



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MEDICIÓN DE CORTICOSTERONA Y VEGF-A SISTÉMICOS EN UN MODELO DE
DIABETES TIPO 1 EXPUESTO A ESTRÉS CRÓNICO

PROPUESTA DE PROYECTO DE TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
DIANA BERENICE PAZ TREJO

TUTOR PRINCIPAL
DR. LENIN DAVID OCHOA DE LA PAZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. EDITH ARNOLD HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: **Diana Berenice Paz Trejo**, cuyo título es: “**Medición de corticosterona y VEGF-A sistémicos en un modelo de diabetes tipo 1 expuesto a estrés crónico**” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. David Natanael Velázquez Martínez

Secretario (Tutor)

Dra. Yazmín Macotela Guzmán

Vocal

Dra. Edith Arnold Hernández

Suplente

Dr. Lenin David Ochoa de la Paz

Suplente

Dr. Rubén Zamora Alvarado

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

El estrés es una respuesta adaptativa cuya desregulación ha sido relacionada con el desarrollo de múltiples psicopatologías, no obstante, aún no se incorpora como variable de estudio en el desarrollo de otras condiciones crónicas como la diabetes. Uno de los modelos para el estudio de la diabetes tipo 1 es la administración de estreptozotocina (STZ) que conserva la etiología de la enfermedad y permite estudiar el curso de la misma.

El presente trabajo realizó la estandarización del modelo murino de diabetes por administración de STZ (65 mg/kg i.p.) así como la evaluación de efectos sistémicos del estrés crónico en condiciones de hipergluemia.

Los sujetos hiperglucémicos tuvieron pesos corporales más bajos y consumo incrementado de alimento y agua; se observó que estos efectos permanecen relativamente estables a lo largo de 6 y 12 semanas.

La evaluación del estrés crónico, posterior a la inducción de hiperglucemia, mostró efectos significativos sobre el peso corporal sin diferencias significativas en cortisol y VEGF séricos. Sin embargo, se observó un incremento en la variabilidad de los niveles de corticosterona en el grupo diabetes-estrés.

Los resultados mostraron la correcta estandarización del modelo de STZ en la reproducción de las características de la diabetes. Por su parte, los cambios en peso corporal por estrés pueden indicar cambios a largo plazo que, a su vez, podrían modular efectos de la hiperglucemia. Finalmente, la variabilidad de corticosterona sugiere una facilitación del deterioro de la retroalimentación negativa del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) sustentando la desregulación endocrina observada en pacientes. Los resultados obtenidos no son suficientes para establecer una relación directa entre el estrés y la diabetes, sin embargo, permiten apuntar una relación moduladora entre la actividad del eje y algunos parámetros de la enfermedad.

ABSTRACT

Stress is an adaptive response, its deregulation is related to the development of several psychopathologies. However, stress isn't considered as a factor in the development of other chronic conditions as diabetes. Streptozotocin (STZ) administration is one of the type 1 diabetes models that mimics etiology and allows evaluation of the course of the disease.

This work standardizes the murine diabetes model by STZ administration (65 mg/kg i.p.) and the evaluation of systemic effects of chronic stress in a hyperglycemia model.

Hyperglycemic subjects showed lower bodyweights and higher water and food intakes, these effects were sustained at 6 and 12 weeks.

Chronic stress evaluation was made after hyperglycemic induction. Significant differences were observed in bodyweight but not in serum levels of corticosterone and VEGF. However, an increase of variability was observed in diabetes-stress group.

Results indicate the right standardization of STZ model by reproducing stable characteristics of diabetes. Effects of stress, in lower bodyweight, indicate long term changes that could be modulating hyperglycemia effects. Variability in corticosterone levels suggests facilitation of negative feedback impairment in hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis which supports endocrine deregulation in diabetic patients. Results don't define a direct relationship between stress and diabetes, however, they allow us to propose a modulatory relationship between the axis activity and some parameters of the disease.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación calidad, gratuita, laica y emancipadora que me brindó desde la licenciatura.

Al Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología), UNAM, por la oportunidad de estudiar desde la interdisciplina, y construir en comunidad, conocimiento científico sobre el cosmos que representa el sistema nervioso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido para mi formación científica con la que espero retribuir a mi país (Becaria No. 288693).

A los donativos de los proyectos DGAPA-PAPIIT y DGAPA-PAPIME: IA208116, IA205918, IN305715, IN306918, PE300715 y PE306318.

A mi tutor, el Dr. Lenin Ochoa de la Paz, quien me dio el voto de confianza para empezar desde cero en un área nueva para mí. Gracias por permitirme enfrentar los retos que representa el trabajo interdisciplinario y abrir mis horizontes del quehacer científico. Le agradezco el apoyo y confianza siempre brindados a mi trabajo y mi persona.

A los miembros del comité tutor. A la Dra. Edith Arnold Hernández, por sus valiosas aportaciones a mi trabajo que, sin duda, me han permitido crecer al buscar ir más allá en las explicaciones de mi fenómeno de estudio, le agradezco su amabilidad y rigor científico. Al Dr. Octavio García González por sus observaciones detalladas y rigurosas que me han impulsado a defender la construcción de argumentos sólidos, basados en evidencia, que cimienten la investigación y comunicación científica.

A los miembros del jurado, Dra. Yazmín Macotela Guzman y Dr. Rubén Zamora Alvarado por sus valiosas observaciones para la mejora del presente trabajo. Un agradecimiento especial para el Dr. David Velázquez Martínez quien me abrió las puertas de su laboratorio hace más de 12 años para comenzar a transitar en el mundo de la ciencia, le agradezco esa primera oportunidad y el acompañamiento que ha dado a mis pasos que sin duda hacen de mí la científica que soy.

A la Dra. Nuri Aranda y Guadalupe Amador Uribe de la Unidad de Enseñanza y Estudios de Posgrado del INB por el apoyo administrativo, agradezco especialmente a la Dra. Aranda sus atenciones que han permitido la culminación de este proceso.

A la Dra. Natalia Arias Trejo de la Coordinación de Posgrado de la Facultad de Psicología, por su disposición para fungir como unidad de enlace con el INB.

Al M.V.Z. Apolonio Haro y Lucía Canseco del Bioterio de la Facultad de Psicología, así como al bioterio de la Facultad de Medicina, por los animales y su cuidado que sirvieron a la realización del presente trabajo.

A Juan José García Ruiz de la Unidad de Videoconferencias de la Facultad de Psicología por el apoyo técnico a lo largo de la maestría.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mi abuelo que está en el cielo, yo le dedico mi canto

A las mujeres de mi vida que me han enseñado a volar. A Judith Trejo, mi madre, por ser ejemplo y apoyo, por el cariño y los llamados de atención que me han forjado como humano, madre y profesionalista, gracias por TODO. A Cynthia Paz, hermana menor que siempre ha cuidado de mí y me ha enseñado más de lo que yo le he podido dar a ella, gracias por ser mi maestra, sin ti definitivamente esta tesis no hubiera sido posible. A mi mabue, por ser la semilla que germinó el cambio. Las amo.

A mis Hugos. A Hugo papá, mi pájaro azul, por sostenerme en la tormenta, por darle sentido a mis canciones y apoyar mis convicciones; gracias por el amor, el sonido y el silencio, gracias por marchar conmigo con la cara y el puño en alto, hasta la victoria siempre. A Huguito, por aprender a caminar conmigo, por darme tu mano y aprender a ser conmigo, gracias hijo.

A toda mi familia que siempre ha sido el bastión más importante en mi vida sin cuyo alboroto esta vía sería insostenible.

A mis amigos y maestros. A Fabián, por tu disposición a compartir el conocimiento, tu apoyo es uno de los pilares que sostienen este trabajo. A Aline, ayer estudiante, hoy maravillosa maestra y colega, gracias por enseñarme, por compartir y acompañarme, te quiero. A Pau, por abrir brecha, porque no solamente hiciste el camino sino que me ayudaste a transitarlo, gracias por ser ejemplo de sororidad y amistad.

A Mariana Navarrete, por el apoyo en esta labor de lágrimas y desvelos.

A mis compañeros NETs y los compañeros del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular de la Glía. Gracias a Amabile y Jess por llorar y reír conmigo, su amistad es la mayor ganancia en este camino.

ÍNDICE

Resumen	I
Abstract	II
Introducción	1
Antecedentes	2
Justificación	12
Hipótesis	12
Objetivos	13
Sujetos.....	13
Materiales	15
Métodos	15
Resultados	20
Discusión	36
Conclusión	41
Referencias	42
Lista de abreviaturas.....	50
Lista de figuras.....	51
Lista de tablas.....	51
Apéndices	52

1- INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica progresiva que se ha convertido en un tema relevante de salud pública a nivel nacional e internacional (Secretaría de Salud Pública, 2016; Wild et al, 2004). Si bien se han logrado múltiples avances en la investigación de tratamientos y herramientas diagnósticas, los mecanismos y factores asociados al desarrollo de la enfermedad continúan siendo explorados. Por su parte, el estrés ha sido vinculado a múltiples psicopatologías (Timmermans, 2013; Ron de Kloet, 2005); sin embargo, la relación entre estrés y diabetes no ha sido totalmente explorada. En este sentido, se ha demostrado que personas con diabetes, además de las alteraciones metabólicas en glucosa y lípidos, presentan alteración en niveles de cortisol (CORT) (Hackett et al, 2016; Kamba et al, 2016; Ortiz et al, 2019), hormona tradicionalmente asociada a condiciones de estrés y que refleja también las alteraciones endocrinas de estos pacientes. Este hallazgo ha llevado, a algunos grupos de investigación, a proponer al cortisol como indicador del deterioro de los pacientes con diabetes (Ortiz et al., 2019).

El estrés crónico forma parte de la vida cotidiana de los pacientes con diabetes tipo 1 y podría regular el progreso de la enfermedad al ser un evento de alta relevancia endocrina y de movilización de recursos energéticos.

Adicionalmente, se han demostrado alteraciones en la micro y macro vasculatura que afectan significativamente la calidad de vida en los pacientes con diabetes generando deficiencias visuales (Robinson et al, 2012) y cognitivas (de la Monte, 2014). En este escenario el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se ha propuesto como uno de los principales biomarcadores de las alteraciones vasculares por diabetes (Nalini et al, 2017).

De esta manera, la presente investigación buscó aportar elementos al estudio del estrés y la diabetes a partir de responder cuáles eran los efectos del estrés crónico en un modelo de diabetes tipo 1 a partir de la evaluación de corticosterona y VEGF sistémicos.

2- ANTECEDENTES

2.1- DIABETES

La diabetes es una enfermedad crónica progresiva que se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre (WHO, 2016). La American Diabetes Association (2018) establece cuatro categorías diagnósticas de diabetes:

- Tipo 1. Causada por deficiencias en la producción de insulina.
- Tipo 2. Relacionada con la resistencia a insulina.
- Gestacional. Diagnosticada en el segundo trimestre del embarazo en mujeres sin antecedentes de la enfermedad. Usualmente desaparece después del nacimiento, sin embargo, las mujeres que la padecen pueden desarrollar a futuro diabetes tipo 2 o diabetes gestacional en embarazos futuros.
- Tipos específicos de diabetes por otras causas (e.g. diabetes neonatal, pancreatitis).

La insuficiencia de insulina, en la diabetes tipo 1, es causada por la pérdida de células beta del páncreas lo que disminuye el metabolismo de glucosa por una deficiencia en el transporte de esta molécula al interior de las células, ocasionando una baja energética a nivel sistémico (Dods, 2013).

Pese a la diferencia etiológica de los tipos de diabetes, la sintomatología en las diferentes categorías es similar. Entre los principales síntomas de la diabetes se encuentran sed excesiva (polidipsia), excreta incrementada de orina (poliuria), hambre constante (polifagia) y pérdida considerable de peso corporal (Dods, 2013).

La diabetes afecta considerablemente la calidad de vida de los pacientes ya que las complicaciones médicas derivadas de ella afectan varios sistemas en el organismo. Entre otras cosas, se la ha asociado con problemas vasculares, renales (WHO, 2016), visuales (WHO, 2016; Lynch & Abràmoff, 2017; Nalini et al, 2017) y alteraciones a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Lynch & Abràmoff, 2017; Brundeln, 2014; Zhanga 2014).

Considerando que son varias las complicaciones derivadas de la diabetes, éstas se han clasificado en agudas y crónicas (Malamed & Orr, 2015). Entre las complicaciones agudas se incluyen la hiperglucemia y la hipoglucemia. Por su parte, las complicaciones crónicas se refieren a procesos patológicos a largo plazo que alteran principalmente los sistemas cardiovascular, visual, renal y nervioso, de aquí que la mayoría de los pacientes con diabetes desarrollen padecimientos en estos sistemas o inclusive, en casos extremos, que fallezcan debido a complicaciones (Malamed & Orr, 2015).

De igual forma, se han determinado tres categorías generales de complicaciones diabéticas asociadas a la vasculatura: enfermedades de vasos sanguíneos grandes (macrovasculares), enfermedades de vasos sanguíneos pequeños (microvasculares) y susceptibilidad incrementada a infecciones (Malamed & Orr, 2015). Entre las macrovasculares se encuentran la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares, mientras que algunas de las microvasculares son la nefropatía y la retinopatía (Cases, 2002).

Entre las alteraciones vasculares que más afectan la calidad de vida de los individuos se encuentra la retinopatía diabética. Esta enfermedad ocular es la principal causa de ceguera en pacientes con diabetes y se describe como una complicación microvascular derivada de la diabetes. Este padecimiento se compone de las fases no proliferativa y proliferativa. La fase proliferativa es el estado más avanzado de la enfermedad y se caracteriza por procesos de neovascularización que conllevan a la pérdida de visión en los pacientes (Nalini et al, 2017; Robinson, 2012).

El desarrollo de la retinopatía involucra diferentes variables: duración de la diabetes, el tipo de diabetes, el control de la enfermedad, presión sanguínea, hiperlipidemia, hábitos, entre otros (Hendrick et al, 2015). Sin embargo, no se ha podido determinar la o las causas exactas que derivan en la aparición y progreso de la misma, por ello, se ha buscado establecer los mecanismos moleculares que permitan la identificación de dianas terapéuticas que prevengan la progresión acelerada de la retinopatía, y de igual forma, la búsqueda de biomarcadores que permitan el diagnóstico temprano. Nalini y colaboradores (2017), correlacionaron

algunos biomarcadores con la severidad de la retinopatía diabética como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor necrótico tumoral alfa ($TNF\alpha$). Estos resultados apuntan y refuerzan el argumento de que las alteraciones celulares ocasionadas por la diabetes se relacionan con procesos vasculares e inflamatorios (Robinson, 2012). Sin embargo, pese a que la retinopatía se describe principalmente como un trastorno de origen vascular, existen reportes que señalan que su origen puede también responder a cuestiones neuropatológicas (Lynch & Abràmoff, 2017).

Si bien es cierto que hay grupos de investigación abocados al estudio de la prevención y tratamiento de la diabetes, son pocas las investigaciones que consideran al estrés dentro de sus variables de estudio. Lo anterior a pesar de que se ha reportado que el estrés puede alterar los niveles de factores relacionados con complicaciones diabéticas como lo son el VEGF (Nowacka et al, 2015) y factores inflamatorios (Malek et al, 2015).

Entre los factores que relacionan estrés y diabetes, se ha descrito a la prolactina. Faron-Górecka y colaboradores (2017), demostraron que los niveles basales de prolactina se correlacionan negativamente con la respuesta a tratamiento de antidepresivos en modelos de estrés crónico. Se ha descrito también que la prolactina tiene acción antioxidante y que podría prevenir el desarrollo de retinopatías asociadas a enfermedades metabólicas (Thébault, 2017). Por otra parte, además de la posible protección por parte de la prolactina en el desarrollo de la retinopatía diabética, existen reportes que indican una participación importante de sus metabolitos, vaso-inhibinas, en el desarrollo de esta enfermedad al inhibir el proceso de angiogénesis (Clapp, 2006).

2.2- VEGF Y DIABETES

Debido a que muchas de las complicaciones derivadas de la diabetes incluyen alteraciones vasculares, se han investigado diferentes moléculas relacionadas con este proceso. Específicamente se ha descrito que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tiene un papel fundamental en la patogénesis de la

diabetes y sus complicaciones, particularmente aquellas que se relacionan con pobre vascularización e hipoxia (Sellami et al, 2018).

VEGF es una familia de proteínas donde VEGF-A promueve angiogénesis, permeabilidad vascular, migración celular y expresión de genes (Shibuya, 2011). Se ha descrito a la señalización por VEGF como un paso crítico (tasa-limitante) de los procesos de angiogénesis (Ferrara et al, 2003).

La retinopatía diabética se relaciona con factores de crecimiento asociados a hipoxia, particularmente el VEGF se encuentra elevado en el fluido ocular de los pacientes con diabetes por lo que la administración intravitreal de fármacos anti-VEGF es parte de las primeras líneas de tratamiento en esta población (Stitt et al, 2016)

Pese a que en su mayoría, el estudio y caracterización del VEGF, se centra en procesos vasculares, también se le ha atribuido un rol importante en los procesos de supervivencia, neurogénesis (Jin et al, 2002) y crecimiento axonal (Jerić et al., 2017). Jerić y colaboradores (2017) reportaron que diferentes condiciones diabéticas, en modelos animales, inducen cambios dinámicos en la expresión de VEGF en el ganglio trigémino, específicamente en neuronas nociceptivas lo cual podría destacar el papel de esta molécula en la patogénesis de neuropatía diabética.

En el caso de pacientes con polineuropatía, se reportó que los niveles sistémicos de VEGF son significativamente más altos que en sujetos control (Deguchi et al, 2009). Sin embargo, Deguchi y colaboradores (2009), reportaron que aún falta aclarar el papel del VEGF en la angiogénesis patológica y en la transición de salud a enfermedad pues apuntan que este factor de crecimiento tiene efectos diferenciales (Deguchi et al, 2009).

Pese a la búsqueda de biomarcadores que permitan predecir el curso que seguirán las complicaciones diabéticas y a su vez permitan el mejor tratamiento de los pacientes, aún hay factores, como el estrés, que no han sido totalmente incorporadas en el estudio de la diabetes y que podrían modular otras variables en la enfermedad.

2.3- ESTRÉS

El estudio del estrés presenta dos grandes conflictos, la falta de una definición monosémica y la ubicuidad de dicho fenómeno. Hasta ahora la definición que tiene mayor validez es la que establece al estrés como un conjunto de respuestas adaptativas ante un estímulo que puede poner en riesgo la integridad del organismo como una amenaza real o percibida (Fink, 2010).

Debido a la ubicuidad del estrés, existe una gran diversidad de situaciones y condiciones que pueden producir la respuesta de estrés, esto explicita la importancia de evaluar su impacto en diversas patologías humanas. Rechenberg y colaboradores (2017), reportaron que los pacientes con diabetes tipo 1 enfrentan altos niveles de estrés que repercuten en su salud; sin embargo, hacen explícita la dificultad de separar los efectos propios del estrés de otras variables como el tiempo de la enfermedad, conductas de autocuidado y fuente de estrés.

El carácter modulador del estrés en la enfermedad ha sido descrito más ampliamente en la salud mental donde se ha podido determinar que constituye un factor de riesgo para el desarrollo de varias psicopatologías (Timmermans, 2013; Ron de Kloet, 2005).

El papel facilitador del estrés en la psicopatología se debe principalmente a la activación de dos sistemas que dirigen los efectos de adaptación. Esta respuesta orgánica incluye al eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y al sistema nervioso autónomo (SNA) (Figura 1).

A grandes rasgos, la activación inicial del sistema nervioso autónomo, simpático y parasimpático provee una respuesta inmediata ante la presencia de estresores generando alteraciones rápidas en los estados fisiológicos como incrementos en la tasa cardíaca y presión sanguínea (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

Por su parte, la activación del eje HPA implica respuestas crónicas y de largo plazo que van desde la activación de cascadas hormonales, la modulación de la conducta e incluso efectos inmunológicos (Bilbo & Schwarz, 2012). Ante la percepción de los estresores, el núcleo paraventricular del hipotálamo secreta hormona liberadora de corticotropinas (CRH), que estimula la secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la pituitaria hacia el torrente sanguíneo; la

ACTH en corteza adrenal estimula la secreción de cortisol que autorregula negativamente su propia liberación por estimulación del sistema nervioso central (Dedovic et al, 2009; Fink, 2007) (Figura 1).

Finalmente, dentro de la respuesta de estrés descrita, también se han demostrado mecanismos que promueven procesos neurodegenerativos inducidos por radicales libres y liberación de factores proinflamatorios (López-López et al, 2014; García-Bueno, 2008). Estos datos sustentan la propuesta del estrés como modulador de estados patológicos en el organismo.

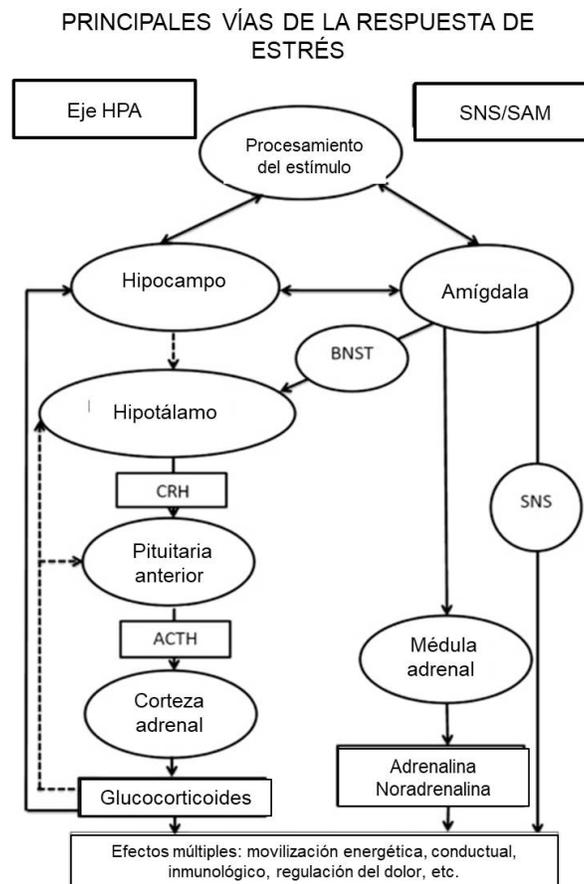


Figura 1. Sistemas involucrados en la respuesta de estrés. Se presentan los efectos de la activación del eje HPA y el SAM por medio de líneas continuas. Con líneas discontinuas se muestra la inhibición de la liberación de glucocorticoides por sistemas de retroalimentación negativa (modificado de Murison, 2016).

2.4- ESTRÉS, CORTISOL Y METABOLISMO

Una cualidad importante que denota la importancia del estrés en el metabolismo, particularmente en la diabetes, es la demanda y movilización de recursos energéticos que representa el estrés y que se traduce en cambios en los niveles de glucosa y activación de órganos reguladores del metabolismo como el páncreas (Packard, 2014).

Se ha descrito que el estrés puede impactar el balance energético en diferentes niveles, desde hipofagia y la pérdida de peso corporal hasta el consumo incrementado de alimentos palatables que incrementan el peso corporal (Rabasa & Dickson, 2016).

En psicopatologías asociadas con estrés, como la depresión, se presenta una relación bidireccional entre diabetes y estrés. Pacientes con depresión tienen mayor probabilidad de desarrollar diabetes y pacientes con diabetes muestran dos veces más sintomatología depresiva comparados con personas sin diabetes (Kyrou & Tsigos, 2009).

Así mismo, se ha reportado que los niveles de obesidad abdominal se asocian con una mayor responsividad del eje HPA, sin embargo, aún se requiere más investigación que permita identificar los efectos particulares de variables como sexo, tipo de estrés y perfil hormonal (Rodriguez et al, 2015).

Se ha reportado también que el estrés crónico puede afectar los niveles de VEGF (Shilpa et al, 2017; Nowacka et al 2015) y de prolactina (Faron-Górecka et al., 2014) descrita como antioxidante para la prevención del desarrollo de retinopatías asociadas a enfermedades metabólicas (Thébault, 2017).

Además de las alteraciones metabólicas, la diabetes tiene efectos endocrinos (Pop-Busui et al, 2007) entre los que destacan alteraciones en los niveles de cortisol (Hackett et al, 2016). En pacientes con diabetes tipo 2 se describe que los niveles de cortisol se relacionan positivamente con los niveles de glucosa y negativamente con la función de las células beta de páncreas (Kamba et al, 2016; Ortiz et al, 2019).

Considerando los datos epidemiológicos sobre depresión y pacientes con diabetes, se ha planteado que el vínculo entre el estrés, la depresión y la diabetes podría ser la alteración del eje HPA (Joseph & Golden, 2017).

Por otra parte, en el síndrome metabólico se reporta tanto hiperactividad del eje HPA como hipercortisolemia mientras que en pacientes con Síndrome de Cushing existe hiperglucemia (Anagnostis et al., 2009).

En modelos animales de diabetes también se han encontrado alterados los niveles de glucocorticoides. En mediciones acumulativas de corticosterona, obtenidas a partir del pelo de ratones modelo de diabetes tipo 1 y 2, se encontró un incremento sostenido de corticosterona (Erickson et al, 2017). Por otro lado, en jerbos tratados con estreptozotocina, se observó que además de niveles sistémicos altos de corticosterona existe en los sujetos hiperglucémicos un incremento en el tamaño de las glándulas adrenales (Hammadi et al, 2018).

Finalmente, Chiodini y colaboradores (2007), encontraron que los niveles de cortisol se relacionaban significativamente con la presencia de complicaciones médicas en pacientes con diabetes.

En conjunto esta información podría apuntar al estrés como un facilitador de la progresión de la diabetes y las complicaciones médicas derivadas de ella.

2.5- MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES

Los modelos experimentales con animales no humanos son de gran utilidad para el estudio de los principios básicos de diferentes patologías, lo cual ayuda por un lado a comprender la fisiopatología y por otro a desarrollar estrategias terapéuticas más puntuales.

En el caso de la diabetes uno de los objetivos que se persigue es que el modelo mimetice la patogénesis y la historia natural de la diabetes y/o induzca el subsecuente desarrollo de las complicaciones derivadas de la misma (Radenković et al, 2016). Debido a la dificultad de emular todas las características de la diabetes, se cuenta con diferentes modelos animales. Sin embargo, la diabetes tipo 1 puede considerarse como el modelo con mayor validez debido a la puntual definición de su etiología: la destrucción de células beta del páncreas.

Inicialmente, los modelos de diabetes se pueden dividir en diabetes espontánea o inducida (Ramos Rodríguez & Domingo Méndez, 1994). Debido a la falta de control de variables en los modelos espontáneos, los modelos de diabetes inducida son los más ampliamente utilizados.

La inducción de la diabetes, para un modelo de diabetes tipo 1, puede ser quirúrgica o farmacológica. El primer modelo experimental de diabetes fue la inducción quirúrgica que responde a pancreatomías (Radenković et al, 2016). La inducción farmacológica se realiza por la administración de fármacos que, de manera específica afectan a las células beta de páncreas. Los fármacos más utilizados son aloxona y estreptozotocina (Ramos Rodríguez & Domingo Méndez, 1994). Sin embargo, aunque ambos fármacos tienen por efecto la destrucción de las células beta pancreáticas, la aloxona no es considerada como la mejor opción debido a tres factores: 1) presenta un mayor efecto tóxico a nivel de hígado y riñones, 2) carece de un efecto estable respecto a la hiperglucemia en largos periodos de tiempo y 3) una gran cantidad de sujetos son resistentes a sus efectos (Radenković et al, 2016).

La estreptozotocina (STZ) puede atravesar la membrana celular a través de los transportadores de glucosa GLUT2 para ocasionar daño a nivel de ADN (fragmentación), lo que causa su efecto citotóxico en las células beta del páncreas (Szkudelski, 2001) (Figura 2). La acción de la STZ se observa dos horas después de la inyección al presentarse un incremento de glucosa en sangre (hiperglucemia) con un concomitante decremento de insulina (Szkudelski, 2001).

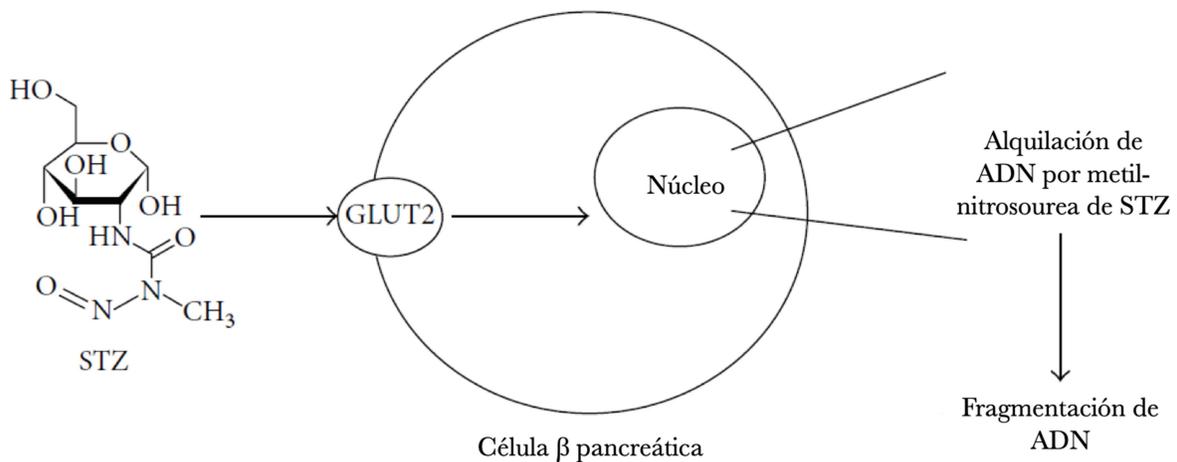


Figura 2. Mecanismo de acción de estreptozotocina (STZ). Se ilustra la interacción con los transportadores de glucosa 2 (GLUT2) de las células beta del páncreas para dañar ADN (modificado de Al-awar et al, 2016).

Estos antecedentes sugieren que es necesario generar mayor investigación sobre el efecto del estrés en la diabetes, su relación con las alteraciones vasculares y calidad de vida de los pacientes con diabetes. Una mayor investigación sobre la relación estrés-diabetes ayudará a un mejor entendimiento de los procesos fisiopatológicos involucrados en la diabetes y sus padecimientos asociados, como la pérdida de visión y afecciones en la salud mental, así como el diseño de programas de intervención que contemplen las alteraciones inducidas por estrés.

3- JUSTIFICACIÓN

La diabetes ha incrementado su incidencia a nivel mundial y representa un alto gasto para el sector salud por lo que es fundamental identificar y entender los factores que inciden en su severidad y desarrollo.

Las complicaciones crónicas derivadas de la diabetes afectan significativamente la calidad de vida los pacientes. A pesar de que el pobre control glucémico es uno de los principales factores asociados con el desarrollo de dichas complicaciones, aún se estudian los factores de riesgo para su aparición y progresión.

Con base en los mecanismos compartidos por el estrés y la diabetes en la desregulación del eje HPA así como las implicaciones que resultan de esta alteración, se puede sustentar la importancia de estudiar al estrés en sus implicaciones para el curso de las complicaciones médicas derivadas de la diabetes.

Aunque se ha estudiado el papel del estrés en varias patologías en salud mental, la relación que tiene con el desarrollo de las alteraciones vasculares generadas por la diabetes ha sido poco estudiada. Lo anterior a pesar de que se tiene registro de que el estrés es una condición presente en la vida de los pacientes con diabetes y pese a los factores endocrinos y metabólicos compartidos entre estrés y diabetes.

De esta manera se considera importante acotar la relación entre ambas variables con el propósito de incorporar, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de la diabetes, herramientas que permitan mejorar el pronóstico de los pacientes.

4- HIPÓTESIS

Las condiciones de estrés crónico modularán negativamente los niveles sistémicos de corticosterona y VEGF-A en un modelo murino de diabetes tipo 1.

5- OBJETIVOS

5.1- GENERAL

Evaluar los niveles séricos de corticosterona y VEGF en un modelo murino de diabetes tipo 1 sometido a estrés crónico.

5.2- ESPECÍFICOS

- Estandarizar el modelo murino de diabetes tipo 1 mediante la administración de estreptozotocina.
- Evaluar los cambios en indicadores metabólicos (glucosa y peso), en los sujetos expuestos a estrés crónico *versus* los sujetos sin estrés, en un modelo murino de diabetes tipo 1.
- Evaluar los niveles de corticosterona en los sujetos expuestos a estrés crónico *versus* los sujetos sin estrés en un modelo murino de diabetes tipo 1.
- Evaluar los niveles de VEGF-A en los sujetos expuestos a estrés crónico *versus* los sujetos sin estrés en un modelo murino de diabetes tipo 1.

6- SUJETOS

En todos los protocolos realizados en el presente trabajo, se mantuvo a los sujetos en condiciones estándar de laboratorio y todas las manipulaciones de los mismos se apegaron a las reglas estipuladas en Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999. De acuerdo a la baja sensibilidad de las hembras a la administración de STZ, en todos los protocolos se utilizaron ratas macho.

6.1- ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO

Parte de la estandarización del modelo incluyó la evaluación de la eficiencia de la dosis diabetogénica de estreptozotocina (STZ) propuesta por Wu y Huan (2008), estos datos pueden consultarse en el apéndice (ver Apéndice 11.1).

Para los datos que se presentan en este apartado se utilizaron en total 20 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 200 y 250 gramos al inicio del

experimento. Todas las ratas se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, alojadas en cajas de policarbonato individuales con agua y alimento *ad libitum*.

Los veinte sujetos se asignaron aleatoriamente en los siguientes cuatro grupos:

Testigo n=3

Vehículo n=5

STZ 65mg/kg 6 semanas n=5

STZ 65mg/kg 12 semanas n=5

Debido a que no todos los sujetos responden al reto con STZ, se separó a los sujetos que no desarrollaron hiperglucemia para constituir un grupo aparte (STZ 65mg/kg sin hiperglucemia 6 semanas n=2).

Para los grupos testigo y vehículo se realizaron los registros durante 12 semanas a fin de que fungieran como controles de ambos grupos de STZ.

6.2- RELACIÓN ENTRE ESTRÉS CRÓNICO Y DIABETES

Se utilizaron 36 ratas macho de la cepa Wistar de entre 200-250 g de peso al inicio del experimento, en condiciones estándar de laboratorio, con agua y alimento *ad libitum*. Los sujetos fueron alojados en cajas comunales de 5 individuos por caja habitación y fueron asignados a los siguientes cuatro grupos:

Vehículo (V) (n=8). Sin exposición a estrés crónico y sin diabetes inducida.

Vehículo-Estrés (V-E) (n=10). Con exposición a estrés crónico y sin diabetes inducida.

Diabetes (D) (n=8). Sin exposición a estrés crónico y con diabetes inducida.

Diabetes-Estrés (D-E) (n=10). Con exposición a estrés crónico y con diabetes inducida.

Los sujetos permanecieron bajo las condiciones estándar de laboratorio durante 6 semanas posteriores al reto durante las cuales se llevaron a cabo los registros descritos a continuación.

7- MATERIALES

7.1- ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO

Para el registro de consumo de agua y alimento se utilizó una probeta y balanza granataria. La medición de glucosa en sangre se realizó con un medidor de glucosa comercial OneTouch ultra mini con sus respectivas tiras reactivas.

7.2- RELACIÓN ENTRE ESTRÉS CRÓNICO Y DIABETES

Los inmunoensayos de corticosterona y VEGF se hicieron con un DetectX® Corticosterone Enzyme Immunoassay kit de la compañía comercial Arbor Assays y un ELISA Kit for Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) de la compañía commercial Cloud-Clone Corp. Las lecturas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro con longitud de onda a 450 nm.

La exposición a la batería de estrés crónico impredecible se realizó con equipo de laboratorio estandarizado para dichos propósitos.

El peso de los sujetos se midió con balanza granataria y la glucosa en sangre con un medidor de glucosa comercial OneTouch ultra mini y sus respectivas tiras reactivas.

8- MÉTODOS

8.1- INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

Se siguió el método descrito por Wu & Huan (2008). En dicho protocolo se describe que, del total de las ratas administradas con STZ, solamente alrededor del 80% de la muestra desarrollan hiperglucemia. En todos los experimentos del proyecto (a excepción de los datos de los apéndices), la dosis administrada de STZ fue de 65 mg/kg en volumen de 1 ml.

Previo a la administración del fármaco o vehículo, se pesó a los sujetos y se privó de alimento por al menos 6 horas con agua *ad libitum*. La preparación de la STZ se realizó el mismo día programado para la inyección de los sujetos, el vehículo utilizado fue buffer de citratos. La administración de la solución se realizó por vía

intraperitoneal usando jeringas de 3 ml de 23-G no tardando más de 5 minutos en el uso de toda la solución para evitar la rápida degradación del fármaco. La mayor parte de la manipulación del fármaco se realizó rápidamente y lejos de la luz ya que se ha descrito que el fármaco es fotosensible y altamente inestable incluso en la solución vehículo. Posterior a la inyección, los sujetos tuvieron acceso libre a alimento y como líquido se proporcionó solución de sacarosa al 10% por 24 horas, pasado ese periodo de tiempo se restauró el acceso al agua natural.

Wu & Huan (2008), reportan que es posible identificar los efectos a nivel del páncreas (destrucción de células beta pancreáticas) 72 horas posteriores a la administración de la STZ, por ello se realizó en este tiempo la determinación de hiperglucemia con un glucómetro comercial (OneTouch ultra mini). Para realizar las mediciones de la concentración de glucosa en sangre se privó de alimento a los sujetos durante 6 horas (de las 7 a las 13 hrs).

La asignación de los grupos fue previa a la administración de STZ. No obstante, debido a que no todos los sujetos desarrollan hiperglucemia, se conformó un grupo adicional con estos en el experimento de estandarización.

8.2- ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO

Los sujetos fueron alojados en cajas individuales para poder cuantificar el consumo de agua y alimento con el objetivo de registrar los diferentes parámetros fisiológicos como polidipsia, polifagia e hiperglicemia en el modelo de diabetes en ratas.

Se tomaron medidas de línea base de todas las variables durante los cinco días que siguieron a la llegada de las ratas al bioterio. Posterior a la asignación de grupos, se realizó la inducción de diabetes experimental, como se describió en el apartado anterior.

Se registró diariamente el peso corporal, consumo de agua y consumo de alimento. Las mediciones de glucosa se realizaron en una muestra de sangre obtenida por punción en la punta de la cola del animal.

Los niveles de glucosa en sangre se midieron antes de la administración de STZ (línea base), 72 horas posteriores a la inyección (diagnóstica) y posteriormente dos veces por semana durante el tiempo de vida experimental de los sujetos. Una vez finalizado el tiempo experimental asignado a cada grupo (6 y 12 semanas) se perfundió a los sujetos a través de una punción cardiaca por la cual se clarearon los tejidos con solución salina y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% (Figura 3).

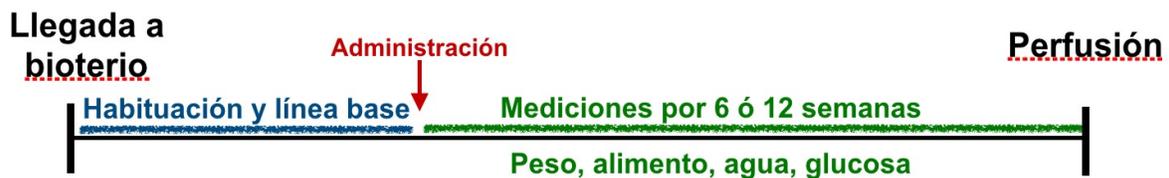


Figura 3. Diseño experimental para estandarización del modelo. Se muestran los momentos de inyección y registro para las variables evaluadas en el modelo de diabetes inducido por STZ.

8.3- RELACIÓN ENTRE ESTRÉS CRÓNICO Y DIABETES

Para la comparación de grupos con y sin estrés en condiciones de normo e hiperglucemia, los sujetos fueron alojados en cajas comunales con 5 sujetos por cada caja habitación.

Se realizó la asignación de sujetos a cada uno de los grupos, la exposición a estrés se realizó posterior a la inducción de la diabetes experimental como se describió anteriormente y las mediciones de peso y glucosa se realizaron durante 6 semanas.

El peso se registró cada 24 horas, mientras que las mediciones de glucosa fueron 4: una línea base, una diagnóstica y posteriormente cada 15 días hasta el día del sacrificio de los animales 6 semanas después del reto (Figura 4).

El estímulo de estrés se presentó a las 72 horas después del reto mediante la batería de estrés crónico impredecible (CUSB), con duración de 10 días, validada por el Laboratorio de Neuropsicofarmacología de la Facultad de Psicología de la UNAM (Rosemberg-García et al, 2013; Ruíz-García et al, 2013; Torres Carrillo,

2016), dicho protocolo cuenta con la aprobación del Comité de Ética para la Investigación de la misma institución (FPSI/422/CEIP/449/2018) (Tabla 1).

CUSB es una serie de 6 estresores aleatorizados a los que se expone a los sujetos durante 10 días. El propósito de la batería es generar estrés crónico y evitar la habituación o predicción de los estímulos estresores durante la exposición de los sujetos.

Día	Estrés
1	Restricción de movimiento 20 min (9:00h; 14:00h; 19:00h).
2	Cama mojada 3h (12:00h); Luces prendidas toda la noche 12h (20:00h).
3	Restricción de movimiento 20 min (9:00h; 14:00h; 19:00h).
4	Cama inclinada 45° 3h (12:00h); Cama mojada toda la noche 12h (20:00h).
5	Agua fría 16°C 5 min (13h); Luces prendidas toda la noche 12h (20:00).
6	Cama mojada 3h (12:00h); Privación de agua toda la noche 12h (20:00h).
7	Restricción de movimiento 20 min (9:00h; 14:00h; 19:00h).
8	Cama inclinada 45° 3h (12:00h); Cama mojada toda la noche 12h (20:00h).
9	Agua fría 16°C 5 min (13h); Luces prendidas toda la noche 12h (20:00).
10	Restricción de movimiento 20 min (9:00h; 14:00h; 19:00h).

Tabla 1. Batería de estrés crónico impredecible (CUSB).

Estresores desarrollados y estandarizados por el Laboratorio de Neuropsicofarmacología de la Facultad de Psicología de la UNAM para CUSB.

Posterior a las 6 semanas del protocolo los sujetos fueron sacrificados por decapitación y se colectó sangre troncal para separar el suero (Figura 4).

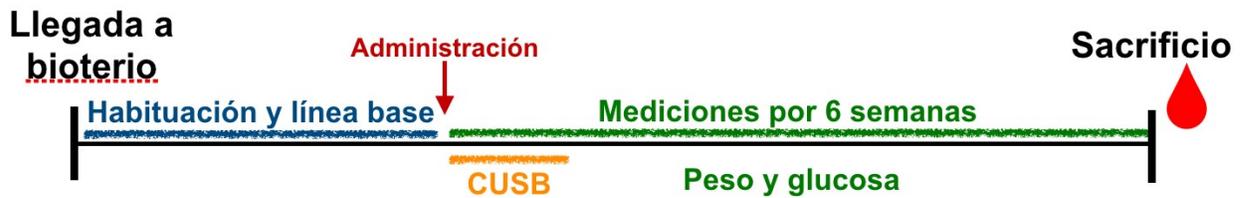


Figura 4. Diseño experimental para evaluar relación entre estrés crónico y diabetes. Se muestran los momentos de inyección, exposición a CUSB y registro para las variables evaluadas.

8.3.1- ANÁLISIS DE MUESTRAS

Posterior al sacrificio, por decapitación rápida, se obtuvo sangre troncal en tubos de 10 ml de los sujetos y se refrigeró a 3°C para su coagulación, una vez coagulada en dichos tubos, la sangre se centrifugó a temperatura ambiente a 1500rpm por 10 minutos y se obtuvo el suero para los análisis de corticosterona y VEGF-A.

Los niveles de corticosterona en suero se analizaron por medio del DetectX® Corticosterone Enzyme Immunoassay kit de Arbor Assays a partir de un volumen de 5 µl de muestra de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los valores que resultaron de las lecturas se analizaron con una función logística de cuatro parámetros.

Se utilizó un inmunoensayo enzimático de sándwich para medición cuantitativa *in vitro* para los niveles de VEGF-A, ELISA Kit for Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) de Cloud-Clone Corp. La medición se hizo a partir de un volumen de 50 µl de muestra siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados de las absorbancias se analizaron con una función logística de 2 parámetros

La selección de las funciones para cada kit de ELISA se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante.

8.3.2- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de las comparaciones entre todos los grupos normoglucémicos, durante la estandarización del modelo, se realizaron con Kruskal-Wallis.

Los análisis de comparación entre 6 y 12 semanas durante la estandarización del modelo y de pesos corporales durante CUSB se hicieron con ANOVA de una vía con la prueba post hoc Tukey. El análisis de los últimos días de vida experimental en la evaluación de la relación estrés-diabetes, se realizó con un ANOVA de una vía con la prueba post hoc Holm-Sidak.

El análisis de los registros de glucosa en la evaluación de la relación estrés-diabetes, se utilizó un ANOVA de dos vías (grupo x momento de medición) con la prueba Tukey como post hoc.

Los datos de las concentraciones de corticosterona y VEGF-A medidos por ELISA se analizaron con un ANOVA de una vía y se realizaron análisis de correlación de Spearman para VEGF, corticosterona, peso corporal de los últimos 15 días de vida y glucosa P1.

9- RESULTADOS

9.1- ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO

Para verificar los efectos de STZ en su dosis diabetogénica se analizaron las variables glucosa en sangre, peso corporal y consumos de agua y alimento (Figura 5).

Los datos de los niveles de glucosa en sangre permiten, de manera indirecta, corroborar el efecto de la STZ sobre las células beta pancreáticas. El incremento de los niveles de glucosa en sangre es donde se observa el principal efecto diabetogénico del tratamiento con STZ (Figura 5A). En la línea base, los sujetos de los cuatro grupos tienen valores similares en esta variable, aproximadamente 100 mg/dL, que son considerados normoglucémicos. Este dato permite sustentar que los cambios posteriores en esta variable son debidos a la manipulación experimental con STZ.

Los sujetos del grupo testigo no recibieron manipulación alguna, por lo que sus niveles de glucosa en sangre se mantienen en valores similares a los de la línea base. En el caso del grupo vehículo se observa que sus valores de glucosa se empalman con los del grupo testigo sustentando la inocuidad del vehículo. Estos

resultados permiten identificar, por una parte que no hay diferencia entre los grupos testigo y vehículo, y en segunda que los valores de glucosa en sangre se mantienen relativamente estables en los sujetos a lo largo del experimento.

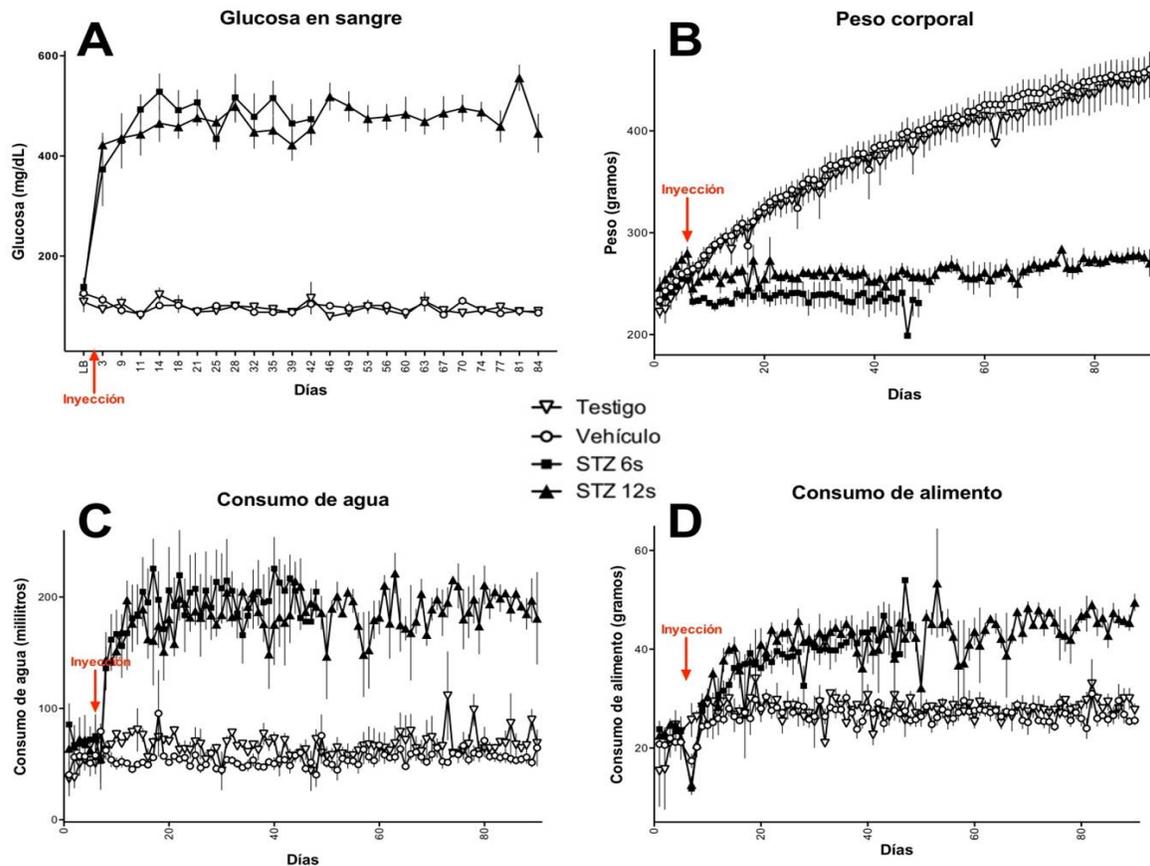


Figura 5. Efectos diabéticos de la estreptozotocina. Se muestran los efectos de la administración de STZ 65 mg/kg o vehículo, indicado con la flecha roja, posterior a la línea base (LB) en las variables de glucosa en sangre (A), peso corporal de los sujetos (B), consumo de agua (C) y consumo de alimento (D). Los datos se expresan como media \pm SEM.

La administración de STZ (65 mg/kg i.p.) indujo un incremento significativo de los niveles de glucosa en sangre como se reporta en la literatura (Wu & Huan, 2008). Los niveles en sangre de estos sujetos hiperglucémicos (400 mg/dL), también se

mantienen relativamente constantes a lo largo del tiempo de registro (6 y 12 semanas).

Debido a que se registró el peso de cada sujeto diariamente, se pudo monitorear el comportamiento de esta variable en el tiempo y observar el efecto de STZ sobre la misma (Figura 5B).

Los registros permiten observar que los sujetos del grupo testigo presentan un incremento de su peso conforme avanza su tiempo de vida. Este resultado era predecible debido a que experimentos que ocupan un amplio intervalo de tiempo contemplan parte del crecimiento de los sujetos experimentales. Por otro lado, también se aprecia que el vehículo administrado no tiene efecto en el peso a lo largo del experimento, pues su función se sobrelapa con la del grupo testigo.

En la gráfica de peso también se indica el día de administración de STZ. Previo a la administración del fármaco, se observa que los sujetos tienen pesos similares y un comportamiento similar de esta variable. Sin embargo, los sujetos tratados con STZ no solo pierden peso, sino que estos valores se mantienen relativamente constantes a lo largo de todo el tiempo de registro. Este dato, en conjunto con las mediciones de glucosa, indica que la hiperglucemia genera una pérdida de peso en los sujetos, y además que estos mismos sujetos no siguen la curva progresiva de incremento en este parámetro como se muestra en el grupo control. Si bien no se midió masa muscular o niveles de grasa corporal, los efectos tan marcados en el peso de los animales sugiere la necesidad de evaluar dichas variables en futuras investigaciones.

En conjunto, los datos de peso corporal permiten validar que la administración de STZ genera el fenotipo característico de la diabetes tipo 1 al hacer uso de las reservas de largo plazo como pueden ser musculares y adiposas.

De igual manera, los registros diarios de consumo de agua y alimento permitieron evaluar el efecto de STZ sobre estas variables a lo largo de todo el protocolo experimental (Figuras 5C y 5D).

En la gráfica se puede observar nuevamente que las funciones de los grupos testigo y vehículo se sobrelapan indicando que la administración del vehículo no tiene efecto. Así mismo, se observa que los valores de línea base son similares

entre los cuatro grupos indicando homogeneidad entre los sujetos. Los grupos hiperglucémicos también guardan similitud entre sus valores de consumo de agua y alimento.

A diferencia de los registros de peso se observó que para las dos condiciones, con y sin STZ, los valores de ingesta de agua y alimento no tienen un incremento progresivo a lo largo del tiempo. Esto indica que dichos parámetros se mantienen relativamente estables a lo largo de la vida experimental de los sujetos.

Para el registro de consumo de agua se observa que los sujetos con hiperglucemia tienden a incrementar de manera significativa su consumo de líquido estableciéndose alrededor de los 200 mL diarios, mientras que los normoglucémicos se mantienen alrededor de los 50 mL diarios. Este resultado coincide con la polidipsia presente en la diabetes.

Respecto al consumo de alimento se obtuvieron valores notablemente mayores en los sujetos hiperglucémicos, alrededor de los 40 g diarios, comparados con los normoglucémicos que consumían menos de 30 g de alimento al día. Estos datos corresponden con la polifagia observada en los pacientes con diabetes tipo 1.

Con estos resultados, se muestra que los cambios en las variables registradas sistemáticamente (peso, consumo de agua y alimento) se deben a un incremento de los niveles de glucosa en sangre. Por esta razón se compararon los registros en las mismas variables entre los sujetos normoglucémicos correspondientes a los grupos testigo, vehículo y sujetos que no respondieron al tratamiento con STZ (Figura 6). Debido a que los datos de los sujetos no responsivos a STZ se circunscriben a 6 semanas, los análisis que se presentan no consideran el periodo de 12 semanas. Sin embargo, los registros anteriores muestran que los valores de los grupos testigo y vehículo se empalman también hacia el final de las 12 semanas. Los análisis estadísticos para estas comparaciones se realizaron con una prueba de Kruskal-Wallis. Debido a que el peso tiende a incrementarse con el paso del tiempo, solamente se consideraron los últimos cinco días de registro del periodo de 6 semanas.

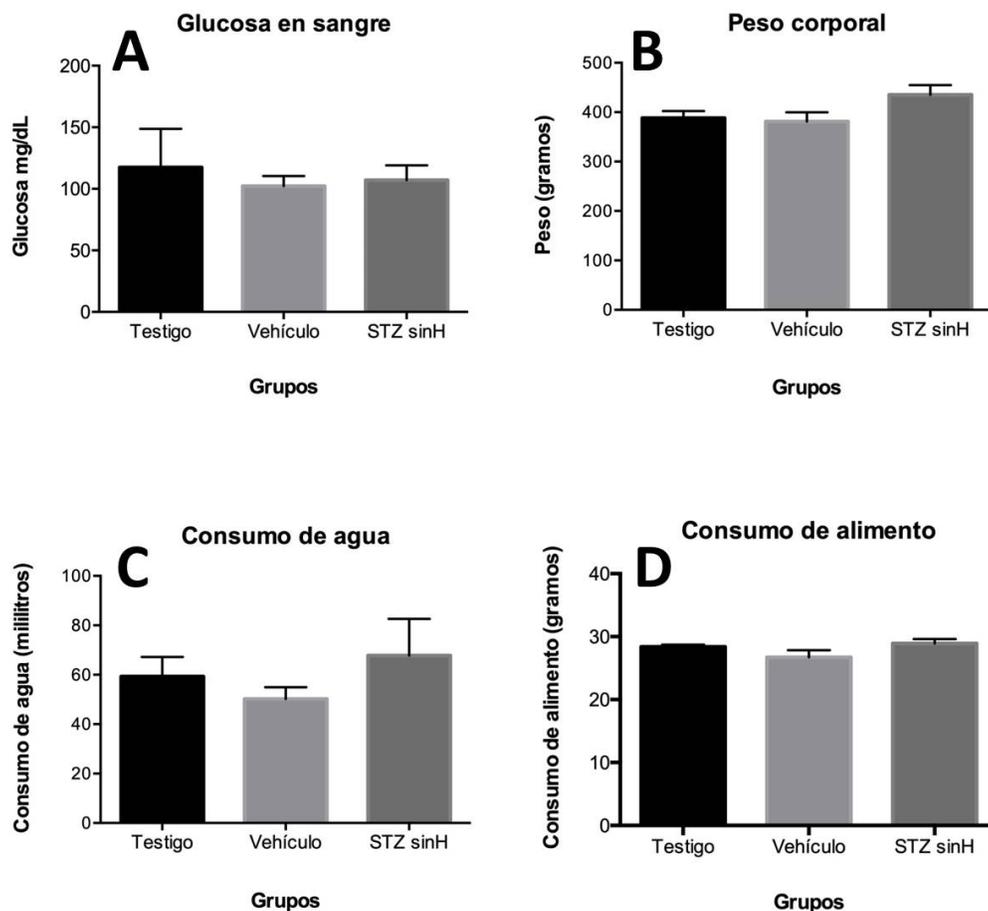


Figura 6. Comparación entre grupos normoglucémicos. Se presentan los valores para las variables glucosa (A), peso corporal (B), consumo de agua (C) y consumo de alimento (D) en los grupos testigo, vehículo y STZ sin hiperglucemia. Los datos se expresan como media \pm SEM no se obtuvieron diferencias estadísticas $p > 0.05$.

La gráfica de los niveles de glucosa en sangre, en los tres grupos, muestra que los sujetos tenían niveles glucémicos similares (alrededor de los 100 mg/dL). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($H=0.3130$ $p > 0.05$ $df=2$). Esto corrobora en primera instancia que el vehículo y el testigo realmente son similares entre sí, y en segunda demuestra que los sujetos que son tratados con la dosis diabotogénica de STZ 65 mg/kg y no responden al tratamiento tienen niveles de glucosa similares a los sujetos que nunca fueron expuestos al fármaco.

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos en las variables de peso corporal ($H=3.385$ $p>0.05$ $df=2$), consumo de agua ($H=0.9412$ $p>0.05$ $df=2$) y consumo de alimento ($H=1.153$ $p>0.05$ $df=2$).

La ausencia de diferencias significativas en los tres grupos normoglucémicos sugiere que los niveles de glucosa en sangre son los responsables de los efectos en las variables de peso corporal y consumos de agua y alimento.

Los resultados de la comparación entre grupos normoglucémicos permitió establecer al grupo vehículo como el grupo control contra el cual se realizaron las comparaciones de los valores de los grupos con hiperglucemia.

Debido a que los grupos hiperglucémicos se separaron en ventanas de tiempo de 6 y 12 semanas, las gráficas que se presentan a continuación toman en cuenta los registros del grupo vehículo para las mismas 6 y 12 semanas (Figura 7). Para analizar las diferencias entre grupos, en estas comparaciones se utilizó un ANOVA de una vía con un análisis post hoc con la prueba de Tukey.

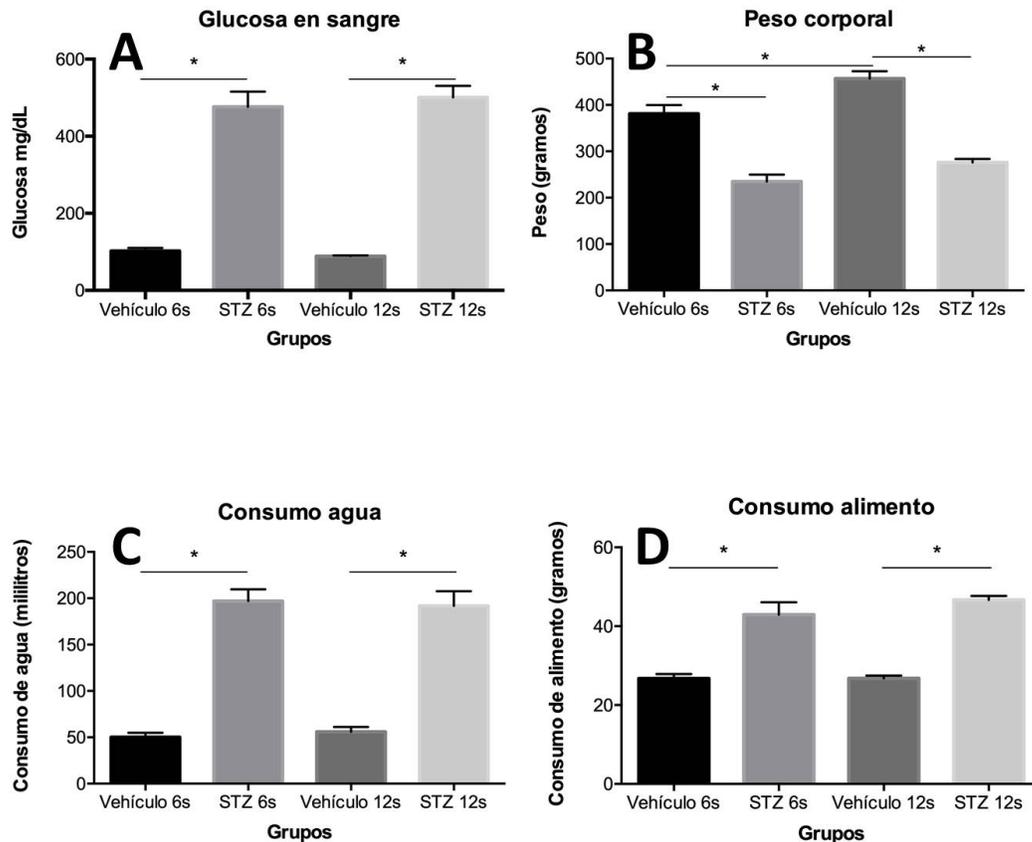


Figura 7. Análisis de variables a 6 y 12 semanas. Se presentan las comparaciones entre los grupos hiperglucémicos y los sujetos vehículo para evaluar la estabilidad de los efectos en el tiempo a 6 y 12 semanas sobre las variables glucosa (A), peso corporal (B), consumo de agua (C) y consumo de alimento (D). Los datos se expresan como media \pm SEM, las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre grupos se indican con asterisco (*).

De acuerdo con los resultados anteriores, los valores de glucosa en sangre son más altos en los sujetos tratados con STZ que los sujetos control. El ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas en esta variable ($F(3,16)=81.35$ $p < 0.05$), el análisis post hoc Tukey ($p < 0.05$) permitió identificar las diferencias entre los grupos vehículo y STZ para cada una de las condiciones. No se encontraron diferencias en glucosa entre los grupos vehículo ni entre los grupos

STZ. Estos resultados dan valor estadístico a la observación de los registros regulares de glucosa que se mantienen constantes a lo largo del tiempo de vida experimental de los sujetos normoglucémicos e hiperglucémicos (Figura 5A).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones del peso corporal de los sujetos ($F(3,16)=46.90$ $p<0.05$); el análisis post hoc Tukey ($p<0.05$) mostró que las diferencias se encontraban entre los sujetos normoglucémicos y los hiperglucémicos tanto para 6 como para 12 semanas. En este parámetro se observan también diferencias entre las mediciones de los sujetos vehículo a 6 y 12 semanas, sin embargo, estas diferencias no se encontraron entre los sujetos con STZ. Estos resultados refieren a los registros diarios de peso en donde los sujetos normoglucémicos presentan un incremento progresivo en el peso corporal mientras que los sujetos hiperglucémicos tienen un peso más bajo y una ganancia de peso corporal disminuida (Figura 5B).

De manera similar a los niveles de glucosa en sangre, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para las variables de consumo de agua ($F(3,16)=58.13$ $p<0.05$) y consumo de alimento ($F(3,16)=34.98$ $p<0.05$), en ambos casos, el análisis post hoc Tukey ($p<0.05$) reveló que las diferencias se encuentran entre los grupos vehículo y los grupos STZ, tanto a las 6 como a las 12 semanas. No se observaron diferencias entre 6 y 12 semanas para ambos grupos hiperglucémicos y tampoco para los grupos normoglucémicos.

Estos resultados en conjunto permiten afirmar que, en términos de las variables analizadas, no hay diferencias entre los periodos de 6 y 12 semanas posteriores a la administración de STZ mostrando estabilidad en los efectos del fármaco en el tiempo. Considerando estas observaciones, la relación entre estrés crónico y diabetes se monitoreó a las 6 semanas.

9.2- RELACIÓN ENTRE ESTRÉS CRÓNICO Y DIABETES

Una vez estandarizado el modelo, se prosiguió a la evaluación de la relación entre estrés crónico y diabetes. Debido a que los sujetos se alojaron grupalmente para la evaluación de estrés, no se tomaron registros de consumo de agua y alimento. Se presentan los datos de los registros de peso colectados cada 24 horas y las cuatro mediciones de glucosa correspondientes a la línea base, diagnóstica y dos de seguimiento posteriores al reto. De las dos mediciones de seguimiento, la primera se dio 5 días tras finalizar CUSB (para los grupos estrés) o los días correspondientes para los grupos sin estrés, esta medición se denominó P1. La segunda medición de seguimiento fue 10 días previos al sacrificio de los sujetos y se denominó P2. Finalmente se presentan las mediciones de concentración de corticosterona y VEGF-A en suero de los sujetos al concluir la semana 6 de experimento.

Del registro diario de peso corporal se presenta una gráfica progresiva de esta variable, similar a las presentadas en la validación del modelo (Figura 8).

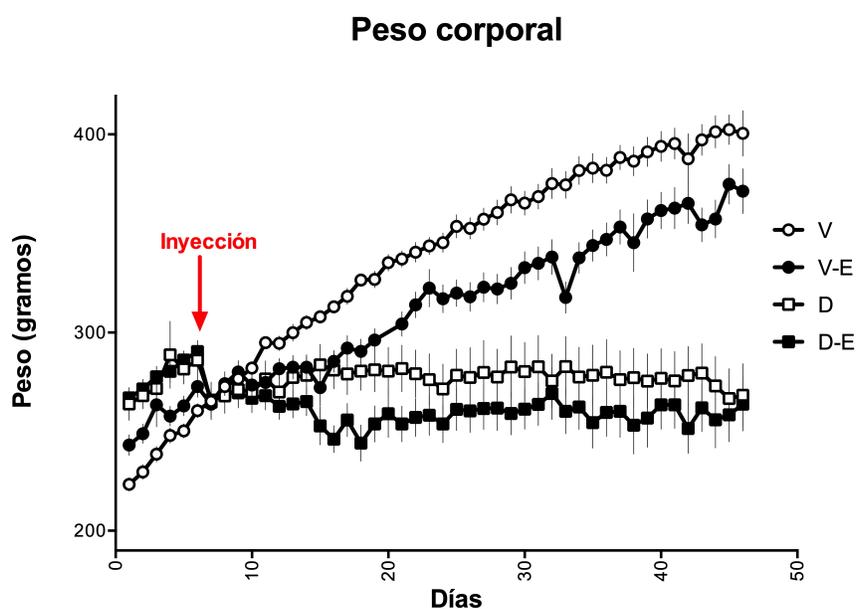


Figura 8. Peso corporal en grupos hiper y normoglucémicos con y sin estrés. Se presentan los datos del registro diario de peso durante las seis semanas de experimento. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Sobre la ganancia de peso se puede apreciar que, para los sujetos de los grupos vehículo, hay un incremento progresivo en el peso corporal. Se observa que en el caso de los sujetos hiperglucémicos de los dos grupos diabetes, al igual que en la validación del modelo, se tienen valores menores que los sujetos normoglucémicos.

Debido a que en la gráfica de ganancia de peso se aprecia un decremento de esta durante los días de exposición a estrés, se corrió una regresión lineal a los valores de peso durante CUSB para todos los grupos para hacer evidente el comportamiento de los datos en esta manipulación (Figura 9).

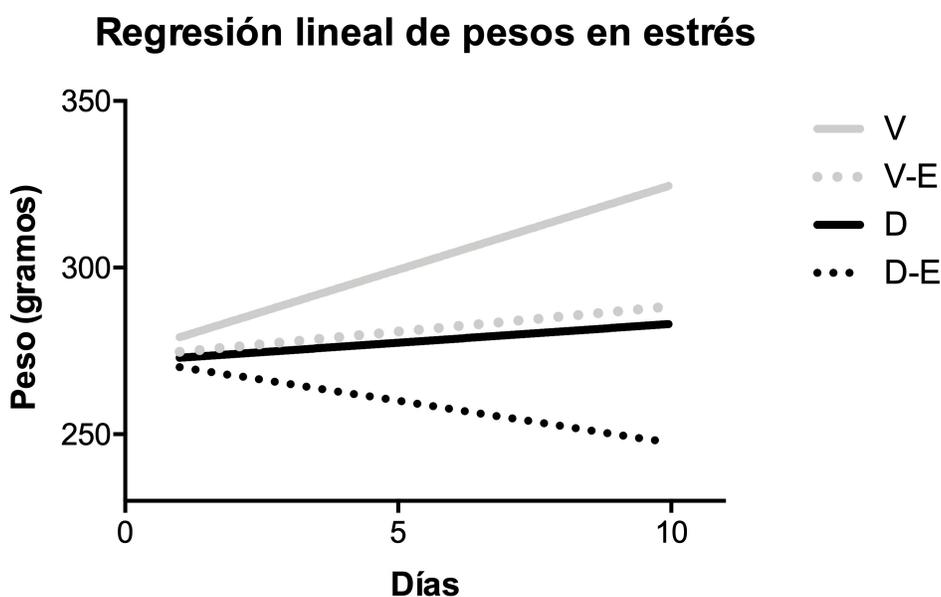


Figura 9. Regresión lineal del peso corporal en CUSB. Se muestran las funciones de las regresiones lineales aplicadas al desarrollo del peso corporal durante los 10 días de CUSB.

Las funciones de regresión lineal confirman que los sujetos V tienden a incrementar su peso corporal presentando una pendiente de 4.993 ± 0.2744 . Sin embargo, los sujetos V-E muestran un peso menor con una pendiente de 1.512 ± 0.5802 . Este resultado indica que los sujetos expuestos a CUSB presentan una disminución en la ganancia de peso. Por su parte, los sujetos hiperglucémicos tienen pesos menores; se observa que los sujetos D tienden a incrementar ligeramente su peso corporal (pendiente de 1.047 ± 0.2945). No obstante, los

sujetos D-E muestran un decremento evidente de la ganancia de peso corporal durante la exposición a estrés, teniendo una pendiente negativa de -2.527 ± 0.7316 lo que indica que no solamente tienen pesos menores sino que tienden a disminuirlo durante la exposición a CUSB.

Debido a los datos observables en las funciones de regresión lineal, se procedió a comparar los valores de peso corporal durante la segunda mitad exposición a CUSB (Figura 10).

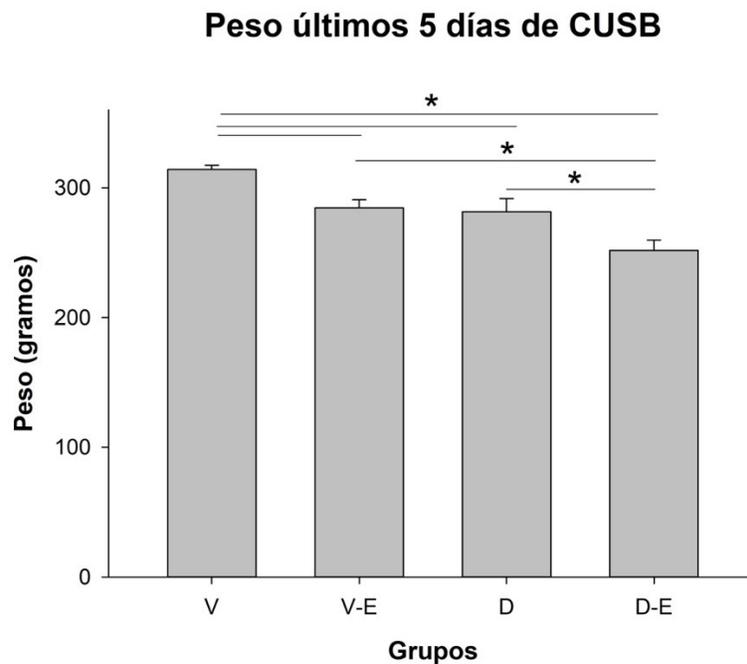


Figura 10. Peso corporal en CUSB. Gráfica de la comparación entre los grupos normo e hiperglucémicos con y sin estrés durante los últimos 5 días de CUSB. Los datos se expresan como media \pm SEM, las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre grupos se indican con asterisco (*).

Los datos de esta comparación se analizaron con ANOVA de una vía obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($F(3, 35) = 12.048$ $p < 0.05$). Se utilizó la prueba post hoc Tukey ($p < 0.05$) que mostró diferencias entre el grupo vehículo y los dos grupos con hiperglucemia, esto de acuerdo con los datos previos. El grupo V-E presenta un decremento significativo del peso corporal con respecto al grupo V dando valor estadístico a las observaciones que se hicieron en las gráficas

anteriores. De manera similar, existe un decremento significativo en el peso corporal del grupo D-E comparado contra el grupo D. De esta observación se concluye que el estrés afecta el peso de los sujetos con y sin diabetes inducida.

A diferencia de las observaciones realizadas durante la estandarización del modelo, en este caso no se encontraron diferencias entre los pesos de los sujetos de los grupos V-E y D durante CUSB. Esto no coincide con lo reportado hasta el momento en el presente trabajo, ya que los sujetos V-E son normoglucémicos y los datos indicaban que los efectos en la disminución del peso corporal aparentemente se debían a los altos niveles de glucosa en sangre.

Debido a que en la gráfica de ganancia progresiva de peso (Figura 8) se observó que los sujetos expuestos a estrés no compensan su peso corporal, se realizó una comparación del peso de los últimos 15 días experimentales (Figura 11).

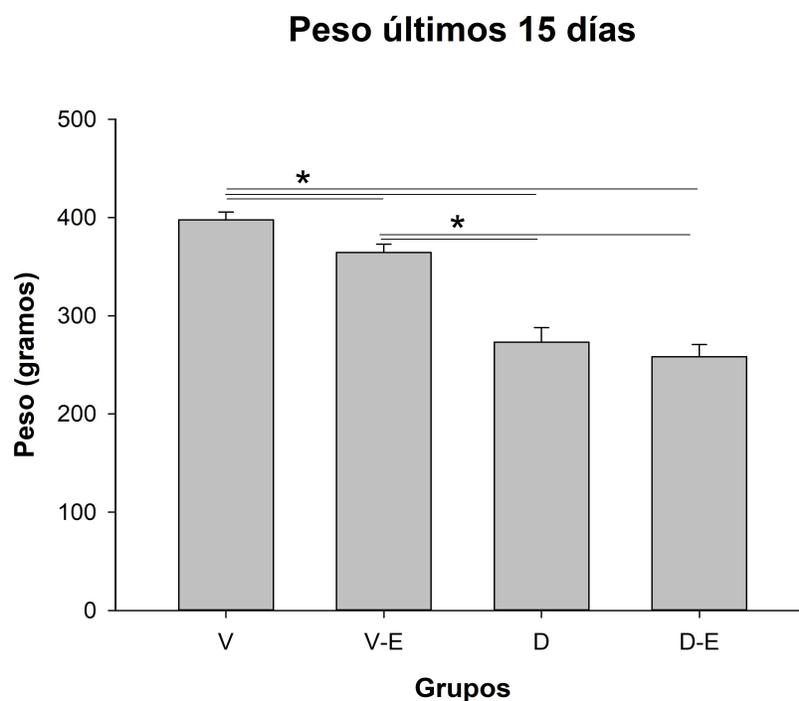


Figura 11. Peso final en protocolo estrés. Se presentan los valores de peso corporal en los últimos 15 días de vida experimental de los sujetos normo e hiperglucémicos con y sin estrés. Los datos se expresan como media \pm SEM, las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre grupos se indican con asterisco (*).

Para el análisis de estos datos se utilizó un ANOVA de una vía que arrojó diferencias estadísticamente significativas ($F(3,35)=21.024$ $p<0.05$). Como prueba post hoc se utilizó Holm-Sidak que mostró diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre los dos grupos vehículo versus los dos grupos diabetes. Para los grupos de D y D-E no se observan diferencias estadísticamente significativas, como en el caso de CUSB ya que ambos grupos muestran pesos similares. Sin embargo, el peso del grupo V-E es significativamente menor que el del grupo V. La diferencia sostenida de peso entre los grupos diabetes y vehículo van de acuerdo con los datos reportados durante la estandarización del modelo.

Esto sugiere que, si bien hay una recuperación del peso corporal posterior al estrés, en el caso de los sujetos normoglucémicos esta recuperación no es suficiente pues los sujetos expuestos a estrés conservan pesos menores a lo largo del registro. Esto podría estar relacionado con una ingesta disminuida de alimento que podría derivar a su vez el uso de almacenes de energía a largo plazo como grasa y músculo, sin embargo, en este experimento no se cuantificó el consumo de alimento.

Debido a que, en la estandarización del modelo, se determinó que los niveles de glucosa se mantienen relativamente estables a lo largo de la vida experimental de los sujetos, se realizaron solamente dos medidas de glucosa posteriores al diagnóstico de la hiperglucemia (P1 y P2). Los datos se graficaron como variable continua (Figura 12).

Glucosa en sangre

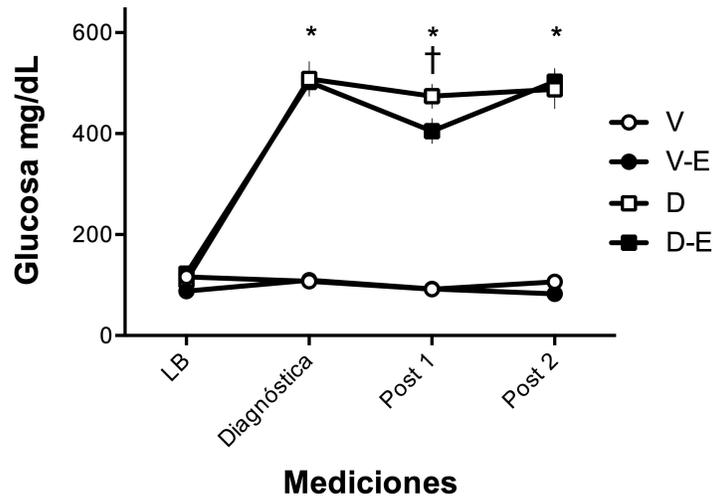


Figura 12. Glucosa en sangre en protocolo estrés. Se presentan los valores de glucosa en sangre de las mediciones realizadas a lo largo del experimento. Los datos se expresan como media \pm SEM. Con asterisco (*) se muestran las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los grupos vehículo (V y V-E) contra los grupos diabetes (D y D-E). Con cruz (†) se marcan las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre el grupo D y el grupo D-E.

Debido a la naturaleza de los datos, para el análisis se utilizó un ANOVA de dos vías (grupo x momento de medición) con la prueba Tukey como post hoc. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los factores medición ($F(3,96)=113$ $p < 0.05$), grupo ($F(3,32)=113$ $p < 0.05$) y en la interacción de ambos ($F(9,96)=39.40$ $p < 0.05$). La prueba de Tukey mostró que en la línea base no hay diferencias entre los grupos, sin embargo, desde la medición diagnóstica hasta P1 y P2 los grupos D y D-E son significativamente más altos en sus valores de glucosa en sangre que ambos grupos vehículo. Pese a que los grupos con diabetes tienen niveles elevados de glucosa, en la medición P1, los sujetos D-E tienen niveles de glucosa significativamente más bajos que el grupo D. Esa diferencia entre los grupos hiperglucémicos desaparece hacia el final del

experimento en P2, un comportamiento similar al peso corporal en los mismos grupos.

A partir de los valores arrojados por el ajuste a la función 4PLC (Figura 11.2.1 en Apéndice 11.2), se calcularon los niveles de corticosterona al despejar x de la función (Figura 13). Para las gráficas y el análisis, los resultados del despeje se multiplicaron por el factor de disolución que en este caso fue de 100.

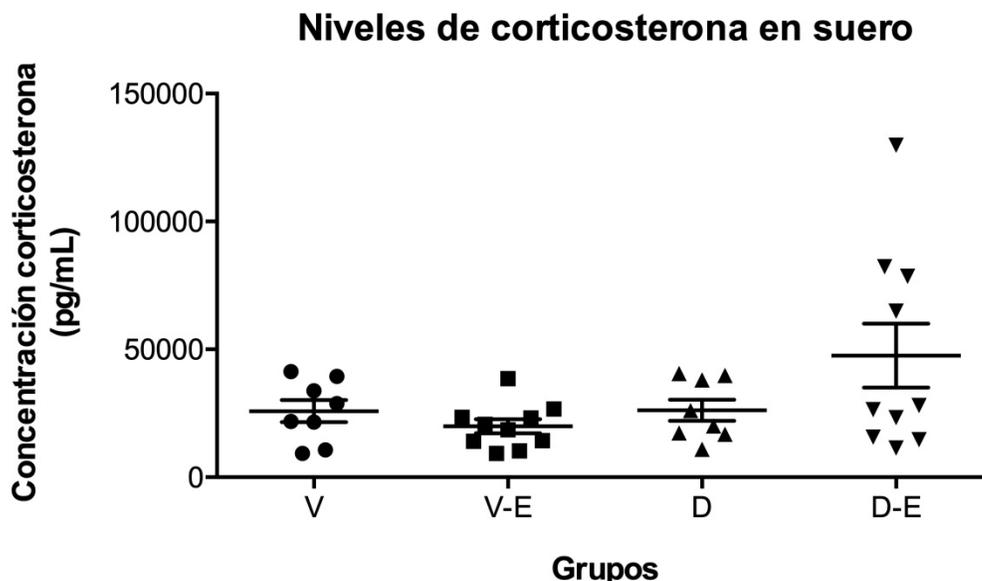


Figura 13. Concentración de corticosterona. Se presentan los valores de la concentración de corticosterona en los grupos normo e hiperglucémicos con y sin estrés. Los datos se expresan como media \pm SEM no se obtuvieron diferencias estadísticas $p > 0.05$

Los datos de las concentraciones de corticosterona se analizaron con un ANOVA de una vía y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($F(3,32)=2.767$ $p > 0.05$). En la gráfica se observa que los grupos V, V-E y D tienen dispersiones de datos notablemente homogéneas por lo que no se esperarían diferencias significativas. Sin embargo, es claro que hay una gran variabilidad en los datos del grupo D-E. Estos resultados sugieren que el estrés en la condición de hiperglucemia afecta selectivamente a los sujetos a largo plazo considerando que estas mediciones ocurrieron 6 semanas después de la administración de STZ.

A partir de los valores obtenidos por el ajuste de las absorbancias a la función de dos parámetros (Figura 11.2.2 en Apéndice 11.2), se calcularon los niveles de VEGF-A al despejar x de la función (Figura 14).

Niveles finales de VEGF-A

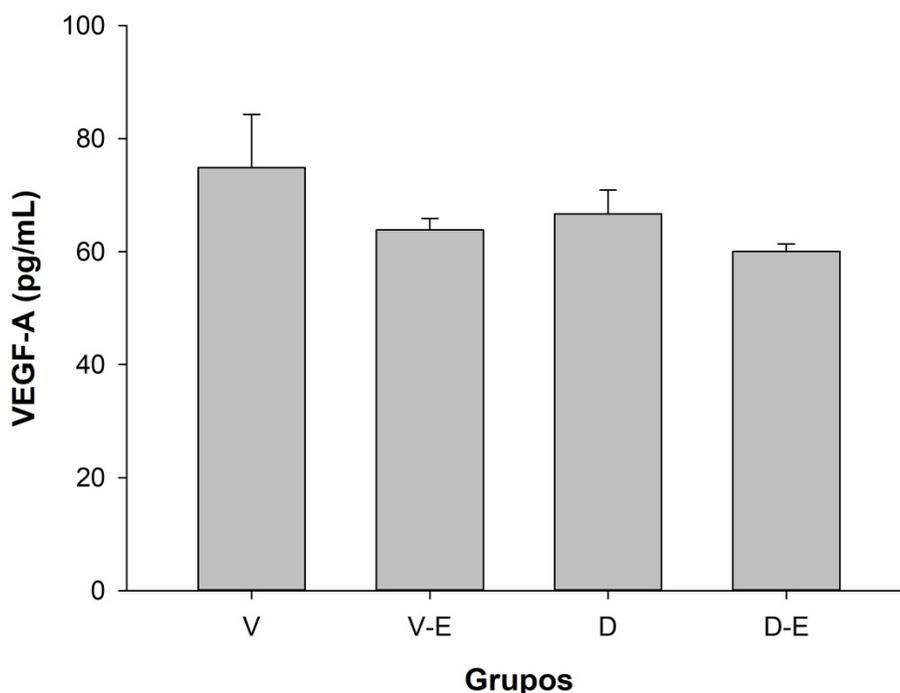


Figura 14. Concentración de VEGF-A. Gráfica de las concentraciones de VEGF-A en los grupos normo e hiperglucémicos con y sin estrés. Los datos se expresan como media \pm SEM no se obtuvieron diferencias estadísticas $p > 0.05$

Los valores de las concentraciones de VEGF-A se analizaron con un ANOVA de una vía y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($F(3,32)=2.767$ $p > 0.05$). Se puede apreciar que no existe una diferencia considerable entre los grupos.

Las correlaciones de Spearman fueron significativas solamente para el caso VEGF-corticosterona ($r_s = -0.537$ $p < 0.05$) y glucosa P1-Peso final ($r_s = -0.666$ $p < 0.05$).

10- DISCUSIÓN

El modelo murino de diabetes tipo 1 por administración de STZ estandarizado en este protocolo provoca hiperglucemia en la mayoría de los sujetos experimentales, de acuerdo al modelo reportado por Wu & Huan (2008).

La ausencia de diferencias en las comparaciones entre los grupos normoglucémicos, testigo, vehículo y STZ sin hiperglucemia, demuestran que los cambios vistos en peso corporal, consumo de agua, consumo de alimento y poliuria se deben a los incrementos significativos en los niveles de glucosa en sangre. Dentro de este argumento, se observó que los sujetos tratados con STZ (hiperglucémicos), incrementan su consumo de agua (polidipsia) y alimento (polifagia), similar al incremento en los pacientes con diabetes. Los mismos sujetos hiperglucémicos presentan poliuria (alta producción y excreción de orina); a pesar de que en este estudio no se cuantificaron los niveles de orina, el aserrín de las cajas habitación en donde se encontraban estos sujetos debía cambiarse diariamente por el exceso de orina. El incremento en el consumo de alimento en estos sujetos contrasta con el decremento significativo de peso corporal, lo cual puede atribuirse a una falta de aprovechamiento de glucosa por la deficiencia de insulina que conlleva a una utilización de tejido adiposo y muscular y se refleja en pérdida de peso corporal. Sin embargo, estas observaciones no pueden sustentarse con los registros realizados en la presente investigación. Dentro de las medidas realizadas, la más relevante para fines del estudio fueron los niveles elevados de glucosa que se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo en los sujetos que respondieron al reto de STZ.

Debido a que los efectos observados entre los grupos de 6 y 12 semanas no mostraron diferencias, a excepción del peso, las evaluaciones subsecuentes en la relación entre estrés y diabetes, se realizaron durante 6 semanas de registro. Esto representa una ventaja desde el punto de vista ético ya que al no proporcionar tratamiento para compensar el deterioro inducido por la hiperglucemia, la reducción en el tiempo experimental garantiza la integridad de los sujetos a lo largo del protocolo.

Se observaron efectos de la manipulación por estrés crónico en las variables de peso y glucosa. Se determinó que CUSB reduce significativamente el peso corporal durante la exposición de todos los sujetos con y sin diabetes; pese a que existe una recuperación fisiológica en esta variable, no es suficiente en el caso de los sujetos normoglucémicos estresados (V-E), ya que mantienen los niveles de peso significativamente más bajos que los normoglucémicos sin estrés (V) hacia el final del experimento. En el caso de la glucosa, todos los sujetos diabéticos tuvieron niveles más altos que los sujetos vehículo, sin embargo, en la medición cercana a CUSB (P1) los sujetos D-E tuvieron valores más bajos que los D. En la evaluación de correlación entre glucosa y peso corporal, la correlación negativa estadísticamente significativa entre variables, permitió corroborar los datos de la estandarización del modelo en la que la hiperglucemia induce baja de peso.

Sobre el efecto del estrés en el peso corporal, estudios previos han descrito que el estrés crónico disminuye el valor de esta variable (Guo et al, 2018; Marin et al, 2007) de manera que puede considerarse un indicador de la efectividad del estrés crónico variable (Vares et al, 2018). En este contexto, los resultados del presente trabajo, en peso corporal, replican lo descrito en la literatura que ha sido explicado principalmente por un decremento en la ingesta de alimento (Martí et al, 1994). No obstante, la anorexia inducida por estrés no puede verificarse con los parámetros de la presente investigación debido a que no se cuantificó la ingesta de alimento a excepción de la estandarización del modelo. A pesar de que la privación de agua también provoca reducción de consumo de alimento y peso corporal, en el presente trabajo solamente hay un periodo de 12 horas de privación de agua y el efecto de baja de peso corporal se mantiene semanas después de ello, por lo que no podríamos explicar los cambios en esta variable por dicha manipulación, así mismo, la exposición a estresores que no incluyen privación de agua también decrementan el peso corporal y la ingesta de alimento (Martí et al, 1994). No obstante, será importante considerar en futuras investigaciones las mediciones de ingesta de alimento, ingesta de agua y medición de glucosa durante la exposición a estrés para mejorar los argumentos a favor de este planteamiento.

Lo descrito hasta el momento, confirma el valor de demanda y movilización de recursos energéticos que representa el estrés en el organismo. Pese a que todos los sujetos expuestos a estrés (normoglucémicos e hiperglucémicos) decrementaron su peso corporal y que esta diferencia se mantuvo en los sujetos normoglucémicos, la ausencia de resultados significativos en peso final de los sujetos diabéticos puede responder al marcado deterioro que presentan los sujetos en estas condiciones; considerando la gráfica de ganancia de peso (Figura 8), se observa que las ratas con hiperglucemia tienen pesos más bajos, y la ganancia de peso a lo largo de las seis semanas es prácticamente nula. Así mismo, la ausencia de efectos de CUSB en la glucosa de los sujetos vehículo sugiere que los efectos del estrés ocurren en función de las condiciones fisiológicas del organismo. Esta observación cobra relevancia debido a que en este trabajo se propone que algunas variables involucradas en el cuadro de la diabetes pueden ser moduladas por el estrés.

La recuperación de peso corporal que se da hacia el final del experimento puede indicar una regulación por parte del sistema de aprovechamiento de recursos energéticos. Sin embargo, esto no permite obviar que haya alteraciones metabólicas (peso y glucosa) y endocrinas (corticosterona) inducidas por CUSB que se mantienen a largo plazo en los sujetos expuestos. Esta conclusión resulta del bajo peso que se observa en los sujetos V-E, el cambio en glucosa del grupo D y la variación en los niveles sistémicos de corticosterona séricos del grupo D-E.

Es importante reiterar que las mediciones de corticosterona se realizaron 6 semanas después de la inducción de diabetes, por lo que los efectos que se observan en los resultados son producto tanto de la interacción de la diabetes como del estrés crónico. Previamente se ha descrito que CUSB modifica los niveles de corticosterona en suero (Torres Carrillo, 2019), sin embargo, los resultados de los sujetos V-E muestran que estas modificaciones no se observan semanas después de la exposición a CUSB. Esto es predecible de acuerdo a los mecanismos de retroalimentación negativa del eje HPA, por lo tanto, el incremento en la variabilidad del grupo D-E puede indicar que existe una alteración sostenida

de los mecanismos de regulación del eje HPA en los sujetos hiperglucémicos que fueron expuestos a la batería de estrés.

El análisis de corticosterona mostró un incremento notable en la variabilidad de su concentración en los sujetos D-E, destacando de la alta homogeneidad en los otros grupos. Los niveles sistémicos de corticosterona en suero no muestran cambios en los sujetos V-E, V y D lo cual se contrapone a investigaciones previas en las que sujetos hiperglucémicos muestran niveles altos de corticosterona por alteraciones en el eje HPA (Erickson et al, 2017). Sin embargo, se ha reportado también que hay resultados contrapuestos en las mediciones de CORT en pacientes con diabetes (Joseph & Golden, 2017). La discrepancia de estos resultados puede explicarse en el contexto de que el deterioro del eje HPA, y sus sistemas de retroalimentación, no necesariamente se expresan directamente en los niveles de CORT; es posible que la alteración en los niveles de CORT se circunscriba a un momento de alto deterioro de los pacientes, momento que generalmente ocurre al pasar más tiempo con diabetes, y que sea esa la razón por la que se observan altos niveles de CORT en modelos animales con largos periodos de registro (Erickson et al, 2017). En esta perspectiva, es probable que exista un punto donde el efecto endocrino es evidente en CORT, sin embargo, la variabilidad del grupo D-E y los resultados contrapuestos apuntan a que el progreso de dicho deterioro puede modularse por algunos factores que interactúen con el eje como el estrés. De esta manera, los grupos diabetes y diabetes estrés podrían considerarse dos momentos en la alteración endocrina de la diabetes donde el estrés promueve una afectación de la retroalimentación negativa del eje facilitando el incremento de corticosterona. De esta manera puede explicarse que más de un sujeto presente niveles altos de corticosterona con respecto a los demás sujetos. Para corroborar esta hipótesis será importante considerar la medición continua de corticosterona, así como el seguimiento de otros elementos del eje HPA, como el mismo hipocampo, que se ha visto que se encuentra afectado en condiciones de estrés y que representa un elemento importante en la retroalimentación negativa del eje (Joëls et al, 2004).

Finalmente, se planteaba que los niveles de VEGF-A podrían proporcionar un indicador del deterioro en los sujetos sobretodo al considerar que las complicaciones crónicas se relacionan con la micro y macrovasculatura, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los sujetos diabéticos. Esto puede implicar que el estrés no tiene efecto en la progresión de las complicaciones médicas derivadas de la diabetes, pero también pueden responder a que las mediciones fueron sistémicas y se ha descrito una variación tejido específica de los niveles de VEGF-A (Nowacka-Chmielewska et al, 2017). De esta manera será importante contemplar en futuros estudios la evaluación de otros indicadores de deterioro así como la medición selectiva de VEGF-A en regiones específicas como retina e hipocampo. Sin embargo, la correlación negativa encontrada entre corticosterona y VEGF, sugiere que puede haber relación entre la desregulación endócrina y algunas complicaciones relacionadas a la vasculatura, no obstante, debido a la expresión tejido-específica del VEGF, es necesario explorar puntualmente esta relación.

10- CONCLUSIÓN

Se logró la estandarización del modelo de diabetes tipo 1 por administración de estreptozotocina a partir de la reproducción de los principales síntomas de la enfermedad que incluyen hiperglucemia, bajo peso corporal, polidipsia, polifagia y poliuria. Estas características refuerzan el carácter del modelo como una herramienta útil para el estudio de los efectos de la diabetes tipo 1 en animales no humanos.

La importancia de considerar al estrés dentro de los modelos experimentales de diabetes, resulta crítica ya que, hasta ahora, dichos modelos no incorporan variables cotidianas que aparecen durante el desarrollo de la enfermedad y pueden llegar a modularla. En esta perspectiva el estudio del estrés favorecería el desarrollo de estrategias de prevención más integrales y la consideración de otros factores de riesgo en el desarrollo de complicaciones médicas derivadas de la diabetes.

Se ha reportado que el estrés impacta en la salud de los pacientes con diabetes lo que puede explicarse en dos niveles: las conductas de autocuidado y los efectos fisiológicos del estrés. Debido a que las ratas en el presente estudio no tienen tratamiento preventivo o correctivo para los efectos de la hiperglucemia, los hallazgos de esta investigación permiten separar el efecto de las conductas de autocuidado y reforzar el papel del estrés como un regulador importante de algunas de las alteraciones observadas en la diabetes tipo 1. Sin embargo, la ausencia de resultados estadísticamente significativos en corticosterona y VEGF-A obligan a ser cuidadosos con esta última aseveración. No obstante, el efecto del estrés en las variables de peso, glucosa y en la variabilidad de corticosterona permiten que más que negar un efecto de CUSB se apunte a una falla en la selección de los indicadores y en la regularidad de las mediciones de los mismos.

REFERENCIAS

Al-awar, A., Kupai, K., Veszeka, M., Szucs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., Pósa, A. & Varga, C. (2016). Experimental diabetes mellitus in different animal models. *Journal of Diabetes Research* 2016(3):1-12. DOI: 10.1155/2016/9051426

American Diabetes Association. (2018) 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 41(Suppl. 1):S13–S27.

Anagnostis, P., Athyros, V.G., Tziomalos, K., Karagiannis, A. & Mikhailidis, D.P. (2009). The Pathogenetic Role of Cortisol in the Metabolic Syndrome: A Hypothesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94(8): 2692–2701, <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0370>

Bilbo, S., & Schwarz, J. (2012). The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology* 33(3), 267–286.

Brundeln M., Kappelle L.J. & Biessels G.J. (2014). Brain imaging in type 2 diabetes. *European Neuropsychopharmacology* 24:1967-1981.

Cases, A. (2002). Enfermedad macro y microvascular en la diabetes mellitus tipo 2. *Nefrología* 22(5): 406-411.

Chiodini I., Adda, G., Scillitani, A., Coletti, F., Morelli, V., Di Lembo, S., Epaminonda, P., Masserini, B., Beck-Peccoz B., Orsi, E., Ambrosi B. & Arosio, M. (2007) Cortisol Secretion in Patients With Type 2 Diabetes, Relationship with chronic complications. *Diabetes Care* Jan; 30(1): 83-88. <https://doi.org/10.2337/dc06-1267>

Clapp C., Aranda J., González C., Jeziorski M.C. & Martínez de la Escalera G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 17(8):301-307.

Dedovic, K., Duchesne, A., Andrews, J., Engert, V., & Pruessner, J. (2009). The brain and the stress axis: The neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *NeuroImage* 47(3), 864–871.

Deguchi, T., Hashiguchi, T., Horinouchi, S., Uto, T., Oku, H., Kimura, K., Makisumi, K. & Arimura, K. (2009). Serum VEGF increases in diabetic polyneuropathy, particularly in the neurologically active symptomatic stage. *Diabetic Medicine* 26: 247–252.

de la Monte, S.M. (2014). Relationships between diabetes and cognitive impairment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 43(1):245-67. doi: 10.1016/j.ecl.2013.09.006

Dods R.F. (2013). *Understanding Diabetes, A Biochemical Perspective*. John Wiley & Sons, Inc.

Erickson, R.L., Browne, C.A. & Lucki, I. (2017). Hair corticosterone measurement in mouse models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Physiology & Behavior* 178(1): 166-171

Faron-Górecka A., Kúsmider M., Kolasa M., Zúrawek D., Gruca P., Papp M., Szafran K., Solich J., Pabian P., Romańskab I., Antkiewicz-Michaluk L. & Dziejzicka-Wasylewsk M. (2014). Prolactin and its receptors in the chronic mild stress rat model of depression. *Brain Research* 1555 48–59

Faron-Górecka A., Kúsmider M., Szafran-Pilch K., Kolasa M., Zúrawek D., Gruca P., Papp M., Solich J., Pabian P., Dziejzicka-Wasylewsk M. (2017). Basal prolactin levels in rat plasma correlates with response to antidepressant treatment in animal model of depression. *Neuroscience Letters* 647 147-152.

Ferrara, N., Gerber, H.P. & LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9:669–676.

Fink, G. (2007). Feedback Systems. En G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (Vol. 2) (pp. 31-42). Academic Press. ISBN 9780123739476.

Fink, G. (2010). Stress: Definition and History. En Stress Science Neuroendocrinology (pp. 3-9). Oxford: Elsevier Inc

García-Bueno B., Caso J.R. & Leza J.C. (2008). Stress as a neuroinflammatory condition in brain: Damaging and protective mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32:1136-1151.

Guo, G., Chen, Y., Hu, Y., Wu, X., He, Y., Wu, J., Huang, M., Mason, M. & Bao, A. (2018) Sex hormones affect acute and chronic stress responses in sexually dimorphic patterns: Consequences for depression models. *Psychoneuroendocrinology* 95: 34-42.

Hackett, R.A., Kivimäki, M., Kumari M. & Steptoe, A. (2016). Diurnal Cortisol Patterns, Future Diabetes, and Impaired Glucose Metabolism in the Whitehall II Cohort Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101(2): 619–625. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2853>

Hammadi, S., Chan, O., Abdellali, M., Medjerab, M., Agoun, H., Bellahreche, Z., Khalkhal, A. & Dahman, Y. (2018). Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetic gerbils (*Meriones tristis*). *Int J Exp Path.* 99:172–179.

Hendrick, A., Gibson, M., & Kulshreshtha, A. (2015). Primary Care: Clinics in Office Practice. Primary Care: Clinics in Office Practice (Vol. 42, pp. 451–464).

Jerić, M., Vukojević, K., Vuica, A., & Filipović, N. (2017). Diabetes mellitus influences the expression of NPY and VEGF in neurons of rat trigeminal ganglion. *Neuropeptides*, 62, 57–64.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L. & Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18):11946-50. DOI: 10.1073/pnas.182296499

Joëls, M., Karst, H., Alfarez, D., Heine, V.M., Qin, Y., van Riel, E., Verkuyl, M. Lucassen P.J. & Krugers H.G. (2004). Effects of Chronic Stress on Structure and

Cell Function in Rat Hippocampus and Hypothalamus. *The International Journal on the Biology of Stress* 7(4):221-231 <https://doi.org/10.1080/10253890500070005>

Joseph, J.J. & Golden, S.H. (2017). Cortisol dysregulation: the bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1391(1):20-34. DOI: 10.1073/pnas.182296499

Kamba, A., Daimon, M., Murakami, H., Otaka, H., Matsuki, K., Sato, E., Tanabe, J., Takayasu, S., Matsushashi, Y., Yanagimachi, M., Terui K., Kageyama, K., Tokuda, I., Takahashi, I. & Nakaji, S. (2016) Association between Higher Serum Cortisol Levels and Decreased Insulin Secretion in a General Population. *PLoS ONE* 11(11): e0166077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166077>

Kyrou, I., & Tsigos, C. (2009). Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(6), 787–793.

López-López A.L., Bonilla Jaime H., Escobar Villanueva M.C., Brianza Padilla M., Vázquez Palacios G. & Alarcón Aguilar F.J. (2014). Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiology & Behavior* 161:15-23

Lynch, S. K. & Abramoff, M. D. (2017). Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vision Research* 139: 101–107. doi: 10.1016/j.visres.2017.03.003

Malamed, S., & Orr, D. (2015). *Medical Emergencies in the Dental Office* (Seventh Edition). PART FOUR: ALTERED CONSCIOUSNESS (pp. 255–280).

Malek, H., Ebadzadeh, M.M., Safabakhsh, R., Razavi, A. & Zaringhalam, J. (2015). Dynamics of the HPA axis and inflammatory cytokines: Insights from mathematical modeling. *Computers in Biology and Medicine* 67(1): 1-12.

Marin, M.T., Cruz, F.C. & Planeta, C.S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology & Behavior* 90:29-35.

Martí, O., Martí, J. & Armario A. (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology & Behavior* 55(4):747-753.

Murison, R. (2016). The Neurobiology of Stress. En *Neuroscience of Pain, Stress, and Emotion* (29-49). United States: Academic Press.

Nalini. M., Raghavulua B.V., Annapurna A., Avinashb P., Chandia V., Swathia N. & Wasim (2017). Correlation of various serum biomarkers with the severity of diabetic retinopathy. *Diab Met Syndr: Clin Res Rev*, Suppl 1:S451-S454. doi: 10.1016/j.dsx.2017.03.034

Nowacka, M.M., Paul-Samojedny, M., Bielecka, M.M., Plewka, D., Czekaj, P. & Obuchowicz, E. (2015). LPS reduces BDNF and VEGF expression in the structures of the HPA axis of chronic social stressed female rats, *Neuropeptides* 54: 17-27.

Nowacka-Chmielewska, M.M, Paul-Samojedny, M., Bielecka-Wajdman, A.M., Barski, J.J. & Obuchowicz, E. (2017). Alterations in VEGF expression induced by antidepressant drugs in female rats under chronic social stress. *Exp Ther Med* 13(2): 723–730.

Ortiz, R., Kluwe, B., Odej, J.B., Echouffo Tcheugui, J.B., Sims, M., Kalyani, R.R. Bertoni, A.G., Golden, S.H. & Joseph, J.J. (2019). The association of morning serum cortisol with glucose metabolism and diabetes: The Jackson Heart Study. *Psychoneuroendocrinology*, 103: 25-32

Packard A.E.B., Ghosal S., Herman J.P., Woods S.C., Ulrich-Lai Y.M. (2014). Chronic variable stress improves glucose tolerance in rats with sucrose-induced prediabetes. *Psychoneuroendocrinology* 47:178-188

Pop-Busui, R., London, Z. & Kellogg A. (2007). *Diabetes and Endocrine Disorders*. En *Neurobiology of Disease* (669-680). United States: Academic Press.

Rabasa, C., & Dickson, S. (2016). Impact of stress on metabolism and energy balance. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 9, 71–77.

Radenković, M., Stojanović, M., & Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 78, 13–31.

Ramos Rodriguez, H.G., & Domingo Mendez, J. (1994). Diabetes mellitus experimental. *Ciencia veterinaria*, (6), 347–377.

Rechenberg K., Whittemore R., Holland M. & Grey M. (2017). General and diabetes-specific stress in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 130:1-8

Robinson R., Barathi V.A, Chaurasia S.S., Wong T.Y. & Kern T.S. (2012). Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Disease Models & Mechanisms* 5:444-456

Rodriguez, A., Epel, E., White, M., Standen, E., Seckl, J., & Tomiyama, A. (2015). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology* 62, 301–318.

Ron de Kloet E., Joëls M. & Holsboer F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience* 6:463-475.

Rosemberg-García I.J., Torres-Carrillo P., Ruíz-García A., Paz-Trejo D. & Sánchez-Castillo H., (2013). Contextual memory in rats exposed to chronic stress. Program No. 98.15/Jjj34. Neuroscience 2013 Abstracts. San Diego Ca: Society for Neuroscience, 2013. Online.

Ruíz-García A., Torres-Carrillo P., Rosemberg-García I.J., Paz-Trejo D. & Sánchez-Castillo H. (2013). Conditioning taste aversion after a chronic stress exposure in rats. Program No. 582.10/LLL60. Neuroscience 2013 Abstracts. San Diego Ca: Society for Neuroscience, 2013. Online.

Secretaría de Salud Pública. (2016). Emite la Secretaría de Salud emergencia epidemiológica por diabetes mellitus y obesidad. 2019, de Secretaría de Salud Pública Sitio web: <https://www.gob.mx/salud/prensa/emite-la-secretaria-de-salud-emergencia-epidemiologica-por-diabetes-mellitus-y-obesidad>

Sellami, N., Lamine, L., Turki, A., Sarray, S., Jailani, M., Al-Ansari, A., Ghorbel, M., et al. (2018). Association of VEGFA variants with altered VEGF secretion and type 2 diabetes: A case-control study. *Cytokine* 106, 29–34.

Shibuya M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer* 2(12), 1097–1105. doi:10.1177/1947601911423031

Shilpa B.M., Bhagya V., Harish G., Srinivas Bharath M.M. & Shankaranarayana Rao B.S. (2017). Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 76: 88-100.

Stitt, A.W., Curtis, T.M., Chen, M., Medina, R.J., McKay, G.J., Jenkins., A., Gardiner, T.M., Lyons T.J., Hammes, H.P., Simo, R. & Lois, N. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research* 51: 156-186.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research* 50(6), 537–46.

Thébault, S (2017). Potential mechanisms behind the antioxidant actions of prolactin in the retina. *Experimental Eye Research* 160:56-61

Timmermans W., Xiong H., Hoogenraad C.C. & Krugers H.J. (2013). Stress and excitatory synapses: from health to disease. *Neuroscience* 248:626-636.

Torres Carrillo, P. (2016). Efectos del estrés crónico a largo plazo: hacia un modelo animal de estrés postraumático. Licenciatura. Facultad de Psicología, UNAM.

Torres Carrillo, P. (2019). Diferencias conductuales y endócrinas en respuesta al estrés: sexo y tipo de estresor como moduladores. Maestría. Facultad de Psicología, UNAM.

Ulrich-Lai, Y., & Herman, J. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience* 10(6), nrn2647.

Vares, M., Metelitsa, M., Kõiv, K., Kaldmäe, M., Laugus, K., Tiitsaar, K., Shimmo, R. & Harro, J. (2018). Chronic stress sensitizes amphetamine-elicited 50-kHz calls in the rat: Dependence on positive affective phenotype and effects of long-term fluoxetine pretreatment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 171:10-19.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King H. (2004). Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care* 27(5): 1047-1053. DOI: 10.2337/diacare.27.5.1047

World Health Organization (2016). Global report on diabetes. France: World Health Organization.

Wu & Huan (2008). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology* 5.47.1-5.47.14. DOI: 10.1002/0471141755.ph0547s40

Zhanga Y., Zhangb X., Zhanga J., Liua C., Yuanc Q., Yina X., Weia L., Cuid J., Taoa R., Weib P., Wang J. (2014). Gray matter volume abnormalities in type 2 diabetes mellitus with and without mild cognitive impairment. *Neuroscience Letters* 562:1-6.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ACTH:** Hormona adrenocorticotropa
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **CORT:** Corticosterona
- **CRH:** Hormona liberadora de corticotropinas
- **CUSB:** Batería de estrés crónico impredecible
- **D:** Grupo experimental diabetes
- **D-E:** Grupo experimental diabetes-Estrés
- **ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- **GLUT2:** Transportador de glucosa 2
- **HPA:** Eje hipotálamo pituitario adrenal
- **P1:** Medición de seguimiento de los niveles de glucosa en sangre, en el experimento “Relación entre estrés crónico y diabetes”, posterior a la exposición a estrés o el tiempo correspondiente en sujetos no expuestos a estrés.
- **P2:** Medición de seguimiento de los niveles de glucosa en sangre, en el experimento “Relación entre estrés crónico y diabetes”, previo al sacrificio de los sujetos experimentales.
- **PFA:** Paraformaldehído
- **SNA:** Sistema nervioso autónomo
- **STZ:** Estreptozotocina
- **TNF α :** Factor necrótico tumoral alfa
- **V:** Grupo experimental vehículo
- **VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular
- **VEGF-A:** Factor de crecimiento endotelial vascular A
- **V-E:** Grupo experimental vehículo-Estrés

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas involucrados en la respuesta de estrés.....	12
Figura 2. Mecanismo de acción de estreptozotocina (STZ).....	16
Figura 3. Diseño experimental para estandarización del modelo	22
Figura 4. Diseño experimental para evaluar relación entre estrés crónico y diabetes	23
Figura 5. Efectos diabetogénicos de la estreptozotocina	26
Figura 6. Comparación entre grupos normoglucémicos	29
Figura 7. Análisis de variables a 6 y 12 semanas.....	31
Figura 8. Peso corporal en grupos hiper y normoglucémicos con y sin estrés.....	33
Figura 9. Regresión lineal del peso corporal en CUSB.....	34
Figura 10. Peso corporal en CUSB.....	35
Figura 11. Peso final en protocolo estrés.....	36
Figura 12. Glucosa en sangre en protocolo estrés	38
Figura 13. Concentración de corticosterona	39
Figura 14. Concentración de VEGF-A.	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Batería de estrés crónico impredecible (CUSB).....	23
---	----

11- APÉNDICES

11.1- ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO

En su protocolo Wu y Huan (2008) aseguran que los efectos de la estreptozotocina (STZ) son dosis dependientes. Para validar el uso del modelo se buscó evaluar también diferentes dosis de STZ, incluyendo la dosis diabotogénica de 65mg/kg. Como punto de partida para este análisis se utilizaron los datos de las comparaciones entre los grupos vehículo y STZ 65mg/kg con hiperglucemia de la estandarización del modelo (ver Figura 11.1.1).

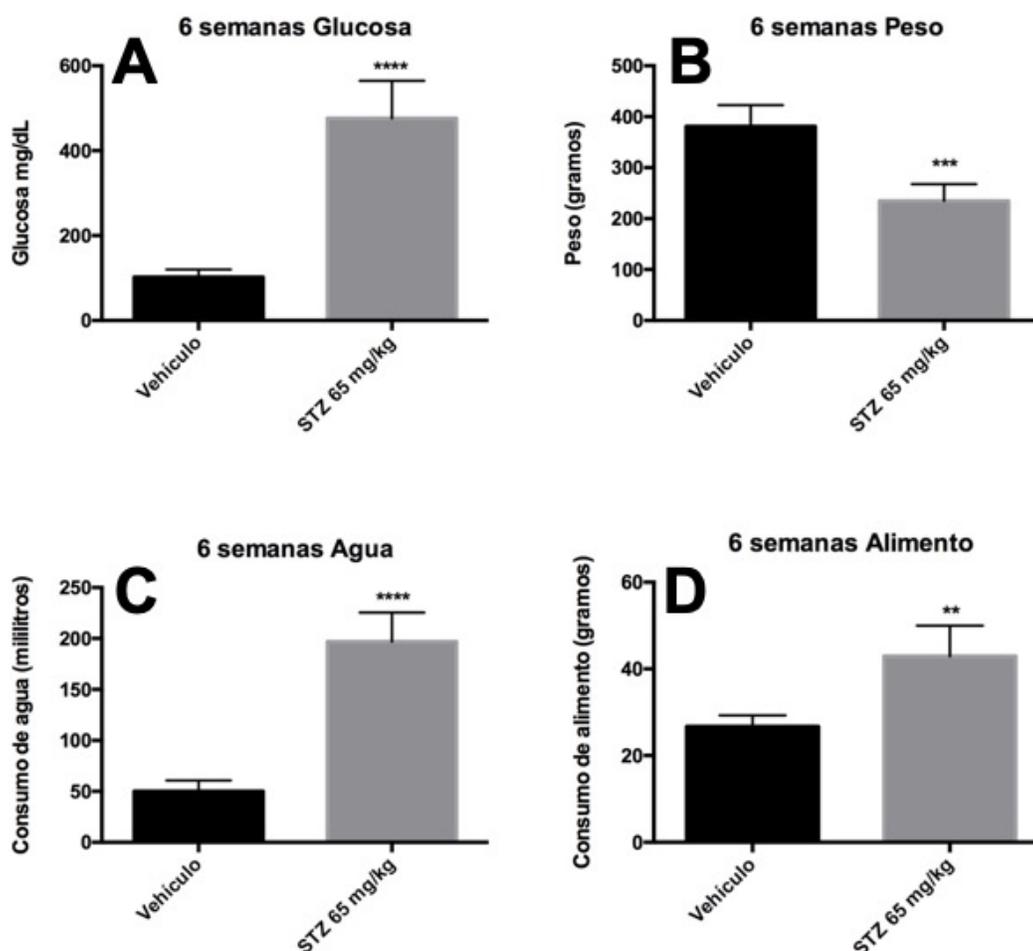


Figura 11.1.1. Comparaciones suplementarias entre Vehículo y STZ. Se muestran datos de glucosa en sangre (A), peso corporal (B), consumo de agua (C) y consumo de alimento (D). Los datos se expresan como media \pm SEM. ****P<0.0001, **P=0.0003

Los datos de esta comparación se analizaron con una prueba t para medias independientes obteniendo diferencias estadísticamente significativas para los niveles de glucosa en sangre ($t=9.215$ $df=8$ $p<0.0001$), peso corporal ($t=6.131$ $df=8$ $p=0.0003$), consumo de agua ($t=10.84$ $df=8$ $p<0.0001$) y consumo de alimento ($t=4.845$ $df=8$ $p=0.0013$). A partir de estos análisis se calculó el tamaño del efecto siguiendo los parámetros de Cohen en donde valores $d=0.2$ se consideran pequeños, $d=0.5$ se consideran tamaños medios y valores $d\geq 0.8$ son considerados como tamaños del efecto grandes.

El tamaño del efecto para los niveles de glucosa en sangre fue $d=13.03179$, para peso corporal $d=8.668567$, para consumo de agua $d=15.33236$ y finalmente para consumo de alimento $d=6.850571$. Esto significa que para todas las variables evaluadas el tamaño del efecto es tan grande que aún con una muestra tan pequeña ($n=5$) puede observarse el efecto de la STZ. Por ello la muestra para el grupo de la dosis baja (35mg/kg) y la dosis alta (85mg/kg) fue de dos sujetos por grupo, esto debido a que solamente se buscaba verificar, apegándonos a principios éticos, que dosis más bajas no fueran diabetogénicas y verificar el riesgo para los animales por la administración de dosis más altas. Para la comparación de estos sujetos se seleccionaron aleatoriamente 2 sujetos de los grupos testigo, vehículo y STZ 65kg/kg con hiperglucemia, también se agregaron a la comparación los dos sujetos que fueron administrados con la dosis diabetogénica, pero no desarrollaron hiperglucemia. Los registros se hicieron por seis semanas posteriores al reto.

Se realizaron las mismas gráficas que se hicieron para la estandarización del modelo. Los registros de glucosa se realizaron dos veces por semana, por lo que se pudo obtener una gráfica continua de de esta variable (ver Figura 11.1.2).

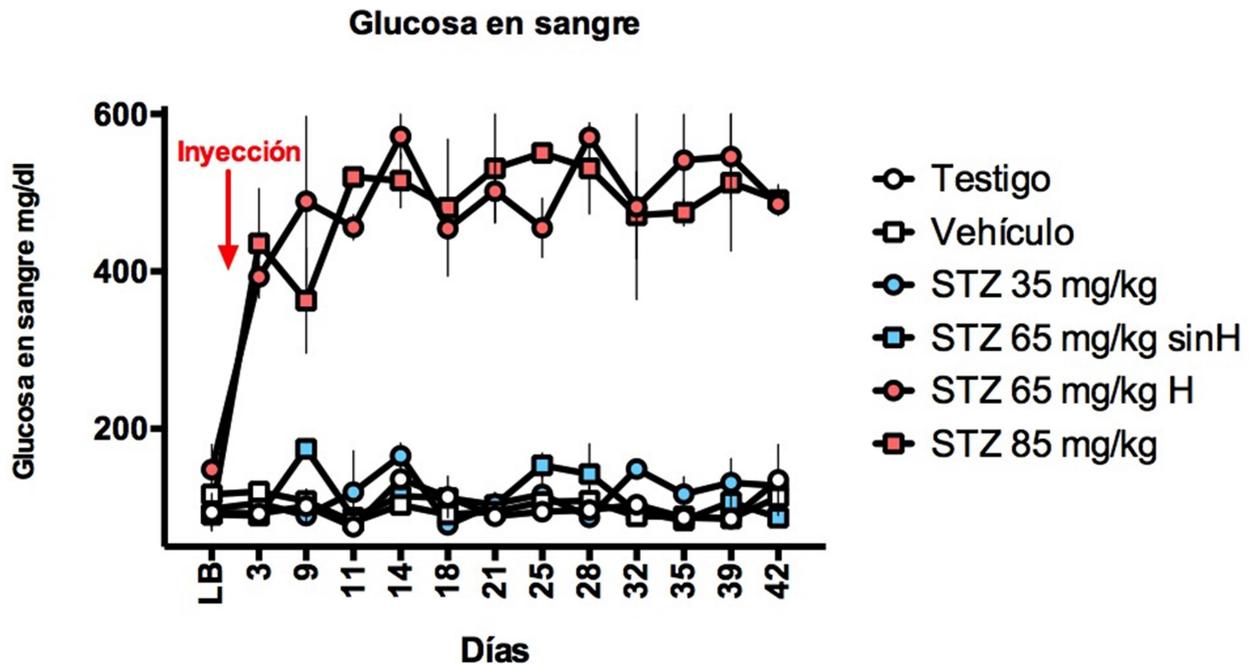


Figura 11.1.2. Niveles de glucosa a diferentes dosis de STZ.

Se muestran diferentes condiciones de STZ. La letra H indica hiperglucemia, mientras que sinH se refiere a la ausencia de hiperglucemia. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Lo que puede observarse es que los dos sujetos administrados con STZ 85 mg/kg desarrollaron hiperglucemia, al igual que los sujetos tratados con la dosis diabetogénica. Cabe resaltar que la medida de variabilidad es grande en el grupo de STZ 85 mg/kg debido a que uno de los sujetos (A7) mostró regularmente valores cercanos a los 600 mg/kg, particularmente este sujeto mostró un deterioro bastante dramático por lo que tuvo que ser eutanizado con sobredosis de pentobarbital i.p. a las 6 semanas posteriores al reto con la STZ. Se observa también que los dos sujetos tratados con STZ 35 mg/kg son normoglucémicos igual que los grupos testigo, vehículo y los sujetos que no respondieron al reto de la dosis diabetogénica.

Diariamente se tomó el registro del peso corporal de los sujetos, por lo que se graficó la ganancia progresiva de masa corporal para todos los sujetos (ver Figura 11.1.3).

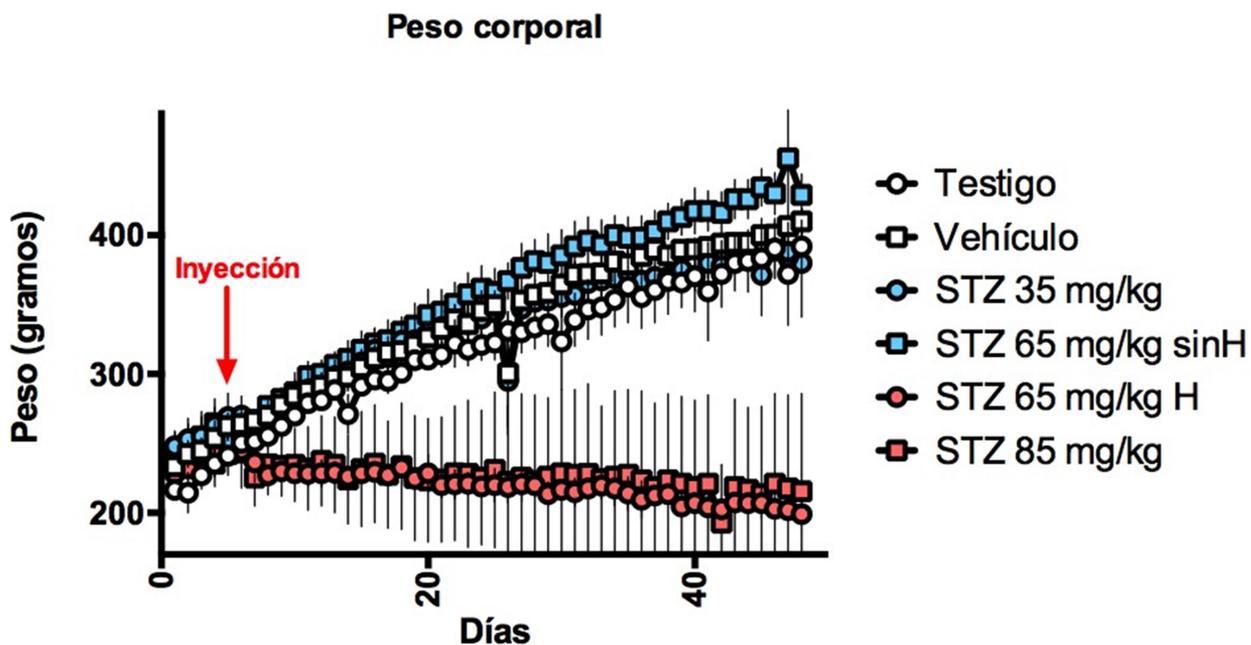


Figura 11.1.3. Peso corporal a diferentes dosis de STZ.

Gráfica de la ganancia de peso en los sujetos con diferentes condiciones de STZ. La letra H indica hiperglucemia, mientras que sinH se refiere a la ausencia de hiperglucemia. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Se puede observar que los sujetos hiperglucémicos de las dosis de STZ 65 mg/kg y 85 mg/kg tienen pesos menores que el resto de los grupos normoglucémicos. Es nuevamente visible el incremento progresivo en la variabilidad del peso de los sujetos del grupo STZ 85 mg/kg, esto se debe nuevamente a que la misma rata A7 tenía un peso de 150g hacia el final del registro cuando el peso normal de las ratas en esa ventana temporal es alrededor de los 400g. El resto de los sujetos normoglucémicos tenían pesos similares y se puede observar cómo, conforme avanza el registro, tienden a incrementar su ganancia de peso corporal. Estas observaciones vuelven a confirmar que el incremento de niveles de glucosa en sangre induce el decremento significativo de peso en los sujetos.

Los registros de consumos de agua y alimento de los sujetos también se realizó diariamente por lo que se pudo graficar el desarrollo de estas variables a lo largo del tiempo de registro (ver Figura 11.1.4).

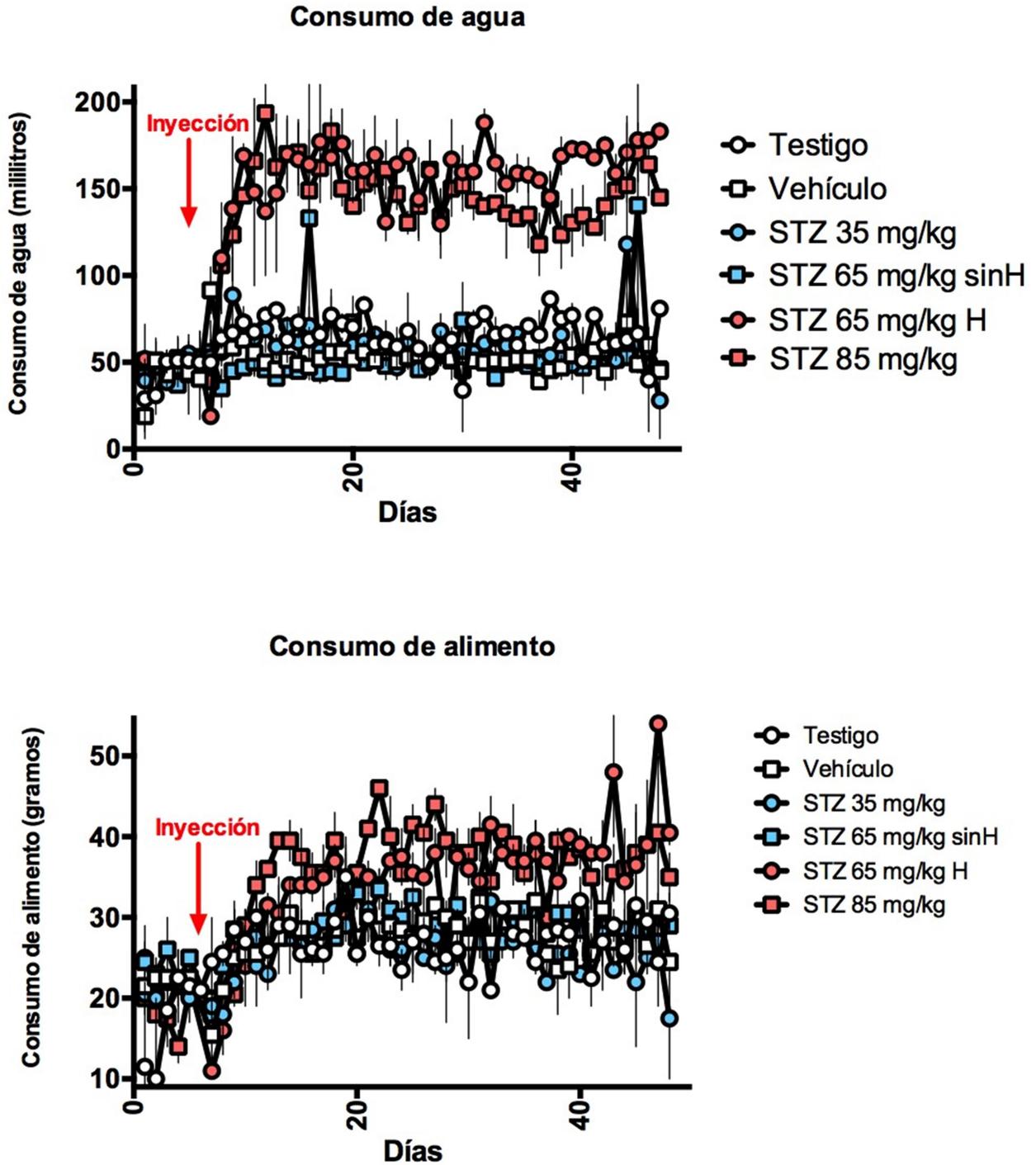


Figura 11.1.4. **Consumos de agua y alimento a diferentes dosis de STZ.** Gráfica de los consumos de agua y alimento en los sujetos con diferentes condiciones de STZ. La letra H indica hiperglucemia, mientras que sinH se refiere a la ausencia de hiperglucemia. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Sobre el consumo de agua, puede observarse claramente que los sujetos con hiperglucemia (STZ 65 mg/kg y 85 mg/kg) consumen más agua que los sujetos de los grupos normoglucémicos (testigo, vehículo, STZ 35 mg/kg y 65 mg/kg sin hiperglucemia). También puede observarse un consumo similar de agua entre todos los sujetos normoglucémicos.

Respecto al consumo de alimento, las gráficas entre los grupos normoglucémicos e hiperglucémicos no son tan marcadamente separadas como en el caso de consumo de agua, sin embargo, sí es posible diferenciar los consumos de los sujetos con hiperglucemia de aquellos que tienen niveles de glucosa alrededor de los 100 mg/dL. En este sentido los sujetos con los tratamientos de STZ de 65 mg/kg y 85 mg/kg, y cuyos niveles de glucosa en sangre son elevados, tienden a incrementar su consumo de alimento posterior al reto con estreptozotocina. Por su parte los sujetos normoglucémicos tienen un consumo de alimento similar entre ellos.

A partir de las gráficas mostradas en el apéndice 11.1, para poder evaluar más claramente las diferencias entre los grupos con diferentes condiciones de STZ, se tomaron los últimos cinco días de las seis semanas de registro para realizar un análisis más puntual. Se realizaron gráficas para cada una de las variables (ver Figura 11.1.5).

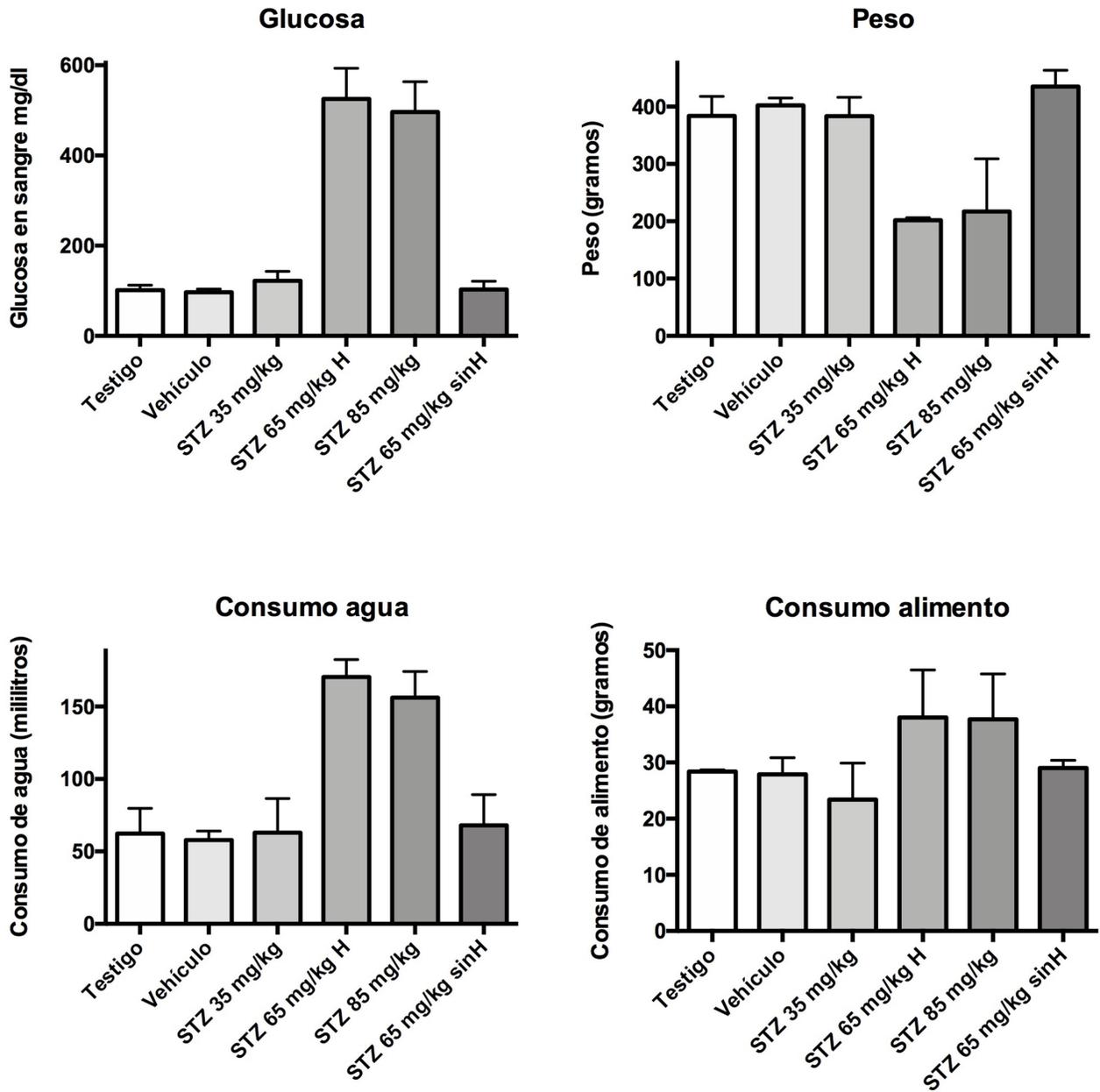


Figura 11.1.5. Comparación de variables a diferentes dosis de STZ. Gráfica de glucosa en sangre, peso corporal y consumos de agua y alimento en los sujetos con diferentes condiciones de STZ. La letra H indica hiperglucemia, mientras que sinH se refiere a la ausencia de hiperglucemia. Los datos se expresan como media \pm SEM.

Debido a que la cantidad de sujetos por cada grupo era demasiado pequeña ($n=2$) no fue posible realizar análisis estadísticos pues no era posible determinar una distribución en los datos. Sin embargo, debido a que la dirección del efecto se había demostrado con los datos de la estandarización del modelo, los datos de este apéndice son suficientes para determinar la variación de las variables en dosis bajas (35 mg/kg) y altas (85 mg/kg) de estreptozotocina.

Sobre los niveles de glucosa en sangre se puede apreciar que los dos sujetos del grupo STZ 35 mg/kg tienen niveles de glucosa similares a los grupos testigo, vehículo y STZ 65 mg/kg sin hiperglucemia. Estos resultados indican que la dosis más baja de estreptozotocina no tiene efectos, al menos en estas condiciones, diabetogénicos.

Para la variable de peso corporal se puede observar que los sujetos normoglucémicos tienen pesos similares y que los sujetos hiperglucémicos tienden a tener peso marcadamente más bajos. Es destacable el error tan grande que tiene el grupo de la dosis más alta de STZ, nuevamente esto se debe a que uno de los sujetos (A7) tenía menos de la mitad del peso corporal que una rata debiera tener en esa ventana temporal. Este resultado enfatiza el efecto nocivo asociado al fármaco en dosis altas.

Sobre el consumo de agua y alimento puede observarse que en los grupos con hiperglucemia hay un incremento en ambas variables. Por su parte los sujetos del grupo STZ 35 mg/kg tiene consumos similares a los demás sujetos normoglucémicos. Este dato refuerza el argumento de que los cambios en los patrones de consumo de agua y alimento se deben a los incrementos en glucosa inducidos por la administración de STZ.

Con base en estos resultados se puede comprobar que dosis más bajas a la dosis diabetogénica de Wu y Huan (2008) no inducen hiperglucemia, mientras que dosis altas son capaces de inducir hiperglicemia en todos los sujetos administrados, sin embargo, el deterioro de los mismos es marcado y pone en riesgo la vida de los mismos.

En conclusión estos resultados terminan de validar el uso de la dosis de 65 mg/kg para generar un modelo de diabetes tipo 1.

11.2- FUNCIONES DE ABSORBANCIA

Para obtener las concentraciones de corticosterona y VEGF-A se corrieron funciones logísticas para las lecturas de absorbancias correspondientes.

Para las mediciones de corticosterona, las lecturas de absorbancia se graficaron en una función logística de 4 parámetros (4PLC) (ver Figura 13), el valor de ajuste de los datos a la función fue de $R^2=0.9861$.

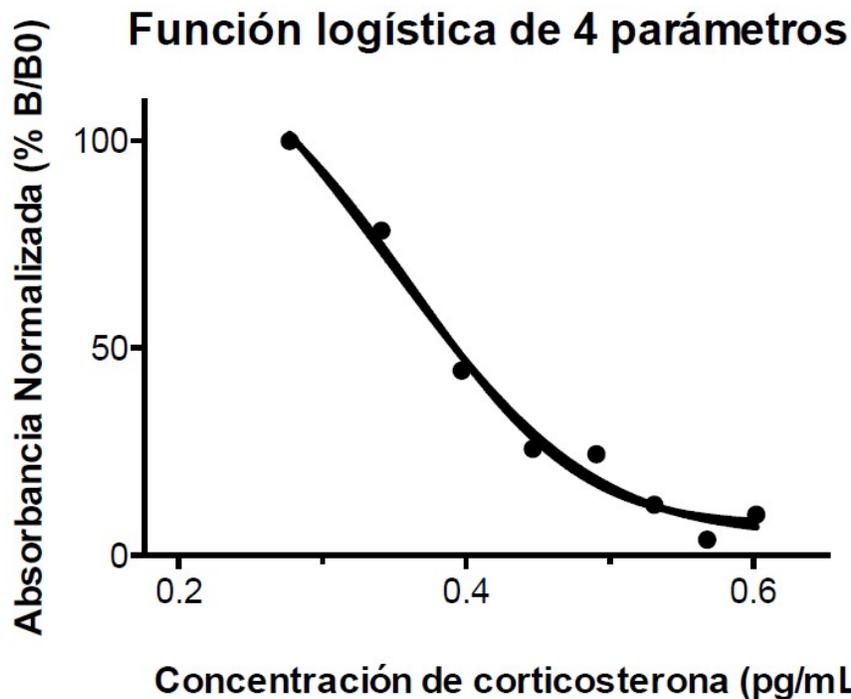


Figura 11.2.1. Logística de 4 parámetros para corticosterona. Se presenta la función 4PLC de los valores obtenidos al analizar los sueros de los sujetos experimentales con el kit de inmunoensayo para corticosterona.

Las mediciones de VEGF-A en suero se graficaron en una función logística de 2 parámetros (Figura 15), el valor de ajuste de los datos a la función fue de $R^2=0.7474$.

Función logística de 2 parámetros

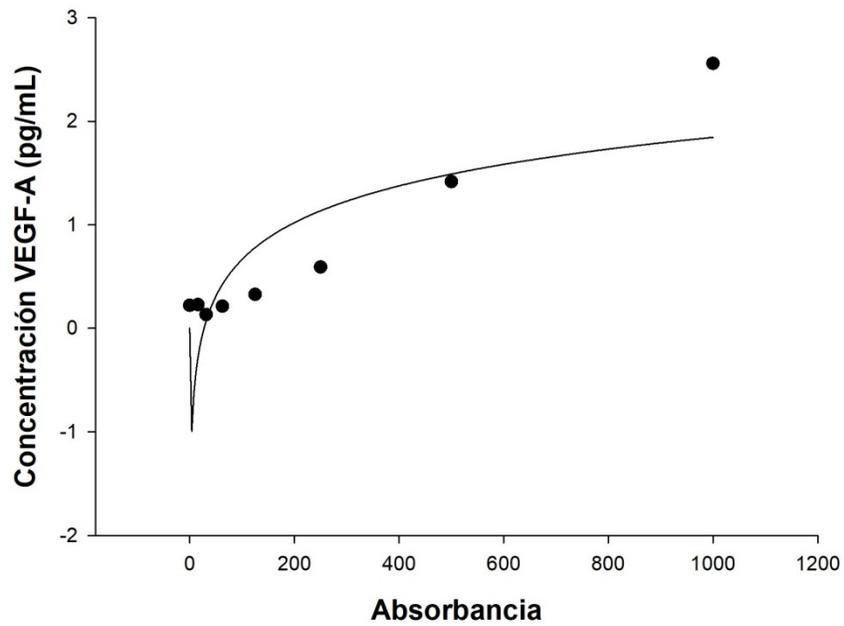


Figura 11.2.2. Logística de dos parámetros para VEGF-A. Gráfica de la función de los valores obtenidos al analizar los sueros de los sujetos experimentales con el ELISA Kit para VEGF-A.