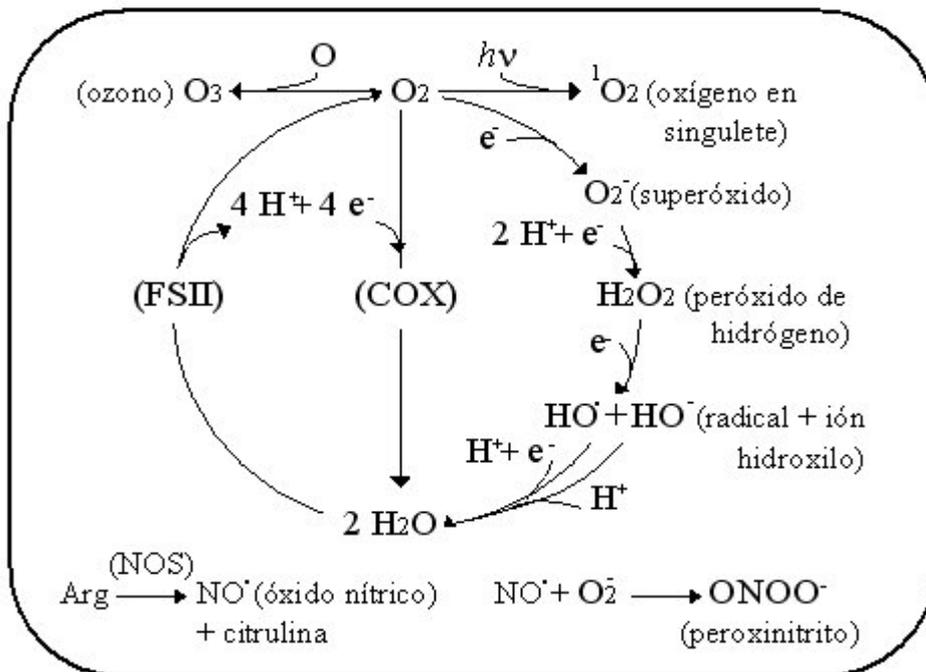


Figura 2. Principales especies reactivas de oxígeno. Las especies de oxígeno reactivas se generan por la ruptura o la excitación del dióxigeno (O , O_3 , 1O_2) o por la reducción parcial del mismo ($O_2\cdot^-$, H_2O_2 , $HO\cdot$). El fotosistema II (FSII) lleva a cabo la oxidación completa del agua en dióxigeno (fotosíntesis) mientras que la oxidasa del citocromo c (COX) efectúa la reducción completa del dióxigeno en agua (respiración). El óxido nítrico ($NO\cdot$) se produce

por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), en cambio, el peroxinitrito se produce de manera espontánea. $h\nu$ = energía de radiación.

Las ROS están involucradas en la etiología de numerosas enfermedades como padecimientos arterioscleróticos vasculares, isquemia, procesos de envejecimiento y en la DM; en esta última, diversos estudios sugieren que las ROS juegan un importante rol en la muerte de células β y en la progresión de la enfermedad (Guigliano *et al*, 1996).

2.6 Mecanismo de defensa antioxidante

La exposición a las ROS producidas por diversos procesos fisiológicos o ambientales, han llevado a los organismos aerobios a generar mecanismos de defensa; estos pueden ser preventivos, de reparación, de defensa física o de defensa antioxidante.

La defensa antioxidante está constituida por un grupo de sustancias, las cuales al estar en bajas concentraciones con respecto a las ROS, retrasan o previenen significativamente la oxidación de un sustrato oxidable, puede ser cualquier molécula orgánica o inorgánica que se encuentre en células vivas: proteínas, lípidos, carbohidratos y el DNA. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con RL y ROS que con el resto de moléculas presentes; ya sea que se encuentren en membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es sacrificar su propia integridad molecular para evitar alteraciones en las moléculas funcionalmente vitales; esta función se realiza en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Los antioxidantes actúan con el objetivo de mantener un equilibrio pro-oxidante/antioxidante, siempre a favor de los últimos (Jakoy *et al*, 1990).

Estos sistemas son tan diversos como las mismas ROS; ya que, pueden ser sistemas antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos; dentro de los enzimáticos encontramos la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu/Zn- SOD) y la isoenzima dependiente de manganeso (Mn-SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión reductasa (GR) y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH); y en los no enzimáticos, se encuentran el ácido ascórbico o vitamina C, el α -tocoferol o Vitamina E, el glutatión reducido (GSH), los carotenoides, los flavonoides, entre otros (Cascales-Angosto, 1999; Luna, 2010).

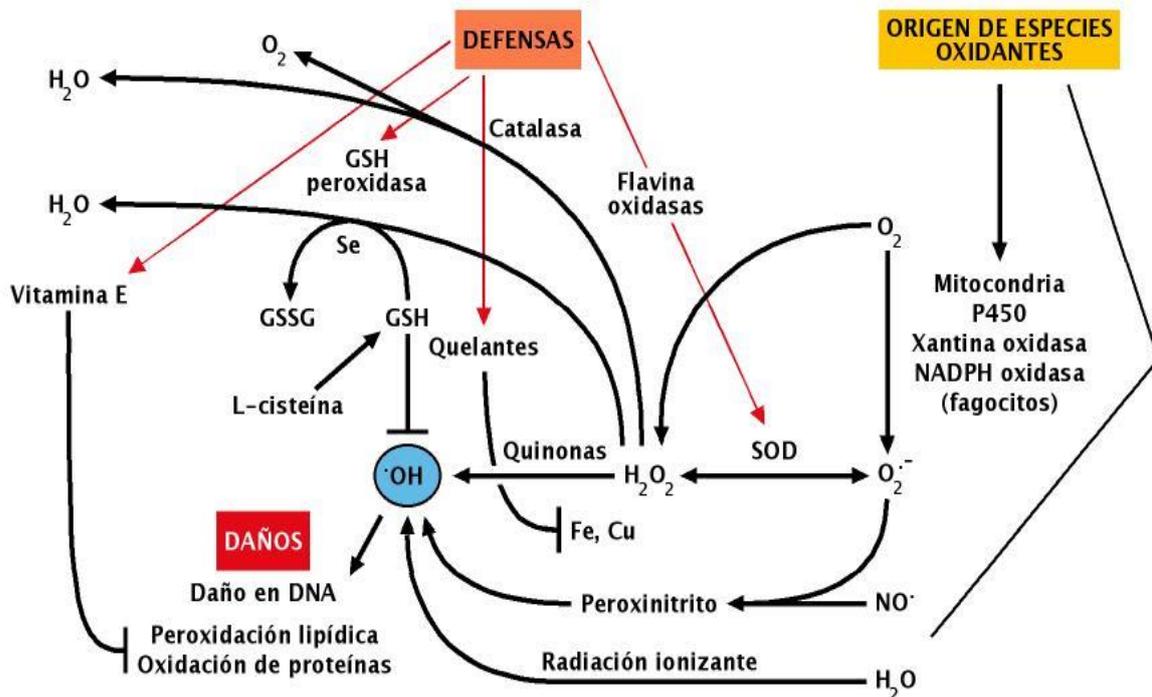
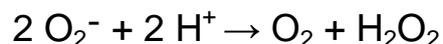


Fig. 3 Acción de los sistemas antioxidantes enzimáticos.

2.6.1 Superóxido Dismutasa

En 1938, Mann y Keilin aislaron una proteína (verde-azulada) de sangre bovina, la cual contenía cobre y nombraron *haemocuprein*. Trabajos posteriores, aislaron proteínas similares: *hepatocuprein*, *cerebrocuprein* o *citocuprein*. Pero el primer reporte en el cual se menciona el nombre de Superóxido Dismutasa (SOD) se atribuye a McCord y Fridovich en 1969 (Halliwell *et al*, 2007). Esta enzima funciona como parte del sistema de defensa celular que la protege de la toxicidad del O₂. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno.



En los mamíferos, esta familia está formada por tres miembros, los cuales se ubican en lugares claramente específicos, dos dentro de la célula y uno extracelular. La primera SOD, tiene en su centro catalítico un cobre y un cinc (SOD-I ó Cu/Zn-SOD) y se encuentra en el citosol; una forma diferente de Cu/Zn-SOD (EC), aparece en fluidos extracelulares. La segunda SOD, presenta un manganeso como centro catalítico y se localiza en la matriz mitocondrial de células eucariotas y en algunas bacterias; y las formas Fe-SOD y Ni-SOD, se localizan en bacterias aerobias (Cascales-Angosto, 1999; Konisgberg, 2008).

2.6.1.1 Cu/Zn-SOD

La Superóxido Dismutasa dependiente de cobre y cinc (SOD-I) se localiza en el citoplasma, núcleo, peroxisomas y la membrana mitocondrial externa. Se descubrió por vez primera en la bacteria luminiscente *Photobacterium leiognathi*. Es un homodímero de 32 kDa que contiene dos sub-unidades proteicas de 153 aminoácidos cada una; las cuales presentan un sitio activo: uno de cobre y otro de cinc, unidos por un imidazolato que es provisto por la histidina 63.

La Cu/Zn-SOD tiene la facultad de convertir radicales superóxido naturales en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. La SOD-I es de importancia catalítica solo por el cobre; ya que el cinc, confiere únicamente estabilidad estructural (Cascales-Angosto, 1999; Haliwell *et al*, 2007; Konisberg, 2008).

2.6.1.2 Mn-SOD

La mitocondria es el organelo sometido a mayor estrés oxidativo; ya que del 4 al 5% de los electrones involucrados en la cadena respiratoria se desvían de su función reductora; por lo que, la Superóxido Dismutasa dependiente de manganeso (SOD-II) es una importante enzima antioxidante homotetramérica de 88 kDa.

Esta enzima mitocondrial es codificada en el núcleo y es transportada a través de la membrana mitocondrial hacia la matriz mitocondrial; su expresión está regulada por el estado redox de la mitocondria. El mRNA codifica un homotetradímero de 22kDa en cada sub-unidad y posee un Mn^{+2} por monómero.

La SOD-II se une a los subproductos del superóxido, resultante de la fosforilación oxidativa, convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno y oxígeno diatómico (Konisberg, 2008; Luo, 2001).

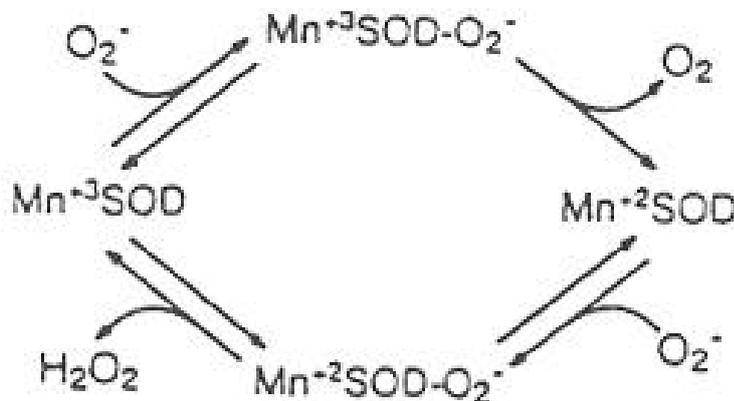


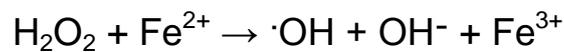
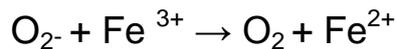
Fig. 4 El O_2^- es convertido a H_2O_2 y O_2 por Mn-SOD

2.6.2 Catalasa

La catalasa es una enzima antioxidante homotetramérica con un grupo hemo (Fe^{3+}) de 240kDa. Su función principal es convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular:



Al estar ausente la catalasa el H_2O_2 se acumula y, en presencia de metales de transición como el hierro o cobre, genera el radical hidroxilo que posee elevada reactividad para reaccionar con macromoléculas:



La catalasa se encuentra presente en la mayoría de las células aerobias, encontrándose en mayor proporción en el hígado, riñón y eritrocitos. A nivel subcelular, la catalasa se encuentra en peroxisomas (80%) y citosol (20%).

Se han identificado tres grupos de catalasas:

- i) Las catalasas monofuncionales, que contienen un grupo hemo y están presentes tanto en los organismos procariotas como eucariotas.
- ii) Las Mn-catalasas, son enzimas hexaméricas que no tienen grupo hemo; su sitio activo tiene un átomo de Mn y están presentes sólo en procariotas anaerobios.
- iii) Las catalasas-peroxidasas, que tienen actividad de catalasa y de peroxidasa; contienen un grupo hemo y sólo se presentan en bacterias y hongos.

La catalasa puede ser inhibida por la azida, el cianuro, el 3-amino-1, 2, 4-triazol, GSH y el ditiotreitól (Halliwell *et al*, 2007; Cascales-Angosto, 1999; Konisgberg, 2008).

2.7 Apoptosis

Es un proceso fundamental para un organismo. Su función principal es la remoción selectiva de células durante la remodelación de órganos y tejidos, así como la involución de ciertos órganos, la renovación de tejidos de recambio, la eliminación de células infectadas o dañadas genéticamente que pueden ser perjudiciales para las células cercanas. La apoptosis se caracteriza por una gran variedad de cambios morfológicos y fisiológicos (Chandra *et al*, 2001; Mandrup-Poulsen, 2001).

Una de las alteraciones tempranas de una célula apoptótica es la pérdida del potencial transmembranal mitocondrial. El núcleo de la célula sufre alteraciones tanto en la cromatina, la cual se condensa; como en la membrana nuclear, los poros nucleares se redistribuyen. La membrana celular se deforma y sufre numerosos abombamientos, las cisternas del retículo endoplásmico (RE) se ensanchan y fusionan, los fosfolípidos de la membrana celular cambian de orientación y se exponen al exterior y, en los estadios finales, se forman los cuerpos apoptóticos, que son agrupamientos de citoplasma rodeados de membrana celular (Ramírez, 1999; Kerr, 1972).

La muerte celular programa o apoptosis, puede ser desencadenada por diversos estímulos: intervienen señales intracelulares (vía intrínseca) y señales extracelulares (vía extrínseca) (Choi *et al*, 2010).

La vía extrínseca se inicia en el citoplasma por la activación de los llamados receptores de la muerte, pertenecientes a la superfamilia de receptores TNF/NGF, los cuales provocan apoptosis después de la unión a sus ligandos o a anticuerpos específicos. Los miembros de esta familia son proteínas transmembrana de tipo I, presentan un extremo intracelular carboxilo terminal, una región transmembrana y un extremo extracelular amino terminal. Estos receptores de la muerte son activados a través de una interacción con su ligando natural, un grupo de citocinas complementarias que pertenecen a la familia de proteínas TNF, con excepción de la LT- α . Se conocen 6 receptores de la muerte: Fas (D95 o APO-1), TNF (p55 o CD120a), TRAIL-R2 (DR5 o APO-2 o KILLER), Receptor de la muerte 3 (DR3 o APO-3 o TRAMD o WSL-1 o LARD) y el receptor de la muerte 6 (DR6) (Chandra *et al*, 2001; Choi *et al*, 2010; Yin *et al*, 2003).

La vía intrínseca o mitocondrial, es activada en respuesta al estrés celular como la hipoxia, la privación de factores de supervivencia, al shock térmico o por daño al DNA. La regulación de esta vía es a través de la interacción entre los miembros de la familia de proteínas Bcl-2: consiste en miembros pro y anti apoptosis. Los miembros pro-apoptosis, Bax, Bak, Bad y Bid, funcionan como sensores de las señales de muerte y ejecutores de la muerte celular programada; mientras que los miembros anti-apoptosis, Bcl-2 y Bcl-x_L, inhiben la iniciación del mismo (Sánchez-Torres *et al*, 2003; Yin *et al*, 2003).

Como se mencionó, la muerte celular programada puede ser activada por diversos estímulos; sin embargo, tiene como componente central al grupo de las caspasas, las cuales son enzimas proteolíticas dependientes de tioles (residuos de cisteína) caracterizadas por su especificidad para hidrolizar péptidos y proteínas con residuos de aspartato (cisteinil proteasas aspartato-específicas) (Dubin *et al*, 2000). Las caspasas pueden dividirse en 2 grandes familias: aquellas que se cree que desempeñan un papel central en la apoptosis (Caspasa -2,-3,-6,-7,-8,-9,-10 y -12) y

las más estrechamente relacionadas a la caspasa-1, cuya función principal parece ser el procesamiento de citocinas (Yin *et al*, 2003).

Otra ruta de activación de las caspasas, además de la vía intrínseca y extrínseca, es iniciada por linfocitos T citotóxicos (Sistema Inmune). Esta ruta contiene gran variedad de enzimas citotóxicas, pero las de particular importancia son la granzima B y la perforina. Esta última, permeabiliza la membrana plasmática de la célula blanco permitiendo así la entrada de granzima B, que activa la Caspasa-3 (Chandra *et al*, 2001; Tin *et al*, 2003).

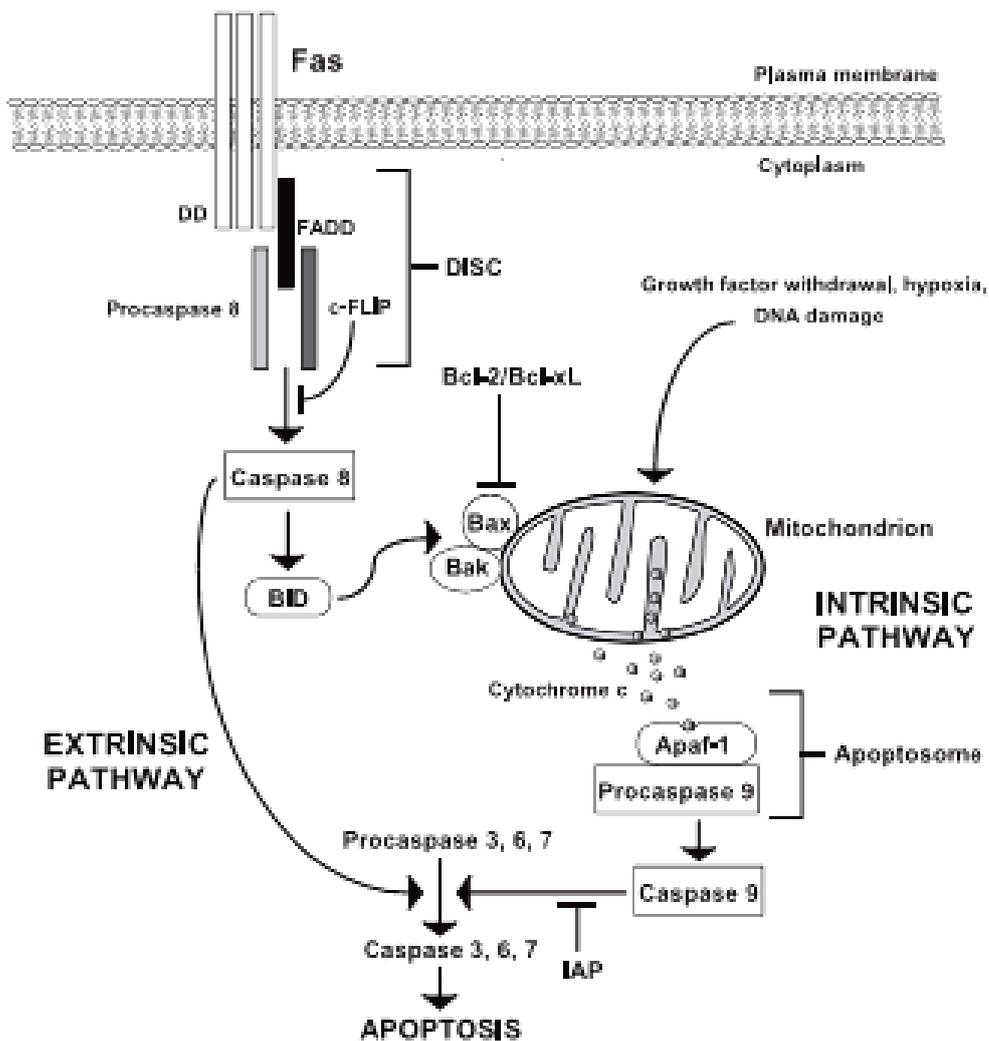


Fig. 4 Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Choi *et al*, 2009)

2.8 APOPTOSIS EN TEJIDO PANCREÁTICO

La apoptosis juega un papel importante en los organismos, manteniendo un control sobre el número de células de los tejidos; tanto en el desarrollo embrionario como en

algunos sistemas del adulto. De esta manera se pueden eliminar células que tienen funciones transitorias durante determinadas etapas del desarrollo (UNBA, 2005).

La transición de células β fetales a células β adultas durante la remodelación fisiológica del páncreas está fuertemente influenciada por apoptosis. Durante la vida fetal en ratas y humanos, la rápida y gran expansión de la masa de células β se caracteriza por la neogénesis celular β , dotando así al páncreas con un número adecuado de células β .

Según Kassem (2000), en humanos, durante las semanas 17-32 de gestación y después de los primeros seis meses de vida, la apoptosis β -celular es relativamente rara (0.6 ± 0.2 y 0.8 ± 0.03 %, respectivamente), en contraste con el periodo perinatal (dos meses antes y dos meses después del nacimiento) existe un incremento en la frecuencia de apoptosis β - celular.

En el adulto la masa de células β es proporcional al peso corporal y está bajo control homeostático de modo que la secreción de insulina es proporcional a la demanda de la misma. La vida media de las células β se estima en 60 días, en condiciones normales más o menos el 0.5% de estas van a la apoptosis. La apoptosis influye en la dinámica de la masa celular β del adulto; por ejemplo, existe un aumento de 2.5% en la masa de células β durante el embarazo, esto debido a la demanda de insulina que el feto impone y la cual es seguida por involución rápida y eficaz de apoptosis en el posparto para regresar al estado inicial (Castillo, 2005; Reed *et al*, 2011).

Sin embargo, la muerte celular programada además de jugar un rol importante en la regulación del número celular en el organismo, también tiene relevancia en el etiología de diversas enfermedades, tales como enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, hematológicas, víricas, cáncer y Diabetes Mellitus. Esta última se genera por una apoptosis excesiva de células β pancreáticas, provocada por caspasas, ROS, citocinas y el Fas-L, provocando así DM1 y 2 (Chandra, 2001; Mandrup-Poulsen, 2001; Ramírez, 1999).

2.9 Hormonas Esteroides Sexuales

En los mamíferos existen tres órganos endócrinos principales que se especializan en la producción de hormonas esteroides: la corteza de las glándulas suprarrenales, el ovario y el testículo. Durante la gestación la placenta es considerada como una fuente adicional en la síntesis de esteroides.

Las hormonas esteroides son derivados del colesterol; por lo que, su estructura química es similar, pues poseen un núcleo común de ciclopentanohidrofenantreno. Dentro de estas hormonas esteroides sexuales se encuentran los estrógenos, andrógenos y progestágenos, conocidos también como esteroides C-18, C-19 y C-21, respectivamente. Como su estructura química está basada en el colesterol, no

son solubles en agua; es decir, son lipófilos. Se difunden pasivamente a través de las membranas celulares, tanto para salir de la célula productora como para entrar a la célula diana. Una vez que salen de la célula productora, viajan por el torrente sanguíneo unidas a proteínas transportadoras: la CBG o transcortina, la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y la albúmina; las cuales evitan su degradación enzimática o aumentan su vida media. Al entrar a la célula diana, se unen a receptores específicos: receptores clásicos o receptores citoplásmicos. El complejo hormona-receptor migra al núcleo en donde actúa como factores de transcripción uniéndose al DNA, activando o reprimiendo uno o más genes; estos a su vez, generan nuevo mRNA que dirige la síntesis de nuevas proteínas. A esta ruta se le conoce como vía genómica.

Sin embargo, existe una segunda vía, la cual es de naturaleza no genómica, en la que los esteroides ejercen efectos rápidos en los órganos blanco, actuando bajo tres diferentes mecanismos, uniéndose a receptores membranales con una estructura idéntica a los receptores clásicos o, uniéndose a receptores con una homología parcial al receptor clásico o, finalmente, uniéndose a receptores con una estructura sin relación alguna con el receptor clásico. Estos mecanismos están involucrados con vías de transducción de señales intracelulares, en donde intervienen proteínas cinasas, fosfolipasas y otras moléculas transductoras (Silverthorn, 2008; Voet & Voet, 2006).

2.10 Andrógenos

Las hormonas esteroides sexuales masculinas son conocidas como andrógenos y son las responsables del desarrollo fenotípico masculino durante la embriogénesis y en la maduración sexual en la pubertad. Los tres andrógenos principales en la función reproductiva masculina son la testosterona, la dihidrotestosterona y el estradiol (Gardner *et al*, 2008).

Los testículos producen aproximadamente del 90 al 95% de los andrógenos. Las células de Leydig son las encargadas de la biosíntesis de los andrógenos. El colesterol para la esteroidogénesis es adquirido por endocitosis de LDL, de esteroides de colesterol de HDL o puede ser sintetizado de *novo* a partir de la acetil-CoA. El colesterol es convertido, por las células de Leydig en pregnenolona dentro de la mitocondria por el citocromo P450; después es liberada y transportada al REL, donde se completa la biosíntesis.

La biosíntesis de colesterol a testosterona puede ocurrir por dos mecanismos: a partir de 17-hidroxi-pregnenolona o ruta $\Delta 5$, y a partir de 17-hidroxi-progesterona o $\Delta 4$. En el humano predomina la ruta $\Delta 5$, mientras que en los roedores la ruta $\Delta 4$. Los esteroides intermedios de la ruta $\Delta 5$, pueden convertirse en los esteroides de la ruta $\Delta 4$ correspondiente.

La biosíntesis de los andrógenos es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas; la hormona liberadora de la hormona leuteinizante (LHRH) estimula la liberación de hormona leuteinizante (LH), la cual a su vez, activa la androgénesis (Rojas *et al*, 2011; Kronenberg *et al*, 2008; Gardner *et al*, 2008; Bagatell *et al*, 2003).

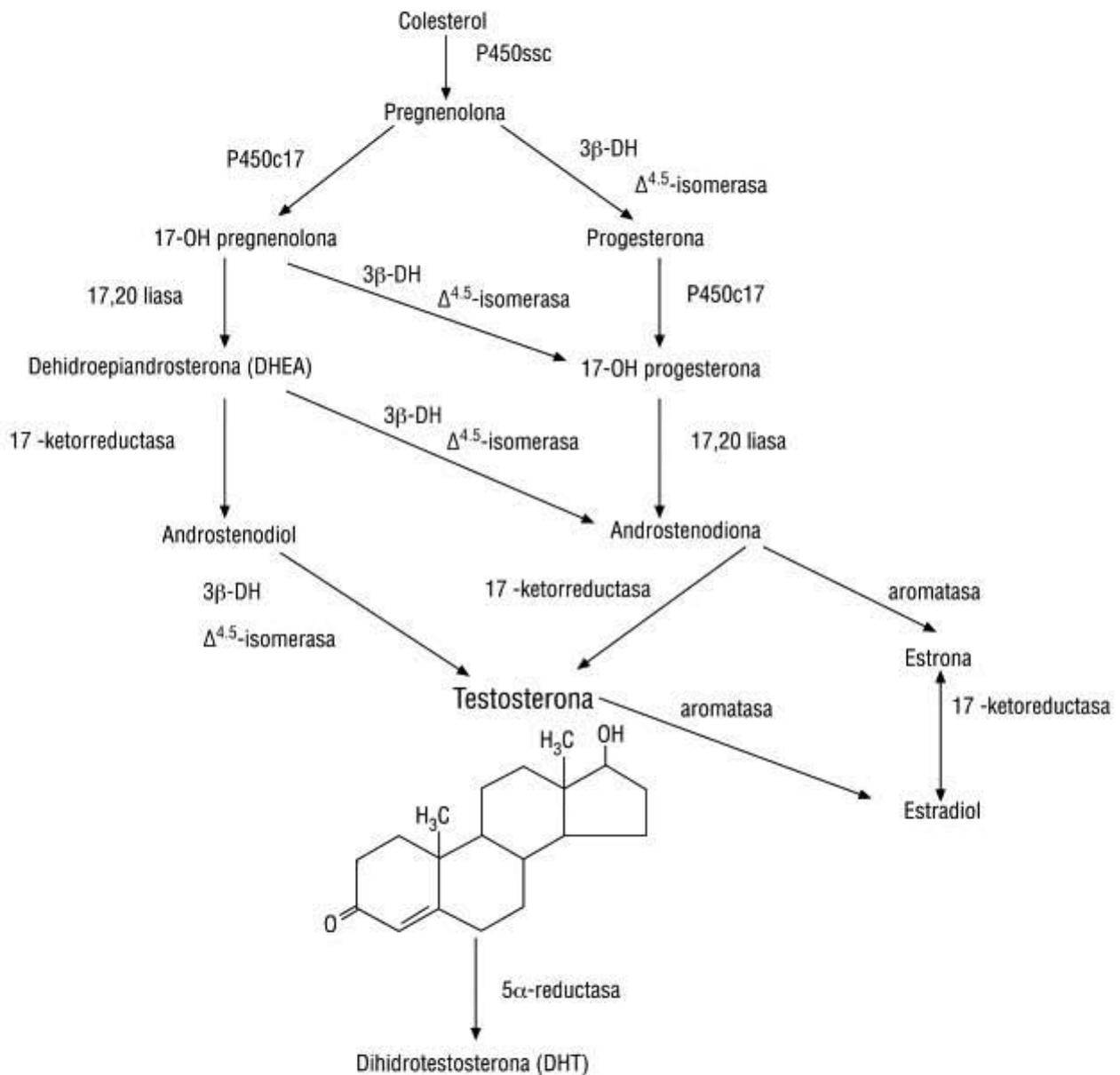


Fig. 4 Metabolismo de esteroides en el testículo. La síntesis de testosterona puede llevarse a cabo a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona (ruta Δ^5) o a partir de la 17-hidroxi-progesterona (ruta Δ^4). La importancia de estas dos vías varía según la especie. En el humano la vía más importante para la síntesis de testosterona es la ruta Δ^5 mientras que en los roedores es la ruta Δ^4 (Rojas *et al*, 2011).

2.10.1 Testosterona

La testosterona es el principal andrógeno producido en el hombre, y es necesario para la diferenciación sexual masculina, el desarrollo de la pubertad, el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios y la espermatogénesis. Además, tiene efectos adicionales en músculo, hueso, en la coagulación, en la hematopoyesis y en el sistema inmune.

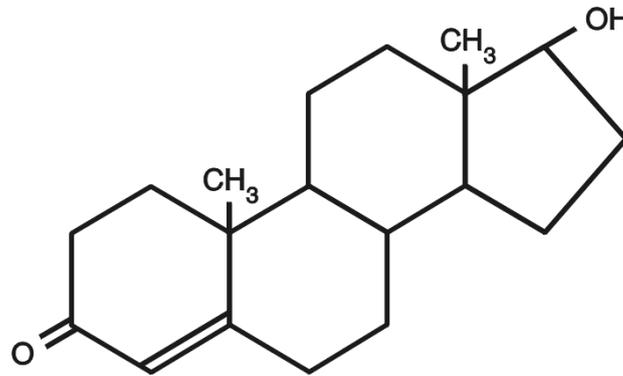


Fig. 5 Estructura molecular de la Testosterona.

La testosterona se metaboliza predominantemente en el hígado; aunque también se degrada en algunos otros tejidos periféricos, particularmente en la próstata y en la piel (Kronenberg *et al*, 2008; Bagatell *et al*, 2003).

Diversas investigaciones han demostrado que la testosterona minimiza los efectos del estrés oxidativo: Alhbom *et al* (2001) demostraron que las células granulo cerebrales tratadas *in vitro* con testosterona son protegidas de los daños del estrés oxidativo, además observaron que después de la administración *in vivo*, la potenciación de las defensas antioxidantes parece jugar un papel importante en la protección otorgada por la testosterona.

De igual forma Hammond *et al* (2001) reportaron que la testosterona tiene un efecto neuroprotector en contra de la apoptosis. Morimoto *et al* (2005) y Palomar-Morales *et al* (2010) demostraron que la testosterona presenta un efecto anti-apoptótico contra el daño producido por STZ. Sin embargo, el mecanismo por el cual la testosterona protege a las células de este daño, no es bien conocido.

2.10.2 Dihidrotestosterona

En el hombre, del 4-8% de la testosterona sufre reducción por la 5 α -reductasa, formando DHT; la cual juega un rol crucial en la formación de los genitales externos masculinos y de la próstata durante la vida fetal. En el adulto, la DHT es asociada con gran variedad de condiciones crónicas, incluyendo la hiperplasia prostática, la

alopecia androgénica, el acné y, tal vez, en el carcinoma prostático (Bagatell *et al*, 2003).

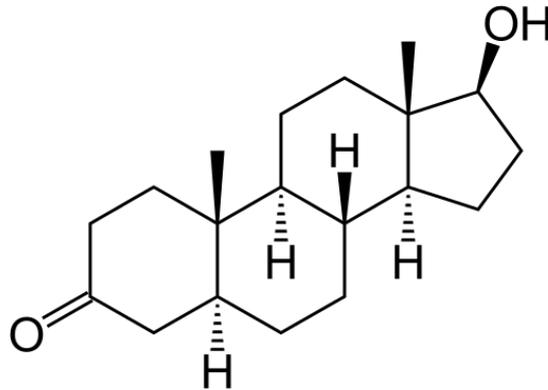


Fig. 6 Estructura molecular de la dihidrotestosterona. La estructura es muy similar a la de testosterona, la diferencia es el doble enlace en el anillo A (lado izquierdo).

Al igual que la testosterona, la DHT también ha sido motivo de diversas investigaciones: Simões *et al* (2013) demostraron que la DHT y el 17β -estradiol, actúan como moduladores de señalización de apoptosis en células de Sertoli inmaduras, además sugieren que los andrógenos y estrógenos pueden ser capaces de modular vías independientes de la apoptosis mediante la regulación de diferentes factores pro-apoptóticos.

2.10.3 Dehidroepiandrosterona

La DHEA es un metabolito intermedio en el metabolismo de las hormonas esteroideas sexuales. Algunos de sus efectos fisiológicos son la eritropoyesis y también es la responsable de la aparición del acné en los jóvenes, etc. Su biosíntesis se realiza principalmente en la zona reticular de la corteza suprarrenal, en las gónadas y en el cerebro; y la mayor parte de la DHEA en el torrente sanguíneo se encuentra como DHEA-s (Kronenberg *et al*, 2008).

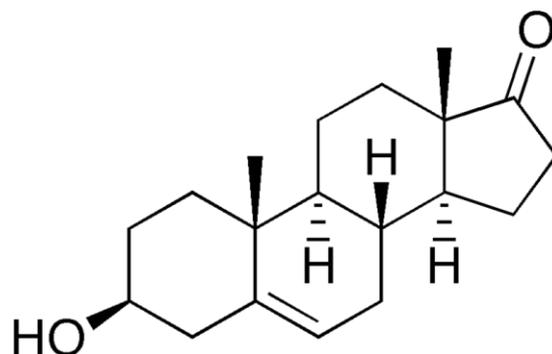


Fig.7 Estructura molecular de la dehidroepiandrosterona. El doble enlace aparece en el anillo B (Lado izquierdo), en comparación con la Testosterona, que lo presenta en el anillo A, y la dihidrotestosterona que no presenta doble enlace.

La función específica de esta hormona no es bien conocida; sin embargo, se cree que su importancia radica en su papel como pre-hormona. Se ha demostrado que la DHEA puede utilizarse en distintos padecimientos, pues disminuye el crecimiento de tumores cancerosos y produce mejorías en enfermedades autoinmunes (Hampl y Starka, 2000). También se demostró que la DHEA-s, a la que no se le ha conferido acción biológica, tiene efectos antidiabéticos en ratas (Kanauchi *et al*, 2001) al inhibir la producción de RL. Sus propiedades antioxidantes se relacionan con la liberación de insulina por las células β pancreáticas (Aragno *et al*, 2000; Dillon *et al*, 2000).

Por lo anterior, se cree que el papel de la DHEA es muy importante, no solo porque actúa como precursor hormonal, sino también por su actividad como modulador directo de las vías de señalización intracelular, tanto genómicas como no genómicas.

2.11 Estreptozotocina

La STZ (2-deoxy-2-(3-(metil-3-nitrosourea)-1-D-glucopiranososa), es un agente alquilante producido por *Streptomyces acrhomogenes*. Su mecanismo de acción es complejo, altera primero la oxidación de la glucosa para ser captado por las células β , para después disminuir la biosíntesis y secreción de la insulina. Las células β pancreáticas captan la STZ a través del transportador de glucosa GLUT-2; se atribuye la toxicidad de ésta a las propiedades específicas del transportador. La STZ provoca aductos o roturas en la cadena de DNA, esto a su vez activa la poli-(ADP ribosa)-sintetasa, una enzima que polimeriza la ADP-ribosa del NAD para formar poli-(ADP ribosa), la activación de la poli-(ADP ribosa) sintetasa causa un agotamiento letal del NAD, provocando una disminución en el rendimientos u viabilidad de las células β (Okamoto, 1985; Schnedl *et al*, 1994; Weiss, 1982).

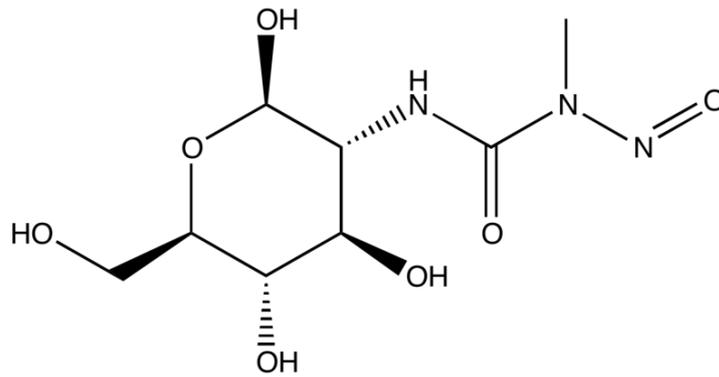


Fig. 8 Molécula de Estreptozotocina

Durante el metabolismo de la STZ se producen varios intermediarios tóxicos como el NO^\cdot , radicales metilo y ROS, los cuales también contribuyen en la fragmentación del DNA y evocan otros daños en las células (González *et al*, 2002; Perschke *et al*, 2000; Skudelski, 2001).

Okamoto (1985) sugiere que la activación de la poli-(ADP ribosa)-sintetasa está involucrada en la patogénesis de la DM tipo 1, por esta razón la STZ es extensamente usada para producir diabetes experimental en roedores (Morimoto, 2010). Existen dos modelos de inducción de diabetes experimental, uno es por dosis única y el otro es el de dosis múltiple. La más frecuente para inducir DM1 en roedores adultos es la de dosis única, usando entre 40 y 60 mg/kg de peso (Skudelski, 2001; González *et al*, 2002).

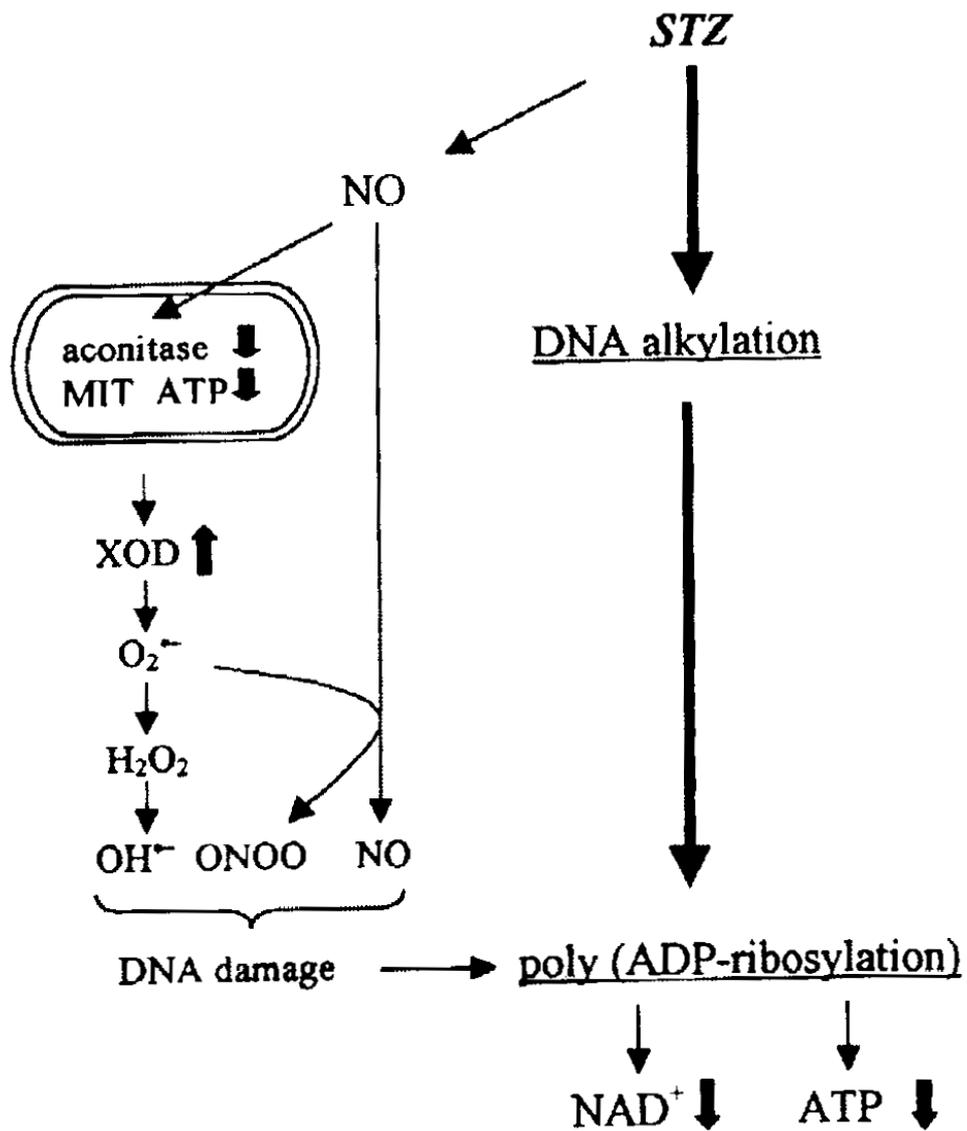


Figura 9. Mecanismo de acción de la Estreptozotocina (Tomado de Skudelski, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente estudio se utilizaron 20 Ratas Wistar macho sanas, de entre 200 a 250 g de peso, que fueron proporcionadas por el Bioterio de la FES Iztacala y donde se mantuvieron en condiciones controladas de humedad (16%), fotoperiodo de (12:12) y temperatura (22° C), a los cuales se les proporciono agua y alimento *ad libitum*.

3.1 Diseño Experimental

Las ratas se castraron por laparotomía, bajo anestesia con ketamina-xilazina (70 y 7 mg/ kg de peso, respectivamente), terminada la intervención se les administro 0.1 ml de antibiótico (1 g ampicilina/1 mL solución salina) para evitar infecciones.

Transcurridas 72 horas, las ratas fueron separadas aleatoriamente en grupos de 5 sujetos, denominados; VEH, TESTO, DHT y DHEA. Se les aplicó una dosis única intraperitoneal de 100 µL de hormona correspondiente o bien, de aceite de maíz en el que fueron diluidas. Después de 24 horas se les administró la única dosis de STZ (60 mg/kg de peso en amortiguador de citratos).

Después de 6 horas, los sujetos experimentales fueron sacrificados con una sobredosis intramuscular de pentobarbital sódico (50 mg/Kg); se disecó el páncreas y se fijó el tejido durante 24 horas en paraformaldehido 4% en PBS frío.

3.2 Inclusión del tejido pancreático

Los páncreas fijados fueron enjuagados con agua corriente durante 2 horas; después se deshidrataron sumergiéndolos de manera sucesiva en concentraciones crecientes de alcohol etílico (25,50,75,80,90,96 y 100%), en xileno-etanol absoluto (1:1) y xileno 100% para después ser incluidos en paraplást plus.

Se realizaron cortes de 5 µm de grosor, colocándolos en laminillas recubiertas con poli-L-lisina. Estas fueron almacenadas en cajas porta laminillas para posterior reacción inmunohistoquímica.

3.3 Técnica Inmunohistoquímica

Se realizó la técnica inmunohistoquímica para la detección de enzimas antioxidantes, Catalasa, Mn-SOD y Cu/Zn-SOD de la siguiente manera:

Las laminillas se desparafinaron por 30 minutos a 50° C y se incluyó una más como control negativo.

Se colocaron en Xilol entre 5 y 10 min.

Para bloquear la peroxidasa endógena fueron incubadas en metanol suplementado con H₂O₂ 0.3% durante 30 minutos.

Se rehidrataron en alcoholes en concentraciones decrecientes (100, 96, 90, 80, 70%) por tres minutos cada uno.

Se colocaron en una cámara húmeda en posición horizontal, para ser incubadas con solución de bloqueo: 50 mg BSA + 5 μ L Tritón X-100 + 1 ml PBS, durante una hora a temperatura ambiente. Esto con el fin de evitar que alguna molécula de la proteína en la muestra tisular reaccione de manera inespecífica con el anticuerpo primario, causando una lectura equivocada de la expresión de la enzima antioxidante (Catalasa, Mn-SOD y Cu/Zn-SOD).

Transcurrido el tiempo, las laminillas se escurrieron lo más posible para ser incubadas con el anticuerpo primario en la siguiente solución:

- Para Cu/Zn SOD: anticuerpo de oveja 1:300 anti-Cu/Zn-SOD humana (Calbiochem).
- Para Mn-SOD: anticuerpo de conejo 1:300 anti-Mn-SOD humana (Santa Cruz).
- Para Catalasa: anticuerpo monoclonar de ratón 1:250 anti-catalasa humana (Sigma Chemical Co).

Se incubaron durante toda la noche a 4^o centígrados.

Al siguiente día se secó, con papel absorbente, el exceso de líquido en las laminillas y se lavaron tres veces con PBS, 5 minutos cada vez.

Las laminillas se incubaron con el anticuerpo peroxidado secundario:

- Para Cu/Zn SOD: anticuerpo de conejo monoclonal 1:200 anti-IgG de oveja (Vectra).
- Para Mn SOD: anticuerpo de oveja policlonal 1:200 anti-IgG de conejo (Santa Cruz).
- Para Catalasa: anticuerpo de cabra monoclonal 1:200 anti-IgG de ratón (Santa Cruz).

Se incubaron durante dos horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación, las laminillas se secó el exceso de líquido y se lavaron tres ocasiones con PBS, 5 minutos cada vez.

Se adicionó el complejo AB (según instrucciones del kit PK-6106 de Vecta Stain para SOD-I, SC-2018 de Sta. Cruz para SOD-II y SC-2017 de Sta. Cruz para Catalasa) y se dejaron reposar por 1 hora a temperatura ambiente.

Se secó el exceso de líquido y se realizaron dos lavados con PBS por cinco minutos cada uno.

La solución de Reacción de Diaminobencina (DAB SK-4100 Vector Laboratories) se aplica directamente sobre las laminillas: 2.5 mL de Agua bidestilada + 1 gota buffer pH 7.5 + 1 gota de H₂O₂ + 2 gotas DAB.

Se realizaron dos enjuagues con PBS y las laminillas se contra tiñeron con hematoxilina durante 10 minutos. El color se viró con Carbonato de Sodio 0.5%, Se enjuagaron con agua de 2 a 5 minutos. Se enjuagaron de nuevo con PBS por 5 minutos. Y finalmente se deshidrataron con alcoholes en concentraciones crecientes (70, 80, 90, 96 y 100%), se transfirieron a Xilol y se montaron en medio de montaje para inmunohistoquímica entellan.

Al siguiente día se observaron en un microscopio óptico (Leica DM 500 con cámara EC3), se tomaron fotos con el Software LZ-Leica versión 2.0.0. Posteriormente se analizó la diferencia de color (escala de grises) de las fotografías obtenidas bajo el programa Image Pro-Plus (Palomar-Morales *et al.*, 2010).

3.4 Tinción de TUNEL

Para detectar la apoptosis, se utilizó el ensayo de TUNEL (deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end-labeling); es un proceso por el cual se marcan de manera fluorescente las células que están muriendo por apoptosis, ya que la enzima desoxinucleotidil transferasa marca cadenas de DNA de 200 pb, por la transferencia de un nucleótido unido covalentemente al fluoróforo, siendo más frecuentemente usado el isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Para esta tinción se utilizó TUNEL In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Roche, REF 11 684 809 910) bajo el siguiente procedimiento:

Se desparafinaron las laminillas durante 30 minutos a 50-60° centígrados.

Se rehidrataron en alcoholes en concentraciones decrecientes (100, 96, 90, 80, 70%).

Se incubaron con 100 µL de Proteínasa K (Roche, REF 03 115 887 001) durante 25 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente: 1 µL Proteínasa K + 1 Tris 10 mM pH 7.4.

El exceso de líquido se secó con papel absorbente y se lavaron tres veces en PBS durante cinco minutos cada vez.

Se incubaron con solución de permeabilización, Tritón X-100 0.1% en PBS, a 4° centígrados durante 2 minutos.

El exceso de líquido se secó con papel absorbente y se lavó con PBS, 5 minutos cada vez.

El control positivo se incubó con DNAsa I (Roche, 10 104 159 001, 2000 UK/mg) 5 mg + 1 mL PBS, durante 10 minutos a 37° centígrados. Transcurrido el tiempo se lavó tres veces con PBS durante 5 minutos.

Se incubaron las laminillas con 30 µL de la mezcla preparada con la solución amortiguadora y la solución enzimática, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, durante 40 minutos a 37° centígrados.

Finalmente se montó en medio para fluorescencia (Ultra Cruz Mounting Medium SC-14941, Sta Cruz) y se sellaron con barniz de uñas.

Al siguiente día se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Leica, Modelo DMLB con filtros I3 para FITC y filtro A para DAPI (Palomar-Morales *et al*, 2010; Morimoto *et al*, 2005)

Se capturaron imágenes, en las cuales se contaron núcleos totales y los núcleos que presentaron apoptosis.

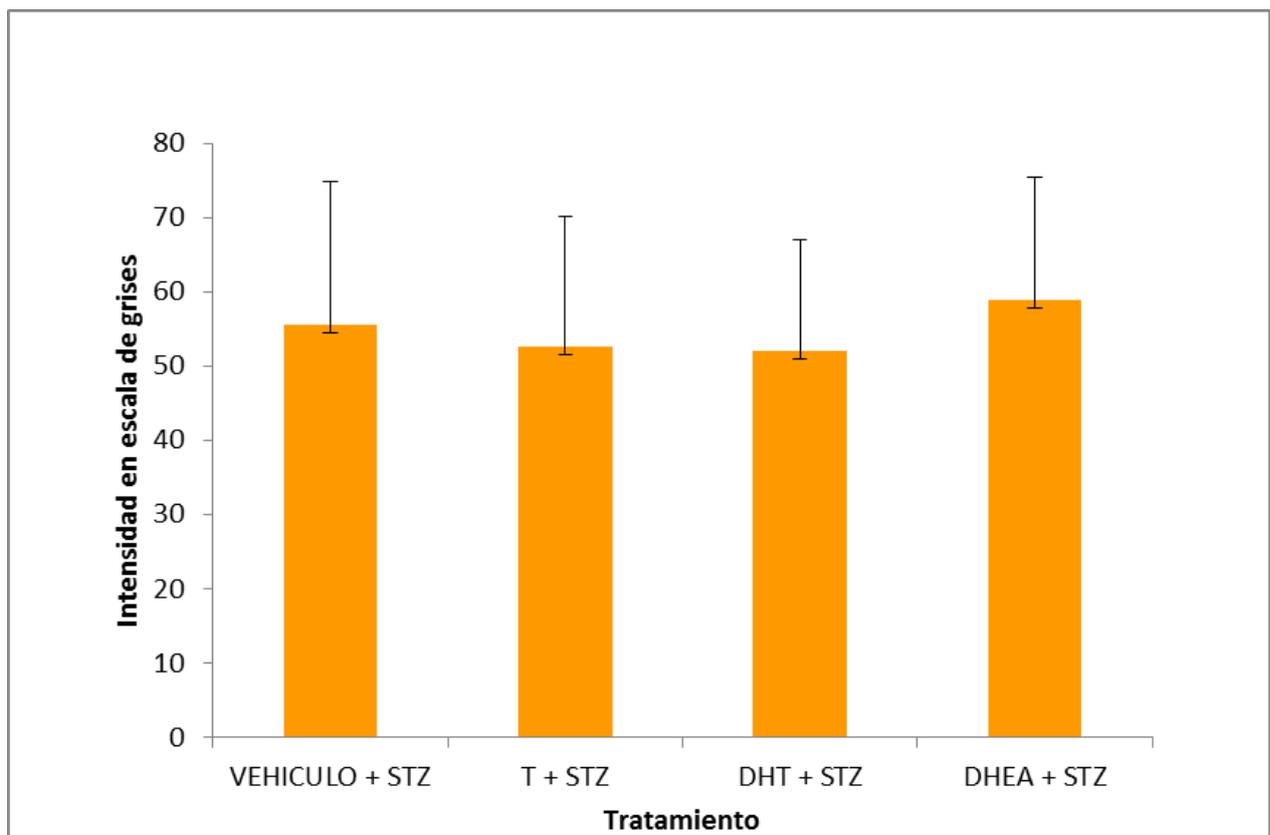
3.5 Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas Inmunohistoquímicas y la Tinción de TUNEL se analizaron estadísticamente con la prueba ANOVA simple y cuando fue requerido se realizó la prueba LSD (Least significant difference). El análisis se realizó en el programa IBM SPSS 21.0 para Windows.

4. RESULTADOS.

4.1 Inmunoexpresión de Catalasa

La expresión de Catalasa en islotes pancreáticos de ratas macho con daño por STZ y tratadas con derivados androgénicos, no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Sin embargo, como se observa en la gráfica 1, existe una ligera tendencia a incrementar la expresión de esta enzima en el tejido pancreático tratado con Dehidroepiandrosterona, con respecto a la Testosterona y Dihidrotestosterona.



Gráfica 1. Expresión de Catalasa en islotes pancreáticos. Se evaluó la intensidad de color (densidad media en escala de grises) en células inmunopositivas.

En las figuras 5, 6, 7 y 8 se observan imágenes representativas de islotes de Langerhans obtenidas después de realizar la técnica Inmunohistoquímica. La presencia del color café determina la presencia de Catalasa (enzima microsomal) en islotes pancreáticos, nótese la diferencia en la intensidad de color en cada uno de los tratamientos

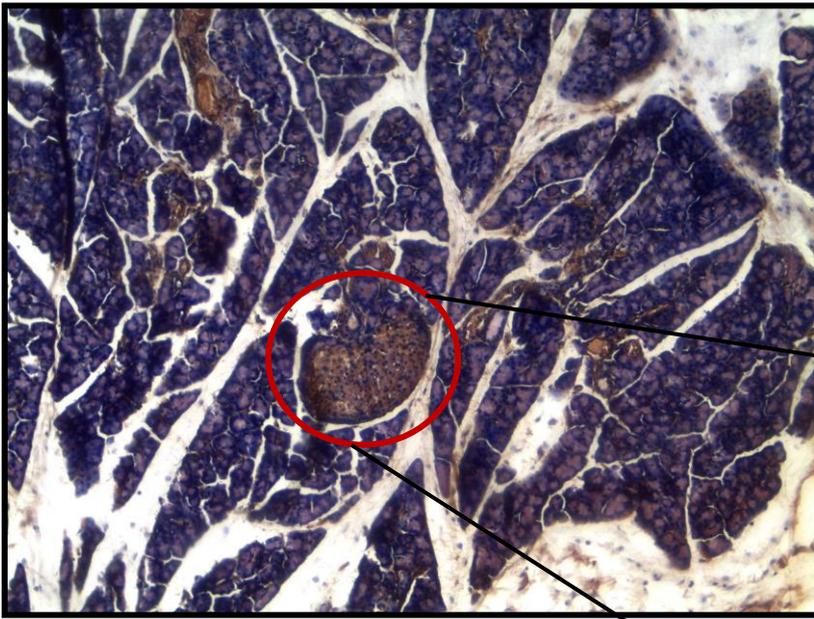


Fig. 10 Inmunoeexpresión de catalasa en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + Vehículo

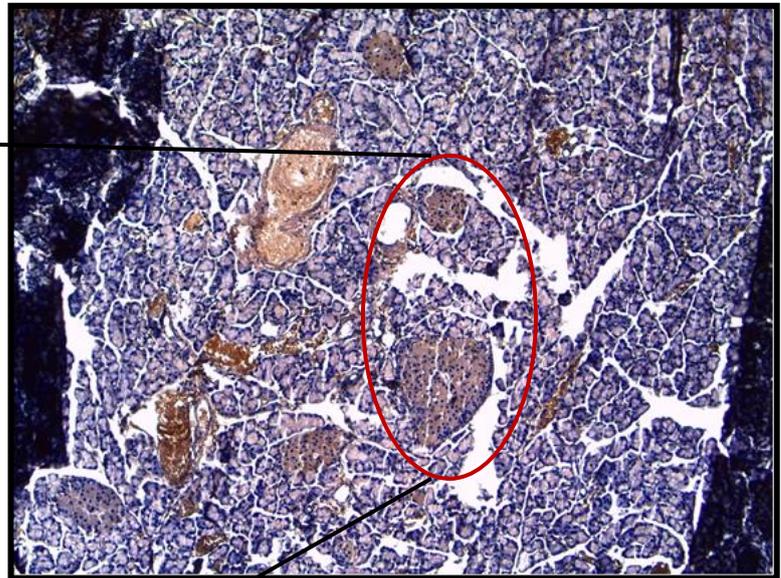
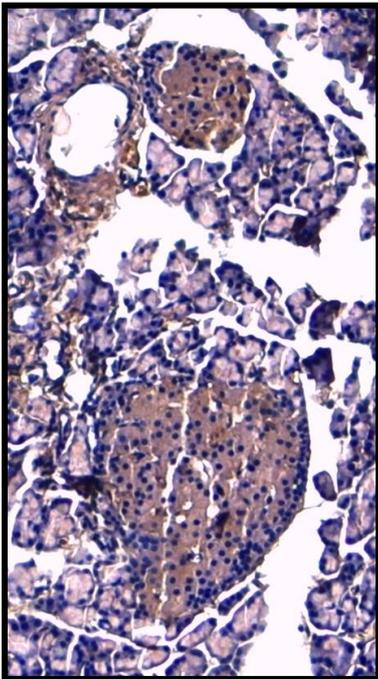
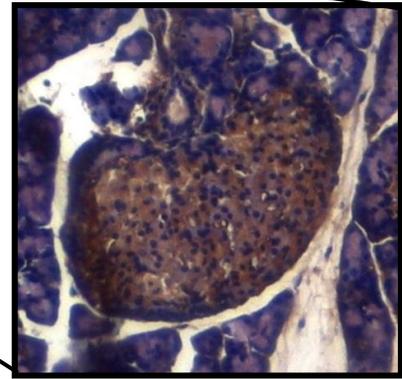


Fig. 11 Inmunoeexpresión de catalasa en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + Testosterona

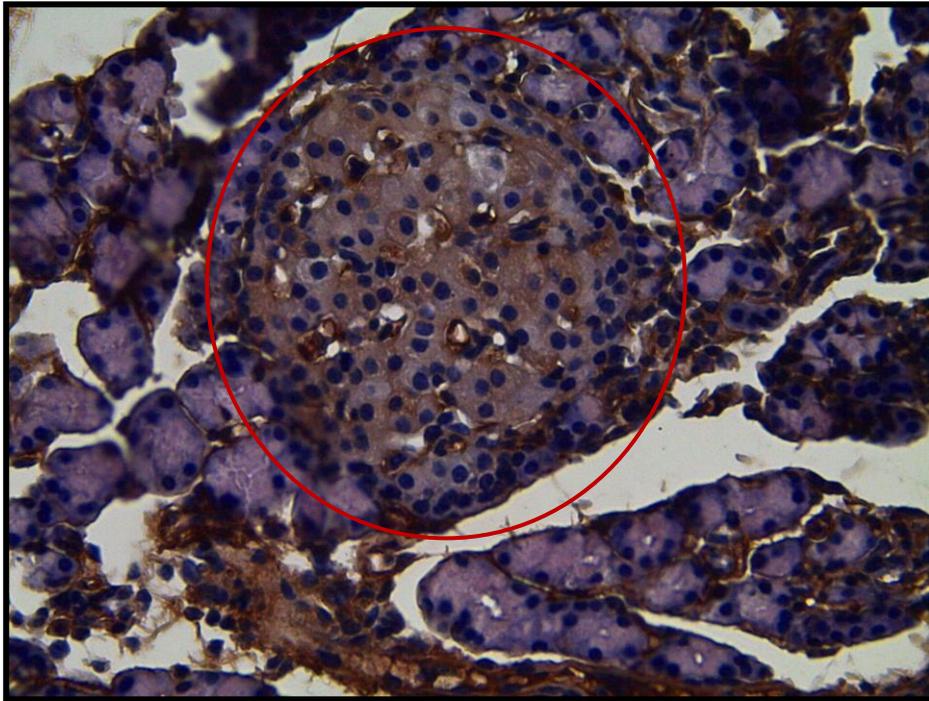


Fig. 12
Inmunoexpresión de catalasa en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + DHT

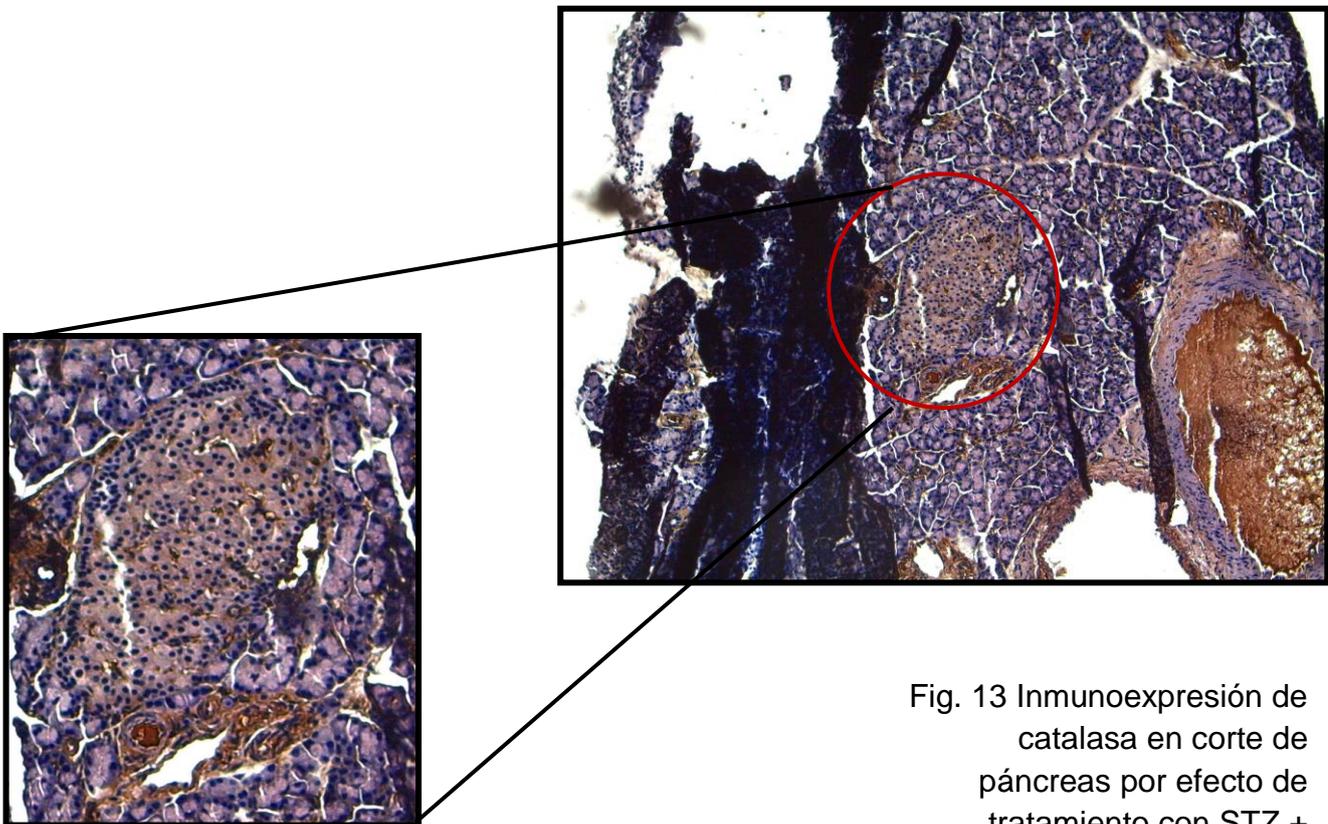
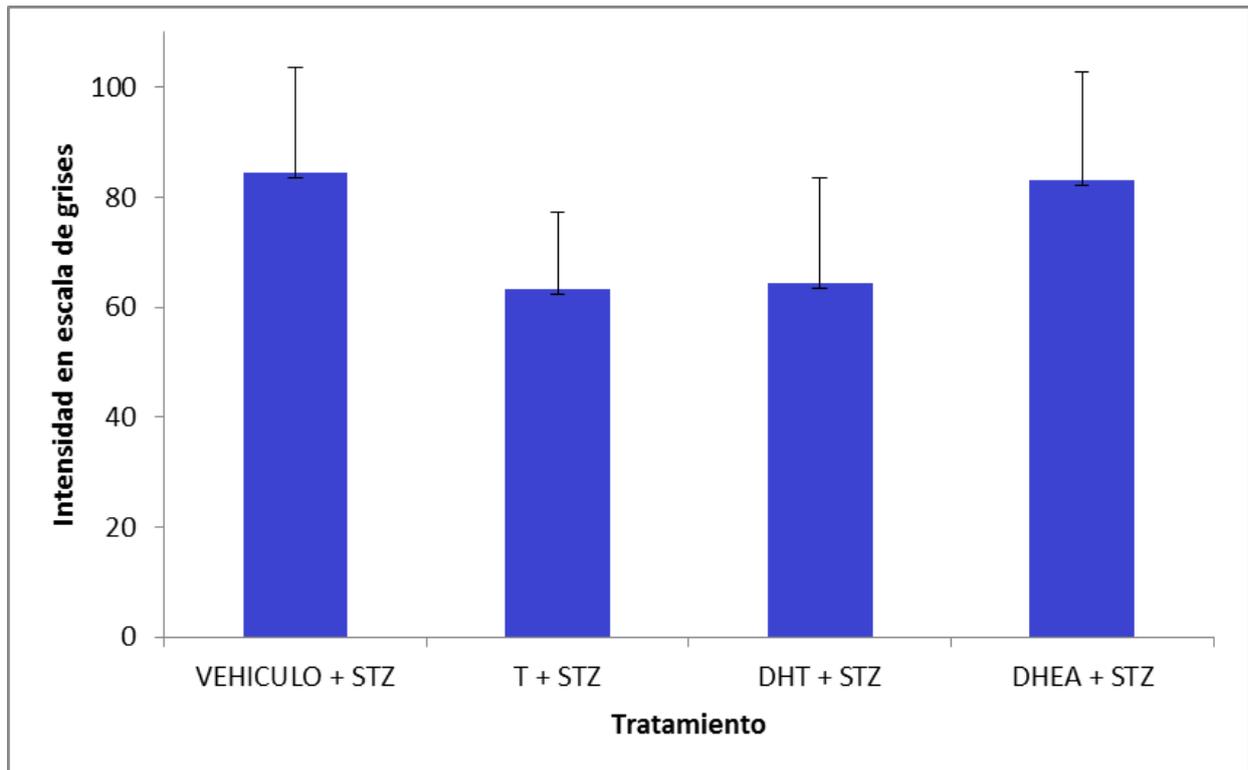


Fig. 13 Inmunoexpresión de catalasa en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + DHEA

4.2 Inmunoexpresión de Cu/Zn-SOD

La inmunoexpresión de Cu/Zn-SOD (citósica) en islotes pancreáticos de ratas machos con daño por STZ y tratadas con Testosterona, DHT y DHEA, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos empleados.



Gráfica 2. Expresión de Cu/Zn-SOD en islotes pancreáticos. Se evaluó la intensidad de color (densidad media en escala de grises) en células inmunopositivas.

Sin embargo; la Gráfica 2 muestra que la expresión de Cu-Zn-SOD tiende a decrecer con los tratamientos de Testosterona y DHT, observando una expresión mayor, pero no significativa, con DHEA.

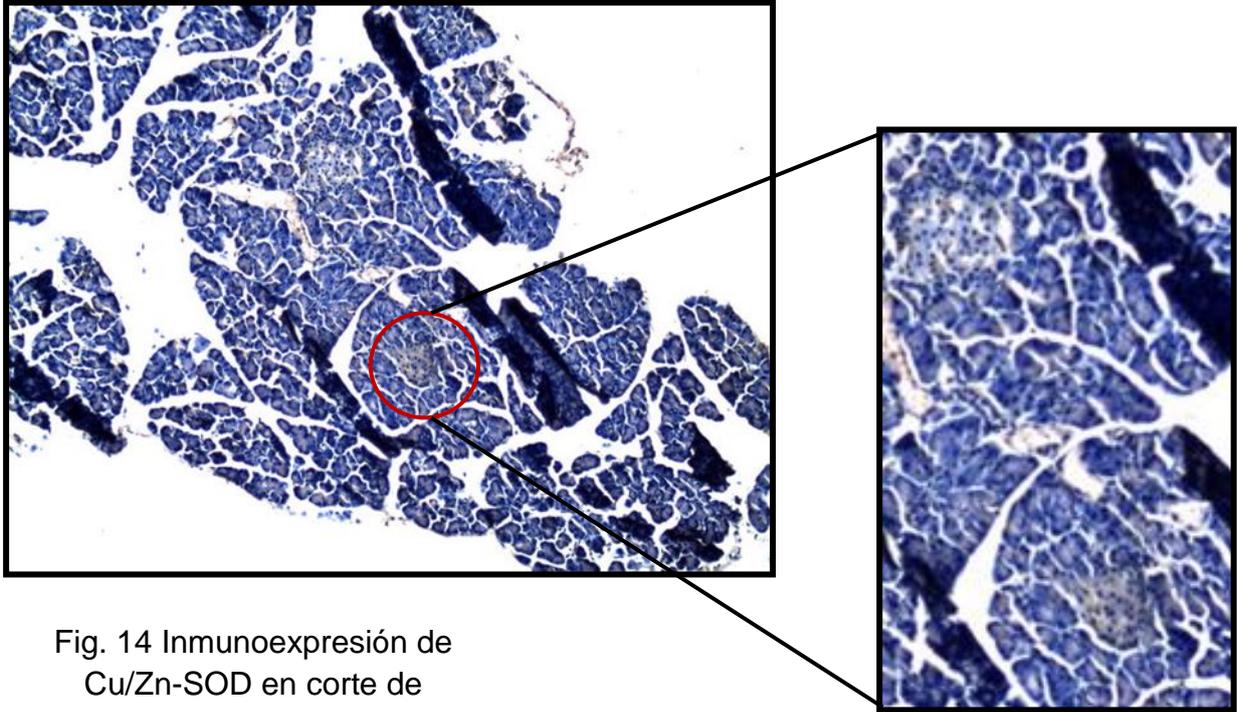


Fig. 14 Inmunoexpresión de Cu/Zn-SOD en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + Vehículo.

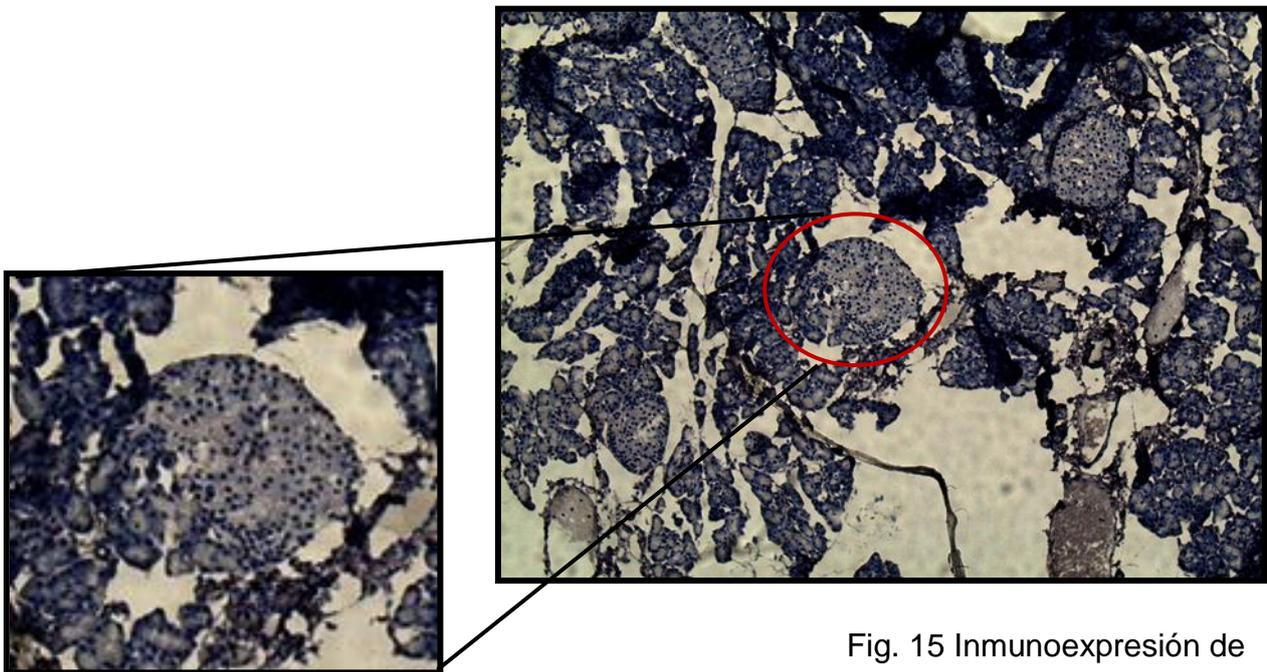


Fig. 15 Inmunoexpresión de Cu/Zn-SOD en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + Testosterona.

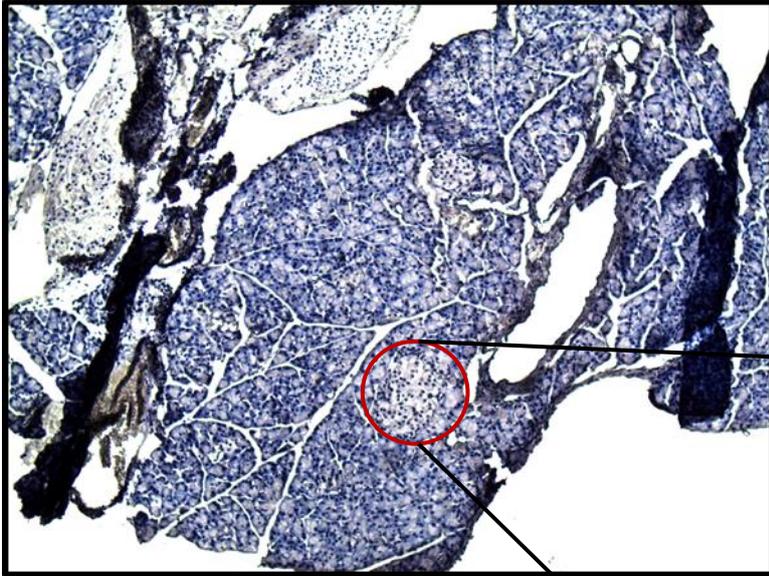


Fig. 16 Inmunoexpresión de Cu/Zn-SOD en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + DHT.

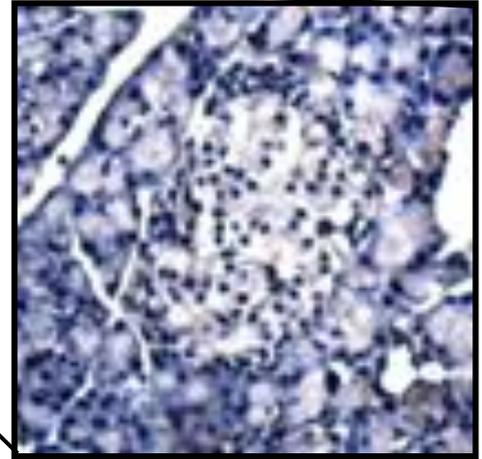
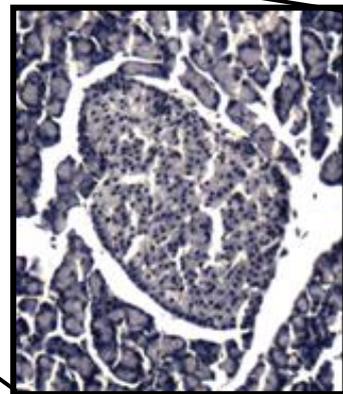


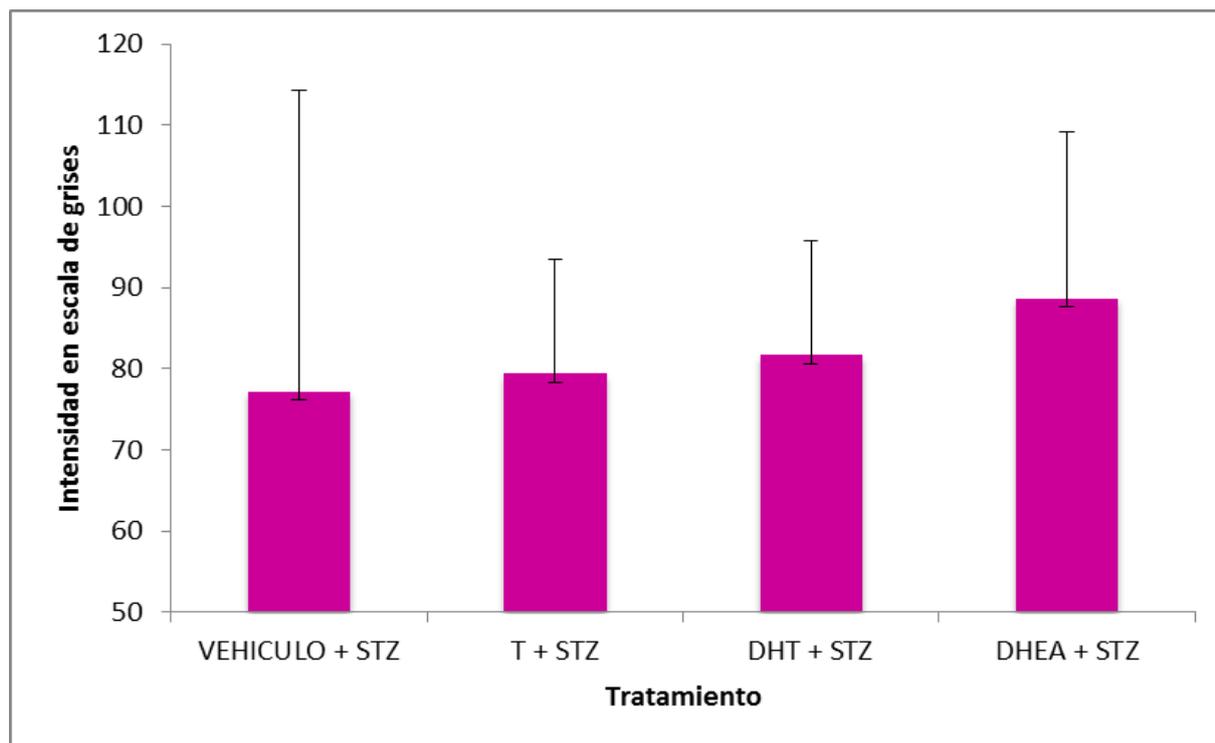
Fig. 17 Inmunoexpresión de Cu/Zn-SOD en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + DHEA.



Las anteriores figuras (9, 10, 11 y 12), muestran imágenes representativas de cortes de tejido pancreático en donde se observa la presencia de Cu/Zn- SOD (color café). La intensidad de color varía de acuerdo al tratamiento aplicado, lo que indica una mayor o menor expresión de la enzima antioxidante evaluado.

4.3 Inmunoexpresión de Mn-SOD

La gráfica 3 muestra la inmunoexpresión de Mn-SOD (mitocondrial) en islotes de Langerhans de ratas macho diabéticas inducidas con STZ y tratadas con derivados androgénicos. Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, se observa una tendencia de incremento en la expresión de la enzima con tratamiento de DHEA, en comparación con los otros tratamiento; así mismo, la expresión de SOD II es ligeramente mayor con DHT que con Testosterona.



Gráfica 3. Expresión de Mn-SOD en islotes pancreáticos. Se evaluó la intensidad de color (densidad media en escala de grises) en células inmunopositivas.

En las siguientes figuras (18, 19, 20 y 21) se muestran fotografías representativas de islotes pancreáticos en donde se evaluó la Inmunoexpresión de la Mn-SOD.



Fig. 18 Inmunexpresión de Mn-SOD en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + Vehículo.

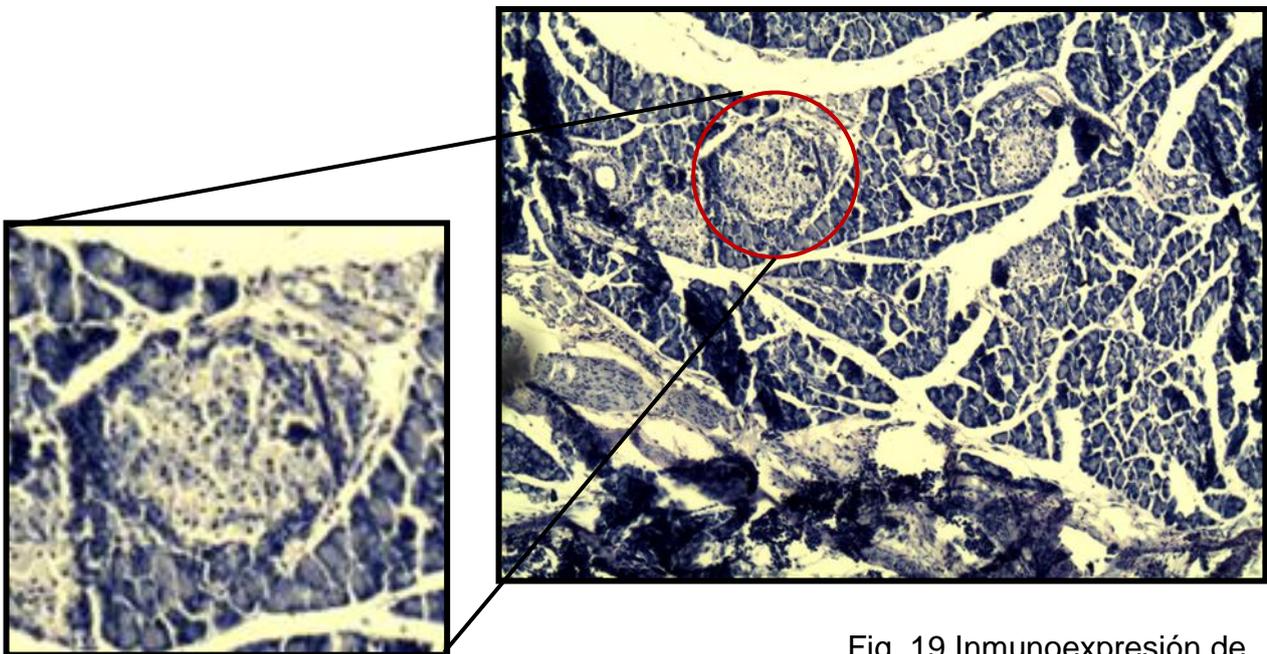
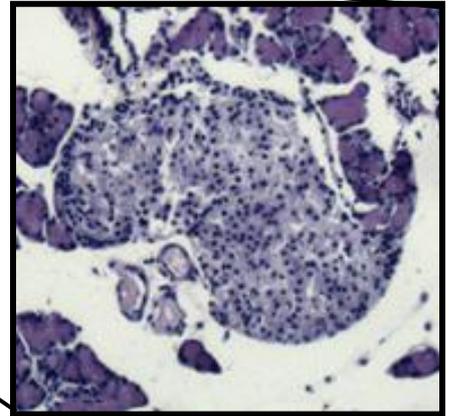


Fig. 19 Inmunexpresión de Mn-SOD en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + Testosterona.

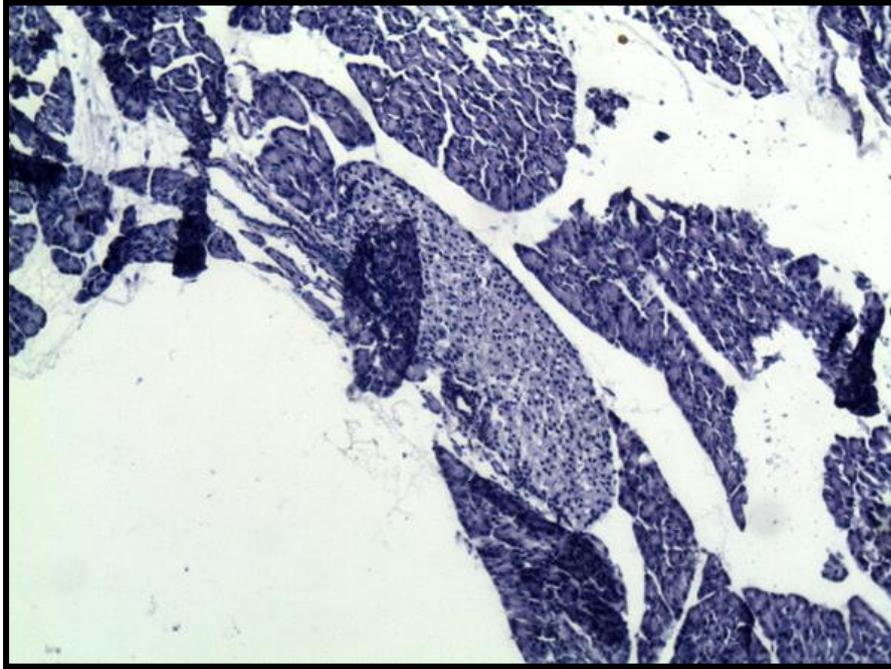


Fig. 20 Inmunoeexpresión de Mn-SOD en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + DHT.

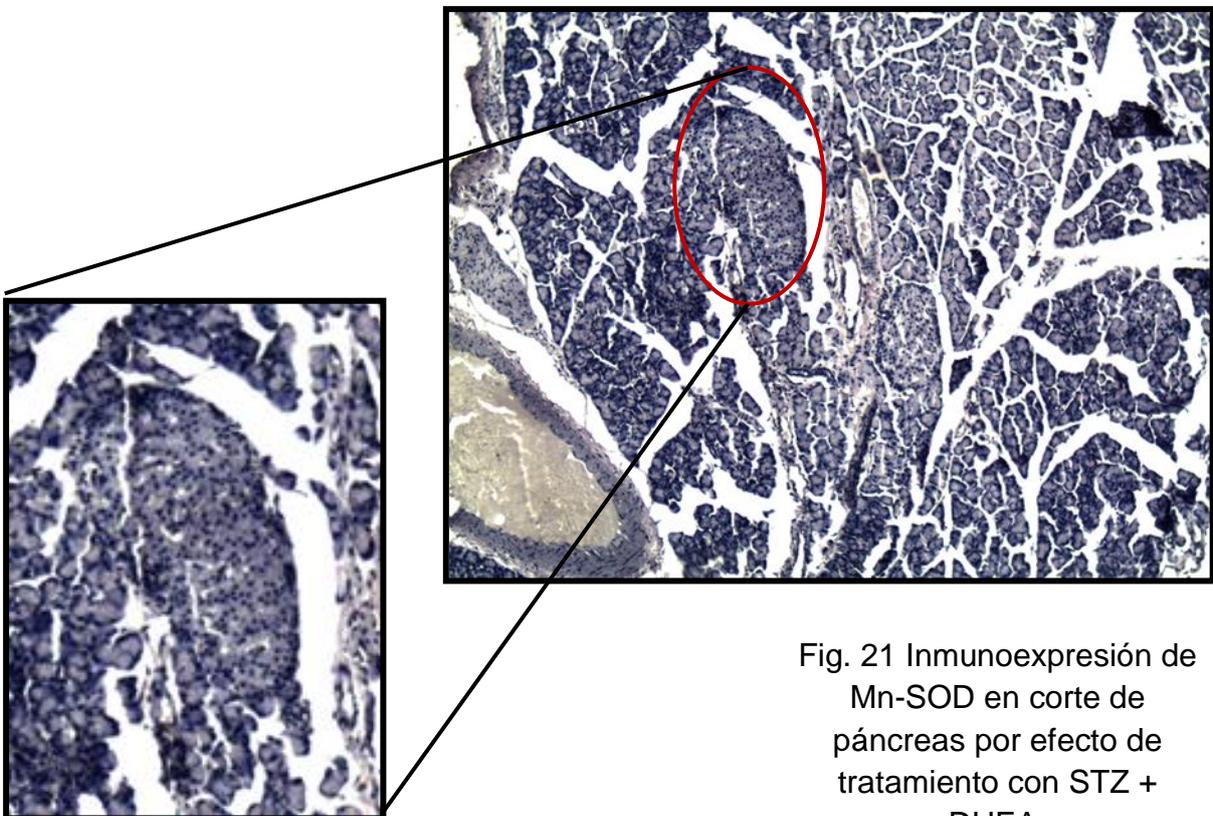


Fig. 21 Inmunoeexpresión de Mn-SOD en corte de páncreas por efecto de tratamiento con STZ + DHEA.

El análisis estadístico de nuestros datos no mostró diferencias significativas; sin embargo, se observa una tendencia de incremento en la expresión de Catalasa, Cu/Zn-SOD y Mn-SOD en células β pancreáticas con daño por STZ y tratadas con dehidroepiandrosterona. Así mismo, la expresión de estas enzimas tiende a decrecer al administrar testosterona o dihidrotestosterona.

4.4 Porcentaje de apoptosis en células β pancreáticas.

La apoptosis de células β pancreáticas fue estudiada por el método de TUNEL y observada por microscopia de fluorescencia. Los núcleos fluorescentes fueron contados y reportados como porcentaje en relación al total de núcleos en islotes de Langerhans.

El tratamiento con aceite de maíz (vehículo) aplicado a ratas macho castradas y con daño por STZ presentó un $29.61 \pm 15.10\%$ de apoptosis. A continuación se muestra una foto representativa de este tratamiento.

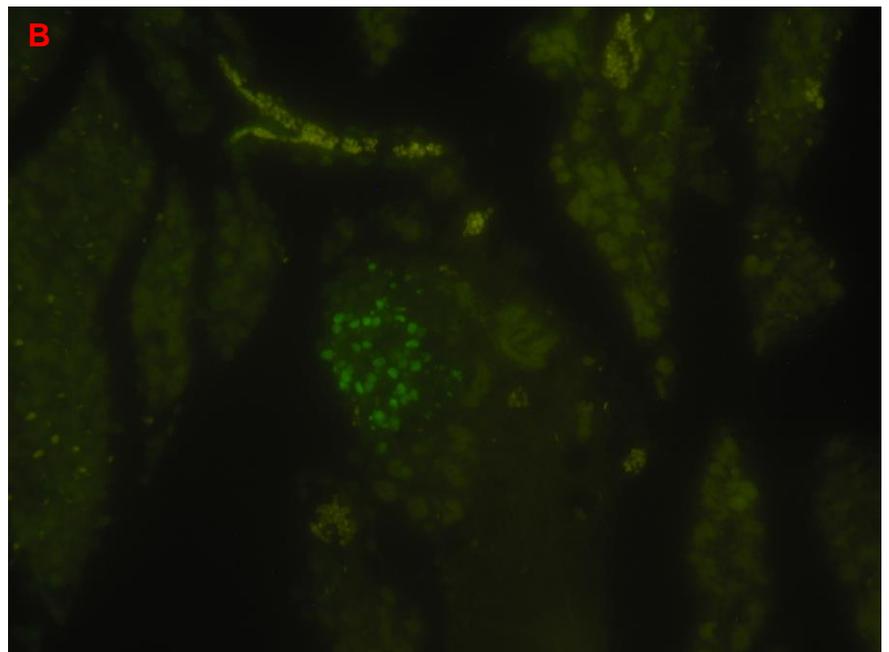
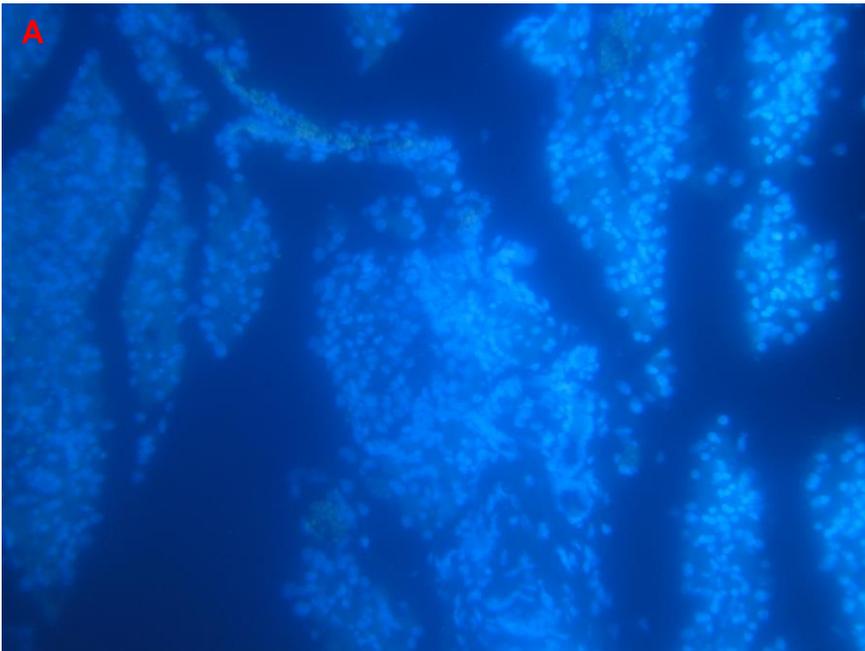


Fig. 17. Corte histológico de 5 μm de tejido pancreático tratado con aceite de maíz (vehículo). En la figura A se muestran los núcleos totales; mientras que en la figura B, se observan, en color verde, los núcleos que se encuentran en apoptosis.

Como se esperaba la Testosterona revirtió el daño que ocasiona la STZ en células β pancreáticas de ratas macho castradas. El grupo tratado con esta hormona esteroide presentó 14.19 ± 8.09 % de apoptosis en islotes de Langerhans, demostrando así, que la testosterona protege a las células β pancreáticas del daño producido por la STZ.

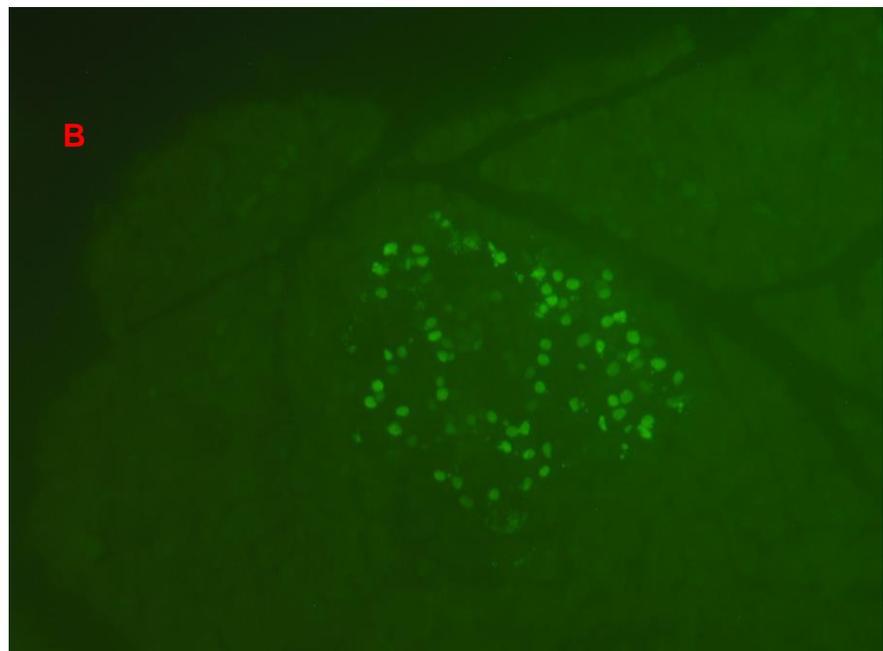


Fig. 18. Corte histológico de 5 μm de tejido pancreático tratado con testosterona. En la figura A se muestran los núcleos totales; mientras que en la figura B, se observan, en color verde, los núcleos que se encuentran en apoptosis.

El tratamiento con dihidrotestosterona aplicado en ratas macho castradas y con daño por STZ, presentó 26.12 ± 4.38 % de apoptosis en islotes pancreáticos.

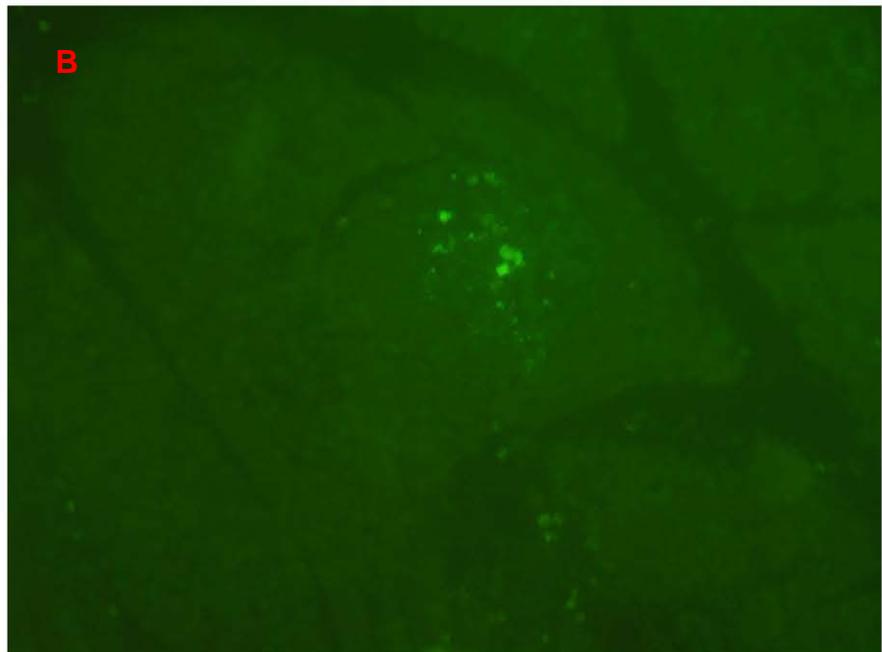
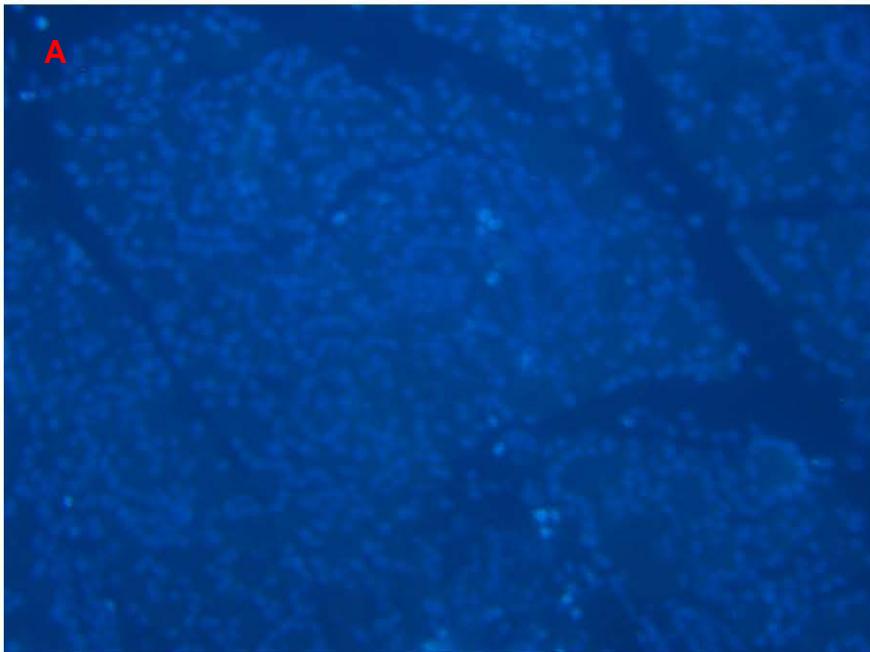


Fig. 19. Imagen representativa de corte histológico de 5 μm de tejido pancreático tratado con DHT. La figura A muestra, en color azul, los núcleos totales; mientras que la figura B, se observan los núcleos en apoptosis.

En las células β de los sujetos tratados con dehidroepiandrosterona solo existe 4.59 ± 6.20 % de apoptosis. Esto indica que el efecto protector de la DHEA en células β pancreáticas, es mayor al que presenta la dihidrotestosterona y testosterona.

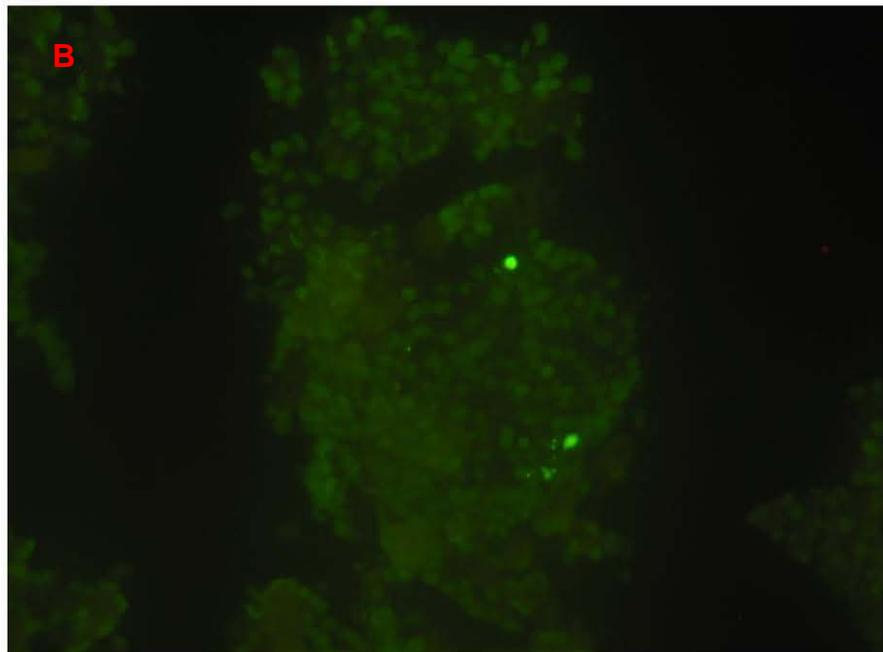
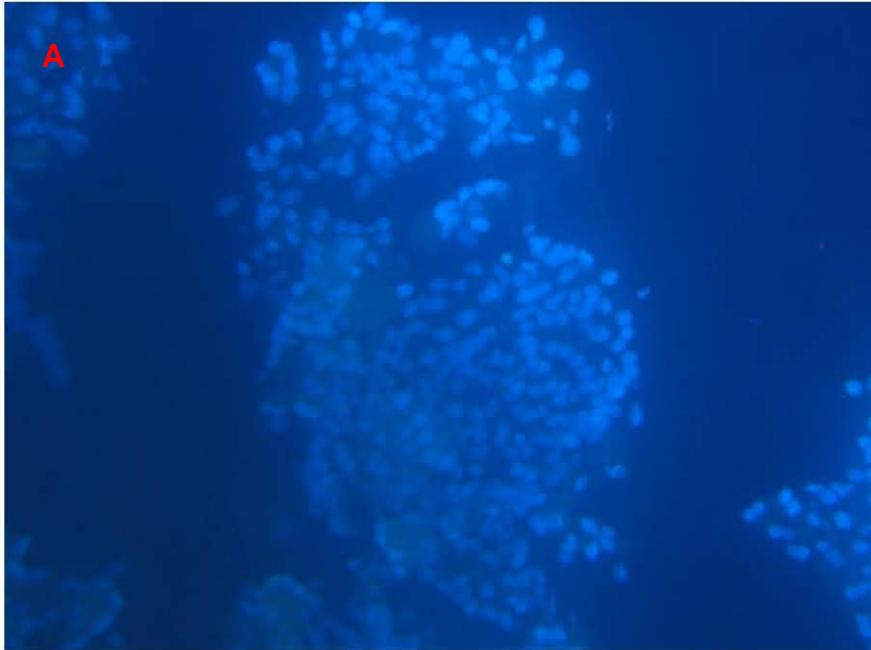
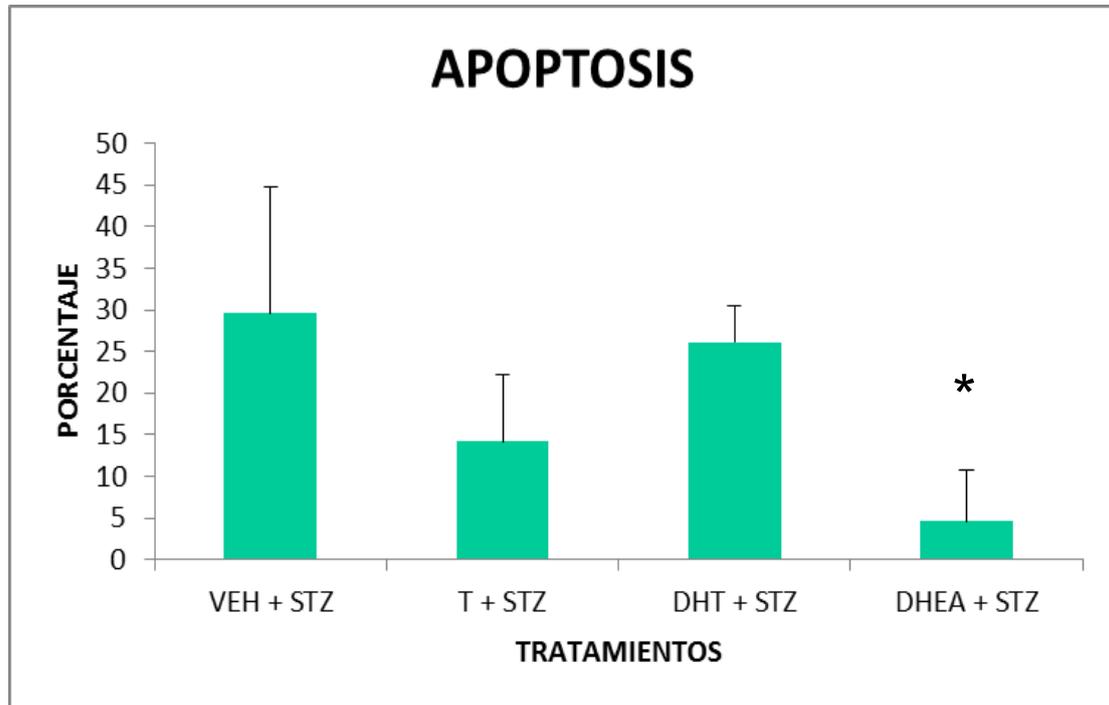


Fig. 20. Tejido pancreático (corte de $5 \mu\text{m}$) de rata macho castrada con daño por STZ y tratado con dehidroepiandrosterona. A= núcleos totales, B= núcleos en apoptosis. Técnica de TUNEL.

La gráfica 5 muestra una comparación del porcentaje de apoptosis que se presentó en cada uno de los tratamientos evaluados. Se observa que el tratamiento con dehidroepiandrosterona aplicado a células β pancreáticas con daño por estreptozotocina, presenta un efecto protector estadísticamente diferente con respecto a los otros andrógenos evaluados. Además este efecto es mayor al que presenta la testosterona.



Gráfica 4. Índice de apoptosis expresado como porcentaje de núcleos apoptóticos/ total de núcleos en isletos pancreáticos de ratas macho castradas con STZ y los diferentes tratamientos hormonales. Los resultados expresan la media \pm SD de 5 animales. * $p < 0.05$. T= testosterona, DHT= dihidrotestosterona, DHEA= dehidroepiandrosterona, STZ= estreptozotocina.

5. DISCUSION.

El presente trabajo evaluó la protección contra la apoptosis producida por STZ en células β pancreáticas al ser tratadas con derivados androgénicos.

La Dihidrotestosterona y Dehidroepiandrosterona se eligieron para ser comparadas con la Testosterona; ya que, se sabe que la Testosterona protege a las células β del daño ocasionado por STZ (Morimoto *et al*, 2005 & Palomar-Morales *et al*, 2010; Fox, 1992).

En la Gráfica 5, se observa que los andrógenos evaluados presentan un efecto de protección en las células β ; sin embargo, este efecto es mayor con DHEA, presentando solo 4.59% de apoptosis en islotes pancreáticos, lo que indica que el tratamiento con esta hormona esteroide reduce la apoptosis producida por STZ hasta un 95%. Estos resultados demuestran que el efecto de la DHEA es más potente que el de la Testosterona y DHT.

Recientes estudios han mostrado la existencia de posibles receptores específicos para la DHEA: un receptor de membrana acoplado a proteínas G (Williams *et al*, 2002, 2004). La existencia de estos receptores específicos para DHEA sugiere que la actividad de ésta es por sí misma y no debido a su conversión en otras hormonas esteroideas.

Así mismo, en distintos padecimientos existe mejoría al administrar DHEA, ya que disminuye el crecimiento de tumores cancerosos y produce mejoría en enfermedades autoinmunes, al inhibir la producción de radicales libres (Hampel y Starka, 2000). Además, la DHEA-S, a la cual no se le ha conferido actividad biológica, ha mostrado efectos antidiabéticos en ratas (Kanauchi *et al*, 2001).

La apoptosis producida con STZ se redujo hasta un 75% con tratamiento por Dihidrotestosterona; ya que el páncreas de los sujetos tratados con este andrógeno presentaron 26.12% de apoptosis en células β . Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Simões (2013) que demostró que los niveles de mRNA de p53, Bcl2 (anti y pro-apoptótico), AIF (factor de inducción de apoptosis) y las caspasas 3 y 9 se reducen con DHT en células de Sertoli inmaduras. De igual forma, el tratamiento previo con esta hormona puede inhibir la apoptosis en células ECV-304 inducidos por H_2O_2 , asociando este efecto con la inhibición de la caspasa-3, 9 y la fosfo expresión p38 MAPK (Zhe-Rong *et al*, 2010). Por último, Bruckheimer (2003) encontró que la DHT suprime la expresión de Bcl-2 en células de cáncer de próstata LNcaP-FGC sensibles a la hormona.

Los resultados obtenidos por Simões (2013); Zhe-Rong (2010) y Bruckheimer (2003), coinciden en que el efecto de la DHT se basa en la inhibición de las caspasas-3 y -9 y la proteína Bcl-2. Aunque nuestros resultados solo demuestran que la DHT protege a las células β pancreáticas del daño provocado por STZ,

concuerdan con la hipótesis que esta hormona modula la señalización de apoptosis en alguno de los factores mencionados.

En el tejido pancreático que fue tratado con testosterona, se observó un 14.19% de apoptosis, como se muestra en la Gráfica 5, reduciendo esta misma hasta un 85%. Nuestro grupo de trabajo en 2010 demostró que la testosterona, pero no el estradiol ni la progesterona, protege a las células β pancreáticas del daño por apoptosis inducido con STZ y que este efecto es exclusivo de los machos (Palomar-Morales *et al*, 2010). Estos resultados coinciden con los de Morimoto *et al*, 2005; al mostrar que el daño temprano por apoptosis producido por STZ en animales (ratas Wistar) castrados fue revertido por el tratamiento con Testosterona. También se sabe que este andrógeno reduce la apoptosis inducida por estrés hiperosmótico en cardiomiocitos de la línea H9c2 a través de mecanismos no genómicos e independientes del receptor de andrógenos, en el que al menos están implicadas las moléculas SAPK/JNK y ERK1/2 (Sánchez-Más *et al*, 2010).

De acuerdo a lo encontrado en la literatura y a nuestros resultados creemos que los efectos antiapoptóticos que presentan los andrógenos: DHEA, DHT y Testosterona podrían darse gracias a su interacción con el Receptor a Andrógenos (AR).

Li (2008) demostró que el AR puede ser expresado por células β , localizándose en el citoplasma, extensamente en microsomas, membrana plasmática y el citosol de células β pancreáticas de ratones sanos y diabéticos. También menciona que este receptor media la apoptosis de las células β bajo condiciones desfavorables y la débil/ausente expresión del AR contribuye a la proliferación β -celular. Además reporta que con el progreso de Diabetes Mellitus la expresión del AR en células β de ratones diabéticos decrece gradualmente hasta desaparecer.

Pero por otro lado, el efecto antiapoptótico que presentan los andrógenos, podría darse gracias a su capacidad antioxidante; ya que se conoce que varios antioxidantes como la N-acetilcisteína tienen la habilidad para bloquear la apoptosis de un manera similar a como lo hacen los inhibidores de caspasas (citado en Kannan *et al*, 2000).

En la literatura existen diversas investigaciones que han mostrado el efecto antioxidante de los andrógenos en diversos tejidos: riñón, hígado, páncreas, próstata ventral. Se sabe además, que reducen la producción de superóxido, regulan el estado redox *in vivo* en PV y LV, protegen las propiedades neuronales de ratas diabéticas inducidas con STZ, modulan enzimas que ayudan a las células a escapar del daño que ocasionan los ROS y el NO, regulan un conjunto de genes relacionados con el estrés oxidativo incluyendo la thioredoxina, 5-peroxiredoxina, SOD 2, glutatión peroxidasa 1, selenoproteína de 15kDa, glutatión-S-transferasa microsomal, glutatión reductasa y la epóxido hidrolasa (Aragno *et al*, 1999; Alhbom *et al*, 1999, 2001; Boccuzzi *et al*, 1997; Klapcinska *et al*, 2008; Pang *et al*, 2002; Tam *et al*, 2003; Yorek *et al*, 2002).

Está bien establecido que durante el metabolismo de STZ son producidos varios intermediarios tóxicos incluyendo radicales metilo, ROS, Óxido Nítrico y otros. (Peschke *et al*, 2000). Estos intervienen en el desencadenamiento de la muerte celular programada; es por eso que se evaluó la inmun expresión de enzimas antioxidantes –Catalasa, Cu/Zn- y Mn-SOD- en células β pancreáticas tratadas con derivados androgénicos.

Es conocido que una dosis de 50 mg/kg de STZ en páncreas reduce la actividad enzimática de superóxido dismutasa en un 32% y la catalasa en un 76% (Mora *et al*, 2009). Sin embargo, Friesen (2004) reportó que al inducir diabetes mellitus con múltiples dosis de STZ los niveles de mRNA de Catalasa, Cu/Zn- y Mn-SOD no se ven afectados; pero, Laybutt (2002) reportó que la pancreatectomía induce un ligero incremento en los niveles de mRNA de Cu/Zn-SOD y Mn-SOD, pero no en los niveles de mRNA para catalasa.

No obstante las células β de roedores expresan bajos niveles de enzimas antioxidantes como la Catalasa, SOD y glutatión peroxidasa (Lenzen *et al*, 1996).

En nuestros resultados, la diferencia en la expresión de Catalasa, Cu/Zn- y Mn-SOD no fue estadísticamente significativa con ninguno de los tratamientos; sin embargo, pese a que no existe una marcada diferencia en su expresión, observamos que con Testosterona y DHT existe una tendencia a disminuir la expresión de éstas (ver grafica 4).

Anteriormente nuestro equipo de trabajo (Palomar-Morales *et al*, 2010) mencionó que el efecto protector de la testosterona podría darse a través de la inducción de catalasa y Cu/Zn- SOD. De igual forma, Sosa (2008) reportó que en islotes pancreáticos con daño por STZ la expresión de Mn-SOD, pero no de catalasa, está regulada por testosterona y en el 2003 Tam reportó que la Mn-SOD es regulada específicamente por testosterona, reduciendo el estrés oxidativo *in vivo* causado por pancreatectomía o castración.

Así mismo, nuestros resultados muestran una tendencia de incremento en la expresión de Catalasa, Cu/Zn- y Mn-SOD en islotes pancreáticos con tratamiento de Dehidroepiandrosterona. Aragno (2000) demostró que la DHEA reduce, en sinaptosomas de cerebro, los niveles de hidroxilo, así como la producción de H₂O₂ y ROS en ratas diabéticas sujetas a Isquemia/Reperfusión.

Según lo reportado por Hanna (2011) el tratamiento con DHEA induce un incremento no significativo de Catalasa y SOD en cerebro de ratas ovariectomizadas. Por lo tanto, podemos decir que el efecto de la DHEA sobre la expresión de Catalasa, SOD 1 y 2 en islotes pancreáticos de ratas castradas diabéticas inducidas con STZ fue insignificante en comparación con Testosterona y Dihidrotestosterona.

6. CONCLUSIONES

- Se presentó un efecto protector contra la apoptosis producida por STZ en células β pancreáticas por tratamiento con derivados androgénicos.
- El efecto de la Dehidroepiandrosterona reduce hasta un 95% la apoptosis que produce la STZ en células β .
- El efecto de la Testosterona reduce hasta un 85% la apoptosis producida por STZ en células β .
- La Dihidrotestosterona reduce hasta un 75% la apoptosis que produce la estreptozotocina.
- El incremento en la expresión de las enzimas Catalasa, Cu/Zn-SOD y Mn-SOD por tratamiento con DHEA no fue significativo.
- Los tratamientos con Testosterona y DHT tienden a reducir la inmunexpresión de Catalasa, Cu/Zn-SOD y Mn-SOD.
- El efecto citoprotector de la testosterona, dihidrotestosterona y dehidroepiandrosterona no está vinculado a la expresión de las enzimas antioxidantes evaluadas.

7. LITERATURA CITADA

Ahlbom E, Grandison L, Bonfoco E, Zhivotovsky B & Ceccatelli S. 1999. Androgen treatment of neonatal rats decreases susceptibility of cerebellar granule to oxidative stress *in vitro*. *Eur J Neurosci*. 11: 1285-1291.

Ahlbom E, Prins GS, Ceccatelli S. 2001. Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Res* 892: 255-262.

Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignadello E, Parola S, Danni O & Boccuzzi G. 1999. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin –treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 26:1467-1474.

Aragno M, Parola S, Brignadello E, Mauro A, Tamagno F, Manti R, Danni O, Boccuzzi G. 2000. Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury induced by transient ischemia/reperfusion in the brain of diabetic rats. *Diabetes* 49: 1924-1931.

Bagatell JC & Bremner WJ. 2003. Androgens in health and disease. Human Press. New Jersey. 3-17 pp.

Balz F. 1994. Natural antioxidants in Human Health and Disease. Academic Press. USA. 25-41 pp.

Bruckheimer EM, Spurgeri K, Weigel NL, Logothetis C & McDonnell TJ. 2003. Regulation of Bcl-2 expression by DHT in hormone sensitive LNCaP-FGC prostate cancer cells. *J Urol*. 169(4): 1553-1557.

Castillo VR. 2005. La apoptosis en biología y patología. *Rev Per Cardio*. 31(2): 119-128.

Cascales-Angosto M. 1999. Estrés Oxidativo: Envejecimiento y enfermedad. *Realigraf S.A*. Instituto de España. Madrid. 50-55 pp.

Chandra J, Zhivotovsky B, Zaitsev S, Juntti-Berggren L, Berggren PO, Orrenius S. 2001. Role of apoptosis in pancreatic beta-cell death in diabetes. *Diabetes* 50 (Suppl 1): 44-47.

Choi D & Woo M. 2009. Executioners of apoptosis in pancreatic β -cells: not just for cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 298: E735-E741.

Davidson JK. 2000. Clinical Diabetes Mellitus a problem oriented approach. 3^a Thieme. New York. 41-44 pp.

Delgado E. 2008. Las estimaciones internacionales indican que la prevalencia de la Diabetes se duplicará en los próximos años. Hospital General Universitario de Asturias. Oviedo. *ReES MFRAF* (7)2:55-58.

- Deroo BJ, Hewitt SC, Peddada SD, Korach KS. 2004. Estradiol regulates the thioredoxin antioxidant system in the mouse uterus. *Endocrinology* 145(12): 5485-5492.
- Dillon JS, Yaney GC, Zhou Y, Voilley N, Bowen S, Chipkin S, Bliss CR; Schultz V, Schuit FC, Prentki M, Waxman DJ, Corkey BF. 2000. Dehydroepiandrosterone sulfate and beta cell function: enhanced glucose-induced insulin secretion and altered gene expression in rodent pancreatic beta cells. *Diabetes* 49: 2012-2020.
- Escobar J.F & Tébar M.F. 2009. La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica. Medica Panamericana. 1-5, 31-37 pp.
- Gardner D & Shoback D. 2008. Endocrinología básica y clínica de Greenspan. 7°. Manual Moderno. 491-495 pp.
- Gomis R, Rovira A, Felú J, Oyarzábal M. 2007. Tratado Sed de Diabetes Mellitus. Médica Panamericana. Madrid. 1-5 pp.
- Halliwell B & Gutteridge JM. 2007. Free radicals in Biology and Medicine. 4°. Oxford Biosciences. USA. 46-51, 80-91, 106-109.
- Hammond J, Le Q, Goodyer C, Gelfand M, Trifiro M, LeBlanc A. 2001. Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *J Neurochem* 77: 1319-1326.
- HAMPL R & Starka L. 2000. 16 α -hydroxylated metabolites of dehydroepiandrosterone and their biological significance. *Endocr Regul* 34: 161-163.
- Hanna FA, Fateheya MM & Hanaa HA. 2011. Neuroprotective effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in rat model Alzheimer's disease. *Acta Bioch Pol* 58(4): 513-520.
- Islas A.S & Revilla M.M. 2004. Diabetes Mellitus. 3ª Mc Graw Hill. México. 3-7, 37, 87-88 pp.
- Kajimoto Y & Kaneto H. 2004. Role of Oxidative Stress in pancreatic β -cell dysfunction. *Ann NY Acad Sci* 1011: 168-176.
- Kannan K & Jain SK. 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7(27): 153-165.
- Kanauchi M, Nakajima M, Dohi K. 2001. Dehydroepiandrosterone sulfate and estradiol in men with diabetic nephropathy. *Nephron* 88: 95-96.
- Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I & Glaser B. 2000. Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hypinsulinemia of infancy. *Diabetes* 49: 1325-1333.

- Klapcinska B, Jagsz S, Sadowska-Krepa E, Gorski J, Kempa K & Langfort J. 2008. Effects of castration and testosterone replacement on the antioxidant defense system in rat left ventricle. *J Physiol Sci* 58(3): 173-177.
- Konisberg FM. 2008. Radicales y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. México: El Manual Moderno. 25-59, 169-200 pp.
- Kronenberg MH, Melmed S, Polonsky SK, Reed LP. 2008. Williams textbook of endocrinology. 11°. Saunders Elsevier. 645-649 pp.
- Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A & Weir GC. 2002. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes*. 51: 413-423.
- Lenzen S, Drinkgern J & Fiedge M. 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20: 463-466.
- Li R, Qui S, Wang H, Tian H, Wang L & Huo Y. 2008. Androgen receptor: a new player associated with apoptosis and proliferation of pancreatic beta-cell in type 1 diabetes mellitus. *Apoptosis*. 13: 959-971.
- Luna LA. 2010. Mecanismos endógenos de generación de especies reactivas de oxígeno y respuesta celular antioxidante ante el estrés oxidativo. Instituto de Geriátria. 93-102 pp.
- Luo J. 2001. Manganese Superoxide Dismutase (Mn-SOD). Free radicals and radiation biology program. *B-180 Med Lab Univ Iowa* 77: 222.
- Madrup-Poulsen T. 2001. Beta-cell apoptosis. Stimuli and signaling. *Diabetes* 50 (Suppl 1): S58-S63.
- Mayor-Oxilia R. 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev Inst Med Trop* 5(2): 23-29.
- Miyake H, Hara I, Gleave ME, Eto H. 2004. Protection of androgen-dependent human prostate cancer cells from oxidative stress-induced DNA damage by overexpression of clusterin and its modulation by androgen. *Prostate* 61(4): 318-323.
- Mora HA, Aragón ND & Ospina GL. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. *Rev Fac Quim Farmac* 16(3): 311-319.
- Morimoto S, Mendoza-Rodríguez CA, Hiriart M. 2005. Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. *J Endroc* 187: 217-224.

- O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. 1996. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol* 178: 176-181.
- O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. 1997. Apoptosis is the mode of beta-cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes* 46: 750-757.
- Okamoto H. 1985. Molecular basis of experimental diabetes: degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic β -cells of islets of Langerhans. *Bioessays* 2:15-21.
- Palomar-Morales M, Morimoto S, Mendoza-Rodríguez CA, Cerbón MA. 2010. The protective effect of testosterone on streptozotocin-induced apoptosis in β cells is sex specific. *Pancreas* 39(2): 193-200.
- Pang ST, Dillner K, Wu X, Pousette A, Norstedt G & Flores-Morales A. 2002. Gene expression profiling of androgen deficiency predicts a pathway of prostate apoptosis that involves genes related to oxidative stress. *Endocrinology*. 143: 4897-4906.
- Peschke E, Ebelt H, Brömme HJ, Peschke D. 2000. "Classical" and "New" diabetogens-comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. *Cell Mol Life Sci* 57: 158-164.
- Ramírez CR, Carracedo AJ, Moreno AC & Guerra PF. 1999. Apoptosis y enfermedad. *Alergol Inmunol Clin.* (14)6: 367-374.
- Reed JC & Green DR. 2011. Apoptosis; Physiology and Pathology. Cambridge University Press. USA. 201-204 pp.
- Rojas DF, Manzo DJ, Soto-Cid AH, Aranda-Abreu GE, Juárez AE, Coria-Ávila GA, Toledo UR, Locia EJ & Hernández AE. 2011. El receptor a andrógenos en la fisiología prostática. *Rev Neurobiol by Univ Xalapa.* (2)4:230511.
- Rosas G, Ruy L, Ney C. 2004. Diabetes Mellitus: una visión latinoamericana. Intersistemas Editores. México. 29-30, 82-85 pp.
- Sánchez-Más J, Turpín MC, Lax A, Ruipérez JA, Valdés M, Pascual-Digal DA. 2010. Efecto diferencial de espironolactona frente a eplerenona sobre el papel protector *in vitro* de testosterona en la apoptosis de cardiocitos. *Rev Esp Cardiol* 63(7):779-787.
- Schnedl W, Ferber S, Johnson HJ & Newgard BC. 1994. STZ transport and cytotoxicity. *Diabetes* 43: 1326-1333.
- Silverthorn DU. 2008. Fisiología Humana: un enfoque integrado. 4°. Panamericana. 220-221 pp.

- Simões VL, Alves MG, Martines AD, Dias TR, Rato L, Socorro S, Oliveira PF. 2013. Regulation of apoptotic signaling pathways by 5 α -DHT and 17 β -estradiol in immature rat Sertolli cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 135: 15-23.
- Sosa LT. 2008. Expresión de las enzimas antioxidantes Catalasa y Mn-Superóxido Dismutasa reguladas por Testosterona en islotes pancreáticos de rata con daño temprano por STZ. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. Los Reyes Iztacala, México.
- Sperling MA. 2003. Type 1 Diabetes: Etiology and Treatment. *Totowa*. New York. 26-27 pp.
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin action in B cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res*. 50: 536-546.
- Tam NNC, Gao Y, Leung YK, Ho SM. 2003. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate. *Am J Pathol* 163(6): 2513-2522.
- UNBA, 2005. Rie.com.ar/?a=18271.
- Voet D & Voet JG. 2006. Bioquímica. 3°. Panamericana. Buenos Aires. 690-691 pp.
- Weiss RB. 1982. Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep* 66: 427-438.
- Williams M; Ling S, Dawood T; Hashimura K; Dai A; Li H; Liu JP; Funder J; Sudhir K; Komesaroff P, 2002. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 176-181.
- Williams M; Dawood T; Ling S; Dai A; Lew R; Myles K; Funder J; Sudhir K ; Komesaroff P, 2004. Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation in vitro and improves endothelial function in vivo by mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4708-4715.
- Winter W & Signorino M^ªR. 2002. Diabetes Mellitus: Pathophysiology, Etiologies, Complications, Management and Laboratory Evaluation. AACCC Press. EUA. page. 30
- Yin Xiao M & Dong Z. 2003. Essentials of apoptosis: A guide for basic and clinical research. *Humana Press*. New Jersey. 3
- Zhe-Rong X, Lin H, Lin C, Yun Q & Yun-mei Y. 2010. Dihydrotestosterone protects human vascular endothelial cells from H₂O₂-induced apoptosis through inhibition of caspase-3, caspase-9 and p38 MAPK. *Europ Journ Pharm*. 643 (1-3): 254-259.