

00346 2
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"ANALISIS NEUROLOGICO, BIOQUIMICO Y MORFOLOGICO
DE UN MODELO DE RATA DIABETICA TIPO (1)
TRATADA CON GLICINA O TAURINA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
HIPOLITO NOE ALVARADO VASQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1

272996



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.

TRABAJO REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA Y EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BIOQUÍMICA, DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO Y EL DR. PEDRO ZAMUDIO CORTES.

DEDICATORIAS

*A TI MAMÁ POR QUERERME E IMPULSARME SIEMPRE
A MI PADRE*

*A MIS HERMANOS QUE SIEMPRE RECUERDO:
ANA, ELIZABETH, RAFA, IRMA, MANOLO,
JESÚS Y RICKI*

*A MIS QUERIDOS ENANOS: MICKI,
ITZEL, ARIANA, CARLITOS Y OLIVIA*

AL DR. ADOLFO POR SU CONSTANTE ESTÍMULO

A MI TÍA ESTHER POR SU GRAN CARIÑO

AGRADECIMIENTOS

*AL DR. GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL POR
PERMITIRME INTEGRAR A SU EQUIPO*

*AL DR. PEDRO ZAMUDIO CORTÉS POR SU AYUDA,
COMENTARIOS E IDEAS.*

*A LAS TÉCNICAS EN HISTOLOGÍA ALICIA MONTOYA,
ALEJANDRA BELMONT Y MA. DE LOURDES "CHALA"
SIN CUYA AYUDA NO SE HUBIERA PODIDO REALIZAR
ESTE TRABAJO*

*A LA M.C.V BEATRIZ VANDA POR REALIZAR EL
ANÁLISIS A NIVEL HISTOPATOLÓGICO*

*AL DR. RICARDO LASCURAÍN POR ENSEÑARME
LA UTILIZACIÓN DE LECTINAS*

*AL DR. ARMANDO PÉREZ POR SU AYUDA EN LA
DETERMINACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS EN CEREBRO*

*AL DR. EDGAR ZENTENO GALINDO MI SUFRIDO TUTOR
POR SU PACIENCIA Y AYUDA PARA LLEVAR A TÉRMINO
LO QUE COMENZE*

A los miembros de mi jurado:

Dra. Alejandra Mainero del Paso, al Dr. Luis Felipe Jimenez García, al Dr. Ricardo Lascuraín Ledesma, al M. en C. Mario Humberto Vargas Becerra, al Dr. Luis Felipe Montaña Estrada y a la M.en C. María Teresa Benítez Rodríguez por su paciente revisión y comentarios al manuscrito original..

INDICE

Pags.

X.- Dedicatorias	
XI.- Agradecimientos	
XII.- Resumen	8
1.0.- Introducción	9
1.1.- Epidemiología de la diabetes mellitus insulino-dependiente	9
2.0.- Patología de la diabetes mellitus.....	13
2.1.- Glucosilación no enzimática (compuestos AGE).....	22
2.1.1.- En el riñón.....	23
2.1.2.- En el ojo.....	23
2.1.3.- En el sistema nervioso.....	24
2.1.4.- En el sistema inmune.....	24
2.1.5.- En el sistema circulatorio (aterosclerosis).....	25
2.1.6.- La glucosilación no enzimática en otros tejidos.....	25
2.2.- Inhibición de la glucosilación no enzimática.....	26
3.0.- Hipótesis.....	29
4.0.- Objetivo general.....	29
4.1.- Objetivos particulares.....	29
5.0.- Material y métodos.....	30
5.1.- Modelo de rata diabética. Selección de los animales y formación de los grupos experimentales.....	30
5.2.- Proceso de diabetización.....	30
5.3.- Administración de los aminoácidos.....	30
5.4.- Obtención de las muestras biológicas.....	31
5.5.- Medición de glucosa, triglicéridos, colesterol y hemoglobina glucosilada.....	32
5.6.- Determinación de colágena.....	33
5.7.- Histopatología de riñón, hígado, páncreas y ojo.....	34
5.8.- Inhibición de la glucosilación no enzimática <i>in vitro</i> utilizando al aminoácido glicina.....	35
5.9.- Histoquímica de cortes de cerebro por congelación usando lectinas.....	36
6.0.- Análisis estadístico.....	37
7.0.- Resultados.....	38

7.1.- Peso y valores bioquímicos encontrados en los grupos experimentales.....	38
7.2.- Resultados del análisis histopatológico.....	45
8.0.- Inhibición de la glucosilación no enzimática <i>in vitro</i> utilizando glicina.....	51
9.0.- Resultados de la histoquímica con lectinas.....	52
10.0.- Discusión.....	54
11.0.- Conclusiones.....	66
12.0.- Bibliografía.....	67

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un padecimiento que constituye un grave problema de salud en un gran número de países. En este padecimiento se presentan diversas complicaciones crónicas como las neuropatías, nefropatías, retinopatías, así como macro- y microangiopatías. El origen de estas alteraciones se desconoce, por lo que se proponen 3 hipótesis principales para explicarlo: a) Una deficiente oxigenación de los tejidos, b) la sobreactivación de la vía de los polioles y c) la unión inespecífica de la glucosa a moléculas libres o de la membrana celular a través del proceso conocido como glucosilación no enzimática. Se considera a esta última como la más importante. Desde hace tiempo se han probado diferentes aminoácidos, aminoguanidinas, y otros compuestos, con la finalidad de inhibir esta unión y disminuir sus efectos, sin obtener resultados concluyentes hasta el momento. En este trabajo a ratas diabétizadas por una aplicación intramuscular de estreptozotocina (50 mg/Kg), se administraron por vía oral los aminoácidos glicina (al 1 %) o taurina (0.5 %) durante un período de 6 meses disueltos en el agua de consumo, como medio para disminuir o retardar la aparición de las complicaciones características de la DM. Los animales tratados con los aminoácidos mostraron una menor pérdida de peso, una menor concentración de glucosa circulante, una disminución en la cantidad de glucosa excretada por orina, una disminución en el porcentaje de hemoglobina glucosilada, menor concentración de triglicéridos y colesterol, así como una mejor respuesta a la estimulación por mitógenos de las células mononucleares totales. A nivel histopatológico se encontró que la infiltración por glucógeno y la presencia de leucocoria característica del individuo diabético, fue menor en los animales que recibieron glicina. Experimentos realizados *in vitro* incubando glucosa marcada con carbono 14, mostraron una menor unión de la glucosa con diferentes proteínas en presencia de glicina, de manera similar a lo reportado para la taurina. La valoración con lectinas que reconocen ácido siálico en cortes de cerebro por congelación, mostraron una menor expresión de ácido siálico en los capilares de cerebros pertenecientes a los animales tratados con taurina o glicina.

Se observó que en presencia de glicina o taurina se regularon los parámetros bioquímicos alterados comúnmente en la DM, así como una disminución en alteraciones patológicas como la infiltración de glucógeno en riñón y la presencia de leucocoria en el ojo. Esto nos permite sugerir la utilización de glicina o taurina (obteniéndose mejores resultados con glicina), para ayudar a disminuir las complicaciones crónicas que se presentan tanto en la diabetes mellitus insulino dependiente como en la insulino independiente.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS

Epidemiología mundial de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad que se conoce desde la antigüedad (1), y desde entonces se ha reconocido su importancia médica y social. Actualmente se considera que un 10 a 20 % de personas en Estados Unidos y Europa padecen diabetes mellitus (DM)(2). La diabetes es un desorden en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas, producto del desequilibrio existente entre la insulina disponible y las necesidades que se tienen de esta hormona. En este trabajo, nos enfocamos a la diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) o diabetes juvenil, caracterizada por una marcada deficiencia de insulina, así como por un incremento en los niveles de glucosa sanguínea y en el catabolismo de grasas y proteínas, en un modelo experimental agudo de DMID.

La DMID es un problema grave de salud en numerosos países; un estudio realizado en Liguria, Italia, de 1987 a 1991, reportó que hay 11.72 casos por cada 100,000 habitantes y que la edad en la cual se presenta está entre los 5 y 9 años (3). En la zona de Roma, entre 1989 y 1993 se valoró a niños y adolescentes de 0 a 14 años, y la tasa de incidencia de la DMID fue de 7.9 por cada 100 000 habitantes; la edad del grupo de mayor riesgo fue nuevamente de los 5 a los 9 años. Además se observó que el número de casos registrados sufre un aumento en invierno, lo que sugiere la existencia de factores ambientales que influyen en el desencadenamiento de la enfermedad. En Austria en un período de 15 años (1979-1993), la tasa de incidencia de la DMID en niños entre los 0-14 años fue de 7.9 por cada 100 000 personas (4).

En algunas zonas el problema es aún más grave. Por ejemplo en Cerdeña, Italia, se ha encontrado la tasa de incidencia más alta de las regiones italianas y del Mediterráneo entre 1989 y 1992, ya que existen 26.2 pacientes por cada 100 000 habitantes entre los 0 y 29 años. En este estudio se menciona la existencia de variaciones estacionales con un aumento de casos en invierno y una disminución en verano (5). En Finlandia se ha observado un patrón estacional sólo para niños entre 0 y 9 años, con una incidencia de 35.6 por cada 100 000 personas. En Francia, ésta fue de 7.6 casos por cada 100 000 habitantes en el período 1988-1990.

Finlandia tiene la incidencia más alta, seguida por Suecia (26/100 000 habitantes), Dinamarca (22/100 000) y Noruega (21/100 000); los países de la región con los índices más bajos son Lituania (7/100 000) y Polonia (6/100 000), por lo que podemos concluir que existen marcadas diferencias aún entre países de la misma región (6), y si bien se desconoce la etiología del padecimiento, todo parece indicar que es resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales.

En países denominados del tercer mundo como Libia, en el período de 1981 a 1990 la incidencia fue de 9.4 hombres y de 8.5 mujeres por cada 100 000 ciudadanos menores de 35 años, con una predominancia en las mujeres entre 0 a 14 años de edad, mientras que en hombres estuvo entre los 15 a los 34 años (7). En este trabajo no se mencionan variaciones estacionales ni anuales para la incidencia de la enfermedad.

En otros países como por ejemplo la India, la DMID u otro tipo de diabetes no es un padecimiento muy común, considerándose más bien como un evento raro. En China la diabetes es un problema de salud menor; en un estudio retrospectivo realizado entre 1989 y 1993 en niños de 1 a 14 años, los investigadores encontraron que la edad promedio en la cual se presenta la diabetes en niños es de 8 años, mientras que en las niñas este padecimiento se presenta un poco más tarde (9.7 años). Si bien la incidencia de la enfermedad parece ir en aumento, China sigue mostrando uno de los porcentajes más bajos en el mundo (8). En el sultanato de Omán, país localizado en la parte sureste de la península arábiga, también se han encontrado tasas de incidencia del padecimiento bajas. Datos de enero de 1993 a diciembre de 1994 muestran 2.46 enfermos por cada 100 000 habitantes en la población de niños de 0-14 años de edad. Un aspecto interesante son las variaciones estacionales observadas, ya que el número de casos aumentó en los meses más fríos del año. Un estudio realizado por cuatro años con un grupo de 400 diabéticos en Burkina Faso, reportó una prevalencia del 10.7 % de sujetos con DMID y 76.5 % con diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID), estos datos indican la importancia como problema de salud de los distintos tipos de diabetes. En Nigeria se ha observado que la diabetes en individuos de 10 a 20 años, representa menos del 5 % del total de enfermos de todos los países del África tropical (10). Se ha observado una asociación de la DMID con otros padecimientos. Por ejemplo en Argelia, se ha observado una asociación del 16 al 20 % de los enfermos con DMID con la enfermedad coleica (11).

aumento constante, pasando de 0.2 defunciones por cada 100 000 habitantes en el año de 1950, a 31.73 por cada 100 000 en 1985 (20), actualmente ocupa el cuarto lugar en cuanto a causas de mortalidad, considerándosele ya como un asunto prioritario dentro de los programas de salud.

El primer intento por determinar la incidencia del padecimiento en la población mexicana lo realizó Izquierdo en 1919, encontrando una prevalencia del 13 % (21), Rull en 1974 reporta el 4.6 % (22). Un estudio realizado en 1990 encontró un porcentaje del 2 %. Observaciones más recientes muestran un ascenso en la frecuencia del padecimiento pasando de un 8.1 al 9 % (23-26). En las zonas urbanas de México el porcentaje va del 6.7 al 8.7 %, mientras que en las zonas rurales la presencia de la enfermedad va desde el 0.9 al 3.01 %, por lo que en las comunidades indígenas se le considera como una enfermedad rara (27).

Con respecto a la DMID, no existe información a la cual referirse específicamente con excepción del trabajo de Robles y colaboradores (28), quienes informan de 2 enfermos por cada 100 000 habitantes.

En los estados del norte del país y en el Distrito Federal es en donde se observa un mayor número de personas diabéticas (29). La mortalidad por DM tiene también una distribución variable de acuerdo a la región, por ejemplo en Oaxaca la tasa de mortalidad es de 56.41 por cada 100 000 personas, en Chihuahua es de 199.85, es decir, los pobladores de este último estado tienen un riesgo 3.5 veces mayor de morir por DM. En Nuevo León, Guanajuato y el Distrito Federal hay arriba de 1000 defunciones por año a causa de la diabetes, mientras que los estados del Sur muestran menos de 500 defunciones al año por esta enfermedad. Los estados del centro de la República tienen un comportamiento intermedio entre las dos zonas mencionadas (30).

Estos datos enfatizan la importancia de la enfermedad en el Sector Salud por la pérdida de años de vida activa de los enfermos (31), por ello, se deben buscar tratamientos para la prevención de las complicaciones secundarias del paciente diabético, así como la implementación de un adecuado plan de manejo y tratamiento de este tipo de pacientes.

2.0.- PATOLOGÍA DE LA DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus muestra como principal característica el incremento de los niveles de glucosa sanguínea. La presencia de la enfermedad no necesariamente implica una deficiencia en la cantidad de la insulina, puede deberse también a una alteración en su estructura con una disminución en su actividad, a modificaciones de su receptor, a la incapacidad de las células β para liberarla o bien a la destrucción de estas últimas.

La etiología de la enfermedad es muy variada, y de acuerdo a ello se ha clasificado en 4 grupos principales (32, 65):

- 1) Diabetes Mellitus tipo I (dependiente de insulina o DMID)
- 2) Diabetes Mellitus tipo II (no insulino-dependiente o DMNID)
- 3) Diabetes Gestacional
- 4) Diabetes Secundaria

En el caso de la DMID, la característica principal es una deficiencia de insulina debida a la reducción tanto en número como en funcionalidad, de las células β pancreáticas. Son 3 los mecanismos considerados importantes para favorecer la presencia de la enfermedad: a) factores genéticos, b) autoinmunidad y c) agresión ambiental (infecciones virales, etc.).

a) Factores genéticos

Las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o en humanos HLA) juegan aparentemente un importante papel en el desarrollo de la diabetes, principalmente los antígenos -B8, -Bw15, -Dw3 y -Dw4 (33). Se han observado también alelos que codifican para proteínas de la clase II (HLA-D), los cuales dan 8 veces más probabilidades de desarrollar DMID. Todd y Bell encontraron susceptibilidad a la DMID en sujetos en los que un aminoácido de la posición 57 en la cadena β de HLA-DQ estaba ocupada por alanina, serina o valina en lugar de ácido aspártico (34). El gene para la proteína HLA-DR3 actúa al parecer de manera sinérgica con los haplotipos positivos -DQ3.2, ya que los portadores de ambos genes tienen un riesgo 20 veces mayor de desarrollar DMID; a este respecto, se ha determinado la presencia de -DR3 en asociación con -DQA1 en pacientes a los cuales se les ha diagnosticado la enfermedad

antes de los 10 años, mientras que un haplotipo relacionado con protección a la diabetes (el DR15-DQA1) está ausente a la edad mencionada (35).

Se han observado diferencias en los haplotipos de riesgo de acuerdo a la raza. Por ejemplo, en niños finlandeses los genotipos HLA-DQB1 se asocian con un alto riesgo de padecer diabetes mellitus, esto se ha confirmado con resultados obtenidos al utilizar sondas para buscar alelos de alto riesgo (de -DQB1) en pacientes con DMID y sujetos control (36).

Otro alelo considerado de importancia es DR4 (37), así como haplotipos de HLA-DR3 y DR4, por otro lado HLA-DR2 parece proteger de la enfermedad (38) al igual que HLA-DQ1.2. Al parecer es la interacción de diferentes grupos de aminoácidos, la molécula DQ y el péptido ligado, los que intervienen para dar la protección.

Los sujetos más susceptibles a la enfermedad son aquellos que poseen genotipos heterocigóticos para los alelos de alto riesgo. Por ejemplo, los heterocigóticos chinos (39) y negros (40) para DR3/9, o bien algunas poblaciones de caucásicos para los antígenos DR1/4 y DR4/8. El alelo de DR4 (DRB1*0405), ha sido descrito como de mal pronóstico para desarrollar la enfermedad en todos los grupos étnicos en los que se encuentra (41), en el caso de México-americanos el alelo *0402 es muy común e implica alta susceptibilidad (42).

Las moléculas DQ en algunas poblaciones pueden representar protección y en otras riesgo, el punto de vista más aceptado para explicarlo propone que es la unión de diferentes alelos de DQ-DR el aspecto importante a tomar en cuenta. En México se ha determinado que los alelos DR3, DR4, DQ2 y DQ8 están altamente asociados a la DMID, mientras que DR11, DR15, DQ5, DQ6 y DQ7 se relacionan con un efecto protector (43).

b) Autoinmunidad

La primera observación que demostró un proceso autoinmunitario como la etiología de la DMID fue realizada por Gepts, quien observó que un poco antes del desarrollo clínico de la enfermedad se presentaba insulinitis (44); el análisis de los tipos celulares involucrados en el proceso autoinmune, determinó 3 tipos principales: a los linfocitos CD8+, un pequeño número de CD4+ y algunos macrófagos (45). Al utilizar marcadores de superficie se ha observado que estos tipos celulares se encuentran activados y están produciendo citocinas. Entre las citocinas que se producen están la interleucina 1 (IL-1),

el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón (IFN). Los dos primeros mediadores son citotóxicos individualmente para las células β y más aún si actúan en conjunto (46). Se ha encontrado que en la insulinitis hay un aumento en la expresión de moléculas del MHC de clase II debido a algunas citocinas como el IFN- γ , y si se utiliza un inductor de la síntesis de IFN- α (polyI:polyC) el comienzo de la diabetes se acelera, probablemente por un incremento en la respuesta inmune tanto celular como humoral (47).

La importancia de la respuesta inmune humoral en la DMID ha sido demostrada por la presencia de anticuerpos contra células de las isletas (ACI), contra la isoforma de 65 kDa de la descarboxilasa del ácido glutámico (ADAG) y contra insulina (AI). En 1974, Bottazzo y colaboradores encontraron que el suero de pacientes con este padecimiento contiene anticuerpos contra células de la isletas pancreáticas (48); se ha descrito que al año del diagnóstico de la enfermedad hasta un 90 % de los pacientes los presentan. La relevancia del sistema inmune en la DMID se confirma al demostrarse que la transferencia de linfocitos T de animales enfermos a animales sanos desencadena la enfermedad (49). También se han encontrado ADAG, esto fue primeramente descrito por Baekkeskov (50). Se considera la presencia de estos ADAG como indicadores altamente confiables del inicio de la diabetes. En los enfermos se ha determinado también la presencia de AI, a los que es posible encontrar antes de las manifestaciones del padecimiento (51).

En Finlandia, no se han encontrado diferencias en la frecuencia ni en la concentración de AI ni para los ADAG, por lo que se atribuye el origen de la enfermedad principalmente al complejo HLA y a la presencia de anticuerpos que reconocen al transportador de glucosa GLUT2, inhibiéndose de esta manera la entrada de glucosa a las células β . La asociación de los AI y ACI implican el mayor riesgo para desarrollar el padecimiento. Las concentraciones de los tres tipos de anticuerpos mencionados varía con la edad y el sexo del individuo, así, la concentración de ADAG dan la mayor sensibilidad diagnóstica después de los 20 años sin importar el sexo, mientras que antes de los 10 años son de una pobre sensibilidad diagnóstica en niños no así en niñas; en comparación los AI son más representativos antes de los 15 años. Por lo mencionado, se considera a la interacción entre la edad, el sexo, los alelos del complejo HLA y a los anticuerpos mencionados, como los factores que interactúan para el desarrollo de la enfermedad.

En el suero de sujetos diabéticos en fases tempranas de la enfermedad se han encontrado, anticuerpos contra la albúmina sérica bovina cuyo epítoto antigénico tiene una considerable homología con una proteína de las isletas conocida como p69 (52); y con una perteneciente al virus de coxsackie. Otra clase de autoanticuerpos encontrados están dirigidos contra los gangliósidos C y D, que se encuentran en altas concentraciones en neuronas e isletas pancreáticas. Aproximadamente el 30 % de los pacientes insulino-dependientes tienen anticuerpos que reconocen al gangliósido GT3, otras moléculas de este tipo son GM2 y GM1 (53). Han sido identificados anticuerpos contra proteínas de 37 y 52 kDa, de esta última se piensa que podría tratarse de la proteína periférica (54). Otros agentes considerados importantes para el desarrollo de la autoinmunidad en la diabetes mellitus son los virus, en donde el contacto entre virus y hospedero debe darse años o meses antes del desarrollo de la diabetes. La hipótesis considerada más factible, propone que éstos lesionan a las células β provocando una reacción autoinmune en personas susceptibles. Uno de los virus implicados es el coxsackie B4, al parecer debido a que la DAG muestra una región homóloga con una proteína del virus coxsackie (55). La infección por rubéola provoca respuesta inmune sobre los islotes pancreáticos dando como resultado DMID en individuos que además posean alelos HLA de susceptibilidad (56). Otros virus asociados con la diabetes son el del sarampión y el de la encefalomiocarditis, este último es capaz de producir la destrucción selectiva de las células β y bajo ciertas condiciones iniciar un proceso autoinmune (57).

El análisis de los datos, nos permite concluir que el origen de la DMID es multifactorial.

c) Factores ambientales

Se han mencionado ya un gran número de trabajos realizados en diferentes regiones del mundo que establecen la importancia de los agentes ambientales en el desarrollo de la enfermedad (5, 14, 15). Como ejemplo están algunos químicos y toxinas capaces de provocar la aparición de la diabetes, como el raticida Vacor, ciertos nitratos (58), el aloxan (59) y la estreptozotocina (60).

La estreptozotocina (STZ) es una molécula que se usa para inducir diabetes experimental (figura 1); y que ha sido utilizada como antibiótico y agente antitumoral (61).

Su acción diabotogénica se relaciona con la alta actividad lítica selectiva que tiene por las células β del páncreas, lo que se ha comprobado en organismos de muy diferentes especies (62). Si bien, se desconoce con exactitud su sitio de acción para provocar el daño, existen dos propuestas: una de ellas se inclina por el desencadenamiento de un proceso autoinmune (63) y la otra por la inducción de la apoptosis de la célula β (64).

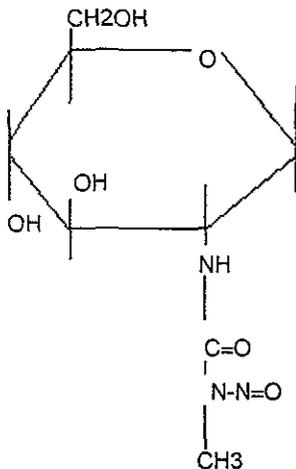


Figura 1.- Estructura química de la molécula de estreptozotocina

Manifestaciones clínicas de la DMID

En la DMID los síntomas como la poliuria, la polifagia y la polidipsia son agudos e imprevistos. La glucosa es una molécula osmóticamente activa que al estar en exceso en el filtrado glomerular sobrepasa la capacidad de reabsorción de los túbulos renales y origina la glucosuria, esta va acompañada de una excesiva pérdida de agua por orina (poliuria) que provoca la polidipsia.

La polifagia es resultado de la incapacidad de las células para utilizar la glucosa circulante en donde como efectos adicionales se observa el aumento en la utilización de los depósitos celulares de carbohidratos, grasas y proteínas (65). Con el incremento en la concentración de la glucosa sanguínea diversas proteínas se ven alteradas, una de ellas es la hemoglobina (HA1c) que sirve como agente diagnóstico, ya que esta se

glucosila y es un indicador del control, evolución y del tiempo que lleva desarrollándose la enfermedad (66).

a) Complicaciones agudas

Si no se controla el aumento en la concentración de la glucosa sanguínea, se observan diversas alteraciones metabólicas. Una de ellas es la excesiva utilización de las reservas grasas, lo que eleva la concentración de ácidos grasos libres y puede llevar a la cetoacidosis por sobreproducción de cetonas por el hígado al sobrepasar la utilización celular y la excreción renal de los cuerpos cetónicos. Los procesos cetogénicos se activan y se inicia la acidosis metabólica, en donde el sustrato son los ácidos grasos libres del tejido graso. Esta es una de las complicaciones más severas de la diabetes mellitus, originalmente se consideraba privativa de la DMID pero puede presentarse también en la DMNID. En nuestro país se cuenta con muy poca información epidemiológica y clínica de esta alteración (67). En un estudio retrospectivo realizado de 1987 a 1993, se encontró que la cetoacidosis es más común en los grupos de comienzo tardío de la DMID, mientras que en el grupo de comienzo temprano con DMNID, el principal factor que promueve la cetoacidosis son las infecciones del tracto urinario. La presencia de esta alteración en los pacientes se atribuye a un inadecuado control metabólico, a la falta de información adecuada del paciente, a no sujetarse a la terapia de insulina o a la dieta (68), por lo que es importante implementar un programa que aporte información para el adecuado manejo de los pacientes en nuestro país.

Otra complicación aguda que puede presentarse es la hipoglucemia, la que se caracteriza por dolor de cabeza, taquicardia, ansiedad, sudoración, constricción de vasos sanguíneos y coma.

b) Complicaciones crónicas

Si la diabetes no se controla y la concentración de glucosa sanguínea se mantiene elevada por mucho tiempo se presentan diversas complicaciones crónicas que van disminuyendo la calidad de vida del paciente, y de las cuales no se conoce hasta el momento su origen. La mayor parte de los estudios indican que las complicaciones más importantes de la diabetes mellitus son consecuencia de los trastornos metabólicos. La

morbilidad asociada con este padecimiento se relaciona con neuropatías, nefropatías, retinopatías, complicaciones vasculares e infecciones.

Neuropatía diabética.- Puede afectar cualquier parte del sistema nervioso, y puede tomar la forma de diversos síndromes por una lesión específica o bien ser resultado de la aterosclerosis acelerada. En esta alteración se observan 2 cambios principales: a) el engrosamiento de las paredes de los vasos sanguíneos que llegan al nervio, lo que hace suponer que la isquemia juega un papel importante y b) la desmielinización de las células de Schwann, lo que produce una conducción nerviosa deficiente. Algunas investigaciones sugieren que la formación y acumulación del sorbitol más el descenso en los niveles del mioinositol también intervienen en el daño a las células de Schwann. Algunos de los síntomas principales son: entumecimiento, parestesias, hiperestesias severas, dolor y defectos en reflejos vasomotores. Algunas de las características particulares de esta alteración se han observado en modelos de rata diabética, lo que hace comparable este tipo de estudios con los realizados en humanos (69). Otro problema del enfermo diabético son los microinfartos a nivel de sistema nervioso central, que provocan la muerte o bien la incapacidad permanente, esto ocurre en más del 60 % de los enfermos diabéticos mayores de 70 años (70). Esta alteración también es posible observarla en modelos de rata diabética con una gran semejanza a lo que ocurre en el humano (71). En la enfermedad cerebrovascular se han observado otros factores como el aumento en la concentración de la apolipoproteína E4 circulante, con descensos en la función cognoscitiva. La presencia de las alteraciones mencionadas son de alto riesgo para el paciente con diabetes mellitus, el que generalmente también presenta niveles altos de colesterol, otro factor de riesgo (72).

Nefropatía diabética.- La DMID es la causa más común de enfermedad renal terminal siendo el glomérulo el más afectado (73). La microangiopatía en general y la que involucra al riñón es la causa más común de muerte y de morbilidad en el sujeto diabético. Los principales cambios en el glomérulo son: engrosamiento de la membrana basal capilar, la esclerosis glomerular difusa o la glomerulosclerosis nodular, factores que provocan una disminución del flujo sanguíneo con una pérdida progresiva de la función renal. En las fases tempranas de la enfermedad, el tamaño renal y la tasa de filtración aumentan como consecuencia de la elevación en el flujo del plasma renal y en

la diferencia de presión capilar, se propone que este aumento promueve el paso de proteínas, desencadenando la proteinuria al lesionar el epitelio del glomérulo. Ha sido descrita además la acumulación de minerales como el hierro, que causa daño tubular en la nefropatía diabética (74). En México, el porcentaje de diabéticos con nefropatía es semejante al informado en otras partes del mundo; todo indica que es el deficiente control de la hiperglucemia lo que lleva a padecer de nefropatía, por lo cual es imperativo el desarrollo de un programa para disminuir esta complicación (75).

Retinopatías.- Son la causa más frecuente de ceguera en los diabéticos y pueden ser simples o proliferativas. En el primer caso se presentan hemorragias intrarretinianas o prerretinianas, con exudado, edema, dilataciones venosas y engrosamiento de los capilares retinianos con aparición de microaneurismas. En la retinopatía proliferativa se cursa con neovascularización y fibrosis, lo que puede provocar ceguera así como hemorragias intravítreas por ruptura de capilares. En México, el problema de la retinopatía es alarmante ya que existe una significativa proporción de enfermos sin diagnóstico y tratamiento (76), esta complicación se encuentra relacionada directamente con un pobre control metabólico y con un alto contenido de triglicéridos y colesterol en el plasma. Por lo mencionado, es de gran importancia establecer un programa de muestreo para ayudar a prevenir la pérdida de la visión debida a la retinopatía diabética, la cual puede evitarse con una adecuada atención. En diferentes modelos de rata diabética se han observado daños parecidos a los que se presentan en humanos (retinopatía, neuropatía, etc.), lo que hace al modelo muy útil para el estudio de la retinopatía derivada de la DMID (77).

Complicaciones vasculares de grandes y pequeños vasos.- Se ha demostrado que la arteriosclerosis es mucho más frecuente en la población diabética que en la no diabética; aparece tanto en enfermos con DMID como con DMNID. Menos del 5 % de sujetos mayores de 40 años que no padecen de diabetes sufren de arteriosclerosis en algún grado (de moderado a grave), mientras que el 75 % de los pacientes diabéticos tienen esta complicación (78). Entre las lesiones que se pueden presentar se citan: ulceración, calcificación, y trombosis; en esta última se estrechan u ocluyen las arterias causando lesiones isquémicas en distintos órganos. En el caso de la enfermedad arterial coronaria, se forman dilataciones por aneurismas lo que redundo en riesgo de ruptura y es

responsable de la mortalidad por infarto al miocardio, así como de daño por accidentes cerebrovasculares (79), así como del aumento en el desarrollo de gangrena en las extremidades inferiores. Alteraciones semejantes se han encontrado en ratas diabetizadas con STZ en donde se ha intentado corregirlas con compuestos como el ácido tióctico (80).

En México, se ha encontrado que un 10 % de los pacientes con diabetes sufren además de hipertensión. Un problema adicional es la hipercolesterolemia asociada con una alta presión sanguínea, de acuerdo con datos de Villalpando y colaboradores (81), esta alteración es muy común en nuestra población en donde el principal problema es el desconocimiento de su padecimiento por el sujeto.

Se desconoce el origen de las alteraciones crónicas mencionadas, pero existen tres propuestas que intentan explicarlas:

a) Deficiente oxigenación de los tejidos.- Esta teoría propone que las complicaciones aumentan en el sujeto diabético debido a una insuficiente oxigenación en los vasos sanguíneos por la inadecuada liberación del O_2 por los eritrocitos (82).

b) Vía de los polioles.- Se refiere a los mecanismos intracelulares responsables de modificar el número de grupos hidroxilo de la glucosa. El exceso de glucosa es reducido por la aldosa reductasa a sorbitol (figura 2), cuyo incremento al no poder ser eliminado rápidamente altera la función celular en los tejidos que utilizan esta vía (cristalino, riñón, nervios). Como es una molécula osmóticamente activa provoca un aumento en la entrada de agua dando como resultado la inflamación del tejido. Un efecto adicional observado, es la disminución del mioinositol y de la actividad del ATP (83).

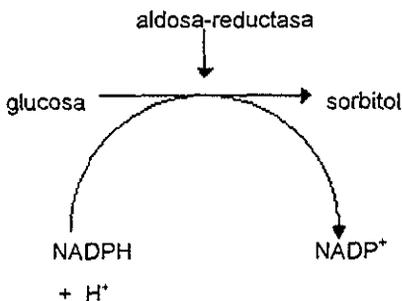


Figura 2.- Reducción de la glucosa por la enzima aldosa-reductasa

c) Glucosilación no enzimática (GNE).- La concentración aumentada de la glucosa en el sujeto diabético favorece la glucosilación anormal de las proteínas, ácidos nucleicos, etc., alterando su funcionalidad e interviniendo además en numerosas alteraciones estructurales (84).

2.1.- Glucosilación no enzimática (y compuestos AGE).

De las diferentes hipótesis existentes para explicar el origen de las alteraciones crónicas de la DM, consideramos como más importante a la glucosilación no enzimática (GNE). En este proceso, el grupo aldehído de la glucosa se une al grupo amino de las proteínas sin intervención enzimática formando una base de Schiff (reacción que es químicamente reversible); si el exceso de glucosa no se controla adecuadamente se forman productos de glucosilación temprana más estables (producto Amadori). Como en la glucosilación no enzimática es necesario un gran período de exposición de las moléculas de proteína a un medio con abundante glucosa, los productos de Amadori sufren nuevas modificaciones químicas y comienzan a interactuar con proteínas de larga vida como la colágena en tejidos intersticiales y vasculares, produciéndose finalmente lo que se conoce como productos finales de glucosilación avanzada (AGE, por sus siglas en inglés *advanced glycosylation end products*) (figura 3), los cuales son irreversibles, y poseen propiedades químicas y biológicas potencialmente patológicas como veremos a continuación.

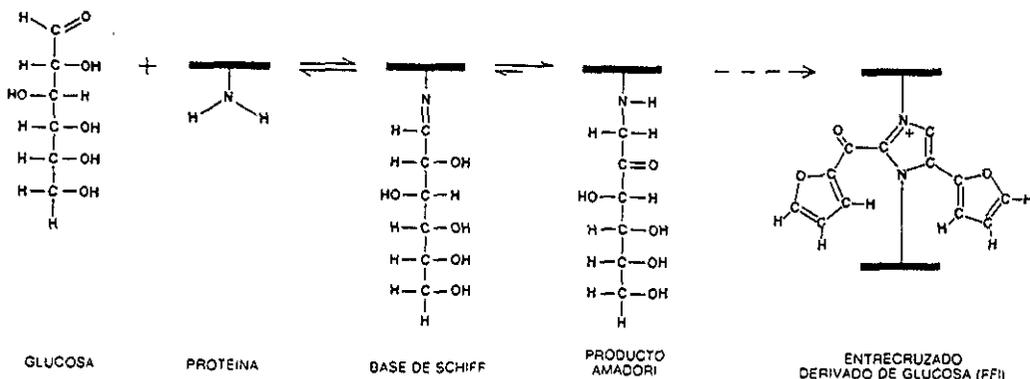


Figura 3.- Etapas de la glucosilación no enzimática. (tomado de Brownlee y cols, 1986)(124)

2.1.1.- Efectos de la glucosilación no enzimática en el riñón

Una gran cantidad de información confirma el papel patogénico de los AGE en las complicaciones renales, pues se ha demostrado que incrementan la permeabilidad vascular, el depósito de proteínas y lipoproteínas, inactivan la acción del óxido nítrico o bien exacerban la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (85). Se ha observado su acumulación en la íntima vascular de los diabéticos particularmente a lo largo de las arterias, así como en las lesiones nodulares del glomérulo utilizando anticuerpos anti-AGE (86); en el caso de la rata diabetizada, los AGE se detectan en las áreas mesangiales y en la membrana basal glomerular del riñón (87); se ha encontrado que en el humano la restauración de la función renal disminuye los niveles de AGE presentes en la piel de sujetos diabéticos (88). Los productos AGE solubles tienen una gran afinidad por el núcleo de las células del riñón, como las de la membrana basal, así como con la matriz mesangial en tejido de animales normales; esta afinidad se ve aumentada si los tejidos provienen de animales diabéticos (89). Los productos de glucosilación avanzada tienen además la capacidad de estimular la expresión de genes como el de la laminina B1 y de las colágenas tipo I y IV, cuyos productos están relacionados con la glomeruloesclerosis (90), probablemente al interactuar con su receptor en este tipo de células (91).

2.1.2.- En el ojo.

En estudios realizados *in vitro* la glucosilación no enzimática disminuye la proliferación de pericitos, e incrementa la proliferación de células endoteliales de la retina (92), alteraciones semejantes a las observadas en la retinopatía diabética del humano. Se ha encontrado además, una elevación significativa en la concentración de los productos AGE en las fases tempranas de la retinopatía diabética, que se va incrementando aún más conforme la enfermedad avanza (93). Los productos AGE son especialmente tóxicos para los pericitos lo que explica la pérdida de este tipo de células en el diabético (94); además promueven la formación de capilares acelulares en la retinopatía diabética (95). Los compuestos AGE se han relacionado con la formación de

cataratas (96) probablemente como agentes que favorecen la formación de entrecruzamientos de la colágena en la córnea del diabético (97).

2.1.3.- En el sistema nervioso

Entre las más importantes complicaciones tardías de la DMID y de la DMNID están las neuropatías periféricas, en donde la glucosilación no enzimática juega un importante papel. Se ha encontrado que las proteínas glucosiladas atraviesan con relativa facilidad la barrera hematoencefálica (98) e influyen en el desarrollo de la neuropatía. Un problema adicional del sujeto diabético es el riesgo de sufrir infartos cerebrales que pueden incapacitarlo o provocar su muerte, aspecto en donde se han visto implicados directamente los productos AGE (99). La importancia de la GNE y de la formación de los productos AGE, también se ha visto en otras alteraciones como la enfermedad de Alzheimer (100). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado su presencia en las placas seniles y en los entrecruzamientos fibrilares (101), también se ha informado de su relación con la apolipoproteína E (102). Otro padecimiento con el que se asocian los productos de glucosilación avanzada es el mal de Parkinson (103). Entre las distintas vías terapéuticas con las que se experimenta en el paciente diabético para prevenir la formación de los AGE se citan: la aminoguanidina (104), los suplementos con mio-inositol (105) y la aplicación de inhibidores de la aldosa reductasa (106), los cuales han dado resultados parciales.

2.1.4.- En el sistema inmune

La glucosilación no enzimática puede interferir en la producción o en la actividad de los diferentes elementos del sistema inmune. Por ejemplo, la glucosilación no enzimática de la lisozima y de la lactoferrina inhibe su actividad bactericida. Los productos AGE estimulan la producción de la interleucina-6 (IL-6), así como del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en monocitos, la sobreproducción de IL-6 observada ayuda a explicar el incremento en la concentración de fibrinógeno del paciente diabético (107). La formación de los AGE en conjunto con la alteración en los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LBD) y triglicéridos, alteran la funcionalidad del macrófago tanto en su

actividad como en la producción de monocinas (108). Se ha demostrado que los AGE actúan sobre este tipo de células sobreestimulando la producción del óxido nítrico de una manera dependiente de la dosis (109). Se ha encontrado en pacientes con falla renal, una asociación entre los AGE y las anomalías en su sistema inmune (110).

2.1.5.- En el sistema circulatorio (aterosclerosis)

A nivel circulatorio los productos AGE también intervienen de manera importante en la fisiopatología de la DMID y de la DMNID, ya que la aterosclerosis (complicación tardía), se desarrolla más rápidamente en el enfermo diabético. Trabajos recientes muestran que la funcionalidad alterada del endotelio en el sujeto diabético, se debe a la interacción de los AGE con sus receptores expresados en las células endoteliales (111). Palinski y sus colaboradores (112), utilizando un anticuerpo que reconoce a los AGE, demostraron su presencia en lesiones ateroscleróticas de aorta en animales diabéticos pero no en tejido procedente de animales normales. La manera como intervienen los productos derivados de la glucosilación no enzimática en la aterosclerosis, es uniéndose a los componentes de la cubierta celular en donde se depositan y promueven la fijación de otras sustancias como las lipoproteínas de baja densidad que inician la formación del ateroma, además se incrementa el entrecruzamiento de las moléculas de colágena provocando que las arterias se vayan endureciendo y la colágena se vuelva insoluble, se inhibe además la actividad de la colagenasa (113). Kume y cols. demostraron que los AGE se acumulan en macrófagos y células de músculo liso en las lesiones ateroscleróticas de humanos (114).

2.1.6.- La glucosilación no enzimática en otros tejidos.

Los glucosilación no enzimática también se realiza en lipoproteínas (115, 116), en la β 2-microglobulina (117), y en la colágena, formándose enlaces cruzados (crosslinking) (118). Las proteínas mencionadas interactúan a su vez con proteínas del plasma y proteínas intersticiales. En los grandes vasos el atrapamiento de lipoproteínas de baja densidad (LDL) retrasa su salida de la pared vascular, y favorece el depósito de colesterol en la íntima, lo que acelera la aterogénesis; se ha observado además que la colágena glucosilada es capaz de estimular la proliferación de células musculares lisas lo que puede acelerar la macroangiopatía en el diabético (119). En los capilares (incluidos los del glomérulo), algunas proteínas plasmáticas como la albúmina se unen a la

membrana basal glucosilada y son responsables en parte del engrosamiento característico de la microangiopatía diabética; es interesante mencionar que las proteínas glucosiladas son además resistentes a la digestión proteolítica. La GNE también se lleva a cabo en los ácidos nucleicos y en sus componentes, como por ejemplo en las histonas (120). Se ha demostrado que los productos AGE son capaces de estimular la síntesis de DNA en células endoteliales (121), y de regular la tasa de transcripción en células mesangiales (122). Lo anterior se considera importante para explicar la alta tasa de malformaciones en hijos de madres diabéticas (123).

Los AGE pueden interactuar con sus receptores en monocitos, macrófagos y en las células del endotelio, provocando un aumento en la permeabilidad endotelial, en la actividad procoagulante de las células endoteliales y de los macrófagos, estimulando la proliferación y síntesis de la matriz extracelular por los fibroblastos así como por las fibras musculares lisas.

Resumiendo, los productos AGE están implicados de manera importante en:

- Formación de enlaces cruzados en las proteínas de la matriz extracelular
- Atrapando proteínas plasmáticas no glucosiladas (LDL, Ig, etc.)
- Dando resistencia a las proteínas celulares a la digestión proteolítica
- Induciendo la lipoperoxidación de los lípidos de la membrana celular
- Inactivando o activando al óxido nítrico
- Se unen a ácidos nucleicos
- Se unen a receptores de AGE en monocitos y células mesangiales
- Estimulan la migración monocitaria
- Estimulan la secreción de citocinas y factores de crecimiento
- Estimulan el aumento de la permeabilidad vascular en el glomérulo
- Estimulan la actividad procoagulante
- Estimulan la proliferación celular
- Estimulan la producción de matriz extracelular

2.2.- Inhibición de la glucosilación no enzimática

Como se ha descrito en los apartados previos, la GNE se relaciona directamente con las complicaciones crónicas de los dos tipos principales de diabetes mellitus: la DMNID y de la DMID (124), que muestran alteraciones patológicas similares. Por lo anterior se

trabaja intensamente en la búsqueda de compuestos capaces de disminuir este proceso, en donde el objetivo principal es bloquear los grupos aldehído de la glucosa o bien los grupos carbonilo que se encuentran presentes en las fases tempranas de la GNE y los cuales intervienen modificando la estructura proteínica o bien favoreciendo la formación de enlaces cruzados .

Entre los diferentes compuestos probados se cita a la aminoguanidina (AG), una hidrazina nucleofílica capaz de interactuar con los productos tempranos de la GNE impidiendo la formación de los AGE (125). Con su uso se ha observado una disminución en la formación de los enlaces cruzados en las proteínas de la pared arterial (126), en la GNE de la hemoglobina (127) y en la prevención del daño al cerebro (99), sin embargo se siguen valorando los efectos secundarios que implica su aplicación a nivel terapéutico (toxicidad y tumorigenicidad.).

Otros agentes probados son los aminoácidos como la D-lisina, que es capaz de inhibir *in vitro* la unión de la glucosa a proteínas como la albúmina (128); *in vivo* en un modelo de rata diabética se observó una disminución en la glucosilación de la hemoglobina, de las proteínas del cristalino y en las de suero (129). Sin embargo, su utilización no se considera libre de complicaciones como medio de prevención de la glucosilación no enzimática (130). La L-arginina también ha sido empleada, demostrándose que la unión de la glucosa a la colágena de tendones de cola de rata se ve disminuida, aunque se ha comprobado la formación de productos AGE al interaccionar la arginina con la glucosa *in vitro* (131).

TAURINA y GLICINA

La taurina es un aminoácido que se encuentra en un gran número de tejidos, principalmente en músculo, páncreas, bazo, riñón, leucocitos y plaquetas (132), en donde ha mostrado desempeñar diversas funciones. En estudios *in vitro* se ha visto que puede disminuir la peroxidación de lípidos, así como la producción excesiva de colágena en células mesangiales expuestas a altas concentraciones de glucosa (133, 134), es capaz de proteger de daños ocasionados a la membrana celular por radicales de oxígeno (135), y además evita el efecto antiproliferativo de la glucosa y de los productos AGE en cultivos de células mesangiales (136). Reacciona activamente con los aldehídos (137) mostrando también una gran capacidad para disminuir la nefropatía en ratas diabéticas (138).

La glicina es un aminoácido que se encuentra en todos los tejidos e interviene en múltiples reacciones metabólicas como precursor de la síntesis de proteínas, purinas, glutatión, creatinina, serina, glucosa, glucógeno, nucleótidos, etc. Se ha demostrado que su administración en soluciones de rehidratación a sujetos diabéticos con problemas diarreicos es segura (139), puede funcionar como un osmoprotector (140), y es un aminoácido que puede ser glucosilado de manera importante en las proteínas (141).

No se han realizado hasta el momento, estudios que ayuden a valorar la importancia de estos aminoácidos como agentes terapéuticos en el sujeto diabético, por lo que este estudio se enfocó a valorar el daño que se produce en los tres principales niveles en el organismo diabético: el bioquímico, el histopatológico y el neurológico en un modelo de rata diabética insulino dependiente analizando los efectos cuando se administraron a los aminoácidos taurina o glicina.

3.0.- HIPÓTESIS

Las alteraciones metabólicas y crónicas que se presentan en la diabetes mellitus tienen su origen en la hiperglucemia, ya que la unión de la glucosa excedente con los grupos amino de las proteínas circulantes y celulares (glucosilación no enzimática), alteran su funcionamiento. Al administrar glicina o taurina, estos aminoácidos interactuarán con el exceso de glucosa disminuyendo la glucosilación no enzimática, evitando de esta manera la aparición de las alteraciones metabólicas y crónicas que se presentan en la DM.

4.0.- OBJETIVO GENERAL

- Valorar el daño a nivel bioquímico, neurológico y histopatológico en un modelo de rata diabética insulino dependiente en presencia y ausencia de los aminoácidos glicina o taurina.

4.1.- Objetivos particulares:

- Estudiar el daño neurológico en un modelo experimental, comparando los patrones de expresión de ácido siálico en el cerebro de ratas diabéticas usando diferentes lectinas.
- Analizar los principales parámetros bioquímicos que se ven alterados en la diabetes mellitus en los diferentes grupos experimentales.
- Comparar el estado anatomopatológico de los principales órganos afectados en la diabetes mellitus en los distintos grupos de estudio, después de 6 meses de tratamiento con los aminoácidos glicina o taurina.

5.0.- MATERIAL Y MÉTODOS:

5.1.- Selección de los animales y formación de los grupos experimentales.- Se utilizaron 40 ratas macho Wistar de 2 meses de edad, con un peso promedio de 253.3 ± 45.9 gr, de las que se obtuvieron dos muestras de 1 ml de sangre por punción de la vena caudal; una de las muestras fue heparinizada y utilizada para determinar la concentración de hemoglobina glucosilada; la otra muestra no se heparinizó y se centrifugó a 1700 rpm durante 15 min para obtener el suero, en donde se determinó la concentración inicial de glucosa. Simultáneamente se valoró la presencia de glucosa en orina.

Los animales no inducidos y los inducidos a la DMID fueron distribuidos al azar en 4 grupos experimentales, quedando de la siguiente manera:

- a) Grupo control (RN).- 10 animales
- b) Grupo diabético sin tratamiento (RST).- 10 animales
- c) Grupo diabético con glicina (RCG).- 10 animales
- d) Grupo diabético con taurina (RCT).- 10 animales

Todos los grupos experimentales recibieron la misma alimentación y estuvieron bajo las mismas condiciones ambientales durante el experimento.

5.2.- Proceso de diabetización.- Se les administró una dosis única de 50 mg/kg de peso por vía intramuscular de estreptozotocina (Sigma, St. Louis Mo., USA.) (STZ) disuelta en agua estéril (pH= 5.0) (60). En el grupo control se administró únicamente el vehículo. A los 7 días se comprobó la diabetización de los animales determinando la presencia de glucosa en sangre (> 200 mg/dl) y en orina.

5.3.- Administración de los aminoácidos.- Se probaron distintas concentraciones de los aminoácidos antes de iniciar su administración, encontrándose problemas como la presencia de diarrea en los animales que recibieron concentraciones elevadas de glicina y de taurina. Finalmente se encontró que usando la glicina al 1 % y la taurina al 0.5 % como las concentraciones más altas, los problemas mencionados desaparecieron.

Al comprobar la diabetización y la glucosuria, se inició la administración con los aminoácidos glicina (1 % p/v) (Hampshire Chemical, Texas USA.), y taurina (0.5 % p/v) (Sigma) diluidos en agua estéril, los que fueron tomados *ad libitum* por los animales por un período de 6 meses.

5.4.- Obtención de las muestras biológicas.- Cada 30 días, un animal perteneciente a cada uno de los grupos fue sacrificado para realizar el análisis histopatológico; se tomaron muestras de plasma y suero para determinar la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol (en suero) y de hemoglobina glucosilada (en la muestra con anticoagulante) de todos los animales. Al final del experimento (6 meses) los animales restantes fueron pesados y sacrificados para obtener muestras de sangre y de los otros órganos como se describe adelante.

Suero y plasma.- Las muestras de sangre se tomaron de la vena caudal de todos los animales cada 30 días, recolectándose 1 ml de sangre con o sin heparina según fuera el caso en tubos Eppendorf estériles. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 1700 rpm para obtener el suero y realizar las determinaciones ya mencionadas.

Orina.- También cada mes se colectó en tubos estériles una muestra de orina de todos los animales para determinar su concentración de glucosa con ayuda de tiras reactivas (Diastix, Bayer). El fundamento de esta prueba parte de la acción de la glucosa oxidasa que cataliza la formación de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por oxidación de la glucosa. Una segunda enzima (peroxidasa), cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con el yoduro de potasio (cromógeno), oxidándolo y dando como resultado un producto colorido, el cual se compara con una escala estándar proporcionada por el fabricante.

Cerebro, ojos, hígado, páncreas, aorta abdominal, riñón.- Al término del tiempo de estudio (6 meses) se anestesió a todos los animales sobrevivientes con éter y se procedió a realizar la disección para obtener los órganos mencionados, los cuales se lavaron 2 veces con solución salina fisiológica y se fijaron en formol al 10 %. Una excepción fue la aorta, ya que después de lavarse se incubó con ácido acético 0,5 M durante 2 horas a 25 °C .

Células mononucleares totales.- A los 6 meses de estudio se obtuvieron por punción cardíaca 8 ml de sangre total con jeringa heparinizada. La muestra se diluyó 1:4 con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) y se purificaron las células mononucleares totales (MNT) por medio de gradiente de Ficoll-Hypaque en proporción de 1:3 (Nycomed, Co.).

Ya separadas se lavaron una vez con 10 ml de medio de cultivo sin suero fetal de ternera. Se procedió finalmente a sembrar 200 000 células por pozo en medio RPMI con suero de ternera fetal al 10 % en placas de cultivo de 96 pozos, y se mantuvieron en cultivo a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas. Al término de este tiempo las células fueron estimuladas con 5 µg por pozo de Concanavalina A (Con A) o bien con 10 µg de fitohemaglutinina (PHA) por pozo durante 18 horas. Posteriormente se marcaron con 1 µCi de timidina tritiada (Amersham, Life Science) por pozo por otras 18 horas, y se colectaron en una cosechadora de células (Brandel USA). El papel filtro utilizado (Whittaker, M.A. Bioproducts) se deshidrató por 72 horas a temperatura ambiental y posteriormente se colocó en viales, en donde se le adicionaron 3 ml de líquido de centelleo; la cantidad de radiactividad se determinó en un contador de radiación beta y los resultados se expresaron en cuentas por minuto (cpm). Todos los ensayos se realizaron por triplicado,

5.5.- Medición de glucosa, triglicéridos, colesterol y hemoglobina glucosilada:

Glucosa.- Se utilizó el "kit" de Bioxon (cat. 519). Se colocaron 20 µl de agua destilada (blanco), 20 µl de suero (muestra) o bien 20 µl de una solución con una concentración conocida de glucosa en tubos estériles, más 2 ml del reactivo que contiene ortotoluidina. Se mezclaron bien y se colocaron en baño de agua hirviendo por 5 min. Posteriormente se enfrió con baño de agua y hielo por 3 minutos y se determinó la absorbancia a 630 nm (Espectrofotómetro Perkin Elmer, Lambda 11). La concentración de las muestras se determinó por la siguiente fórmula:

$$\text{Glucosa (mg/dl)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times 100$$

Triglicéridos.- Su determinación se realizó enzimáticamente en el laboratorio de análisis clínicos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, por medio del "kit" para triglicéridos de la compañía bioMérieux (catalogo 61 236), cuyo principio se basa en la separación de los triglicéridos obteniéndose glicerol más ácidos grasos; posteriormente el glicerol por medio de la glicerol-3-fosfato produce glicerol-3-fosfato, de este último producto se obtiene fosfato de dihidroxiacetona por medio de la glicerol-3-fosfato oxidasa, se adiciona ahora peróxido de hidrógeno más paraclorofenol más

amino-4-antipirina, en donde con ayuda de la enzima peroxidasa se obtiene un producto colorido.

Colesterol. La concentración se valoró en suero utilizando un "kit" (Sigma, cat. 352), el cual determina enzimáticamente la cantidad de colesterol. Se preparó el reactivo a temperatura ambiental y se colocó 1 ml por tubo, en donde se adicionó un volumen de 10 µl de agua, de muestra problema, o bien 10 µl del estándar. Se mezcló por inversión suave, incubándose durante 5 min a 37 °C. Se leyó la absorbancia a 500 nm. La concentración de colesterol se determinó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Colesterol del suero (mg/dl)} = \frac{\text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times \text{concentración del estándar}$$

Hemoglobina glucosilada.- Se utilizaron columnas de afinidad por intercambio catiónico para determinar la concentración de este tipo de hemoglobina (HELENA, cat. 5351). Cincuenta microlitros de sangre total se mezclaron perfectamente con 400 µl de solución de lisis, de aquí se tomaron 100 µl y se colocaron en la columna por 8 min. Al término de este tiempo se adicionaron 4.5 ml de la primera solución de desarrollo que eluye la hemoglobina no glucosilada, la que se recolectó en un tubo distinto al utilizado para hemolizar la muestra. Esta se llevó a 15 ml totales con agua destilada. Un tubo nuevo fue colocado en la base de la columna y se adicionaron 3 ml de la segunda solución de desarrollo que permitió la elución de la hemoglobina glucosilada. Los tubos fueron tapados y mezclados 3 veces antes de leer en un espectrofotómetro (HemmeSpec® Plus) a 415 nm. Se leyó primero la solución con la hemoglobina glucosilada y posteriormente la solución conteniendo a la hemoglobina no glucosilada, el aparato realizó automáticamente los cálculos y determinó el porcentaje total de hemoglobina glucosilada.

5.6.- Determinación de colágena.- Las muestras de la aorta después de ser lavadas con solución salina fisiológica se incubaron con ácido acético 0.5 M (Sigma) durante 2 horas a 25 °C con el objeto de solubilizar las moléculas de colágena que aún no mostraran enlaces cruzados, posteriormente el ácido fue decantado y almacenado en un recipiente. El tejido restante fue deshidratado e incubado por 72 horas con HCl 6M para extraer todas las moléculas de colágena aún presentes en éste. El mismo procedimiento

mencionado se llevó a cabo con el ácido acético almacenado. En ambos casos se eliminó el ácido clorhídrico por evaporación y se determinó el contenido de colágena por el método de Woessner (por determinación de la concentración de hidroxiprolina). Se obtuvo una curva patrón de hidroxiprolina, en donde a cada concentración de la curva así como a cada muestra problema (volumen de 100 µl), se le adicionó 1 ml de solución de cloramina T 0.05 M (Sigma, Co.) por 20 min a temperatura ambiental. En seguida se agregó 1 ml de ácido perclórico 3N (Productos Químicos Monterrey) a cada tubo, y posteriormente se adicionó 1 ml de una solución de paradimetilaminobenzaldehído al 20 % en metilcelosolve (Sigma, Co.). Las muestras fueron incubadas durante 20 min a 60 °C. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm (Perkin Elmer lambda 11). A los resultados obtenidos de la curva patrón se les realizó una regresión lineal de donde fueron estimadas las concentraciones de hidroxiprolina de las muestras experimentales. A los valores encontrados se les multiplicó por un factor de 7.5 que corresponde a la relación de hidroxiprolina existente en cada cadena de colágena para obtener la cantidad de colágena total presente en la muestra. Se expresó lo obtenido como porcentaje de colágena total del tejido (142).

5.7.- Histopatología de riñón, hígado, páncreas y ojo.- A los 6 meses (término del estudio) los animales sobrevivientes se sacrificaron y se disecaron los órganos completos de los cuales se tomaron fragmentos que fueron lavados previamente en solución salina fisiológica para posteriormente ser fijados en formol al 10%. Estas muestras fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio de Investigación en Morfología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en donde el patólogo realizó el análisis de las muestras a doble ciego.

El animal diabético presenta entre otras alteraciones: polifagia derivada de la necesidad de cubrir sus necesidades de glucosa por medio del alimento al no poder usar adecuadamente la glucosa circulante; polidipsia derivada de la deshidratación por el exceso de orina producida (poliuria) por el organismo para eliminar el exceso de glucosa sanguínea. Por estos motivos consideramos importante comparar la cantidad de alimento ingerida y la cantidad de éste desechada a través de la excretas; de manera semejante se pensó en comparar la cantidad de agua ingerida con la cantidad perdida por medio de la orina. Para realizar lo anterior, se mantuvo a los animales sobrevivientes

al término del experimento por 72 horas previas a la realización de las mediciones mencionadas en cajas metabólicas, con la finalidad de acostumbrar a los organismos a éstas. Al terminar este período de tiempo se procedió ahora a pesar la cantidad total de alimento consumido por 24 horas y se obtuvo el promedio más la desviación estándar; se siguió el mismo procedimiento con la cantidad de heces producidas a las 24 horas, el procedimiento mencionado se realizó por 2 días. El promedio de peso de las heces se dividió entre el peso promedio de alimento ingerido y se multiplicó por cien para obtener el porcentaje que representaron las heces con respecto al total de alimento ingerido. Se realizó el mismo procedimiento con respecto a la orina y a la cantidad de agua ingerida de los distintos grupos estudiados.

Hay que mencionar que se tuvo cuidado al cuantificar la cantidad de excretas para que no pudiera verse influido su peso con restos de alimento.

5.8.- Inhibición de la glucosilación no enzimática *in vitro* utilizando al aminoácido glicina. Para demostrarlo se utilizó suero total de humano, hemoglobina humana, albúmina bovina e inmunoglobulina G (IgG) humana.

Las concentraciones finales fueron las siguientes: se usaron 100 mg/dl de proteína total, glicina no marcada a una concentración de 100 mg/dl y glucosa marcada con C^{14} a una concentración final de 400 mg/dl y con una marca de 10 μ Ci/dl.

Cada una de las proteínas y el suero total, se incubaron en un tubo con glucosa marcada radiactivamente. En tubos distintos bajo las mismas condiciones, estos compuestos se incubaron además con la glicina. El tiempo de incubación fue de 72 horas a temperatura ambiental, y al finalizar se precipitó la proteína correspondiente con sulfato de amonio. Para realizar esto en el caso del suero total, se utilizó una concentración de sulfato de amonio del 90 %, para la hemoglobina se usó una concentración del 60 %, para la albúmina del 45 % y al 33 % para la IgG. El precipitado se resuspendió en 200 μ l, de donde se tomaron 100 μ l que fueron colocados en papel filtro y dejados secar a temperatura ambiental. El papel ya seco se colocó en viales en donde se adicionaron 3 ml de líquido de centelleo, se mezcló con ayuda de un vortex y se leyó en un contador de centelleo. El porcentaje de inhibición de la glucosilación no enzimática, se obtuvo al comparar las lecturas obtenidas de los tubos de proteínas incubadas con glucosa sin glicina, con las obtenidas de los tubos de proteínas incubadas con glucosa y glicina

5.9.- Histoquímica de cortes de cerebro por congelación usando lectinas.

Lista de lectinas que reconocen ácido siálico, utilizadas para el marcaje de los cortes de cerebro por congelación.

Organismo de origen de la lectina	oligosacárido reconocido
<i>Sambucus nigra</i> (SNA)	NANA (α 2,6) Gal/GalNAc
<i>Maackia amurensis</i> (MAA)	NANA(α 2,3) Gal
<i>Limulus polyphemus</i> (LPA)	NANA
<i>Machrobranchium rosebergi</i> (MR)	O-acetil-siálico

NANA.- Acido siálico o N-acetil-neuramínico

Después de ser lavado el cerebro con solución salina fisiológica, fue cubierto completamente por resina sintética tissue-tek (Miles Inc, USA) que impide la degradación del tejido por el proceso de congelación y sumergido inmediatamente después en nitrógeno líquido durante 3 minutos. Al término del tiempo se mantuvo a - 70 °C en un ultracongelador (REVCO, Inc. USA). Para el análisis con lectinas se tomaron cortes transversales de 3 mm de grosor de la parte media del cerebro (indicada con una flecha en la figura 4), abarcando los dos lóbulos cerebrales, de esta porción se realizaron cortes por congelación con un grosor de 7 μ m.

Los cortes fueron colocados en un portaobjetos, se fijaron con acetona-cloroformo (1:1 v/v) por 10 minutos, y se lavaron 2 veces con PBS-Tritón X100 (0.01 %), incubándose finalmente con suero de rata al 10 % en PBS durante 15 minutos. Se volvió a lavar de manera similar a la ya mencionada. Se incubaron con 3 μ l de lectina por 15 min y se repitió el procedimiento de lavado. Se incubó ahora con streptavidin-peroxidasa por 15 min. Nuevamente se lavó, y finalmente se reveló con diaminobenzidina (1 mg por cada 3.3 ml de PBS), hasta ver aparecer manchas de color café; en este momento se lavó la preparación con PBS-Tritón para detener la reacción. Finalmente el corte se cubrió con PBS-glicerol en proporción de 1:1.

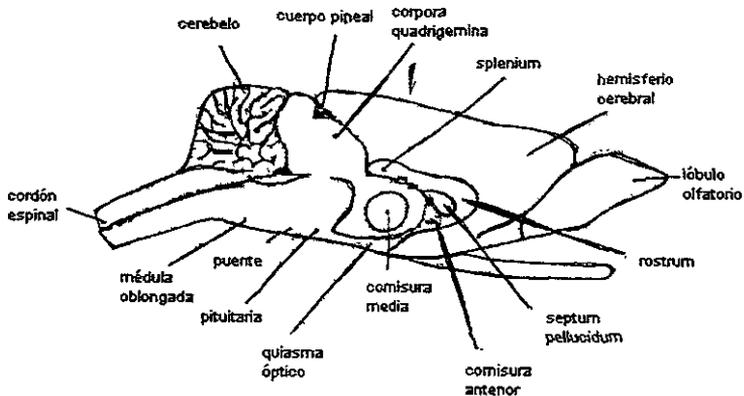


Figura 4.- Representación esquemática del cerebro de rata, en donde la flecha indica la zona estudiada en este trabajo.

Análisis estadístico.- Se realizó las pruebas de Tukey y de Dunnett en donde una $p < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa, las comparaciones se realizaron entre los animales normales vs los demás grupos ($*p \leq 0.05$), y entre los animales diabetizados sin tratamiento vs los grupos RCG y RCT ($*p \leq 0.05$).

En figuras y tablas a menos que se indique lo contrario se muestran el promedio \pm error estándar.

7.0.- RESULTADOS

7.1.-Peso y valores bioquímicos encontrados en los grupos experimentales.

Peso.- Los animales de los distintos grupos experimentales fueron pesados cada 30 días durante los 6 meses que duró el estudio, los valores obtenidos se observan en la tabla 1.

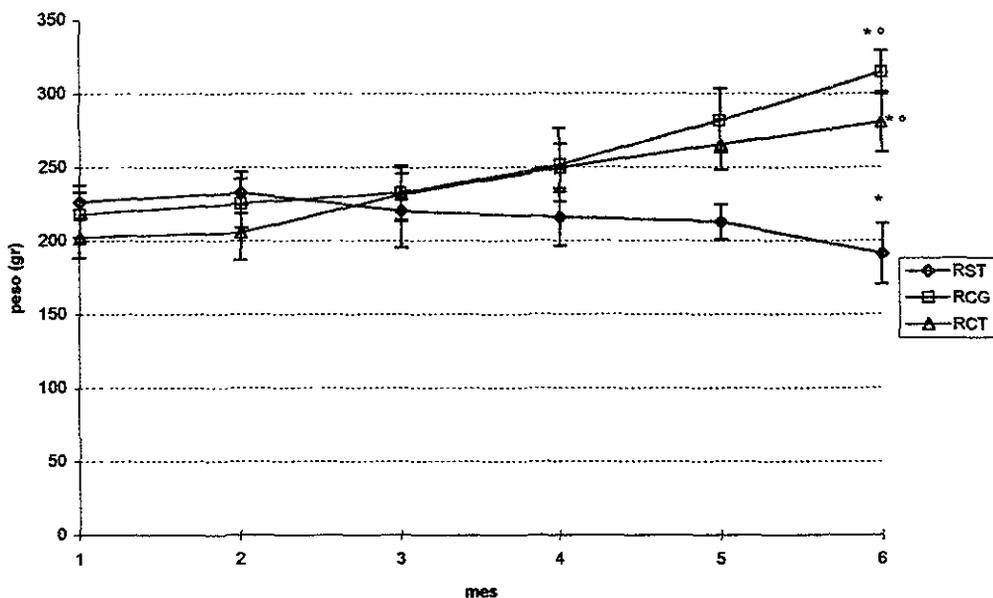
Tabla 1.- Promedio de peso (en gramos) de los animales normales y diabetizados por mes de estudio (promedio \pm error estándar).

Mes de estudio (número de animales)	Ratas normales (RN)	Ratas diabéticas sin tratamiento (RST)	Ratas diabéticas con glicina (RCG)	Ratas diabéticas con taurina (RCT)
1 (10)	357.5 \pm 16.3	226.8 \pm 11.4 *	218.0 \pm 15.4 *	202.2 \pm 13.5 *
2 (9)	420.8 \pm 18.6	232.8 \pm 14.2 *	225.7 \pm 16.5 *	205.8 \pm 18.7 *
3 (8)	540.5 \pm 9.2	220.5 \pm 25.2 *	232.8 \pm 18.4 *	231.7 \pm 18.3 *
4 (7)	583.0 \pm 7.5	216.0 \pm 19.5 *	251.6 \pm 24.9 *	249.6 \pm 16.2 *
5 (6)	623.0 \pm 10.2	212.9 \pm 11.9 *	281.7 \pm 21.7 *	265.4 \pm 17.1 *
6 (5)	643.0 \pm 16.1	191.2 \pm 20.7 *	314.4 \pm 14.7 * ^o	280.6 \pm 20.6 ** ^o

(* grupo RN vs todos los grupos $p \leq 0.01$, ^o grupo RST vs los grupos RCG y RCT $p \leq 0.01$)

En la figura 5 se muestra únicamente como se modifica el peso en los grupos diabetizados conforme transcurre el tiempo del experimento. Los animales tratados con los aminoácidos mostraron menor pérdida de peso en comparación con el grupo sin tratamiento.

Figura 5.- Variación de peso en ratas diabetizadas, tratadas y no tratadas con glicina o taurina.

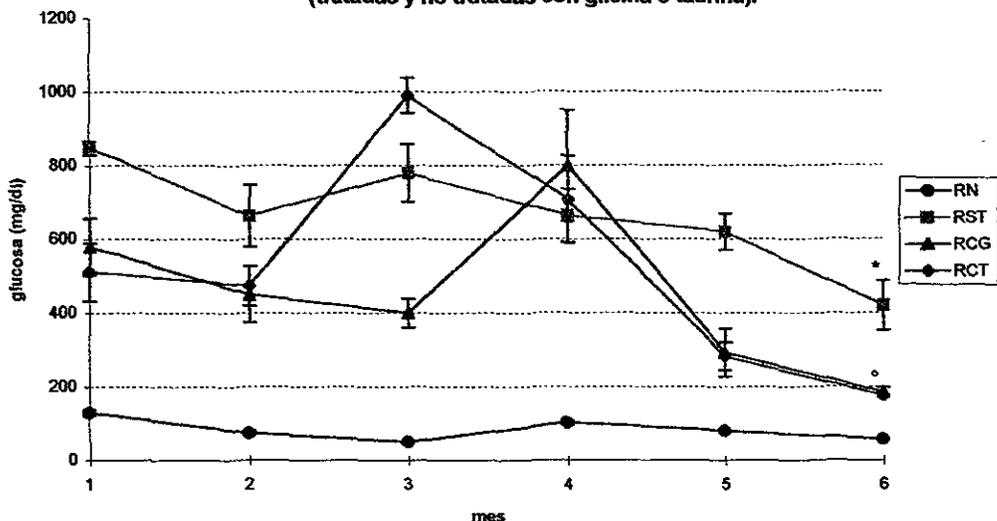


Se muestran los promedios \pm el error estándar

*; ° $p < 0.05$

Glucosa en sangre.- La concentración de glucosa en los grupos experimentales después de diabetizar pero antes de comenzar la administración de los aminoácidos fue la siguiente: el grupo RN tuvo una concentración inicial de 102.2 ± 4.5 mg/dl, en los animales diabetizados se tuvo como promedio 298.4 ± 3.3 mg/dl (antes de separarlos en los diferentes grupos). Con estas características se distribuyeron los animales al azar y se comenzó la administración de los aminoácidos (glicina 1% o taurina 0.5 %), disueltos en agua estéril y así la tomaron *ad libitum*. Las diferencias que se pueden considerar como más significativas se observaron en el sexto mes, en donde la concentración de glucosa de los animales tratados con glicina o taurina (185.0 ± 12 y 175.2 ± 1.8 mg/dl respectivamente) estuvieron por abajo de la mitad de la concentración mostrada en el grupo RST (420.0 ± 67 mg/dl).

Figura 6.- Concentración de glucosa en sangre de ratas normales y diabetizadas (tratadas y no tratadas con glicina o taurina).



Se muestran los promedios \pm el error estándar

*. ° $p < 0.05$

Glucosa en orina.- Si bien la cantidad de glucosa en orina no se considera un factor clínico confiable por los altibajos que se encuentran comúnmente al determinarla, es un buen marcador para determinar alteraciones en la absorción de la glucosa en el riñón. En la tabla número 2, se puede observar que las ratas del grupo RN nunca mostraron eliminación de glucosa, mientras que en los grupos restantes se determinó gran concentración en orina. A pesar de que el análisis estadístico solo encontró diferencias en los primeros meses, en los animales sin tratamiento existió siempre una mayor cantidad de glucosa, en contraparte a los animales en donde se administró como suplemento a los aminoácidos glicina y taurina mostraron menor eliminación de este carbohidrato por orina.

Tabla 2.- Concentración de glucosa en orina en mg/dl en los animales normales y diabetizados sin y con tratamiento. Promedios mensuales \pm error estándar

Mes de estudio (número de animales)	RN	RST	RCG	RCT
1 (10)	0.0	891.6 \pm 132.8	550.0 \pm 79	800.0 \pm 123.3
2 (9)	0.0	1177.0 \pm 228.6	256.6 \pm 67.98 °	593.7 \pm 117.3 °
3 (8)	0.0	1500.0 \pm 188.7	506.2 \pm 53 °	221.4 \pm 50.89 °
4 (7)	0.0	1042.8 \pm 187.5	800.0 \pm 151.1	708.0 \pm 118.6
5 (6)	0.0	1500.0 \pm 223.3	950.0 \pm 253.1	750.0 \pm 114.3
6 (5)	0.0	1200.0 \pm 160.9	630.0 \pm 183.3	825.0 \pm 156.5

(°p \leq 0.01)

Hemoglobina glucosilada.- Inicialmente el valor porcentual promedio de hemoglobina glucosilada fue de $2.9 \pm 0.01\%$. Al primer mes, no existieron diferencias en la cantidad de hemoglobina glucosilada en los grupos RST, RCG y RCT. Al término de 6 meses en el grupo normal se obtuvo una concentración de $3.2 \pm 0.26\%$ de hemoglobina glucosilada, en el grupo RST fue de 7.2 ± 0.2 , y en los animales tratados con glicina o taurina fue de 5.6 ± 0.3 y de $5.5 \pm 0.2\%$ respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas por lo que podemos decir que estos aminoácidos influyeron en la glucosilación no enzimática de la hemoglobina en los organismos a los cuales se administraron (tabla 3).

Tabla 3.- Porcentaje de hemoglobina glucosilada en las ratas normales, diabetizadas sin tratamiento, y en las diabetizadas que recibieron como suplemento a la glicina o a la taurina. Resultados del primero, tercero y sexto mes de estudio.

Mes de estudio (número de animales)	RN	RST	RCG	RCT
1 (10)	2.9 ± 0.03	3.5 ± 0.6	3.15 ± 0.44	2.9 ± 0.6
3 (8)	2.6 ± 0.03	8.5 ± 0.05 *	5.5 ± 0.08 **°	8.0 ± 0.07 **°
6 (5)	3.2 ± 0.2	7.2 ± 0.26 *	5.6 ± 0.3 **°	5.5 ± 0.2 **°

Promedio ± error estándar. (* p ≤ 0.01, ° p ≤ 0.01)

Colesterol.- A los tres meses del estudio la concentración de colesterol del grupo RST se encontró ligeramente por encima de la mostrada por los demás grupos (tabla 4). Al final del trabajo en las ratas RN se tuvo una concentración de 216.7 ± 17.8, en las RST 330.8 ± 21.0, en las RCG 194.6 ± 11.6 y en las RCT 243.7 ± 20.1 mg/dl. No existieron diferencias estadísticas significativas al comparar a los grupos RN, RCG y RCT entre sí; donde sí existieron diferencias estadísticas fue en la comparación realizada entre los grupos RCG y RCT con respecto a los animales pertenecientes al grupo RST.

Tabla 4.- Niveles de colesterol en mg/dl (promedio ± error estándar) en cada uno de los grupos experimentales al primero, tercero y sexto mes de seguimiento

Mes de estudio (número de animales)	RN	RST	RCG	RCT
1 (10)	133.9 ± 2.7	147.6 ± 3.28	152.0 ± 4.0	154.0 ± 5.3
3 (8)	95.0 ± 4.6	130.0 ± 7.4 *	110.0 ± 5.3	100.0 ± 3.8 *
6 (5)	216.7 ± 17.8	330.8 ± 21.0 *	194.6 ± 21.0 °	243.7 ± 20.1 **°

(* p ≤ 0.05, ° p ≤ 0.01)

Concentración de triglicéridos.- Al primer mes de tratamiento en los animales RCG y RCT se observaron concentraciones relativamente más elevadas de triglicéridos. Los datos obtenidos para RST son muy semejantes a los encontrados en el grupo RN, en donde no existieron diferencias significativas entre estos dos grupos. No sucede así a los 3 meses en donde la concentración del grupo RST y del RCT se elevan de manera significativa, mientras que los grupos RN y el RCG muestran valores muy semejantes (no existieron diferencias significativas). Al término del estudio en los grupos RN, RCG y RCT la concentración de triglicéridos fue claramente inferior a la mostrada por los animales del grupo RST, el análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Tabla 5.- Concentración de triglicéridos en el suero de los animales normales, diabetizados sin tratamiento y diabetizados con suplemento de glicina o taurina. Resultados del primero, tercero y sexto mes de estudio (mg/dl).

Mes de estudio (número de animales)	RN	RST	RCG	RCT
1 (10)	49.2 ± 3.3	57.9 ± 8.1	96.6 ± 10.9	87.5 ± 9.07
3 (8)	220.0 ± 6.3	1100.0 ± 81.3*	290.0 ± 11.6 °	1000.0 ± 63.6 *
6 (5)	131.7 ± 10.2	1025.6 ± 58.1*	133.3 ± 12.9 **°	142.2 ± 7.1 °

(promedio ± error estándar) (* $p \leq 0.05$, ° $p \leq 0.05$)

Estimulación de células mononucleares totales (MNT).- A los seis meses de tratamiento los animales fueron sacrificados y se purificaron las MNT, las cuales se estimularon con las lectinas: concanavalina A (Con A) y fitohemaglutinina (PHA). Como podemos observar en la tabla 6, la capacidad de respuesta de las células obtenidas de los animales pertenecientes a RST mostraron menor capacidad de respuesta ante los dos diferentes estímulos mitogénicos que las pertenecientes a RCG y RCT. Es importante enfatizar que la mayor respuesta al estímulo fue observada en las células MNT provenientes del grupo RCG (semejante a la respuesta obtenida en el grupo RN), en seguida fueron las MNT del grupo RCT y finalmente las de los animales pertenecientes a RST. Si tomamos en cuenta los índices de estimulación se observa que mientras las

MNT del grupo RST no tuvieron respuesta ante el estímulo mitogénico, los animales diabetizados tratados con glicina y taurina además de incorporar mayor cantidad de timidina, presentaron índices de estimulación casi del doble con respecto a la basal (incorporación de timidina de las células no estimuladas), aunque es importante hacer notar que las células provenientes de las ratas del grupo RN tuvieron entre 4 y 5 índices de respuesta a la estimulación con respecto a la basal. El análisis entre el grupo RST con respecto a los grupos RCG y RCT sí mostró diferencias significativas.

Tabla 6.- Incorporación de timidina tritiada expresada en CPM en células mononucleares totales estimuladas con mitógenos, procedentes de los animales normales y de los animales diabetizadas sin y con suplemento de aminoácidos.

	RN (I.E)	RST(I.E)	RCG(I.E)	RCT(I.E)
Actividad Basal	4080 ± 557 (1.0)	1842 ± 205 (1.0)*	7100 ± 290 (1.0) *	3100 ± 226 (1.0) *
ConA	17256 ± 368 (4.2)	1876 ± 241 (1.0)*	13080 ± 2191(1.8)*,°	7152 ± 1296(2.3)*
PHA	21158 ± 1160 (5.1)	2020 ± 279 (1.0)*	14150 ± 612 (1.9)*,°	5980 ± 1073 (1.9)*,°

(promedio ± error estándar) (* p≤ 0.05, °p≤ 0.05)

n= 5 animales por grupo, cpm= cuentas por minuto, I.E= índice de estimulación

7.2.- Resultados del análisis histopatológico.

Cada 30 días un animal de cada grupo fue seleccionado al azar y sacrificado para buscar probables diferencias en el grado de daño histopatológico en los principales órganos afectados en la diabetes mellitus sólo se encontraron diferencias significativas en este aspecto hasta el sexto mes del estudio y son los resultados que se presentan en las siguientes tablas y fotografías..

En riñón.- A nivel de glomérulo se observó glomerulosclerosis en todos los grupos de animales diabetizados; sin embargo se observó un aspecto interesante en relación al engrosamiento de la membrana basal glomerular, ya que se encontró un mayor grado de engrosamiento en la membrana basal de los animales no tratados con los aminoácidos (figuras 7, 8, 9 y 10).

Con respecto al grado de tubulonefrosis valorado en los grupos estudiados, se obtuvieron los resultados que podemos visualizar en la siguiente tabla.

Tabla 7.- Nivel de tubulonefrosis en riñón de ratas normales y ratas diabetizadas suplementadas con los aminoácidos glicina o taurina a los 6 meses de estudio.

No. de animal	RN	RST	RCG	RCT
1	0	1	1	1
2	0	1	1-2	1
3	0	1	1	1
4	0	1-2	1	1
5	0	1-2	1-2	1

Grado de daño: 0= ausente, 1= leve o escaso, 2= moderado, 3= grave o abundante
n= 5 animales por grupo

La tubulonefrosis se evaluó en los grupos normales como en los diabetizados, y se consideraron 4 niveles de daño, como los datos indican no se tuvieron diferencias significativas en los grupos de animales diabetizados, aunque podría mencionarse la presencia de la alteración de manera similar entre los grupos RST y RCG.



Figura 7.- Glomérulo de una rata diabetizada sin tratamiento. Como se puede observar existe una gran proporción de membrana basal glomerular teñida (mb), así como de membrana basal capsular (bc). Tinción metenamina de Jones (aumento 100 X).

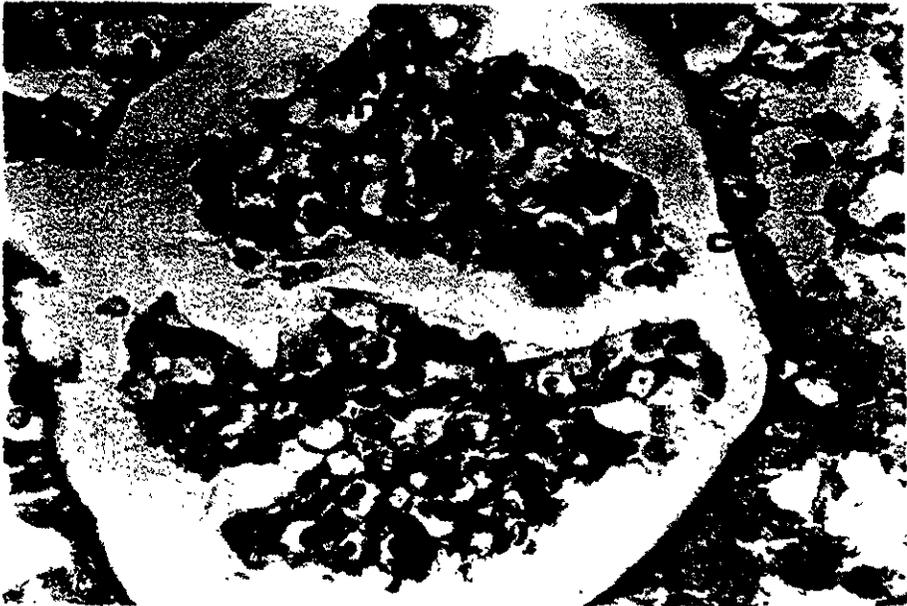


Figura 8.- Glomérulo de una rata diabética tratada con glicina durante 6 meses. Si comparamos con la figura anterior podemos observar que existe un menor porcentaje de mb teñida al utilizar metenamina de Jones (100 X). c: membrana basal capsular.



Figura 9.- Glomérulo de rata diabética tratada con taurina durante 6 meses. En el glomérulo de los animales que recibieron como suplemento a la taurina se encontró una menor expresión de membrana basal glomerular (mb), de manera semejante a lo encontrado en los animales que recibieron glicina (100 X)

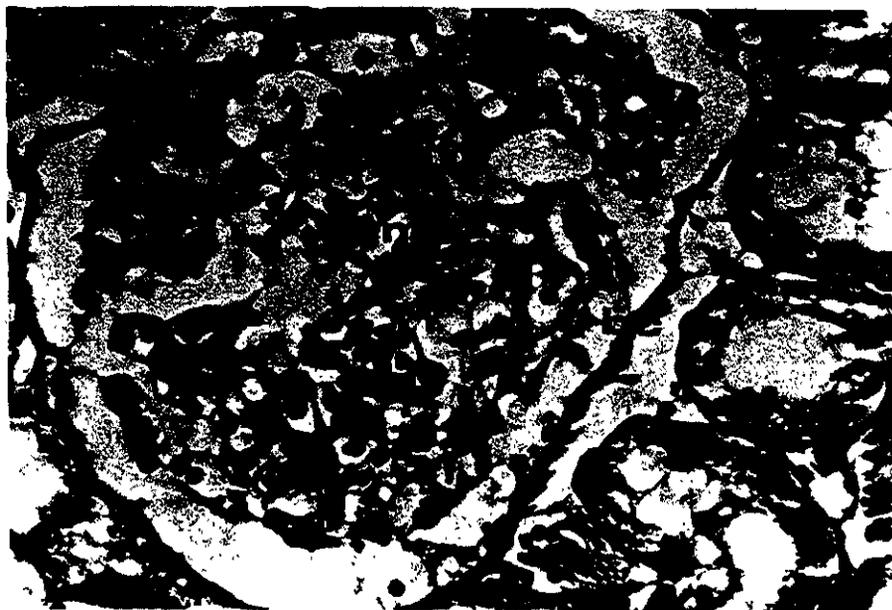


Figura 10.- Glomérulo de rata normal. Si se compara esta figura con las anteriores, podemos mencionar que la tinción de la mb es similar entre los animales normales y los diabéticos tratados con glicina o con taurina (tinción metenamina de Jones, aumento 100 X).

En la tabla 7a se muestran los resultados obtenidos al mantener a los animales en cajas metabólicas.

Tabla 7a.- Porcentaje obtenido al comparar la cantidad de excretas producidas con respecto al total de alimento tomado por cada animal, así como de la orina producida con respecto al agua ingerida (promedio \pm error estándar).

Grupo	gr.excretas/gr.alimento	Vol.orina/vol.de agua
RN	39.6 \pm 9.7 %	52.0 \pm 6.4 %
RST	64.0 \pm 3.4 % *	101.1 \pm 14.4 % *
RCG	44.7 \pm 4.1 % °	76.4 \pm 0.9 %
RCT	46.5 \pm 0.5 % °	79.4 \pm 1.08 %

Se muestran los resultados promedio de las mediciones realizadas a los seis meses de estudio y llevadas a cabo por 2 días, cada 24 horas (* $p \leq 0.05$, ° $p \leq 0.05$).

Valoración de la infiltración de glucógeno en el riñón.- En la infiltración de glucógeno encontramos a las células de Armani-Ebstein con gotas de glucógeno derivadas directamente de la elevada glucemia, por lo tanto es una lesión reversible con un adecuado control de los niveles de glucosa sanguínea en el organismo diabético. En la tabla 8 se muestran los resultados encontrados en los animales estudiados. Los animales sin tratamiento fueron los que presentaron a mayor escala este tipo de daño, les sigue el grupo RCT y finalmente el grupo RCG. Se puede mencionar que los resultados obtenidos en este último grupo son parecidos a los del grupo de animales normales, lo cual podría indicar que la regulación de la concentración de glucosa en el animal diabético disminuye la infiltración de glucógeno en el riñón, esto se demostró en los animales tratados con glicina.

Tabla 8.- Resultados del estudio de la Infiltración por glucógeno en el riñón de ratas normales, diabetizadas sin tratamiento y ratas diabetizadas tratadas con los aminoácidos glicina o taurina. Tiempo de tratamiento de 6 meses.

No. de animal	RN	RST	RCG	RCT
1	1	2-3	2	1
2	0	3	1	2
3	1	2-3	1	2
4	0-1	3	1	2-3
5	0	3	1	1

Presencia de daño: 0= ausente, 1= leve o escaso, 2= moderado, 3= grave o severo
n= 5 animales por grupo

Alteraciones en hígado.- En la tabla 9 se muestran los resultados del análisis histopatológico realizado al hígado. Se reportan seis alteraciones en donde solo la presencia de glucógeno se puede considerar como representativa del diabético. En los hepatocitos de los 5 animales que conformaron el grupo RCG se encontró la modificación, en 3 animales del grupo RCT, en 2 individuos pertenecientes al grupo RN, y curiosamente en ninguno de los animales pertenecientes al grupo sin tratamiento que es en donde se esperaría un mayor daño.

Tabla 9.- Alteraciones histopatológicas encontradas en el hígado de los animales pertenecientes al grupo testigo, diabetizados sin tratamiento y diabetizados tratados con los aminoácidos a los 6 meses de estudio (número de animales con la alteración entre paréntesis).

Alteración observada \ Grupo	RN	RST	RCG	RCT
Necrosis mesozonal leve	NO	NO	SI (1)	NO
Hepatocitos levemente positivos a glucógeno	SI (2)	NO	SI (5)	SI (3)
Hepatocitos sin glucógeno	SI (3)	SI (5)	NO	SI (2)
Lipidosis de gota gruesa	NO	SI (2)	NO	NO
Congestión portal con datos de hipoxia	NO	SI (1)	NO	NO
Hiperplasia focal	NO	SI (1)	NO	NO

Páncreas.- En el tejido del páncreas se encontraron 11 alteraciones, sin embargo, no existieron datos que marcaran alguna diferencia fundamental entre los distintos grupos. Un aspecto interesante observado, es la presencia de regeneración del páncreas exócrino en algunos individuos pertenecientes a los grupos RCG y RCT, característica que no se encontró en el grupo RST.

Tabla 10.- Cambios patológicos encontrados en el páncreas de animales normales y diabetizados (número de animales que muestran la alteración entre paréntesis) a los seis meses de estudio.

Grupo Alteración observada	RN	RST	RCG	RCT
Disminución en el número y tamaño de los islotes	NO	SI (5)	SI (5)	SI (5)
Regeneración de páncreas exócrino	NO	NO	SI (2)	SI (2)
Células binucleadas	NO	NO	SI (3)	NO
Hiperplasia de conductillos en porción exócrina	NO	NO	SI (1)	SI (1)
Sin cambio aparente	SI (5)	NO	NO	NO
Porción endocrina atrófica	NO	SI (2)	NO	NO
Insulinitis	SI (1)	NO	NO	NO
Infiltrado inflamatorio mononuclear en grado leve	SI (1)	NO	NO	NO
Vacuolas en porción exócrina	SI (1)	NO	NO	NO
Porción exócrina degenerada	NO	SI (1)	NO	SI (1)

n= 5 animales por grupo

En el ojo se valoraron dos alteraciones, la presencia de opacidad (leucocoria) la cual se visualiza como una masa blanca dentro del globo ocular que varía en densidad de acuerdo a la gravedad del daño, y la presencia de microaneurismas. Se encontró que en el grupo de ratas normales 4 de ellas no mostraron alteración y únicamente 1 animal presentó leucocoria en grado leve. En el grupo RST, 2 ratas tuvieron la alteración en grado leve y 3 en grado moderado. En los animales del grupo RCG, tres ratas no

mostraron la alteración, 1 la presentó en grado leve y una en grado moderado. Con respecto a los animales del grupo RCT, en tres individuos se encontró opacidad en grado leve y dos la presentaron en grado moderado.

Con respecto a la presencia de microaneurismas se encontraron principalmente en los animales diabéticos de los grupos sin tratamiento y tratados con taurina.

--

Tabla 11.- Presencia de leucocoria y de microaneurismas en los ojos de animales normales, y diabetizados sin y con administración de los aminoácidos glicina o taurina.

Grupo Alteración	RN	RST	RCG	RCT
Opacidad del ojo	sin opacidad (4) y leve (1)	leve (2) y moderado (3)	sin opacidad (3), leve (1) y moderado (1)	leve (3) y moderado (2)
Microaneurismas	sin cambio (5)	presentes (4)	presentes (1)	presentes (3)

Individuos con la alteración entre paréntesis

n= 5 animales por grupo

Cólagena en Aorta.- No existieron diferencias significativas en el porcentaje de colágena soluble entre los grupos control y los grupos diabetizados, tal y como se observa en la tabla número 12.

Tabla 12.- Porcentaje de colágena soluble con respecto a colágena total en aorta abdominal de rata a los 6 meses de estudio (promedio \pm D.E).

Grupo	RN	RST	RCG	RCT
Porcentaje (%)	5.82 \pm 1.24	6.84 \pm 0.78	5.95 \pm 0.95	6.35 \pm 0.37

n= 5 animales por grupo.

8.0.- Inhibición de la glucosilación no enzimática *in vitro* utilizando glicina.- En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos al incubar suero total, albúmina, hemoglobina o inmunoglobulina G (IgG) con glucosa marcada con carbono 14, con o sin glicina.

Se observa en estos resultados que a las 72 horas hay una disminución del 20 % en la incorporación de glucosa marcada al incubar suero total con glicina, de un 30 % en el caso de la albúmina, del 54 % para la hemoglobina y finalmente de un 42 % en el caso de la IgG. Como podemos observar la incubación con glicina provoca una disminución en la unión de la glucosa con las proteínas utilizadas en este trabajo.

Tabla 13.- Inhibición de la glucosilación no enzimática en suero total, albúmina, hemoglobina e inmunoglobulina G incubadas con glucosa marcada con carbono 14 y glicina (se muestran los promedios \pm error estándar de tres experimentos).

Proteína	cpm \pm D.S	porcentaje de sulfato de amonio usado para precipitar	Porcentaje de disminución en las cpm
ST + glu	50072 \pm 826.7	90 %	
ST + glu+ gli	39958 \pm 1471 *	90 %	20 %
sin precipitar	398509		
Alb.+ glu	42286 \pm 713.6	45 %	
Alb.+ glu+ gli	29885 \pm 1470.5 *	45 %	30 %
sin precipitar	425475		
HB + glu	51103 \pm 736.1	60 %	
HB + glu + gli	23648 \pm 632.7 *	60 %	54 %
sin precipitar	416740		
IgG + glu	36834 \pm 455.5	33 %	
IgG +glu + gli	21521 \pm 326.7 *	33 %	42 %
sin precipitar	475643		

Abreviaturas: ST= suero total, Alb= albúmina, HB= hemoglobina, IgG= inmunoglobulina G, glu= glucosa, gli= glicina, cpm= cuentas por minuto.

(*proteína+glucosa vs proteína + glucosa + glicina, $p \leq 0.05$)

9.0.- Resultados de la histoquímica con lectinas.- Entre las estructuras reconocidas con las lectinas utilizadas (SNA, MAA, LPA y MR), están las meninges (figura 11), plexo coroideo (figura 12), células perivasculares (figura 13), y cuerpos neuronales (figura 14). Las estructuras mencionadas fueron reconocidas en general en todos los cerebros estudiados sin importar el grupo. Las diferencias importantes se encontraron con respecto al grado de tinción. Se observó una mayor intensidad en la tinción con las lectinas LPA y MR en los vasos de cerebros provenientes de animales no tratados con

los aminoácidos glicina o taurina (figuras 15), con respecto a los cerebros de los animales que recibieron a los aminoácidos (figuras 16 y 17). Otra diferencia encontrada es la definición de los cuerpos neuronales obtenidos con la lectina MR en cerebros provenientes de individuos normales del grupo RN, no así en los demás grupos experimentales (figura 19).

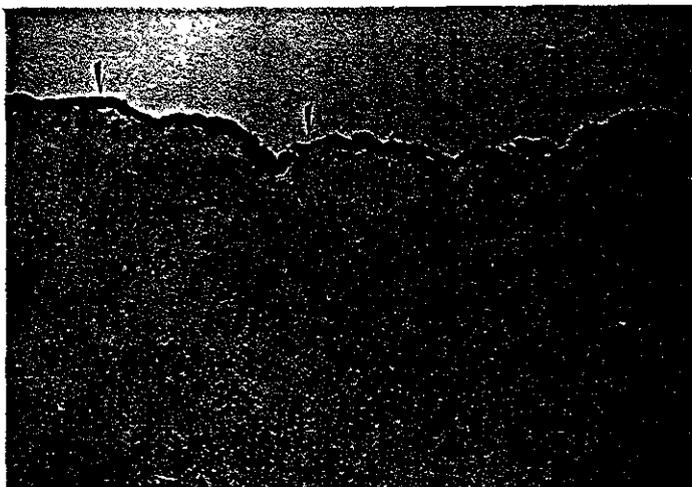


Figura 11.- Meninges. La flecha indica a las meninges teñidas al usar a las lectinas específicas para el ácido siálico (10 X).



Figura 12.- Plexo coroideo reconocido por las lectinas biotiniladas específicas para el ácido siálico (flecha, 40 X)

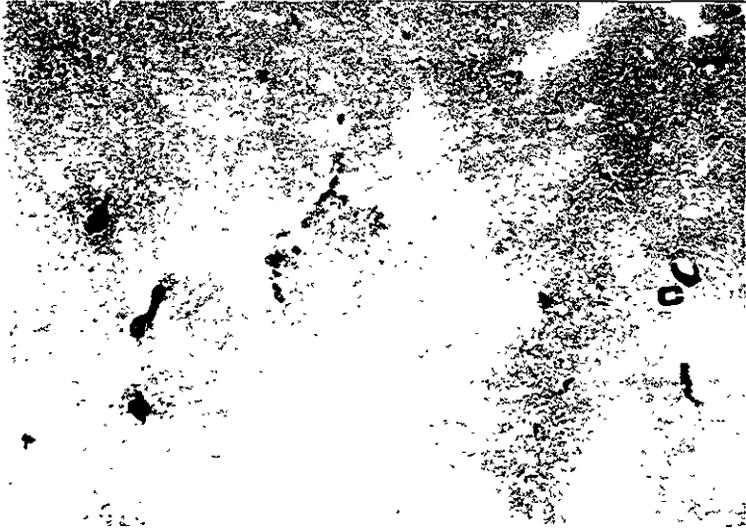


Figura 13.- Células perivasculares reconocidas por las lectinas usadas en este trabajo (letra c, 10 X).

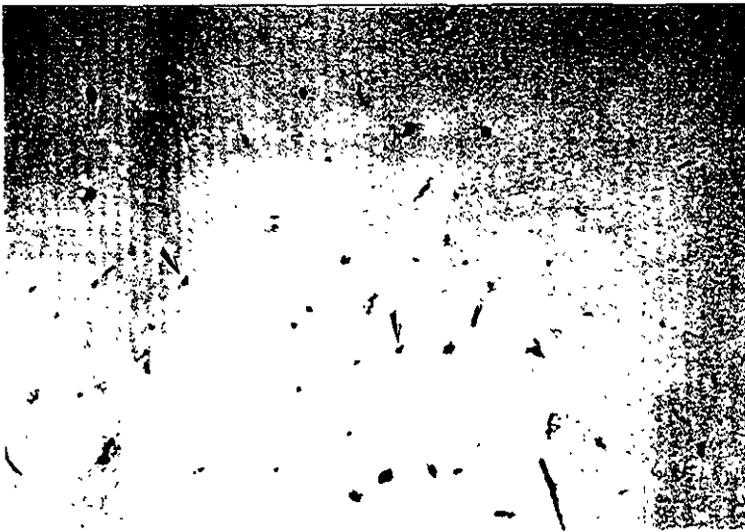


Figura 14.- Cuerpos neuronales teñidos por las lectinas específicas para ácido siálico (flecha, aumento 10 X)



Figura 15.- Vasos cerebrales de animales diabetizados sin tratamiento reconocidos por las lectinas de MR (10 X). Notese la gran extensión del vaso reconocida por las lectinas.

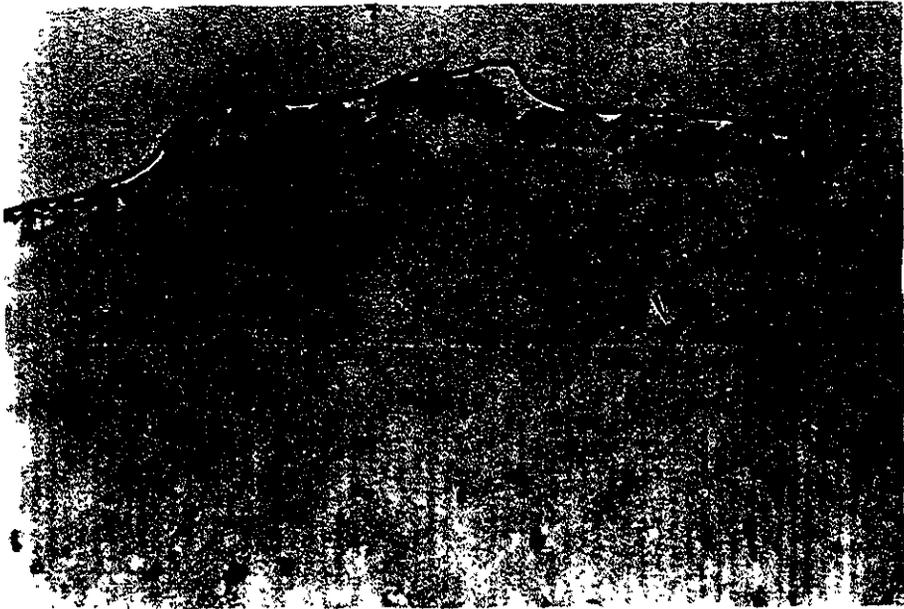


Figura 16.- Tinción de vasos de cerebro de ratas diabéticas tratadas con glicina y teñidas con las lectinas MR o LPS (10 X). Si comparamos con la figura anterior podemos darnos cuenta que es menor la extensión teñida por las lectinas.

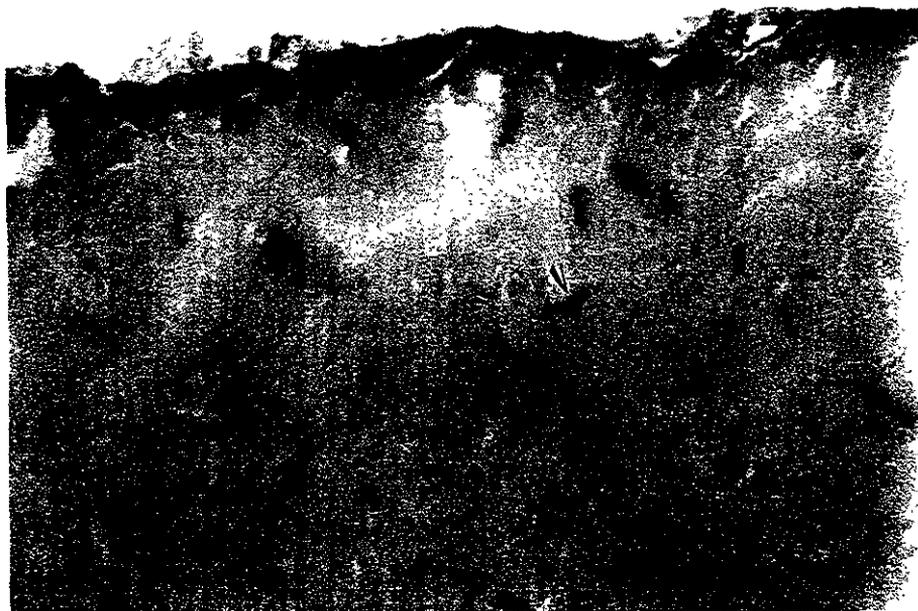


Figura 17.- Vasos sanguíneos de ratas diabetizadas suplementadas con taurina, y teñidos con las lectinas mencionados anteriormente, como podemos observar la porción reconocida es mucho menor a la observada en los vasos de animales sin tratamiento y es a su vez muy parecida a lo encontrado en las ratas diabetizadas tratadas con glicina (10 X).

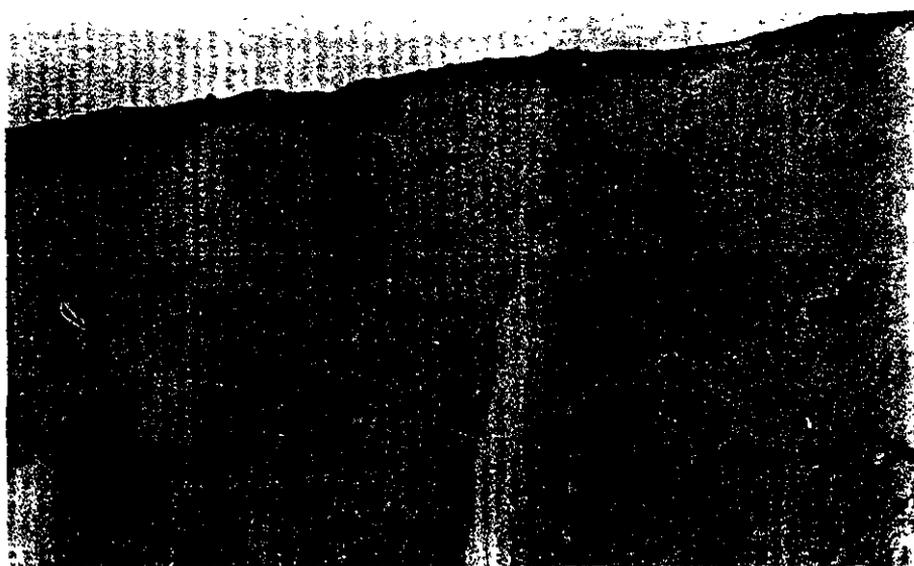


Figura 18.- Vasos de cerebros provenientes de animales normales. Al realizar la comparación con las figuras E, F y G podemos concluir que la expresión de ácido siálico O-acetilado es muy parecida entre los animales diabetizados suplementados con los aminoácidos y los animales normales (10 X).

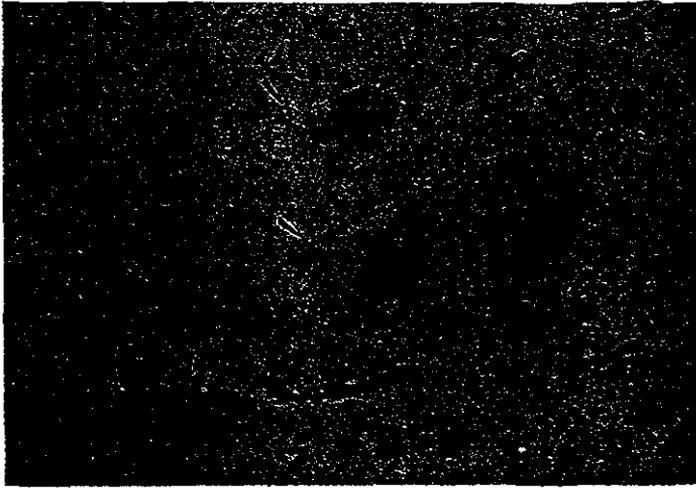


Figura 19.- Cuerpos neuronales reconocidos con la lectina de MR en cerebro de animales normales (40 X).

DISCUSION

La diabetes mellitus insulino dependiente es un desorden metabólico derivado de la alteración en la concentración y/o en la actividad de la insulina; esto tiene como consecuencia principal el incremento en la concentración de glucosa sanguínea lo que acarrea posteriormente alteraciones como el aumento en la concentración de triglicéidos, colesterol así como de lipoproteínas en el suero, observándose además un aumento en los procesos de glucosilación no enzimática de las proteínas (GNE) (72, 79, 81, 84) Una consecuencia muy importante de no controlar la concentración de glucosa en la sangre, es la formación de los productos finales de la GNE también conocidos como AGE (del inglés *advanced glycosilation end products*), los cuales están implicados de manera importante en las complicaciones crónicas de los enfermos diabéticos (85). Con la finalidad de evitar o disminuir la GNE se han probado sustancias naturales y sintéticas (guanidinas, aminoácidos, etc.), y en donde por un método de competencia por el sitio de unión con glucosa se ha logrado obtener algunos buenos resultados. En este trabajo se propone, apoyados en experimentos recientes que demuestran la capacidad de taurina para interaccionar con glucosa *in vitro* (143), a los aminoácidos taurina y al aminoácido glicina como medios para disminuir el proceso de la GNE, lo que nos permite proponer que con su administración se logrará la disminución de la GNE de las proteínas.

Una característica de la DMID es la pérdida constante de peso por la sobreutilización de las reservas de grasa del organismo, utilizadas para corregir la falta de ATP por el mal uso de la glucosa. Esta particularidad se observó principalmente en los animales del grupo sin tratamiento (RST), en donde se observó que la caída en el peso corporal se va haciendo más evidente con el transcurso del tiempo (tabla 1 y gráfica 5); en comparación en los grupos de ratas diabetizadas y tratadas con glicina (RCG) o taurina (RCT), la disminución en la masa corporal fue mayor en los primeros meses, sin embargo, este comportamiento negativo va desapareciendo llegando a ganar masa corporal los animales a partir del 5° mes, aunque sin llegar a ser como en el grupo normal (RN). Esta ganancia de peso en los animales tratados con los aminoácidos podría explicarse por la formación endógena de glucosilaminos, los cuales han demostrado tener la capacidad de actuar como anabólicos, ayudando de esta manera a incrementar el peso del animal de manera semejante a lo observado en ratas normales a

las cuales se administró experimentalmente glucosilglicina a bajas concentraciones (144). Otro aspecto interesante de los glucosilaminoácidos es su acción en el metabolismo de los lípidos tanto en ratas normales como diabéticas regulando su concentración (145). Lo mencionado, ayudaría evitando grandes alteraciones en la masa corporal del organismo. Al analizar la tabla 1, se puede sugerir que la glicina administrada muestra un efecto benéfico más claro al término del estudio en comparación con la taurina.

La característica primordial del individuo diabético tipo I es la alta concentración de glucosa, la que se regula con insulina principalmente. En este trabajo (como se observa en la figura 6) la concentración de este carbohidrato fue menor desde los primeros meses del tratamiento en los animales diabetizados y tratados con los aminoácidos, con respecto a los animales sin tratamiento; se observaron algunas excepciones en el tercer mes en el grupo RCT y en el cuarto mes para el grupo RCG, en donde se elevaron las concentraciones de glucosa. En el quinto y sexto mes los niveles de glucosa fueron claramente inferiores en los grupos que recibieron como suplemento a los aminoácidos en comparación al grupo RST ($p < 0.05$). Al cotejar los valores obtenidos del grupo normal con los de los grupos RCG y RCT, encontramos que estos últimos presentaron entre 3 y 4 veces la concentración del grupo RN, mientras que el valor promedio del grupo RST constituyó entre 7-8 veces esta concentración, es decir, con la administración de glicina o taurina disminuyó un 50 % la concentración de glucosa en relación al grupo que no tuvo ningún tratamiento adicional. Es interesante el hecho de que conforme transcurren los meses los niveles de glucosa de todos los grupos estudiados muestran una caída (sin llegar a igualarse), en donde se incluye al grupo RST, este hecho lo atribuimos a la pérdida cada vez mayor de las reservas (grasas y proteicas) de donde pueden echar mano los animales sin tratamiento para obtener energía o bien sintetizar glucosa, y no a la recuperación de las células beta del páncreas, ya que de acuerdo a lo encontrado en el estudio histopatológico, éstas ya no existían. En los animales tratados con los aminoácidos, se observó que conforme transcurre el tiempo, éstos van mostrando una menor pérdida de peso a la par de una menor concentración de glucosa. El análisis estadístico indicó que no existe diferencia entre los grupos RCT y RCG ($p < 0.05$) a partir del 5° mes, lo cual probablemente nos hable de un efecto similar de los 2 aminoácidos.

La reducción en los niveles de glucosa en los animales tratados con los aminoácidos, se puede relacionar en el caso de la taurina con su capacidad de unión al receptor de insulina, estimulándose así la captación de glucosa (146); para la glicina se ha llegado a proponer la existencia de un mecanismo semejante, uniéndose este aminoácido al mismo receptor en un sitio distinto. Se ha visto que la taurina puede potenciar la acción de la insulina (147), o bien activar un mecanismo de transporte independiente de la estimulación de la acción o de la liberación de insulina (148). Otra característica importante de la taurina es su capacidad de unión a la glucosa, inhibiendo de esta manera la GNE al impedir la interacción del grupo aldehído con el grupo amino de las proteínas (137). La taurina es además un importante antioxidante (134), capacidad que ayudaría a disminuir el daño provocado por los radicales libres que se producen en altas concentraciones de glucosa (149). Si comparamos la habilidad de la glicina y de la taurina para unirse a la glucosa se observa una gran semejanza, la taurina es capaz de interactuar de manera importante con la glucosa *in vitro* (137), y en nuestro trabajo obtuvimos valores semejantes en este aspecto para la glicina (tabla 13). Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el cual la glicina puede aminorar la concentración de glucosa circulante, pero se pueden proponer varias respuestas posibles. Una particularidad importante de este aminoácido es su afinidad por la glucosa como se comprobó en este trabajo al utilizar glucosa marcada (tabla 13), en donde se observó una reducción del 20 a más del 50 % (en las cpm) en la unión *in vitro* de glucosa con diferentes proteínas séricas al incubarlas con glicina. Otra alternativa para explicar nuestros resultados es que como glucosilaminoácido la glicina se puede utilizar por vías metabólicas alternas, capaces de influir en la concentración de glucosa circulante, vías como: la síntesis de proteínas (150), o bien por su unión a receptores como el del ácido gammaminobutírico (GABA), el cual al ser activado puede promover el transporte activo de glucosa y ayudar a regular el exceso de glucosa circulante en el enfermo diabético. En ratas normales la glicina se utiliza principalmente en la biosíntesis de componentes del organismo (151).

La administración exógena de cualquier compuesto o aminoácido (como en nuestro estudio), lleva el riesgo de traer consigo efectos secundarios de magnitud variable. En ratas normales y diabéticas se ha reportado que la administración exógena de glicina es incorporada en un bajo porcentaje (2.9 %) a la síntesis de novo de glucosa (152), lo cual descarta la probable elevación adicional de este carbohidrato al utilizar un aminoácido

glucogénico, ya que se ha observado su utilización principalmente para la síntesis de proteínas (en un 83 %) (153). Otro aspecto observado e interesante para mencionar es la disminución de varios aminoácidos (incluidos taurina y glicina) en el plasma del enfermo diabético (154); esto atenuaría el riesgo de alteraciones metabólicas (hiperglicemias por ejemplo) al suplementar a los organismos con los aminoácidos estudiados. Puntos a favor de la administración de glicina con respecto a la taurina en el individuo diabético, es la mayor cantidad de vías bioquímicas en donde la glicina puede ser utilizada, así como el menor costo y toxicidad de este aminoácido para un tratamiento a largo plazo como es necesario en el paciente diabético.

En la diabetes mal controlada, la concentración excesiva de glucosa sobrepasa la capacidad del riñón para captarla, por lo que se comienza a excretar en la orina. En todos los grupos diabetizados existió glucosuria durante el transcurso del estudio, sin embargo, fue menor la concentración excretada en los animales tratados con los aminoácidos y aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas por lo general los grupos RCG y RCT desecharon una menor concentración de glucosa por orina. Se sabe con respecto a lo mencionado, que depende principalmente de la concentración de glucosa circulante (aunque existen excepciones en el humano por la dependencia de la funcionalidad renal); por lo tanto la disminución observada en el suero probablemente es la que influye para la menor excreción por orina explicándose así la menor concentración encontrada en los animales tratados (tabla 2).

El análisis histopatológico del riñón no mostró diferencias significativas entre los animales suplementados y no suplementados con los aminoácidos, sin embargo, se observó (cualitativamente) un menor engrosamiento de la membrana basal glomerular en el riñón de los animales que recibieron como suplemento a la glicina o a la taurina (figuras 7-10). Existen antecedentes en donde se indica como una característica del animal diabético el engrosamiento paulatino de la membrana basal glomerular, por el aumento en los depósitos de lípidos y mucopolisacáridos a causa de la GNE. La unión inespecífica de la glucosa a las proteínas de la membrana basal, provoca la sobreexpresión de proteínas de la *matriz* extracelular importantes para el desarrollo de la glomerulosclerosis, como: laminina B1 y las colágenas I y IV (85, 90, 155); así, se favorece también la acumulación de lípidos y la salida inespecífica de proteínas glucosiladas y no glucosiladas como la albúmina (156).

El haber encontrado un menor engrosamiento de la membrana basal glomerular en los animales suplementados con los aminoácidos, probablemente indique una disminución de la GNE, dando como resultado una menor acumulación de lípidos y proteínas de la matriz extracelular, así como un menor efecto sobre la funcionalidad del glomérulo, lo que se puede atribuir a otros resultados de este mismo trabajo, como la disminución observada en la combinación de proteínas del suero o albúmina con glucosa marcada con carbono 14 al incubar en presencia de glicina (del 20 % al 30 %). Es relevante mencionar, que el riñón es particularmente susceptible a los efectos de la GNE por la presencia de receptores para los productos derivados de ésta (AGE) en las células mesangiales (91). Existen antecedentes que muestran la disminución de la nefropatía diabética al administrar compuestos que interaccionan con glucosa como sería por ejemplo la taurina (157). La glicina es capaz de unirse a la glucosa y además posee propiedades antioxidantes, y por lo tanto puede proteger del daño derivado de este tipo de agentes (158), si bien no se ha demostrado con anterioridad su capacidad para proteger el riñón del individuo diabético, sus características probablemente sean la explicación del menor daño observado (en la membrana basal glomerular) en los animales tratados con este aminoácido, de manera semejante a lo encontrado con la taurina.

La hemoglobina es una proteína muy susceptible de ser glucosilada en forma no enzimática (159), y se utiliza desde fines de la década de los 50' como un marcador para valorar el manejo adecuado del sujeto diabético, ya que nos indica la GNE derivada de la glucosa de los dos meses previos a la realización del estudio (160). En nuestro trabajo, durante el primer mes de estudio no se encontraron diferencias en los grupos estudiados con respecto a los animales normales, es a partir del 3^{er} mes que los valores encontrados de hemoglobina glucosilada (HBG) en el grupo RCG (5.5 ± 0.08 %), son claramente distintos a los de los grupos RST (8.5 ± 0.05 %) y RCT (8.0 ± 0.07 %) ($p < 0.05$), aún cuando no llegaron a normalizarse los valores con respecto al grupo normal (2.6 ± 0.03 %). En el último mes de estudio se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de los grupos tratados con glicina y taurina con respecto al grupo sin tratamiento, ya que mientras este último grupo tuvo un 7.2 ± 0.26 % de HBG, los animales del grupo RCG mostraron 5.6 ± 0.3 y los pertenecientes a RCT tuvieron un 5.5 ± 0.26 %; sin embargo no llegaron a igualar el valor del grupo testigo (3.2 ± 0.26 %). Se han utilizado otros aminoácidos como la L-lisina (129), o compuestos como la

aminoguanidina (127), logrando disminuir la GNE, sin embargo existen limitantes como su toxicidad, lo cual ha restringido su administración con fines terapéuticos. La capacidad de la taurina (161) y de la glicina para unirse a la glucosa puede ayudar a inhibir la GNE de la hemoglobina; los resultados de este trabajo al utilizar glucosa marcada con carbono 14 y encontrar que la presencia de glicina inhibe en más del 50 % su unión a la hemoglobina (*in vitro*) lo confirman. El análisis estadístico muestra diferencias significativas con respecto a los resultados de los animales sin tratamiento, pero no entre los grupos tratados con los dos aminoácidos estudiados, lo cual nos indica un comportamiento parecido,.

La oxidación deficiente de la glucosa en el sujeto diabético altera el metabolismo de sus grasas, ya que al no poder usar a la glucosa como fuente de energía el organismo comienza a movilizar sus reservas de lípidos con el fin de cubrir esta deficiencia. La disminución de la concentración de insulina favorece el aumento de la lipólisis con la consiguiente elevación en la concentración de ácidos grasos libres en plasma; su alta concentración satura las vías oxidativas y esterificantes dando como resultado: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hígado graso así como cetoacidosis. En nuestro estudio no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de colesterol total en el primer y tercer mes del estudio; fue hasta el sexto mes cuando los valores cambiaron de forma estadísticamente significativa entre los grupos tratados con los aminoácidos y el grupo sin tratamiento. Los triglicéridos no estuvieron alterados en el primer mes, pero en el tercer mes la concentración en el grupo tratado con glicina fue claramente diferente a las de los otros dos grupos diabetizados. Los valores obtenidos en el grupo RCG concuerdan con resultados previos (Dr. Pedro Zamudio en el INER; Dr. Guillermo Carvajal en el IPN; Dra. McCarthy en el INC. comunicación personal), en donde se logró observar un rápido efecto de la glicina en la regulación de los niveles de triglicéridos, mientras que la taurina resultó ser más lenta para ejercer un efecto similar. Al sexto mes de estudio se tuvo un comportamiento muy parecido en los grupos suplementados con los aminoácidos a pesar de ser su cinética diferente; los resultados encontrados fueron semejantes a los del grupo control. Mientras tanto, en el grupo sin tratamiento los resultados indicaron una clara hipertrigliceridemia crónica y el análisis estadístico mostró diferencias significativas. La disminución encontrada en los niveles de colesterol y triglicéridos en los grupos RCG y RCT, posiblemente no se relacionen con un solo mecanismo, y la menor concentración de glucosa (la causa inicial) encontrada

después de suplementar con los aminoácidos, probablemente favoreció la disminución de los lípidos en el plasma. Otro probable mecanismo de control es la activación por la taurina de enzimas como la 7α -hidroxilasa, enzima importante en la síntesis de ácidos biliares, favoreciéndose la reducción del colesterol; la taurina también actúa incrementando la transferencia del colesterol de los tejidos periféricos al hígado por medio del aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). También se ha descrito una mayor actividad de la lipoproteín-lipasa, con la consiguiente hidrólisis de las lipoproteínas ricas en TG dando como efecto la reducción de lípidos en el suero. En el caso de la glicina no se han reportado los mecanismos por medio de los cuales pudiera reducirse la concentración de los lípidos del suero, sin embargo, es probable que algunos sistemas enzimáticos como los mencionados puedan verse activados por la presencia del aminoácido, incluso más rápido que con la taurina esto por el efecto observado en menor tiempo.

Desde hace varios años se reportó que las células pertenecientes al sistema inmune de individuos diabéticos responden mal al estímulo con mitógenos (162), ya que se han encontrado respuestas disminuidas al estímulo con PHA, Con A y fitolaca americana (163). En general los linfocitos de pacientes diabéticos mal regulados tienen una pobre respuesta a estímulos antigénicos, y sus subpoblaciones celulares son particularmente vulnerables. Estas alteraciones desaparecen al regular la concentración de glucosa, observándose una mejoría en la respuesta a mitógenos. La respuesta parece residir en la naturaleza química de los receptores presentes en la membrana celular, los cuales son susceptibles de ser alterados por la unión de la glucosa a sus grupos amino. En la tabla 6 podemos observar una menor respuesta al estímulo por mitógenos en las células procedentes de los animales pertenecientes al grupo RST en comparación con las obtenidas de los grupos RCT y RCG. Es importante enfatizar que la mayor respuesta a los estímulos mitogénicos fue observada en el grupo tratado con glicina. En el análisis estadístico no se encontraron diferencias entre la capacidad de respuesta de las células del grupo RN y RCG estimuladas con Con A, un mitógeno capaz de activar principalmente a las células T implicadas en la citotoxicidad celular. Al estimular con PHA, mitógeno que activa a las células T (capaces de estimular a los linfocitos B implicados en la respuesta de anticuerpos), encontramos diferencias entre el grupo tratado con glicina y el control, sin embargo también existieron entre el grupo sin tratamiento y el tratado con glicina, lo cual indicaría que a pesar de no lograr que las

células obtenidas de animales tratados con glicina y estimuladas con PHA igualen el comportamiento de las células normales, si se logró una mejoría. En las células obtenidas de animales tratados con taurina la estimulación (cpm) fue menor con respecto al grupo tratado con glicina y no mostró diferencias estadísticas significativas al estimular con PHA pero si al usar Con A, esto con respecto a la estimulación celular observada en las células de los animales sin tratamiento.

La capacidad de los aminoácidos usados para inhibir la unión de la glucosa con los grupos amino de las proteínas, y la mejor respuesta a mitógenos encontrada en este trabajo en las células mononucleares de animales suplementados con los aminoácidos, reafirman su utilidad para inhibir la GNE y como consecuencia obtener una mejor respuesta del sistema inmune del enfermo diabético, el cual es muy susceptible a infecciones por patógenos oportunistas. Si observamos los resultados al utilizar Con A y PHA, comprobaremos que la respuesta celular a la presencia de los mitógenos mejora, indicando que es probable un incremento en la respuesta inmune celular y humoral en los animales diabéticos tratados con los aminoácidos.

La información del análisis histopatológico mostró que en este modelo no se impidió de manera significativa la presencia de alteraciones en los órganos, sin embargo a pesar de estos resultados se obtuvieron algunos datos interesantes. Por ejemplo, se encontró menor depósito de glucógeno en el riñón de los animales tratados con glicina, lo que nos podría indicar un mejor regulación metabólica. En el páncreas de los animales tratados con glicina o taurina se vieron además procesos de regeneración de la porción exócrina, esto probablemente indique protección por los aminoácidos ante el estrés oxidativo derivado de la diabetización con la estreptozotocina (STZ), si bien aún existen muchas dudas al respecto, se ha encontrado que la presencia de la STZ inhibe a enzimas como la superóxido dismutasa que interviene en el procesamiento de los radicales libres, que en este caso se producirían por el exceso de glucosa. Esta información junto con otros datos ya mencionados podrían sugerir una mejor regulación del metabolismo de la glucosa en el animal diabético al tratarse con los aminoácidos, principalmente con el uso de glicina, una mejoría además no dependiente de la presencia de células β ya que no existe recuperación de estas.

En el diabético están presentes la poliuria así como la polifagia, alteraciones que están implicadas en la deshidratación así como en la ingesta excesiva de alimento al no poder usar adecuadamente a la glucosa. Partiendo de estos hechos consideramos

importante determinar la relación entre la cantidad de agua ingerida contra cantidad de agua desechada por orina, así como la cantidad de alimento ingerida contra la cantidad de excretas, en los animales diabéticos suplementados y no suplementados así como en los animales control. En la tabla 7a se puede ver que las ratas del grupo RCG y RCT tuvieron una menor pérdida de líquido por la orina en comparación con el grupo RST, si bien no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la relación de agua/orina. En cuanto a la relación alimento/excretas sí se encontraron diferencias estadísticas significativas, lo que nos indica que a pesar de no tener resultados claramente diferentes existe una ligera mejoría metabólica en los animales tratados con los aminoácidos.

Otras alteraciones patológicas encontradas en el individuo diabético son la opacidad de la cornea (leucocoria) y la presencia de microaneurismas en el ojo, modificaciones derivadas de los procesos de óxido-reducción de la glucosa (produciéndose sorbitol) y del aumento en la GNE de las proteínas. En este trabajo se observó un menor grado de opacidad en los animales suplementados con glicina; en contraste en los grupos RST y RCT se encontró un mayor grado de leucocoria. Con respecto a la presencia de microaneurismas fue menor su presencia en los animales tratados con glicina, en donde existió menor daño. En el ojo, las alteraciones derivan principalmente del exceso de glucosa, ésta es reducida por la aldosa reductasa a sorbitol que es una molécula osmóticamente activa y se acumula provocando el daño característico del ojo del diabético; un papel importante también lo juega la GNE de las proteínas que puede modificar la funcionalidad de las células endoteliales y además acumularse en el globo ocular. Se ha encontrado que con la utilización de mono- y diaminoguanidinas (inhibidores de la GNE), se puede disminuir el proceso de leucocoria y la actividad de la aldosa reductasa (164). Con glicina se puede disminuir la GNE de las proteínas del cristalino y por lo tanto el daño al ojo, y además atenuar la presencia de cataratas (165). Otro dato interesante es referente a la presencia de glicina marcada con carbono 14 en el humor vítreo y en el cerebro a las 2 horas de su ingesta (datos no publicados), lo que indica la capacidad de la glicina para poder intervenir en distintas zonas del organismo e interactuar con el exceso de glucosa; en cuanto a la taurina, no existen antecedentes al respecto.

No contamos con información que nos permita relacionar a los aminoácidos utilizados con la regulación de enzimas importantes para el desarrollo de las alteraciones

presentes en el ojo del diabético como la aldosa reductasa, sin embargo, existen datos interesantes que indican la activación de esta enzima por estrés oxidativo (166), fenómeno presente en el diabético por el exceso de glucosa. Si tomamos en cuenta la actividad como antioxidantes de la taurina y la glicina, probablemente esta característica intervenga protegiendo del estrés oxidativo e indirectamente actúe inhibiendo la activación de la enzima y por lo tanto del sorbitol. Su utilidad para disminuir la concentración de glucosa circulante y por lo tanto la GNE, y su importancia en la regulación de la concentración de los lípidos del organismo, son indicio de los beneficios de su aplicación para atenuar algunas de las complicaciones a las que el diabético es susceptible.

La colágena es una proteína susceptible al igual que la hemoglobina de sufrir GNE (167), lo que afecta su solubilidad, recambio y degradación, favoreciéndose además la formación de entrecruzamientos entre diferentes haces de colágena. Estos últimos son particularmente importantes por su papel en el endurecimiento de las arterias y pequeños vasos, implicados en la micro- y macroangiopatía. Por lo anterior, consideramos importante determinar la proporción de colágena soluble con respecto a la colágena total en la aorta abdominal. En los resultados no se encontraron diferencias entre los grupos, esto se contrapone a lo reportado por otros autores, que observaron una diferencia entre la cantidad de colágena soluble con respecto a la total en ratas tratadas con aminoguanidina como inhibidor de la glucosilación no enzimática (126); los autores de este trabajo hallaron una menor cantidad de colágena soluble en animales diabetizados sin tratamiento, mientras que en los animales con el inhibidor de la GNE, se obtuvo una mayor proporción de colágena soluble. Probablemente la diferencia en los resultados esté relacionada con la técnica, sitio estudiado o bien el mecanismo por el cual se inhibe la GNE en nuestro modelo.

La relevancia de la GNE en la génesis de la microangiopatía, hizo importante analizar a nivel cerebral algún posible cambio. Esto es importante por el elevado riesgo del individuo diabético de sufrir infartos cerebrales relacionados directamente con la presencia de productos derivados de la glucosilación no enzimática (productos AGE), así como de microinfartos capaces de incapacitarlo o provocar su muerte (99). Se ha descubierto que las proteínas glucosiladas atraviesan más rápidamente la barrera hemato-encefálica acelerando de esta manera la neuropatía (98). Para buscar algún cambio utilizamos lectinas capaces de reconocer al ácido siálico, miembro de una familia

de azúcares carboxilados de 9 carbonos, que se encuentra comúnmente en todas las unidades de oligosacáridos de los vertebrados, en donde el más común es el ácido N-acetil-neuramínico, considerado el precursor de todos los demás integrantes. Este carbohidrato se encuentra en la membrana celular y es considerado como un residuo terminal de las cadenas de oligosacáridos. Existen diversos ejemplos (como el cáncer) en donde la presencia o ausencia del ácido siálico es considerada como una señal de transformación celular o de modificación postraduccional; la presencia de ácido siálico en la cubierta celular se relaciona además con la enfermedad cardiovascular, y se ha reportado que su concentración está elevada en el individuo diabético con microalbuminuria y proteinuria (168), así como en el diabético en general (169), por estas razones en este trabajo analizamos su presencia a nivel del tejido que forma la microcirculación cerebral

Se reconocieron independientemente del grupo estudiado, las siguientes estructuras con las lectinas específicas para el ácido siálico: las meninges, el plexo coroideo, las células perivasculares y los cuerpos neuronales. Trabajos realizados recientemente en cerebros de rata normal, en donde se usaron lectinas como las usadas en este estudio, reconocieron estructuras similares (170). El aspecto interesante a mencionar es el diferente grado de tinción, ya que se registró una mayor expresión de ácido siálico en los capilares de cerebros provenientes de animales sin tratamiento. Si analizamos la figura 15, podremos darnos cuenta que una mayor extensión del capilar se tiñe intensamente; no sucede así con los cerebros de animales tratados con los aminoácidos (figuras 16 y 17), en los que el grado de tinción es menor y en muchos casos semejante al observado en cerebros provenientes de animales control (18). Se logró reconocer al ácido siálico usando la lectina de *Limulus polyphemus* (LPA) que reconoce a todas las variantes del ácido siálico, y con la lectina de *Machrobranchium rosebergi* (MR) capaz de unirse solo al ácido siálico O-acetilado. El ácido siálico es importante porque influye en la carga eléctrica de la membrana, en la deformación celular y en la interacción célula-célula en el endotelio y en otros tipos celulares como los leucocitos (171). La diabetización con STZ provoca una menor expresión del ácido siálico en la membrana de hepatocitos (172), e induce la caída en la actividad de ciertas glucosiltransferasas sin afectar significativamente la actividad de las sialiltransferasas (173). En el organismo diabético la concentración normal del ácido siálico se puede ver alterada principalmente por efecto de la glucosilación no enzimática, esto se ha

observado principalmente en células endoteliales y en pericitos (174). Por los antecedentes mencionados nos damos cuenta de la existencia de muchas dudas aún con respecto al papel que juega el ácido siálico en el organismo diabético.

Es interesante el reconocimiento logrado usando la lectina de MR capaz de reconocer al ácido siálico O-acetilado. Este tipo de carbohidrato tiene una baja presencia en el cerebro normal (humano), mientras que es expresado en mayor grado comúnmente en células de origen neuroectodérmico y al parecer juega un papel importante en la migración de neuronas en el desarrollo del cerebro embrionario (175), así como en la organización y crecimiento de conos y neuritas (176). Su expresión en el cerebro de los animales diabéticos probablemente indique una modificación (transformación) en las características de las células de los capilares provocada por el exceso de glucosa. A este respecto se ha reportado que la GNE y el estrés oxidativo se consideran como el origen de las placas amiloides en el daño cerebral de la enfermedad de Alzheimer. El aumento de la edad va a la par con un incremento en la concentración del ácido siálico en diferentes tejidos, esto es interesante por considerarse a la diabetes como un envejecimiento acelerado, probablemente porque las células del anciano se van transformando y degenerando. Por otra parte, se ha descrito una mayor concentración del ácido siálico en el síndrome de desgaste por aminoácidos de excitación (aspartato y glutamato), así como en la disminución a largo plazo de la conducción neuronal. Desconocemos cual sea la función o el papel principal del ácido siálico en el cerebro de la rata diabética, sin embargo, por su importancia en los contactos célula-célula, su relevancia en el desarrollo celular, así como en los procesos de transformación celular, probablemente sea un marcador biológico para indicar el inicio de alteraciones celulares, en este caso de las células de los capilares del cerebro, modificaciones que al parecer disminuyeron al utilizar aminoácidos que inhiben la unión inespecífica de la glucosa a las proteínas, de manera análoga a otros inhibidores de la GNE (99), dando de esta manera protección a las células y tejidos del organismo.

Para finalizar podemos mencionar que los aminoácidos utilizados en este trabajo se muestran como una buena opción para ayudar a disminuir los procesos de glucosilación no enzimática, tanto por su capacidad de unión a glucosa, como por sus propiedades antioxidantes, que ayudan a proteger del daño por estrés oxidativo que se ha observado en el organismo diabético.

CONCLUSIONES

1.- La administración de los aminoácidos glicina o taurina a ratas diabetizadas, ayuda a disminuir su pérdida de peso, principalmente en los animales tratados con glicina.

2.- La glicina y la taurina intervienen en la regulación de la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre, así como en la cantidad de glucosa excretada por orina.

3.- La administración de glicina y taurina en ratas diabetizadas disminuye la glucosilación no enzimática de la hemoglobina, pero no de la colágena de aorta.

4.- Con la administración de los aminoácidos glicina y taurina, se logró mejorar la capacidad de respuesta a estímulos mitogénicos de las células mononucleares totales procedentes de animales diabéticos.

5.- Se encontró una menor infiltración de glucógeno en riñón y menor grado de leucoconia en los ojos de los animales del grupo tratado con el aminoácido glicina, así como un menor engrosamiento de la membrana basal del glomérulo en los dos grupos tratados con los aminoácidos.

6.- La glicina es capaz de inhibir la unión de la glucosa a la albúmina, hemoglobina e inmunoglobulina G, disminuyendo de esta manera la glucosilación no enzimática de las proteínas, de manera similar a lo reportado en la literatura para la taurina.

7.- Con la administración de glicina y taurina a ratas diabetizadas se observó un menor grado de expresión de ácido siálico O-acetilado a nivel del tejido de la microcirculación en el cerebro de estos animales, en comparación con los cerebros provenientes de animales sin tratamiento.

Bibliografia:

- 1.- Ackerknecht E.H. 1982. A short history of medicine. Baltimore, USA. John Hopkins University Press. pp. 24-172
- 2.- Karam J.H, Solber P.R, Forsham P.H. 1991. Pancreatic hormones and diabetes mellitus. F.S Greenspan Ed. Basic clinical endocrinology. 3rd. USA. pp. 592-650
- 3.- Mazzella M, Cotellessa M, Bonassi S, et al. 1994. Incidence of type I diabetes in the Liguria region, Italy. Results of a prospective study in a 0 to 14 years age-group. *Diabetes Care*. 17(10): 1193-6
- 4.- Schober E, Schneider U, Waldhor T, Tuomilehto J. 1995. Increasing incidence of IDDM in Austrian children. A nationwide study 1979-1993. Austrian diabetes incidence study group. *Diabetes Care*. 18(9): 1280-3
- 5.- Muntoni S, Stabilini L, Stabilini M, Mancosu G, Muntoni S. 1995. Steadily high incidence over 4 years in Sardinia. *Diabetes Care*. 18(12): 1600-1
- 6.- Tuomilehto J, Karvonen M, Padaiga Z, Tuomilehto-Wolf E, Kohtamaki K. 1996. Epidemiology of insulin-dependent diabetes mellitus around the Baltic sea. The DIABALT Study group. *Horm Metab Res*. 28(7): 340-3
- 7.- Kadiki O.A, Reddy M.R, Marzouk A.A. Incidence of insulin-dependent diabetes (IDDM) and non-insulin-dependent diabetes (NIDDM)(0-34 years at onset) in Benghazi, Libya. *Diabetes Res Clin Pract*. 32(3): 165-73
- 8.- Wang H, Shen S, Shen Y. 1996. Incidence of insulin dependent diabetes mellitus in children of Shanghai, China. *Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih*. 30(2): 74-6
- 9.- Drabo P.Y, Kabore J, Lengani A, Ilboudo P.D, 1996. Diabete sucre au Centre hospitalier national de Ougadougou (Burkina Faso). *Epidemiologie, types et manifestations cliniques*. *Bull Soc Pathol Exot*. 89(3): 185-90
- 10.- Boudraa G, Hachelaf W, Benbouabdellah M, Belkadi M, Benmansour F.Z, Touhami M. 1996. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and their first-degree relatives in West Algeria: screening with serological markers. *Acta Paediatr Suppl*. 412: 58-60
- 11 - De Vitis I, Ghirlanda G, Gasbarrini G. 1996. Prevalence of coeliac disease in type I diabetes: a multicentre study. *Acta Paediatr Suppl*. 412: 56-7
- 12.- Lloyd C.E, Kuller L.H, Ellis D, Becker D.J, Wing R.R, Orchard T.J. 1996. Coronary artery disease in IDDM. Gender differences in risk factors but not risk. *Arterioscler Thromb Vac Biol*. 16(6): 720-6

- 13.- Kemmeren J.M, Beijerinck D, Van Noord P.A, Banga J.D, Deurenberg J.J, Pameijer F.A, van Der Graaf Y. 1996. Breast arterial calcifications: association with diabetes mellitus and cardiovascular mortality. Work in progress. *Radiology*. 201(1): 75-8
- 14.- Jones M.E, Swerdlow A.J. 1996. Bias caused by migration in case-control studies of prenatal risk factors for childhood and adult diseases. *Am J Epidemiol*. 143(8): 823-31
- 15.- McKinney P.A, Law G.R, Bodansky H.J, Staines A, Williams D.R. 1996. Geographical mapping of childhood diabetes in the northern English country of Yorkshire. *Diabet Med*. 13(8): 734-40
- 16.- Green A, Sjolie A.K, Eshoj O. 1996. Trends in the epidemiology of IDDM during 1970-2020 in Fyn County, Denmark. *Diabetes Care*. 19(8): 801-6
- 17.- Mejía D, Villagrán J, Calderón M. 1879. Estadística de mortalidad en México. Ilustración. Imprenta Escalante. 32
- 18.- Coronel E.R. 1886. Reporte de la mortalidad en México. Encuademaciones Padilla. México. 79
- 19.- Martínez P.D. 1970. Diez observaciones sobre la mortalidad en México. *Salud Pública Mex*. 12: 37-43
- 20.- Saldaña R.J, Sosa E.P.V, García M.M.A. 1994. Epidemiología de la diabetes mellitus en México. Pasado, presente y futuro. *Rev Fac Med UNAM*. 37(1): 15-28
- 21.- Izquierdo J.J. 1919. La glucemia media fisiológica de los habitantes de la ciudad de México. *Gac Med Mex*. 54: 438-73
- 22.- Fernández E, Wong B, Lisker R. 1974. Diabetes mellitus y lípidos sanguíneos en una población rural del estado de México. *Rev Invest Clín Méx*. 26: 19-28
- 23.- González C, Stern M.P, Villalpando E, Hazuda H, Haffner S.M, Lisci E. 1992. Prevalencia de diabetes e intolerancia a la glucosa en una población urbana de nivel socioeconómico bajo. *Rev Inv Clín*. 44:321-8
- 24.- Rodríguez J, Rojo P.J, Vásquez del Mercado E. 1993. Prevalencia de la diabetes mellitus en un grupo de trabajadores. XXXIII Reunión Anual. Soc Mex Nutr Endoc. Vol.25
- 25.- Sepúlveda J, Tapia R, Rull J. 1993. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas. Dirección General de Epidemiología. SSA
- 26.- De la Fuente J.R. 1995. Informe de Labores. Secretaría de Salud 1994-1995.

- 27.- Guerrero R.F, Rodríguez M.M, Sandoval H.F. 1997. Low prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in indigenous communities of Durango, Mexico. Arch Med Res. 28: 137-40
- 28.- Robles C, Comejo B.J, Dorantes A.L, Gutiérrez G.L, Magos L.C, Pérez P.E. 1987. Incidencia de la diabetes mellitus tipo I en el DF y área metropolitana (resumen). XXVII Reunión anual de la Soc Mex. de Endocrinol. Mérida. pp. 3
- 29.- Escobedo de la Peña J, Santos B.C. 1995. La diabetes mellitus y la transición de la atención a la Salud. Salud Pública Mex. 37(1): 37-46
- 30.- Phillips M, López M, Papaquí J. 1994. La diabetes en México: ¿Que nos dice la Encuesta Nacional de Salud? Bol Oficina Sanit Panam. 117(4): 307-14
- 31.- King H, Rewers M. 1991. Diabetes in adults is now a third world problem. The WHO ad hoc diabetes reporting group. Bull World Health Organ. 69: 643-8
- 32.- National Diabetes Data Group. 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes. 23: 1039-57
- 33.- Isselbacher K, Adams R, Braunwald E, Petersdorf R, Wilson J. 1980. Harrison's. Principles of internal medicine. New York, USA. Vol. II. pp. 1741-1755
- 34.- Todd J.A, Bell J.I, MsDevitt H.O. 1987. HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. Nature. 329(6140): 599-604
- 35.- Kockum Y, Lemmark A, Dhlquist G, Falorni A, Hagopian W.A, Landin-Olsson M, et al. 1996. Genetic and immunological findings in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. The Swedish Childhood Diabetes Study Group and the Diabetes Incidence in Sweden Study (DISS) Group. Horm Metab Res. 28(7): 344-7
- 36.- Ilonen J, Reijonen H, Herva E, Sjoroos M, Itia A, Lovgren T, et al. 1996. Rapid HLA-DQB1 genotyping for four alleles in the assessment of risk for IDDM in the finnish populations. The childhood diabetes in Finland study group. Diabetes Care. 19(8): 795-800
- 37.- Rewers M, Bugawan T.L, Norris J.M, Blair A, Beaty B, Hoffman M, et al. 1996. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). Diabetologia. 39(7): 807-12
- 38.- She J.X. 1996. Susceptibility to type 1 diabetes: HLA-DQ and DR revisited. Immunol Today. 17(7): 323-29
- 39.- Huang H.S, Peng J.T, She J.Y, Zhang L.P, Chao C.C, Liu K.H, She J.X. 1995. HLA-encoded susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus is determined by DR and

- DQ genes as well as their linkage disequilibria in a chinese population. *Hum Immunol.* 44: 210-19
- 40.- Fernández-Vina M, Ramírez L.C, Raskin P, Stastny P. 1993. Genes for insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in the major histocompatibility complex (MHC) of african-americans. *Tissue Antigens.* 41: 57-64
- 41.- Cucca F, Lampis R, Frau F, Macis D, Angius E, Másile P, et al. 1995. The distribution of DR4 haplotypes in Sardinia suggests a primary association of type 1 diabetes with DRB1 and DQB1 loci. *Hum Immunol.* 43(4): 301-8
- 42.- Erlich H.A, Zeidler A, Chang J, Shaw S, Raffel L.J, Klitz W, et al. 1993. HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families. *Nat Genet.* 3(4): 358-64
- 43.- Gorodezky C, Olivares A, Debazo H, Rodríguez L, Altamirano N, Robles C. 1995. Los mecanismos moleculares de susceptibilidad y de protección dependientes del MHC en la diabetes tipo 1 en mexicanos. *Gac Méd Méx.* 131(4): 395-403
- 44.- Gepts W. 1965. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes.* 14: 619-33
- 45.- Hänninen A, Jalkanen S, Salmi M. 1992. Macrophages T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 90: 1901-10
- 46.- Ablamunits V, Baranova F, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. 1994. *In vitro* inhibition of insulin release by blood mononuclear cells from insulin-dependent diabetic and healthy subjects: synergistic action of IL-1 and TNF. *Cell Transplant.* 3(1): 55-60
- 47.- Sobel D.O, Ewel C.H, Zeligs B, Abbassi V, Rossio J, Bellanti J.A. 1994. Poly I:C induction of alpha-interferon in the diabetes-prone BB and normal Wistar rats. Dose-response relationships. *Diabetes.* 43(4): 518-22
- 48.- Bottazzo G.F, Florin-Christensen A, Doniach D. 1974. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* 2(7892): 1279-83
- 49.- Rossini A.A, Greiner D.L, Friedman H.P. 1993. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* 1: 43-45
- 50.- Baekkeskov S, Aanstoot H.J, Christgau S. 1990. Identification of the 64 K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature.* 347: 151-6

- 51.- Palmer J.P, 1987. Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab Rev.* 3: 1005-15
- 52.- Pietropaolo M, Castaño L, Babu S. 1993. Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. *J Clin Invest.* 92: 359-71
- 53.- Dotta F, Colman P.G, Lombardi D. 1989. Ganglioside expression in human pancreatic islets. *Diabetes.* 38: 1478-83
- 54.- Christie M.R, Tun R.Y.M, Lo S.S.S. 1992. Antibodies to GAD and tryptic fragments of islet 64 k antigen as distinct markers for development of IDDM: studies with identical twins. *Diabetes.* 41: 782-7
- 55.- Clare-Salzler M.J, Tobin A.J, Kaufman D. 1992. Glutamate decarboxylase: an autoantigen in IDDM. *Diabetes Care.* 15: 132-5
- 56.- Karounos D. G, Wolinsky J.S, Thomás J.W. 1993. Monoclonal antibody to rubella virus capsid protein recognizes a beta-cell antigen. *J Immunol.* 150: 3080-5
- 57.- Yoon J.W, McClintock P.R, Bachurski C.J. 1985. Virus-induced diabetes mellitus. No evidence for immune mechanisms in the destruction of beta cells by the D-variant of encephalomyocarditis virus. *Diabetes.* 34: 922-5
- 58.- Maclaren N, Atkinson M. 1992. Is insulin dependent diabetes mellitus environmentally induced? *N Engl J Med.* 327: 348-9
- 59.- Goldner M.G, Gomori G. 1944. Alloxan diabetes. *Proc Am Diabetes Assoc.* 4: 87-9
- 60.- Rakieta M.G, Rakieta M.L, Nadkarni M.V. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemoter Rep.* 29: 91-5
- 61.- Moertel C.G, Lefkopoulou M, Lipsitz S, Hahn R.G, Klaassen D. 1992. Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 326(8): 519-23
- 62.- Mendez J.D, Ramos G.H. 1994. Animal models in diabetes research. *Arch Med Res.* 25(4): 367-75
- 63.- McEvoy R.C, Andersson J, Sandler S, Hellerstrom C. 1984. Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse. Evidence for stimulation of a cytotoxic cellular immune response against an insulin-producing beta cell line. *J Clin Invest.* 74(3): 715-22

- 64.- O'Brien B.A, Harmon B.V, Cameron D.P, Allan D.J. 1996. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pat.* 178(2): 176-81
- 65.- Mattson C.P. 1994. Pathophysiology: concepts of altered health states. 4th Ed. Philadelphia, USA. pp. 927-948
- 66.- Wolffenbuttel B.H.R, Giordano D, Founds W.H, Bucala R. 1996. Long-term assessment of glucose control by haemoglobin-age measurement. *Lancet.* 347: 513-15
- 67.- Blanco L.A, Elizundia Ch. F, López L.Z, Serrano S.A, Saigado C.M, Ocampo L.R. 1993. Cetoacidosis diabética. *Bol Med Hosp Infantil Mex.* 50: 64-67
- 68.- Eastman R.C, Silverman R, Harris M, Javitt J.C, Chiang Y.P, Gorden P. 1993. Lessening the burden of diabetes. Intervention strategies. *Diabetes Care.* 16(8): 1095-102
- 69.- Russell C.L, Burchiel J.K. 1993. Abnormal activity in diabetic rat saphenous nerve. *Diabetes.* 42: 814-19
- 70.- Fisher M, Bogousslavsky J. 1993. Evolving toward effective therapy for acute ischemic stroke. *JAMA.* 270: 360-64
- 71.- Jiang N, Finklestein S.P, Do T, Caday C.G, Charette M, Chopp M. 1996. Delayed intravenous administration of basic fibroblast growth factor (bFGF) reduces infarct volume in a model of focal cerebral ischemia/reperfusion in the rat. *J Neurol Sci.* 139(2): 173-9
- 72.- Kalmijn S, Feskens E.J, Launer L.J, Kromhout D. 1996. Cerebrovascular disease, the apolipoprotein E4 allele, and cognitive decline in a community-based study of elderly men. *Stroke.* 27(12): 2230-5
- 73.- Krolewski A.S, Caness M, Warram J. 1988. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 318: 140-5
- 74.- Nankivell B.J, Tay Y.C, Boadle R.A, Harris D.C. 1994. Lysosomal iron accumulation in diabetic nephropathy. *Ren Fail.* 16(3): 367-81
- 75.- Villalpando G.C, Stern P.M, Pérez A.B, Díaz M.S, Andrade I.S, Revilla C. et al. 1996. Nephropathy in low income diabetics: The Mexico city diabetes study. *Arch Med Res.* 27(3): 367-72
- 76.- Villalpando G.M.E, Villalpando G.C, Pérez A.B, Stern P.M. 1994. Diabetic retinopathy in Mexico. Prevalence and clinical characteristics. *Arch Med Res.* 25(3): 355-60

- 77.- Hotta N, Koh N, Sakakibara F, Nakamura J, Hamada Y, Hara T, et al. 1996. Effects of beraprost sodium and insulin on the electroretinogram, nerve conduction, and nerve blood flow in rats with streptozotocin- induced diabetes. *Diabetes*. 45(3): 361-66
- 78.- WHO Study group: diabetes mellitus. World Health Organization technical report series 727. Geneva. 1985
- 79.- Corsi M, Lacerna F, Burzone A, Belcaro G. 1996. Studio macro-e microcircolatorio dei pazienti diabetici. *Minerva Cardioangiol*. 44(11): 535-7
- 80.- Strodtter D, Lehmann E, Lehmann U, Tritschler H.J, Bretzel R.G, Federlin K. 1995. The influence of thioctic acid on metabolism and function of the diabetic heart. *Diabetes Res Clin Pract*. 29(1): 19-26
- 81.- Villalpando G.C, Stern P.M, Perez A.B, Diaz M.S, Haffner S. 1996. Undiagnosed hypercholesterolemia: A serious health challenge. The Mexico city diabetes study. *Arch Med Res*. 27(1): 19-23
- 82.- Williamson J.R, Chang iK, Frangos M, Hasan K.S, Ido Y, Kawamura T, et al. 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*. 42: 801-13
- 83.- Frank R.N. 1994. The aldose reductase controversy. *Diabetes*. 43: 169-72
- 84.- Nathan M.D. 1996. The pathophysiology of diabetic complications: How much does the glucose hypothesis explain? *Ann Intern Med*. 124(1 pt 2): 86-89
- 85.- Bucala R, Vlassara H. 1995. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis*. 26(6): 875-88
- 86.- Nishino T, Horii Y, Shiiki H, Yamamoto H, Makita Z, Bucala R, Dohi K. 1995. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy. *Hum Pathol*. 26(3): 308-13
- 87.- Shikata K, Makino H, Sugimoto H, Kushiro M, Ota K, Akiyama K, et al. 1995. Localization of advanced glycation end products in the kidney of experimental diabetic rats. *J Diab Compl*. 9(4): 269-71
- 88.- Lee W.K, Akyol M, Shaw S, Dominiczak M.H, Briggs J.D. 1995. Kidney transplantation decreases the tissue level of advanced glycosylation end-products. *Nephrol Dial Transplant*. 10(1): 103-7
- 89.- Gugliucci A, Bendayan M. 1995. Reaction of advanced glycation end products with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem*. 43(6): 591-600

- 90.- Yang C.W, Vlassara H, Striker G.E, Striker L.J. 1995. Administration of AGEs *in vivo* induces genes implicated in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int Suppl.* 49:S55-8
- 91.- Abel M, Ritthaler U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt A.M, Greten J, et al. 1995. Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 10(9): 1662-7
- 92.- Kalfa T.A, Gerritsen M.E, Carlson E.C, Binstock A.J, Tsilibary E.C. 1995. Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36(12): 2358-67
- 93.- Beisswenger P.J, Makitz Z, Curphey T.J, Moore L.L, Jean S, Brinck-Johnsen T, et al. 1995. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes.* 44(7): 824-9
- 94.- Yamagishi S, Hsu C.C, Taniguchi M, Harada S, Yamamoto Y, Ohsawa K, et al. 1995. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: a possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 213(2): 681-7
- 95.- Hammes H.P, Weiss A, Hess S, Araki N, Horiuchi S, Brownlee M, et al. 1996. Modification of vitronectin by advanced glycation alters functional properties *in vitro* and in the diabetic retina. *Lab Invest.* 75(3): 325-38
- 96.- Stevens A. 1995. The effectiveness of putative anti-cataract agents in the prevention of protein glycation. *J Am Optom Assoc.* 66(12): 744-9
- 97.- Sady C, Khosrof S, Nagaraj R. 1995. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 214(3): 793-7
- 98.- Patel N.J, Misra V.P, Dandona P, Thomás P.K. 1991. The effect of non-enzymatic glycation of serum proteins on their permeation into peripheral nerve in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia.* 34: 78-80
- 99.- Zimmerman A.G, Meistrell III. M, Bloom O, Cockcroft M.K, Bianchi M, Risucci D, et al. 1995. Neurotoxicity of advanced glycation end products during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 3744-48
- 100.- Thome J, Munch G, Muller R, Schinzel R, Kornhuber J, Blum-Degen D, et al. 1996. Advanced glycation end products-associated parameters in the peripheral blood of patients with Alzheimer's disease. *Life Sci.* 59(8): 679-85

- 101.- Smith M.A, Sayre L.M, Monnier V.M, Perry G. 1996. Oxidative postranslational modifications in Alzheimer disease..A possible pathogenic role in the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles. *Mol Chem Neuropathol.* 28(1-3): 41-8
- 102.- Dickson D.W, Sinicropi S, Yen S.H, Ko L.W, Mattiace L.A, Bucala R, Vlassara H. 1996. Glycation and microglial reaction in lesions of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 17(5): 733-43
- 103.- Castellani R, Smith M.A, Richey P.L, Perry G. 1996. Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Res.* 737(1-2): 195-200
- 104.- Cameron N.E, Cotter M.A. 1996. Rapid reversal by aminoguanidine of the neurovascular effects of diabetes in rats: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Metabolism.* 45(9): 1147-52
- 105.- Anders A.F.S, Dunlap J.A, Davidson P.E, Wiese J.T, Lightle L.F.R, Greene A.D, et al. 1997. Supplemental myo-inositol prevents L-fucose-induced diabetic neuropathy. *Diabetes.* 46: 301-6
- 106.- Greene D.A, Sima A.A.F, Stevens M, Feldman E, Killen P, Henry D, et al. 1993. Aldose reductase inhibitors: an approach to the treatment of the nerve damage of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab Rev.* 9: 189-217
- 107.- Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura Y, Numano F. 1995. The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 748: 562-70
- 108.- Iacopino A.M. 1995. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis.* 1(4): 214-29
- 109.- Rojas A, Caveda L, Romay C, López E, Valdes S Padrón J, et al. 1996. Effect of advanced glycosylation end products on the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 225(2): 358-62
- 110.- Friedlander M.A, Witko-Sarsat V, Nguyen A.T, Wu Y.C, Labrunte M, Verger C, et al. 1996. The advanced glycation end product pentosidine and monocyte activation in uremia. *Clin Nephrol.* 45(6): 379-82
- 111.- Wautier J.L, Zoukourian C, Chappey O, Wautier M.P, Guillausseau P.J, Cao R, et al. 1996. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest.* 97(1): 238-43

- 112.- Palinski W, Koschinsky T, Butler S.W, Miller E, Vlassara H, Cerami A, et al. 1995. Immunological evidence for the presence of advanced glycosylation end products in atherosclerotic lesions of euglycemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(5): 571-82
- 113.- Sakata N, Meng J, Jimi S, Segawa M, Takebayashi S. 1995. Aging of aorta and atherosclerosis-role of nonenzymatic glycation of collagen. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 32(5): 336-43
- 114.- Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, et al. 1995. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol.* 147(3): 654-67
- 115.- Wehr H. 1995. Biological consequences of lipoprotein modification. *Postepy Biochem.* 41(3): 201-5
- 116.- Yegin A, Ozben T. 1995. Serum glycated lipoproteins in type II diabetics patients with and without complications. *Ann Clin Biochem.* 32(pt 5): 459-63
- 117.- Niwa T, Katsuzaki T, Momoi T, Miyazaki T, Ogawa H, Saito A, et al. 1996. Modification of beta 2m with advanced glycation end products as observed in dialysis-related amyloidosis by 3-DG accumulating in uremic serum. *Kidney Int.* 49(3): 861-7
- 118.- Monnier V.M, Glomb M, Elgawish A, Sell D.R. 1996. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes.* 45 suppl 3: S67-72
- 119.- Iino K, Yoshinari M, Yamamoto M, Kaku K, Doi Y, Ichikawa K, et al. 1996. Effect of glycated collagen on proliferation of human smooth muscle cells *in vitro*. *Diabetologia.* 39(7): 800-6
- 120.- Gugliucci A, Bendayan M. 1995. Histones from diabetic rats contain increased levels of advanced glycation end products. *Biochem Biophys Res Commun.* 212(1): 56-62
- 121.- Yamagishi S, Yamamoto Y, Harada S, Hsu C.C, Yamamoto H. 1996. Advanced glycosylation end products stimulate the growth but inhibit the prostacyclin-producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS Lett.* 384(1): 103-6
- 122.- Iehara N, Takeoka H, Tsuji H, Yamada Y, Kita T, Doi T. 1996. Advanced glycosylation end products modulate transcriptional regulations on mesangial cells. *Contrib Nephrol.* 118: 114-6

- 123.- Lee T.A, Plump A, DeSimone C, Cerami A, Bucala R. 1995. A role for DNA mutations in diabetes-associated teratogenesis in transgenic embryos. *Diabetes*. 44: 24-4
- 124.- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. 1984. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*. 101: 527-37
- 125.- Smith PAS. Derivatives of hydrazine and other hydronitrogens having N-N bonds. Benjamin/Cummings, Reading. 1983. pp. 15-26
- 126.- Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. 1986. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*. 232: 1629-32
- 127.- Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, et al. 1992. Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycosylation. *Science*. 258: 651-53
- 128.- Sensi M, Pricci F, De Rossi GM, Morano S, Di Mario U. 1989. D-lysine effectively decreases the non-enzymic glycation of proteins *in vitro*. *Clin Chem*. 35/3: 384-87
- 129.- Sensi M, De Rossi GM, Celi FS, Cristina A, Rosati C, Perrett D, et al. 1993. D-lysine reduces the non-enzymic glycation of proteins in experimental diabetes mellitus in rats. *Diabetologia*. 36: 797-801
- 130.- Ceriello A, Dello Russo P, Curcio F, Giugliano D, D'Onofre F. 1985. Acetylsalicylic acid and lysine inhibit protein glycosylation *in vitro*. A preliminary report. *Diabet Metab*. 10: 128-9
- 131.- Menzel E.J, Reihnsner R. 1991. Alterations of biochemical and biomechanical properties of rat tail tendons caused by non-enzymatic glycation and their inhibition by dibasic amino acids arginine and lysine. *Diabetologia*. 34: 12-16
- 132.- Trautwein E.A, Hayes K.C. 1990. Taurine concentrations in plasma and whole blood in humans: estimation of error from intra- and interindividual variation and sampling technique. *Am J Clin Nutr*. 52: 758-64
- 133.- Azevedo M, Falcao J, Raposo J, Mauso C. 1988. Superoxide radical generation by Amadori compounds. *Free Radic Res Comm*. 4: 331-35
- 134.- Trachtman H, Futterweit S, Bienkowski RS. 1993. Taurine prevents glucose-induced lipid peroxidation and increased collagen production in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 191(2): 759-65
- 135.- Nakamura T, Ogasawara M, Koyama Y, Nemoto M, Yoshida T. 1993. The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by oxygen radicals. *Biol Pharma Bull*. 16(10): 970-2

- 136.- Trachtman H, Futterweit S, Prenner J, Hanon S. 1994. Antioxidants reverse the antiproliferative effect of high glucose and advanced glycosylation end products in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 199(1): 346-52
- 137.- Ogasawara M, Nakamura T, Koyama Y, Nemoto M, Yoshida T. 1994. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. *Adv Exp Med Biol.* 359: 71-8
- 138.- Trachtman H, Futterweit S, Maesaka J, Chan M, Valderrama E, Fuchs A, et al. 1995. Taurine ameliorates chronic streptozocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Am J Physiol* 269: F429-F438
- 139.- Haider R, Azad Khan AK, Roy SK, Dewan N, Alam AN, Mahalanabis D. 1994. Management of acute diarrhoea in diabetic patients using oral rehydration solutions containing glucose, rice, or glycine. *BMJ.* 308: 624-6
- 140.- Marsh CD, Vreugdenhil KP, Mack EV, Belzer OF, Southard HJ. 1992. Glycine protects hepatocytes from injury caused by anoxia, cold ischemia and mitochondrial inhibitors, but not injury caused by calcium ionophores or oxidative stress. *Hepatology.* 17: 91-8
- 141.- Casey EB, Zhao HR, Abraham EC. 1995. Role of glycine 1 and lysine 2 in the glycation of bovine gamma B-crystallin. Site-directed mutagenesis of lysine to threonine. *J Biol Chem.* 270(35): 20781-6
- 142.- Ruiz López Victor M. Efecto de los inmunosupresores en la cicatrización bronquial en un modelo de autotransplante pulmonar. Tesis FES Zaragoza 1995.
- 143.- Ogasawara M, Nakamura T, Koyama Y, Nemoto M, Yoshida T. 1994. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. *Adv Exp Med Biol.* 359: 71-8
- 144.- Finot PA. 1982. Nonenzymatic browning products: physiologic effects and metabolic transit in relation to chemical structure. A review. *Diabetes.* 31(Suppl 3): 22-8
- 145.- Goodman OH, Shihabi KZ. 1990. Supplemental taurine in diabetic rats: effects on plasma glucose and triglycerides. *Biochem Med Metabol Biol.* 43: 1-9
- 146.- Maturo J, Kulakowski CE. 1987. Insulin-like activity of taurine. *Adv Exp Med Biol.* 217: 217-26
- 147.- Lampson WG, Kramer JH, Schaffer SW. 1983. Potentiation of the actions of insulin by taurine. *Can J Physiol Pharmacol.* 61: 457-63
- 148.- Kulakowski CE, Maturo J. 1984. Hypoglycemic properties of taurine: not mediated by enhanced insulin release. *Biochem Pharmacol.* 33(18): 2835-38
- 149.- Brownlee M. 1994. Glycation and diabetic complications. *Diabetes.* 43: 836-41

- 150.- Borsook H, Abrams A, Lowy PH. 1955. Fructose-amino acids in liver: stimuli of amino acid incorporation *in vitro*. J Biol Chem. 215: 111-24
- 151.- Bismut H, Caron M, Coudray-Lucas C, Capeau J. 1995. Glucose contribution to nucleic acid base synthesis in proliferating hepatoma cells: a glycine-biosynthesis-mediated pathway. Biochem J. 308(pt 3): 761-7
- 152.- Hetenyi G Jr, Anderson PJ, Raman M, Ferrarotto C. 1988. Gluconeogenesis from glycine and serine in fasted normal and diabetic rats. Biochem J. 253(1): 27-32
- 153.- Brodin SV, Ivanovych VH. 1996. The metabolism of [2-(14)C] glycine in rat tissues *in vivo*. Ukr Biokhim Zh. 68(2): 34-7
- 154.- Szabo A, Kenesei E, Korner A, Miltenyi M, Szucs L, Nagy Y. 1991. Changes in plasma and urinary amino acid levels during diabetic ketoacidosis in children. Diabetes Res Clin Pract. 12(2): 91-97
- 155.- Skolnik EY, Yang Z, Makita Z, Radoff S, Kirstein M, Vlassara H. 1991. Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodeling and diabetic nephropathy. J Exp Med. 174: 931-9
- 156.- Boyd-White J, Williams JC Jr. 1996. Effect of cross-linking on matrix permeability. A model for AGE-modified basement membranes. Diabetes. 45(3): 348-53
- 157.- Trachtman H, Futterweit S, Maesaka J, Ma Chan, Valderrama E, Fuchs A, et al. 1995. Taurine ameliorates chronic streptozocin-induced diabetic nephropathy in rats. Am J Physiol. 269: F429-F438
- 158.- Weinberg JM, Varani J, Johnson KJ, Roeser NF, Dame MK, Davis JA, et al. 1992. Protection of human umbilical vein endothelial cells by glycine and structurally similar amino acids against calcium and hydrogen peroxide-induced lethal cell injury. Am J Pathol. 140: 457-71
- 159.- Higgins JP, Bunn FH. 1981. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. J Biol Chem. 256(10): 5204-8
- 160.- Wolfenbettel BH, Giordano D, Founds HW, Bucala R. 1996. Long-term assessment of glucose control by haemoglobin-AGE measurement. Lancet. 347(9000): 513-5
- 161.- Franconi F, Bennardini F, Mattana A, Miceli M, Ciuti M, Mian M, et al. 1995. Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation. Am J Clin Nutr. 61: 1115-9

- 162.- Casey JI, Heeter BJ, Klyshevich KA. 1977. Impaired response of lymphocytes of diabetic subjects to antigen of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 136: 495-501
- 163.- Jones LR, Peterson MCh. 1981. Hematologic alterations in diabetes mellitus. *Am J Med*. 70: 339-52
- 164.- Spycher ES, Tabataba-Vakili S, O'Donnell BV, Palomba L, Azzi A. 1997. Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stresses of smooth muscle cells. *FASEB J*. 11: 181-88
- 165.- Kumari K, Umar S, Bansal V, Sahib KM. 1991. Inhibition of diabetes-associated complications by nucleophilic compounds. *Diabetes*. 40: 1079-84
- 166.- Ramakrishnan S, Sulochana KN. 1993. Decrease in glycation of lens proteins by lysine and glycine by scavenging of glucose and possible mitigation of cataractogenesis. *Exp Eye Res*. 57(5): 623-28
- 167.- Monnier VM. 1993. Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process. *J Gerontol*. 48: B105-B111
- 168.- Crook MA, Earle K, Morocutti A, Yip J, Viberti G, Pickup JC. 1994. Serum sialic acid, a risk factor for cardiovascular disease, is increased in IDDM patients with microalbuminuria and clinical proteinuria. *Diabetes Care*. 17(4): 305-10
- 169.- Rehman J, Rahman MA. 1991. Studies on glycosylated plasma proteins in diabetic patients. *JPMA*. 41(1): 16-8
- 170.- Zambenedetti P, Giordano R, Zatta P. 1996. Identification of lectin binding sites in the rat brain. *Glyco J*. 13: 341-46
- 171.- Waters PJ, Flynn MD, Pennock CA, Corral RJ, Greenwood RJ, Eisenthal R. 1995. Decreased sialidase activity in mononuclear leucocytes of type 1 diabetic subjects: relationship to diabetic complications and glycaemic control. *Diabet Med*. 12(8): 670-73
- 172.- Carter JR, Chandramouli V. 1981. Cell surface changes in diabetes. In *Diabetes mellitus*. M Brownlee editor. Garland STPM Press, New York. 277-286
- 173.- Tepperman HM, DeWitt J, Tepperman J. 1983. The effects of streptozotocin diabetes on the activities of rat liver glycosyltransferases. *Diabetes*. 32: 412-15
- 174.- Reilley N, Ruggiero D, Lecomte M, Lagarde M, Wiemspenger N. 1997. Advanced glycation end products induce specific glycoprotein alterations in retinal microvascular cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 235(2): 281-85

175.- Blum AS, Barnstable CJ. 1987. O-acetylation of a cell-surface carbohydrate creates discrete molecular patterns during neural development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 8716-20

176.- Araujo H, Menezes M, Mendez-Otero R. 1997. Blockage of 9-O-acetyl gangliosides induces microtubule depolymerization in growth cones and neurites. *Eur J Cell Biol*. 72: 202-13