

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

**Dimorfismo sexual en la sensibilidad a la insulina y la
susceptibilidad al desarrollo de diabetes en ratas**

Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias

Presenta

María de la Paz Vital Becerra

Directora de tesis: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

México, D.F. , Octubre 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue apoyado por beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y la Dirección General DGEP, UNAM.

Agradecimientos

A la Directora de esta Tesis: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia.

A los miembros de mi comité tutorial: Doctores Marco Antonio Cerbón Cervantes y Julio Moran Andrade.

A mis sinodales, los Doctores:

Dra. María Cristina Fernández Mejía (Presidente)

Dr. Mauricio Díaz Muñoz (Secretario)

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Dra. María Eugenia Mendoza Garrido

Dra. Verónica Guarner Lans

Les agradezco a todos ellos por su participación en la revisión y discusión del manuscrito de esta Tesis.

Agradecimientos

Unidad de Microscopía confocal y electrónica del Instituto de Fisiología Celular por la facilitación oportuna de sus instalaciones y el uso del microscopio confocal.

Al Bioterio del Instituto de Fisiología Celular por la facilitación oportuna de animales.

A la Dra. Cristina Fernández por la oportunidad de realizar una estancia Posdoctoral en su laboratorio y por todas las facilidades que me otorgo durante el trámite de mi titulación.

Al Dr. Hilario Merchant Larios por permitirme generosamente el uso del microscopio confocal a su cargo.

Índice	
CONTENIDO	Página
Abreviaturas	
Resumen	7
Summary	8
Introducción	9
1.- Páncreas	9
2.- Insulina: síntesis, secreción, acción, receptor, transducción de señales	10
3.- Sensibilidad a la insulina	17
4.- Resistencia a la insulina	17
5.- Regulación del metabolismo de glucosa en el hígado	17
6.- Regulación del metabolismo de glucosa en tejido adiposo	19
7.- Diabetes: definición, clasificación, epidemiología	21
8.- Dimorfismo sexual en el funcionamiento de las células β	22
9.- Modelo animal de diabetes: Estreptozotocina, Nicotinamida	23
Planteamiento del problema	28
Hipótesis	28
Objetivos	28
Metodología	29
Resultados	36
Discusión	47
Conclusiones	53
Referencias	54
Anexos	64

Resumen

El aumento en la prevalencia de diabetes en el mundo es alarmante. Dicha prevalencia es mayor en las mujeres que en los hombres. Al momento no existen datos consistentes en la literatura que expliquen esta diferencia.

El objetivo de este estudio fue el de analizar el dimorfismo sexual en la sensibilidad a la insulina y la susceptibilidad al desarrollo de diabetes en ratas.

Se compararon los cambios en el peso corporal, las concentraciones de glucosa sanguínea y los niveles de insulina en suero entre las ratas hembra y macho prepúber, púber y adultas. Paralelamente se implementó un modelo animal diabético inducido por estreptozotocina, bajo la protección de nicotinamida en las ratas hembra y macho y se compararon los mismos parámetros metabólicos durante las 4 semanas siguientes a la inducción de la diabetes.

Los niveles de insulina en suero fueron más altos en las hembras prepúberes (230%), púberes y adultas (45%) que en las ratas machos control, sin embargo la glucosa sanguínea fue similar comparando ambos sexos, en las distintas edades. Todas las ratas tratadas con estreptozotocina desarrollaron hiperglucemia. Sin embargo, las hembras mostraron los niveles de glucosa sanguínea más altos (25.8 mmol/L), seguidos de una reducción en el peso corporal (13%), en los niveles de insulina en suero (80%), en la expresión pancreática de insulina (95%) y en la supervivencia (63%).

Concluimos que sí existe dimorfismo sexual en la sensibilidad a la insulina en ratas normales prepúberes, púberes y adultas, siendo las hembras menos sensibles a la insulina y más susceptibles a desarrollar diabetes después del tratamiento con estreptozotocina.

Summary

The increasing prevalence of diabetes in the world is alarming; which is considerably greater in females than in males. At the moment there are not consistent data in the literature that explain this difference.

The goal of this study was to evaluate sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats.

Changes in body weight, blood glucose and serum insulin concentrations were compared between female and male Wistar rats in prepubertal, pubertal and adult stages of life. Parallel a diabetic model was induced by streptozotocin under nicotinamide protection in both sexes and the same metabolic patterns were evaluated during the next 4 weeks. Finally, the pancreases were processed for morphometric analysis.

Higher fasting serum insulin levels were found in female as compared to age matched male rats in the three age groups; however show similar blood glucose levels. After STZ treatment, female rats show lower insulin (80%), and higher glucose levels, and a worse survival rate (63%) as compared to male rats. The more severe disease phenotype observed in female animals is associated with a more dramatic perturbation of pancreatic islet morphology.

Significant differences exist in insulin sensitivity between sexes, being females less sensitive to insulin than males at all age groups and more susceptible to rapidly develop a more severe form of diabetes than males.

Introducción

El páncreas

El páncreas es una glándula de función mixta, exocrina y endocrina. La actividad exocrina la realizan los acinos pancreáticos cuyas células se encargan de sintetizar y secretar las diversas enzimas digestivas al duodeno. La actividad endocrina la realizan los islotes pancreáticos, los cuales están distribuidos por toda la glándula y están formados principalmente por tres tipos celulares secretores de hormonas. A saber, las células α que secretan glucagon, las células δ que secretan somatostatina y las células β que secretan insulina (Norman y Litwack, 1997). Ver figura 1.

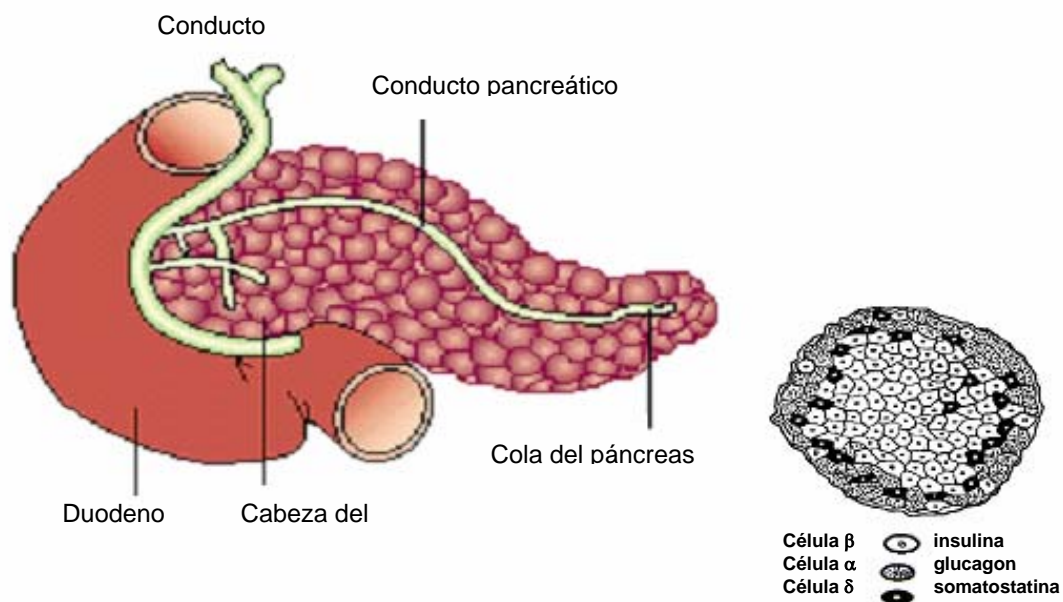


Figura 1. Esquema del páncreas y de un islote pancreático de rata adulta.

La insulina

La insulina es un polipéptido de peso molecular de 5700 a 6100 kDa, compuesto por dos cadenas de aminoácidos A y B, de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente. Las dos cadenas están unidas por dos puentes disulfuro entre cisteínas y existe un tercer puente disulfuro dentro de la cadena A (Norman y Litwack, 1997). Ver figura 2.

La síntesis de insulina: El gen de la insulina consiste de tres exones y dos intrones y es traducido a su precursor, la preproinsulina, que es un péptido lineal de 110 aminoácidos de peso molecular de 12 kDa.

La preproinsulina está compuesta de la proinsulina unida a su péptido señal. Este último consta de 24 aminoácidos en el extremo amino y facilita la separación de la proinsulina del compartimiento citosólico, donde se inicia la síntesis proteínica. A su paso por retículo endoplásmico rugoso (RER), esta secuencia es escindida formando la proinsulina de 81-86 aminoácidos de peso molecular 9 kDa. En la luz del RER, la proinsulina se dobla y se forman los puentes disulfuro. La proinsulina está formada por la insulina y el péptido C de 21- 30 aminoácidos. Pasando por el aparato de Golgi, se condensa en los gránulos secretores inmaduros, donde la proinsulina por ruptura proteolítica se separa en la insulina madura y el péptido C. Los gránulos maduros contienen cantidades equimolares de insulina y péptido C, son transportados a la membrana celular y son secretados por exocitosis (Norman y Litwack, 1997). Ver figura 2.

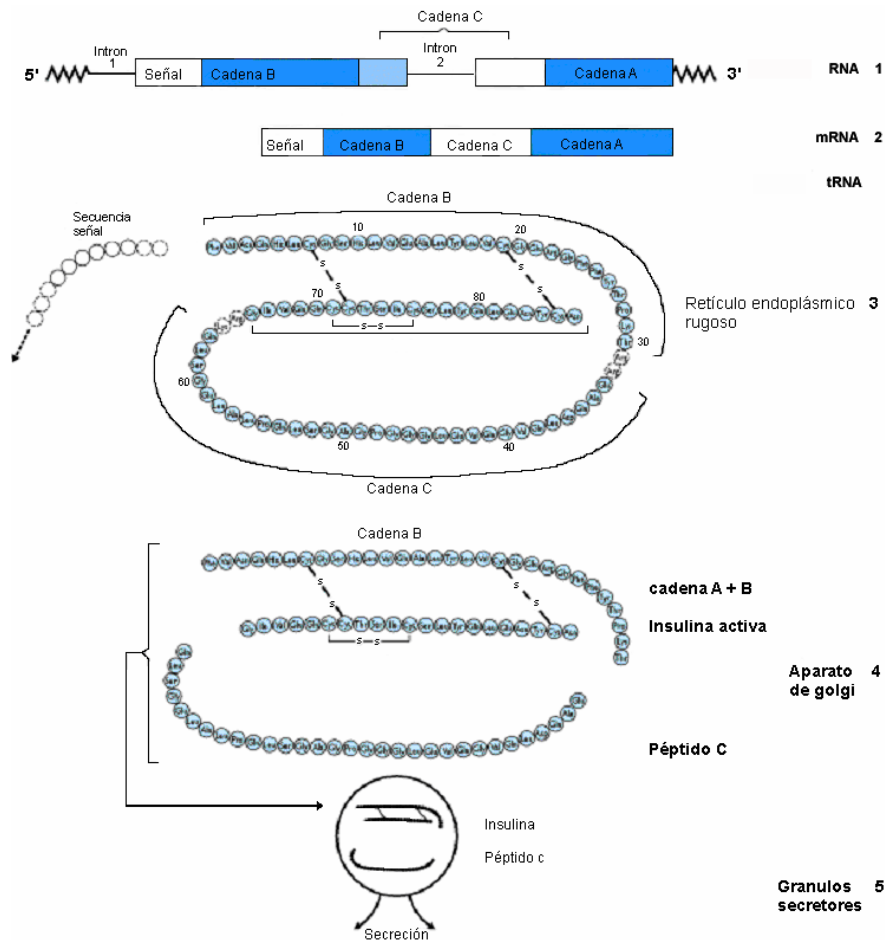


Figura 2. Síntesis de insulina. 1 Estructura del transcrito primario de RNA. 2 Mensajero maduro RNAm después de la escisión de los intrones. 3 Estructura de la proinsulina después de la separación del péptido señal de la preproinsulina. 4 Separación del péptido C, liberando la insulina biológicamente activa. 5 Empacamiento de la insulina y el péptido C en gránulos secretores para el almacenamiento y liberación. Modificado de Nussey y Whitehead 2001.

La secreción de insulina: La secreción de insulina en respuesta a glucosa sigue un proceso complejo de múltiples pasos que requiere el transporte y la oxidación de glucosa, cambios electrofisiológicos y la fusión de los gránulos secretores maduros en la membrana plasmática de la célula β . Ver figura 3. La glucosa entra al interior de la célula β por difusión facilitada a través de una proteína membranal transportadora de glucosa (GLUT) a favor de su gradiente de concentración (Scheepers et al. 2004). Ver figura 4.

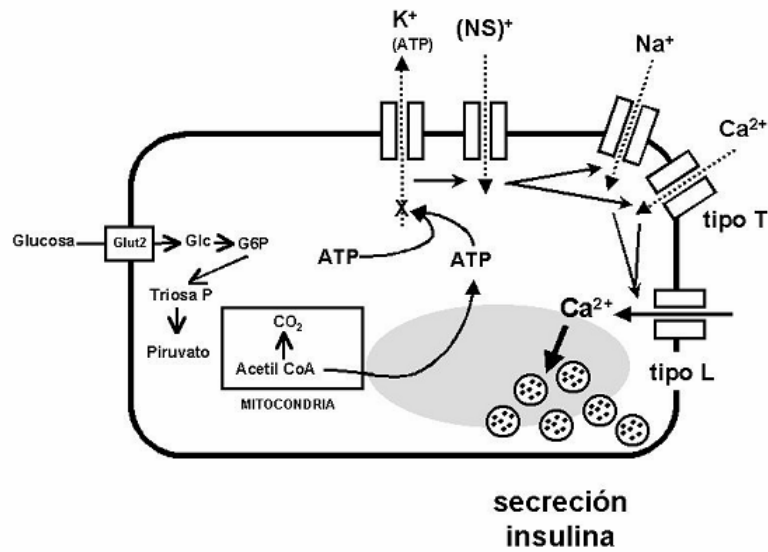


Figura 3. Esquema del acoplamiento entre el metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina en las células β pancreáticas.

Los GLUTs se caracterizan por presentar 12 α hélices transmembranales. A la fecha se han descrito al menos 12 GLUTs, de los cuales los más importantes son los cuatro primeros (Scheepers et al. 2004).

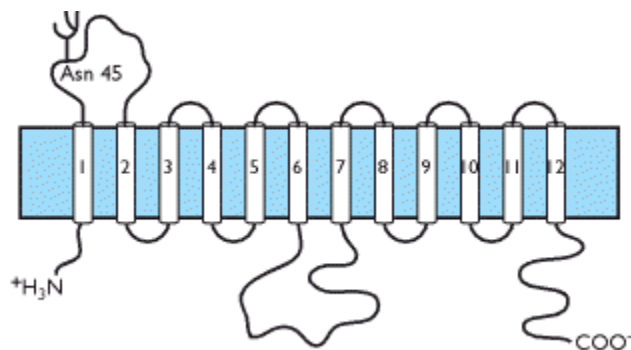


Figura 4. Esquema de la estructura proteínica de los transportadores de glucosa (GLUTs 1-5) muestra las 12 α hélices transmembranales. Modificado de Scheepers et al. 2004.

En las células β pancreáticas de rata, el GLUT2 controla la entrada de glucosa y es esencial en el mecanismo de la secreción de insulina inducida por glucosa (Olson y Pessin, 1996).

Cuando la glucosa ingresa al interior de la célula β es fosforilada para formar glucosa 6-P, en las células β existen dos enzimas que fosforilan a la glucosa, la hexocinasa I y la glucocinasa (hexocinasa IV). La generación de ATP por la oxidación de glucosa es responsable de acoplar el metabolismo de la glucosa con la secreción de insulina a través de la actividad eléctrica de la célula β .

En el acoplamiento entre el catabolismo de la glucosa y la secreción de insulina se propone que el aumento en la relación ATP/ADP induce el cierre de canales de K^+ membranales (K_{ATP}) de la célula β . El cierre de estos canales lleva a la despolarización de la membrana a un potencial en el cual aumenta la probabilidad de apertura de canales de Na^+ y Ca^{++} , con lo cual se produce la entrada de Ca^{++} que induce la secreción de insulina por exocitosis (Ashcroft y Rorsman, 1989) Ver figura 3.

La acción de la insulina: La insulina es una hormona que puede iniciar vías diversas de señalización, inducir efectos inmediatos y a largo plazo. Los efectos inmediatos incluyen un incremento en la tasa de captura de la glucosa de la sangre a las células del músculo (miocitos) y adipocitos, y la modulación de la actividad de varias enzimas que intervienen en el metabolismo de la glucosa. Estos efectos ocurren en minutos, no requieren síntesis de proteínas y la concentración de insulina requerida es de 10^{-9} M (Lodish et al. 2000).

La exposición continua de insulina a las células produce efectos a largo plazo incluyendo el incremento de la expresión de enzimas del hígado que sintetizan glucógeno y enzimas del tejido adiposo que sintetizan triglicéridos. Estos efectos ocurren en horas y la concentración de insulina requerida es de 10^{-8} M (Lodish et al. 2000).

La insulina es la hormona anabólica y catabólica más potente, promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos (glucógeno), lípidos y proteínas, mientras que inhibe su degradación y liberación a la circulación. La insulina incrementa la entrada de glucosa a tejido muscular y graso, además inhibe la producción de glucosa hepática, por lo que es el principal regulador de la concentración de glucosa (Saltiel y Kahn, 2001). Ver figura 5.

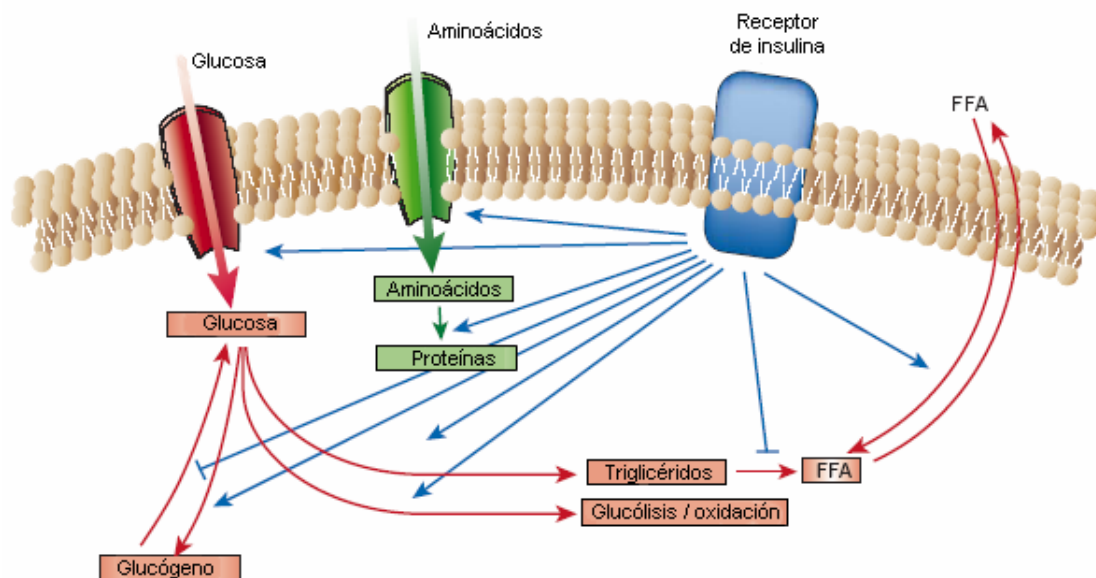


Figura 5. Esquema de los efectos de la insulina en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Modificado de Saltiel y Kahn, 2001.

La insulina estimula también la entrada de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos a las células, incrementa la expresión o actividad de enzimas que catalizan la síntesis de glucógeno, de lípidos y de proteínas, mientras que inhibe la actividad o expresión de aquellas enzimas que catalizan su degradación (Saltiel y Kahn, 2001). Ver figura 5 y 6.

La deficiencia en la acción de la insulina resulta en una alteración profunda de estos procesos y produce elevaciones de los niveles de glucosa y lípidos en ayuno y posprandial (Saltiel and Kahn, 2001). La insulina inicia su acción cuando se une a su receptor.

El receptor de insulina: El receptor de insulina pertenece a la superfamilia de receptores con función de cinasa de tirosina. Es una proteína tetramérica, consistente de dos subunidades α - hélices extracelulares y dos subunidades β -hélices citosólicas, que funcionan como enzimas alostéricas, en donde las subunidades α inhiben la actividad de cinasa de tirosina dependiente de ATP de las subunidades β (ver figura 6). La unión de la insulina a las subunidades α lleva a la desinhibición de la actividad de cinasa de las subunidades β permitiendo la autofosforilación de las subunidades β del receptor, y un cambio conformacional que incrementa la actividad de cinasa de tirosina (Patti y Kahn, 1998).

La transducción de señales en la acción de la insulina: Cuando el receptor de insulina se autofosforila, cataliza la fosforilación de proteínas celulares de la familia de substratos del receptor de insulina (IRS), residuos de tirosina Shc, Gab-1 y Cbl. Las tirosinas fosforiladas en estos substratos actúan como sitios

de anclaje para proteínas con dominio SH2 (homología-2-Src). Muchas de las proteínas SH2 son moléculas adaptadoras tales como p85 que es la subunidad reguladora de PI(3)K, Grb2 y Crk, las cuales activan proteínas G pequeñas al unirse a factores de intercambio de nucleótidos. Otras SH2 son enzimas, como la proteína fosfatasa SHP2 (Lodish et al. 2000). De esta forma se activan diversas vías de señalización, incluida la activación de PI(3)K y activaciones subsecuentes de proteínas cinasas dependientes de fosfatidilinositol (3, 4, 5) P₃, cascadas de ras y MAP cinasas, y Cbl/CAP y la activación de TC10. Estas vías actúan en forma coordinada para la regulación del tráfico de vesículas, síntesis de proteínas, activación e inactivación de enzimas, expresión génica, que resulta en la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas (Saltiel y Kahn, 2001). Ver figura 6.

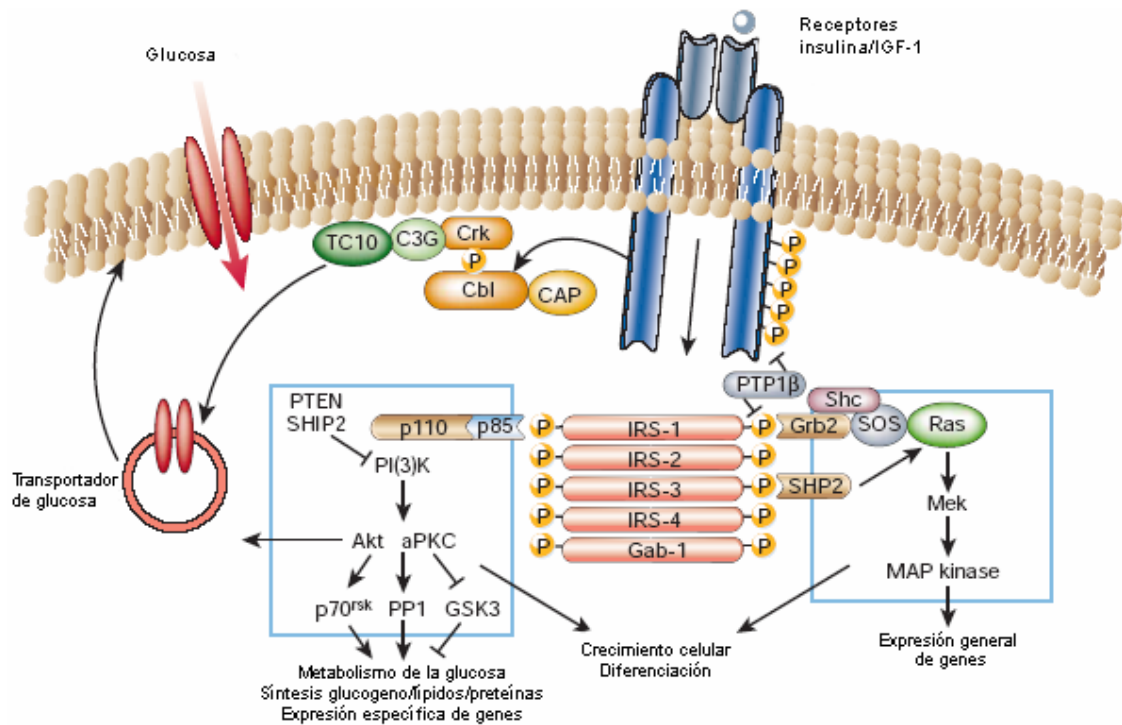


Figura 6. Esquema de las vías de señalización de la insulina. Modificado de Saltiel y Kahn, 2001.

La sensibilidad a la insulina

La concentración de insulina circulante se relaciona inversamente con la sensibilidad de las células a la insulina, a mayor concentración de insulina menor es su sensibilidad (Mari et al. 2005). En algunos trabajos, la concentración plasmática de insulina en ayuno ha sido validada como la medición única de laboratorio, que resulta más apropiada para describir la sensibilidad a la insulina en individuos con niveles de glucosa sanguínea normales (4 a 7 mmol/l); comparado con el método clamp euglicémico¹, modelo de homeostasis [HOMA], la relación insulina glucosa y el Índice de Bennett (McAuley et al. 2001; Laakso, 1993).

La resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina se caracteriza por la incapacidad de la insulina de ejercer su efecto biológico a concentraciones circulantes que son efectivas en sujetos sanos. La resistencia a la insulina se ha propuesto como el principal factor vinculante en el síndrome metabólico, enfermedad que engloba la intolerancia a la glucosa, la hipertensión y la dislipidemia (el aumento del colesterol, así como de otras grasas en la sangre, por encima de sus valores normales (Fernández-Mejía, 2006).

La resistencia a la insulina en la obesidad y en la diabetes tipo 2 puede explicarse por distintos mecanismos, entre ellos, una disminución en la concentración y actividad de cinasa del receptor de insulina, la concentración y fosforilación de IRS-1 (substrato del receptor de insulina), IRS-2, PI(3)K,

¹ Ver anexo 1.

además de alteraciones en la translocación del transportador de glucosa y la actividad de enzimas intracelulares (Pessin y Saltiel, 2000).

El tejido adiposo tiene una participación importante en la resistencia a la insulina. Los ácidos grasos libres derivados de los adipocitos están elevados en muchos estados de resistencia a la insulina, y se sugiere que podrían inhibir, la entrada de glucosa, la síntesis de glucógeno, la oxidación de la glucosa y el incremento la síntesis de glucosa hepática (Bergman y Ader, 2000).

En el vínculo entre el incremento en los ácidos grasos libres circulantes y la resistencia a la insulina podría participar en la acumulación de triglicéridos y de metabolitos derivados de ácidos grasos en músculo e hígado.

En individuos obesos se dice que existe una resistencia a la insulina porque aunque pueden tener hiperinsulinemia la concentración sérica de glucosa está en un nivel normal superior. Algunos individuos desarrollan intolerancia a la glucosa y/o hiperglucemia (concentraciones elevadas de glucosa sanguínea) en ayunas, y cuando hay sobrecarga de la función de las células β desarrollan diabetes mellitus tipo 2 (Ferrannini et al. 1997).

La regulación del metabolismo de la glucosa en el hígado

En los hepatocitos la insulina estimula la utilización y almacenamiento de glucosa en forma de lípidos y glucógeno, mientras que inhibe la síntesis y liberación de glucosa. El glucógeno es un polímero de glucosa, es la principal forma de almacenamiento de glucosa en animales.

Cuando las concentraciones de glucosa en sangre disminuyen más de 4 mmol/l las células α pancreáticas secretan glucagon. Esta hormona se une a sus receptores en los hepatocitos disparando la degradación de glucógeno y la

liberación de glucosa a la sangre. La síntesis y degradación de glucógeno se delimita principalmente a hepatocitos y miocitos, células donde se almacena glucógeno (Lodish et al. 2000).

En el hígado, la insulina bloquea la glucogenólisis y la gluconeogénesis, y estimula la síntesis de glucógeno, de esta forma contribuye a la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Esto ocurre a través de un efecto directo de la insulina en el hígado, así como de un efecto indirecto en la disponibilidad a los sustratos como ácidos grasos libres, lactato y aminoácidos (Santiel y Kahn, 2001).

La regulación del metabolismo de la glucosa en tejido adiposo

La insulina promueve la síntesis de lípidos a partir de glucosa e inhibe su degradación, principalmente a través de la inhibición de la lipasa sensible a hormonas, en tejido adiposo. En presencia de insulina la glucosa se almacena principalmente en forma de lípidos, debido a la captación aumentada de glucosa y a la activación de enzimas que sintetizan lípidos, como la piruvato deshidrogenasa, la sintasa de ácidos grasos y la acetil CoA carboxilasa (Santiel y Kahn, 2001).

En la obesidad los niveles elevados de ácidos grasos derivados de los adipocitos contribuyen a la resistencia a la insulina en hígado y en músculo al afectar la señalización del receptor de insulina (Bergman y Ader, 2000; Boden y Shulman, 2002).

El aumento en los ácidos grasos libres (AAL) circulantes se han asociado con una reducción en la fosforilación del IRS-1 estimulada por insulina y en la

actividad de PI(3)K asociada con IRS-1 (Shulman, 2000). Sin embargo la vía de señalización por la cual los AAL inhiben la fosforilación de IRS-1 no es clara. Gao y colaboradores (2004) sugieren que al igual que en hígado y músculo en tejido adiposo, los AAL activan a la PKC θ a través de diacilglicerol o cerámidas, y por su parte PKC θ activa a la cinasa κ B inhibidora de cinasas de serina (IKK) y a la cinasa NH₂-terminal Jun-c (JNK). Las cinasas IKK y JNK a su vez fosforilan al IRS-1 en la ser-307, de esta forma interfiere con la interacción IRS/receptor de insulina y/o promueve la degradación de IRS y finalmente contribuye a la resistencia a la insulina (Gao et al. 2004).

El tejido adiposo secreta adipocinas como la leptina, adiponectina y el factor de necrosis tumoral (TNF α), entre otros, los cuales regulan la ingesta de comida, el gasto energético y la sensibilidad a la insulina (Santiel y Kahn, 2001).

La leptina es una hormona que activa la señal de almacenamiento de energía, inhibe la ingesta de alimentos y acelera el metabolismo energético (Unger, 2003). En los periodos de ayuno la disminución en los niveles circulantes de leptina dispara el incremento en el apetito y disminuye la tasa metabólica.

La deficiencia de leptina en la lipodistrofia (La lipodistrofia es una alteración en la forma en que el cuerpo produce, usa y almacena grasa, llamada también redistribución de la grasa) causa resistencia a la insulina (Shimomura et al. 1999). En humanos y roedores con una sola copia del gen de leptina se presenta obesidad (Farooqi et al. 2001) y la ausencia de leptina lleva a obesidad y a resistencia a la insulina (Friedman, 2002).

La obesidad y la lipodistrofia causan resistencia a la insulina y predisposición a diabetes tipo 2, demostrando que el tejido adiposo es crucial en el metabolismo

regulador, más allá de su capacidad para almacenar la glucosa (Gavrilova et al. 2000).

Diabetes

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por presentar hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina (American Diabetes Association, 2005).

La diabetes se clasifica en dos grandes grupos: diabetes mellitus tipo 1 y 2.

La diabetes tipo 1, representa cerca del 10 % de todos los casos de diabetes y se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas con la consecuente deficiencia en la producción de insulina e hiperglucemia porque disminuye la entrada y aprovechamiento de la glucosa en las células. Los pacientes con diabetes tipo 1 requieren insulina exógena para sobrevivir.

La diabetes tipo 2 representa cerca del 90 % de todos los casos de diabetes y se caracteriza en principio por una resistencia a la acción de la insulina, que posteriormente se asocia con un malfuncionamiento y pérdida de células β pancreáticas (Zimmet et al. 2001).

El incremento en la prevalencia de diabetes a nivel mundial es alarmante. En 1985, 30 millones de personas en el mundo mayores de 20 años tenían diagnóstico de diabetes, una década después se estimó que la cifra había aumentado a 135 millones, y para el año 2000 ya eran 177 millones y es probable que llegue a más del doble para el año 2030 (Wild et al. 2004; King et al. 1998).

La prevalencia de diabetes varía entre mujeres y hombres mayores de 20 años. En 1995 había más mujeres que hombres con diabetes (73 millones contra 64 millones). Se estima que esta tendencia continúe para el 2025 (159 millones contra 141 millones; King et al. 1998).

Dimorfismo sexual en el funcionamiento de las células β pancreáticas

La diabetes es responsable del 1.4 % de las muertes totales en el mundo, donde el 57 % corresponde a mujeres y el 43 % a hombres. La incidencia de diabetes es también mayor en las mujeres (53.73%), que en los hombres (46.26%), de un total de 150 millones de casos (adultos mayores de 20 años) en todo el mundo (Wild et al. 2004; Zimmet et al. 2001). Sin embargo, no se sabe si existe dimorfismo sexual en el funcionamiento de las células β pancreáticas.

Los datos encontrados en la literatura no son consistentes para explicar esta diferencia en la prevalencia a padecer la enfermedad. Tampoco se sabe si existe mayor susceptibilidad en las mujeres de desarrollar diabetes. Es muy importante estudiar si existen diferencias en la forma en que las mujeres y los hombres mantienen el metabolismo de la glucosa o desarrollan diabetes.

Estudios recientes en población joven y sana muestra que en niñas de 5 años y en mujeres adolescentes existe una mayor resistencia a la insulina que en niños (Hoffman et al. 2000; Murphy et al. 2004), y se ha propuesto que esta diferencia intrínseca podría estar asociada con el cromosoma X (Murphy et al. 2004), sin embargo esto no ha sido demostrado.

Diferentes modelos en roedores muestran también diferencias en la sensibilidad a la insulina entre género. Por ejemplo, la secreción de insulina

inducida por glucosa en islotes pancreáticos aislados de ratas Wistar hembras es dos veces mayor que en los machos a los 4, 8 y 21 días de nacidos (Lopes Da Costa et al. 2004). En los ratones diabéticos no obesos (NOD), los cuales desarrollan insulinitis (infiltraciones en los linfocitos), a la 5 semana de vida. La progresión de insulinitis a diabetes tipo 1 ocurre en más del 85% en las hembras y en cerca del 25% en los machos (Hawkins et al. 1993; Winer et al. 2002; Lampeter et al. 1989). Así mismo, la incidencia de diabetes aumenta en machos castrados, y por el contrario, ésta disminuye en hembras castradas o con tratamiento androgénico (Makino et al. 1981). Esto sugiere que las hormonas androgénicas protegen a los islotes pancreáticos de la insulinitis en los ratones NOD.

Modelo animal de diabetes

Existen diferentes modelos experimentales de diabetes (Sima y Shafrir, 2001). Uno de los modelos experimentales que es más frecuentemente usado se produce a través del efecto citotóxico de la estreptozotocina (Rakieta et al. 1963; Like et al. 1976). La estreptozotocina (STZ) es un derivado de la nitrosourea monofuncional, aislado de *Streptomyces achromogenes*. Su estructura molecular corresponde a la molécula de 2-deoxy-D-glucosa substituida en el C₂ por un grupo N-methyl-N-nitrosourea (Herr et al. 1967; Bolzan y Bianchi, 2002). Ver figura 7

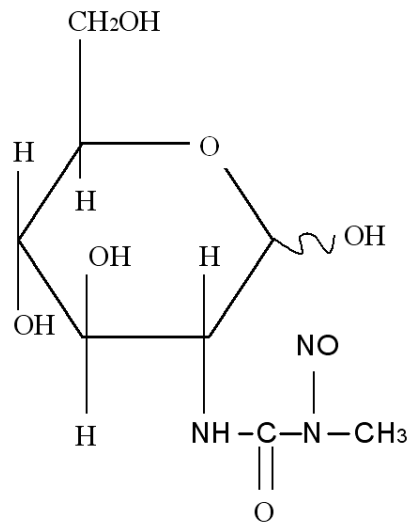


Figura 7. Estructura química de la estreptozotocina. Su estructura molecular corresponde a la molécula de 2-deoxy-D-glucosa substituida en el C₂ por un grupo N-methyl-N-nitrosourea. Tomado de Herr et al. 1967.

La STZ daña de forma selectiva a las células β pancreáticas de rata al actuar en éstas a través del transportador de glucosa GLUT 2 induciendo diabetes (Hosokawa et al. 2001; Bolzan y Bianchi, 2002). La STZ daña las células por dos diferentes mecanismos: a) induce inflamación de los islotes por reclutamiento de linfocitos mononucleares activados en áreas externas del islote con la subsiguiente destrucción de las células β en pocos días, cuando se administra múltiples dosis bajas (Papaccio et al. 2000); y b) destruye rápidamente las células β por una acción tóxica directa, dañando el DNA, al administrarse en una sola dosis alta (Yamamoto et al. 1981).

La toxicidad de la STZ puede ser atenuada por la nicotinamida. El modelo de diabetes en ratas producido por estreptozotocina (STZ) y nicotinamida lleva a un estado de hiperglucemia de larga duración sin elevada mortalidad (Masiello et al. 1998).

La nicotinamida, también conocida como niacinamida o vitamina B3, es una amida del ácido nicotínico soluble en agua, es un precursor de la coenzima β -

nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y aumenta la relación ATP/ADP en la cadena del transporte de electrones en la mitocondria (Ishaque y Al-Rubeai, 2002). Ver figura 8.

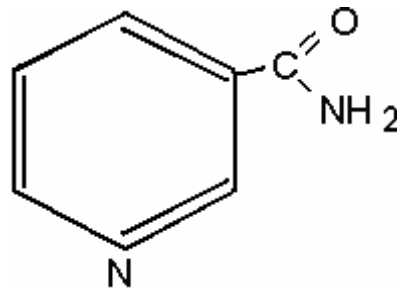


Figura 8. Estructura química de la nicotinamida niacinamida o vitamina B3, es una amida del ácido nicotínico soluble en agua, es un precursor de la coenzima β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+).

Diversas células humanas como las células tumorales y las células β pancreáticas son las más sensibles a la nicotinamida. La nicotinamida protege parcialmente a las células β pancreáticas del efecto tóxico de la STZ (Schein et al. 1967; Dulin et al. 1969). Sin embargo, para una mayor protección se requieren altas concentraciones que normalmente no se pueden alcanzar *in vivo* (Kolb y Burkart, 1999).

La nicotinamida a concentraciones fisiológicas (0.1 mmol) actúa como un precursor del dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD^+), que es una coenzima importante en el metabolismo energético, mientras que a concentraciones cercanas a 1 mmol/l elimina los radicales libres de oxígeno. La nicotinamida a concentraciones farmacológicas, cercanas a 0.1 mol/l es un inhibidor específico de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Kolb y Burkart, 1999).

La PARP, es la enzima que repara el DNA, se le conoce también como poli-(ADP-ribosa) sintetasa o poli-(ADP-ribosa) transferasa. Esta enzima se activa selectivamente cuando se dañan cadenas del DNA, su acción es catalizar la adición de unos brazos de cadenas largas de poli-(ADP-ribosa) (PAR) de su sustrato la NAD a una variedad de proteínas nucleares y principalmente a PARP (Pieper et al.1999a).

La inducción de diabetes por STZ y la activación de PARP se vincularon a mediados de los años 60 cuando, cuando se vio que los niveles pancreáticos de NAD disminuían por efecto de la STZ. Después se demostró que tanto la aloxana como la STZ dañan el DNA y activan la PARP (Yamamoto et al. 1981, LeDoux et al. 1988).

Un daño masivo en el DNA produce un aumento cercano a 500 veces en la actividad de la PARP. La PARP cataliza la transferencia y la polimerización de unidades de ADP-ribosa para ella misma y para otras proteínas nucleares como las histonas, y las topoisomerasas de DNA I y II (Pieper et al. 1999b). Este aumento en la actividad de la PARP disminuye rápidamente las concentraciones celulares de su sustrato, la NAD. Esta disminución de la NAD, produce una disminución en la producción de ATP y la célula en un esfuerzo por sintetizar más NAD consume más ATP presentándose una crisis energética que culmina en la muerte de la célula (Pieper et al. 1999b). Como la nicotinamida aporta el sustrato NAD, evita que la célula presente en crisis energética.

No es claro como se une la PARP a las cadenas de DNA rotas, pero el inicio y elongación de polímeros de la PAR probablemente se da por un mecanismo similar a la dimerización de proteínas. La PARP cataliza la elongación de reacciones que forman brazos y estructuras complejas mayores a 200 residuos de ADP-ribosa que son estructuralmente similares a los ácidos nucleicos.

La poli ADP-ribosilación de proteínas generalmente produce la inhibición y disociación de proteínas de la cromatina del DNA. De esta forma la PARP ayuda a mantener la integridad cromosomal protegiendo al DNA de una recombinación homóloga inapropiada. La unión de PARP a las terminales de DNA podría evitar su asociación con la maquinaria de la recombinación genética, la PARP cargada negativamente podría repeler electrostáticamente otras moléculas de DNA. La auto-poli ADP-ribosilación inactiva a la PARP por medio de repulsión electrostática entre enzimas unidas a polímeros de ADP-ribosa cargados negativamente y cadenas de DNA, y la liberación de la PARP de DNA permite el acceso a enzimas de reparación del DNA a la zona lesionada (Pieper et al. 1999b).

La PARP tiene una vida media de un minuto, después del cual es hidrolizada a uniones ribosa-ribosa y convertida en ADP-ribosa libre por la enzima poli(ADP-ribosa) glucohidrolasa (Pieper et al. 1999a). Se sabe además que la PARP tiene efectos *in vivo*. El ratón transgénico PARP $-/-$, está completamente protegido del efecto tóxico de la STZ, una semana después de su administración, así mismo en ratones PARP $+/-$ dos semanas después, comparado con en ratones silvestres (Pieper et al. 1999a).

Planteamiento del Problema

No se sabe si existe dimorfismo sexual en la fisiología de las células β pancreáticas, por lo tanto en presente trabajo se analizará la expresión y la secreción de insulina con el propósito de esclarecer si existen diferencias entre ratas hembras y machos.

Hipótesis

Si existe dimorfismo sexual en el funcionamiento de las células β pancreáticas, entonces la expresión y secreción de insulina será diferente en ratas hembras y machos, pudiendo conferirle diferente susceptibilidad a desarrollar diabetes.

Objetivo general

Analizar el dimorfismo sexual en la sensibilidad a la insulina en tres etapas del desarrollo; y explorar las posibles diferencias en el desarrollo de diabetes en ratas adultas en ambos sexos.

Objetivos particulares

1. Determinar la sensibilidad a insulina en ratas Wistar prepúberes, púberes, y adultas en ambos sexos, realizando pruebas tolerancia a la glucosa y de sensibilidad a la insulina.

2. En un modelo experimental de diabetes en ratas adultas de ambos sexos:
 - Determinar los cambios en el peso corporal.
 - Determinar la concentración de glucosa sanguínea.
 - Determinar la concentración de insulina en suero.
 - Analizar la sobrevivencia después de 4 semanas de diabetes.
 - Analizar la expresión de insulina y glucagon por inmunofluorescencia en cortes de páncreas de rata.

Metodología

Materiales. Se obtuvieron de las siguientes fuentes: estreptozotocina (STZ), nicotinamida, antisuero de ratón contra glucagon de rata, tritón X-100, yoduro de propidio, citrato de sodio y sales de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO); ELISA ultra sensible para insulina (KIT 1-2-3 Ultra- sensitive Rat Insulin ELISA, de ALPCO Diagnostics, Windham, NH, USA); Paraplast (Sherwood Medical Co. St. Louis MO, USA); antisuero de cabra contra insulina de cobayo ICN, (FITC) antisuero secundario contra IgG de cobayo, CY5 antisuero secundario contra IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA).

Animales. A ratas de la cepa Wistar de ambos sexos, prepúberes (21 días de nacidas), púberes (48 de nacidas) y adultas (2 meses) se le midió el peso corporal, la glucosa sanguínea y la insulina en suero.

Sensibilidad a la insulina. La sensibilidad a la insulina se calculó a partir de los valores de insulina y la glucosa en ayuno (McAuley et al. 2001). Como se mencionó en la Introducción, estos parámetros han sido validados como la medición más apropiada para describir la sensibilidad a la insulina en individuos normoglicémicos, comparado con otros métodos como el clamp insulínico, el HOMA (Laakso 1993, McAuley et al. 2001).

Prueba de tolerancia a la glucosa. Esta prueba refleja la acción de la insulina secretada por la estimulación de glucosa, en la captura de glucosa en músculo y grasa, además de la inhibición de la producción hepática de glucosa. Se realizó en ratas ayunadas por 16 horas, se les administró glucosa (2 g/kg de peso corporal) IP y en una gota de sangre de la cola a los minutos 0, 15, 30, 60 y 120 después de la inyección se midió la glucosa. La medición de glucosa se realizó por el método de glucosa oxidasa usando un glucómetro automático² (Precision, QIDTM, MediSense, Inc., Abbott Laboratories Company, USA) (Goren et al. 2004).

Prueba de tolerancia a la insulina. Esta prueba refleja la sensibilidad a la insulina y mide la captura de glucosa principalmente en músculo. Se realizó en ratas alimentadas *ad libitum*, se les administró insulina (1 U/kg de peso corporal) intraperitoneal (IP) y se midió la glucosa en una gota de sangre de la cola a los minutos 0, 15, 30 y 60 después de la inyección. Esta prueba siempre se realizó entre las 11:00 y las 14:00 horas (Goren et al. 2004).

² Ver anexo 2.

Medición de grasa abdominal. Ratas prepuberales de ambos sexos fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital (60 mg/kg). Se obtuvo grasa de regiones perigonadal, debido a que es fácil de identificar en las diferentes etapas estudiadas, en los machos se obtuvo la grasa epididimal y se pesó, mientras que en las hembras se obtuvo y reunió la grasa parametrial y retroperineal y se pesó (Gui et al. 2004).

Modelo experimental de diabetes. Se usaron ratas adultas de ambos sexos, de 2 meses de edad con un peso de 250 a 280 g. Para inducir diabetes a las ratas primero se les administró nicotinamida (87.5 mg/kg de peso corporal) IP, disuelta en solución salina al 0.9 %. Después de 15 minutos se indujo la destrucción de las células β pancreáticas, al administrarles estreptozotocina (STZ) (90 mg/kg de peso) IP, disuelta en solución amortiguadora de citratos 0.1 M (pH 4.5), justo antes de usar. En paralelo a ratas control se les administró igual volumen de la solución salina y solución amortiguadora de citratos siguiendo el mismo orden y tiempos.

Un grupo piloto de 5 machos y 5 hembras adultos recibieron una dosis única de del doble nicotinamida (175 mg/kg) y después de 15 minutos se indujo la destrucción de las células β pancreáticas de la misma forma arriba indicado. En paralelo a ratas control se les administró igual volumen de la solución salina y solución amortiguadora de citratos.

Obtención de sangre. Una vez a la semana, durante las siguientes 4 semanas después del tratamiento con nicotinamida y STZ, se midió, el peso corporal, la glucosa sanguínea y la insulina en suero. Las ratas se ayunaron por 4 horas

(de las 7:00 a las 11:00 h), se anestesiaron con éter y se obtuvo sangre por punción del plexo intraorbital retrobulbar y la sangre se fue recolectando en un tubo de polipropileno. Se recolectó aproximadamente 600 µl de sangre y se dejó coagular a temperatura ambiente por media hora. Posteriormente la sangre se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se obtuvo el suero. El suero recolectado se mantuvo a –20 °C hasta su análisis.

Medición de glucosa en sangre. La glucosa sanguínea se midió en una gota de sangre que quedó en el capilar, después de la obtención de sangre del plexo intraorbital retrobulbar, usando el mismo glucómetro que se usó en la prueba de tolerancia a la glucosa y la prueba de sensibilidad a la insulina. Únicamente las ratas tratadas con nicotinamida y STZ que observaron niveles de glucosa sanguínea por arriba de 16 mmol/l fueron incluidas en el análisis.

Medición de peso corporal. Las ratas se pesaron una vez por semana en una balanza con canastilla para animales (OHAUS Triple Beam Texas USA).

Medición de insulina. La concentración de insulina en los sueros de las ratas se determinó por medio de un análisis inmunoenzimático (ELISA) ultra sensible de insulina de rata, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los sueros se incubaron con una solución de antisuero monoclonal conjugado con peroxidasa por dos horas a 18-28 °C en agitación (800-1100 rpm), posteriormente las placas se lavaron y se incubaron por 30 minutos con la solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se detuvo la reacción agregando ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia de la reacción

enzimática se midió a una longitud de onda de 450 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, USA) y se usó como referencia 600 nm. Todas las mediciones se hicieron por duplicado. La sensibilidad de la prueba por este método es de 10 pg/ml y el coeficiente de variación entre ensayos fue de 3.2 %.

Análisis morfométrico del páncreas. Después de 4 semanas del tratamiento con nicotinamida y STZ, las ratas se anestesiaron y se les disecó el páncreas para realizar un análisis inmunohistoquímico y morfométrico. Finalmente los animales se sacrificaron por dislocación cervical.

Los páncreas de 6 ratas control y 6 ratas diabéticas se removieron y fijaron durante la noche a 4° C en paraformaldehído al 4% (peso/vol) en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4), posteriormente se deshidrataron siguiendo este orden: etanol al 50, 70, 80, 96%, alcohol absoluto, alcohol-xilol y xilol, después se embebieron en Paraplast formando bloques. Se cortaron en un micrótopo y seleccionaron 4 cortes seriales de 5 µm cada una, del área de la cola del páncreas cada 100 µm y se montaron en laminillas de vidrio. Al inicio de la inmunocitoquímica los cortes de páncreas se desparafinaron y se pasaron por un tren de rehidratación con alcoholes en orden inverso al de la deshidratación, al término del cual se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos.

Se inició la inmunocitoquímica permeabilizando los cortes con tritón al 0.1% (vol/vol), posteriormente se incubaron durante una noche con antisuero de cabra contra insulina de cobayo (1:4000). Al día siguiente los cortes de páncreas se incubaron durante una hora con antisuero secundario contra IgG

de cobayo (1:100) marcado con fluoresceína isotiocinada (FITC) para la detección de insulina. Posteriormente los cortes se incubaron con antisuero de ratón contra glucagon de rata (1:6000) durante 4 horas y después se incubaron con antisuero secundario de ratón contra IgG de rata (1:100) marcado con CY5 para la detección de glucagon. Se contratiñeron los cortes con ioduro de propidio a 10 μ g/ml para facilitar la identificación nuclear.

Finalmente los cortes se observaron en un microscopio confocal usando un sistema BioRad MRC-1024, equipado con un láser Kr/Ar unido a un microscopio invertido Nikon Diaphot-TMD 300, con un objetivo 40x en aceite de inmersión (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). El iris de apertura, la ganancia y el poder del láser permanecieron fijos en todas las sesiones. El FITC se excitó con una onda de 494 nm, y la emisión de luz fue con un filtro pasa bandas de 520 nm, mientras que CY5 se excitó con una onda de 650 nm, y la emisión de luz fue con un filtro pasa bandas de 670 nm. Las imágenes del confocal fueron vistas y procesadas usando el programa Confocal Assistant 4.02 (Todd Clark).

Se realizaron los siguientes controles: 1) control negativo de los antisueros, se realizaron los protocolos experimentales sin la adición del antisuero primario o secundario; 2) control de especificidad del antisuero, se realizaron preabsorbiendo toda la noche los anticuerpos anti-insulina y anti-glucagon con su respectivo antígeno, seguido después los mismos protocolos experimentales. No se pudo detectar señal de fluorescencia en ninguno de los controles.

El porcentaje de áreas de células α y β en el páncreas se calculó al dividir las áreas positivas a insulina o positivas a glucagon en un corte por el área total del corte y multiplicando este valor por 100. Únicamente los islotes con más de

15 células endocrinas se consideraron en este análisis, como ya se describió previamente (Xu *et al.* 1999).

Las mediciones morfométricas se realizaron usando el analizador manual de imágenes ópticas (Laser Pix program Bio-Rad version 4.0.0.13 (Hemel Hempstead, UK), en una imagen proyectada de los cortes histológicos del páncreas. Se analizaron cerca de 140 islotes por rata.

Análisis estadístico. Todos los datos se presentan como media \pm error, n indica el número de sujetos evaluados. Las diferencias significativas se evaluaron por el análisis de varianza ANOVA, seguido por la prueba de rangos múltiples de Fisher's. Se estableció la diferencia estadística con una $P < 0.05$. Se uso el programa estadístico Stat View.4.57.0.0, Abacus Concepts Inc, Berkeley, CA, USA.

Resultados

El desarrollo metabólico. Se examinaron y compararon el peso corporal, la glucosa sanguínea y la insulina en suero entre ratas hembra y macho en tres etapas: prepubertad (21 días), pubertad (45 días) y adulto (2 meses) (Tabla 1).

Tabla 1. Estatus Metabólico durante el desarrollo en ratas hembras y machos

	Prepubertad		Pubertad		Adulto	
	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Peso corporal (g)	82 ± 4 ^b	87 ± 5 ^b	253 ± 7	209 ± 4 ^a	303 ± 3	278 ± 5 ^a
Glucosa sanguínea (mmol/L)	9 ± 0.03 ^b	9 ± 0.02 ^b	7 ± 0.03	7 ± 0.02	7 ± 0.02	7 ± 0.03
Insulina en suero (pmol/L)	14 ± 3 ^b	47 ± 2 ^{ab}	110 ± 9	160 ± 1 ^a	104 ± 1	151 ± 9 ^a
Relación insulina/glucosa (pmol/mmo)	1.6 ± 1 ^b	5.2 ± 1 ^{ab}	14.7 ± 1	22.2 ± 1 ^a	14.5 ± 1	20.2 ± 1 ^a

Los datos representan la media y el error de al menos 12 ratas en cada condición. ^a p < 0.01 con respecto a machos control; ^b con respecto a pubertad y adulto.

Encontramos que las ratas control de los dos sexos siguen una curva de crecimiento similar a la previamente publicada (Houdijk et al. 2000), donde los machos púberes y adultos pesan cerca de 20% más que las hembras (Engelbregt et al. 2000); mientras que antes de la pubertad, no encontramos diferencias en el peso corporal entre sexos.

Grasa abdominal. Las ratas prepúberes de ambos sexos presentan el mismo peso corporal, sin embargo, el porcentaje de grasa abdominal en las hembras fue significativamente mayor ($4.3 \pm 0.07 \%$) que los machos ($2.09 \pm 0.3 \%$).

Los valores de glucosa sanguínea en ayuno fueron similares entre sexos en todas las etapas. Sin embargo, los valores de glucosa en la prepubertad fueron 20 % más altos y las concentraciones de insulina fueron más bajas (70% menos en hembras y 87% menos en machos), cuando se compararon con la pubertad y adultez (Tabla 1).

En las tres etapas estudiadas, las concentraciones de insulina en suero fueron más altas en las hembras comparadas con los machos, 235% más en las prepúberes y 45% más en las púberes y adultas.

Sensibilidad a la insulina: Relación insulina/glucosa fue mayor en las hembras en las tres etapas estudiadas, sugiriendo menor sensibilidad a la insulina (Tabla 1).

Prueba de tolerancia a la glucosa. Esta prueba se realizó en ratas prepúberes y púberes ayunadas por 16 horas y refleja la acción de la insulina secretada por la estimulación de glucosa, en la captura de glucosa en músculo y grasa, además de la inhibición de la producción hepática de (Goren et al. 2004). Nosotros no observamos diferencias entre sexos en los valores de glucosa en esta prueba. Como describimos previamente los animales prepúberes tienen valores de glucosa sanguínea mayores que los púberes y los adultos (Figura 9A y C).

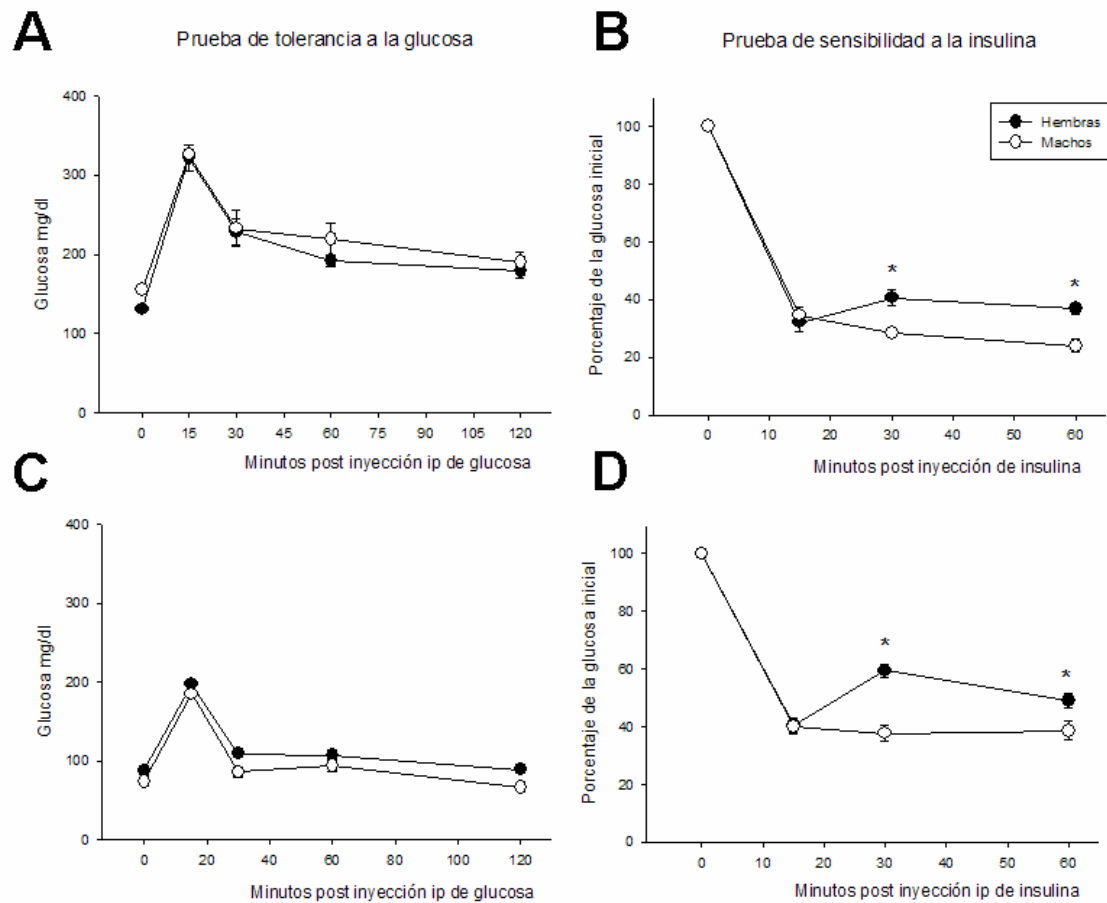


Figura 9. Homeostasis de la glucosa en ratas a 21 (A, B) y 45 (C, D) días de edad. Los círculos cerrados representan a las hembras y los círculos abiertos, a los machos. Se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa (A, C) y una prueba de tolerancia a la insulina (B, D), como se describe en los métodos. Los datos representan media y error de al menos 6 ratas por grupo. * $P \leq 0.01$ vs macho.

Prueba de tolerancia a la insulina. Esta prueba se realizó en ratas prepúberes y púberes alimentadas *ad libitum* y refleja la sensibilidad a la insulina principalmente en músculo. Después de 15 minutos de la administración de una dosis farmacológica de insulina, se observó una disminución de la glucosa plasmática similar en ambos sexos. Sin embargo, después de 30 y 60 minutos la glucosa plasmática en los machos fue 20% menor que en las hembras. Estas observaciones sugieren que las hembras prepúberes y púberes son

menos sensibles a la insulina que los machos prepúberes y púberes (Figura 9B y D).

Modelo experimental de diabetes. Para explorar aún más las diferencias sexuales en la sensibilidad a la insulina, implementamos un modelo diabético experimental usando STZ (90 mg/kg) y nicotinamida (87.5 mg/kg) (como está descrito en metodología), y comparamos el patrón metabólico entre sexos durante cuatro semanas del desarrollo de la diabetes.

Previamente, en un grupo piloto se usó la misma cantidad de STZ combinada con una dosis mayor de nicotinamida (175 mg/kg). En este experimento no se observaron cambios en el peso corporal, comparado con los controles. Solamente un macho y una hembra desarrollaron hiperglucemia después de 5 semanas y todos los animales sobrevivieron más de 8 semanas.

Con la intención de lograr una protección menor del efecto tóxico de la STZ, decidimos usar una dosis de nicotinamida menor (87.5 mg/kg).

Peso corporal. Mientras el peso corporal de los machos control aumentó a lo largo del experimento, el peso corporal de las hembras control no cambió significativamente (Figura 10A). En contraste, los machos diabéticos no aumentaron de peso y en las hembras diabéticas, se observó una reducción neta del 13 % cuando se comparó con la semana 0 (Figura 10A).

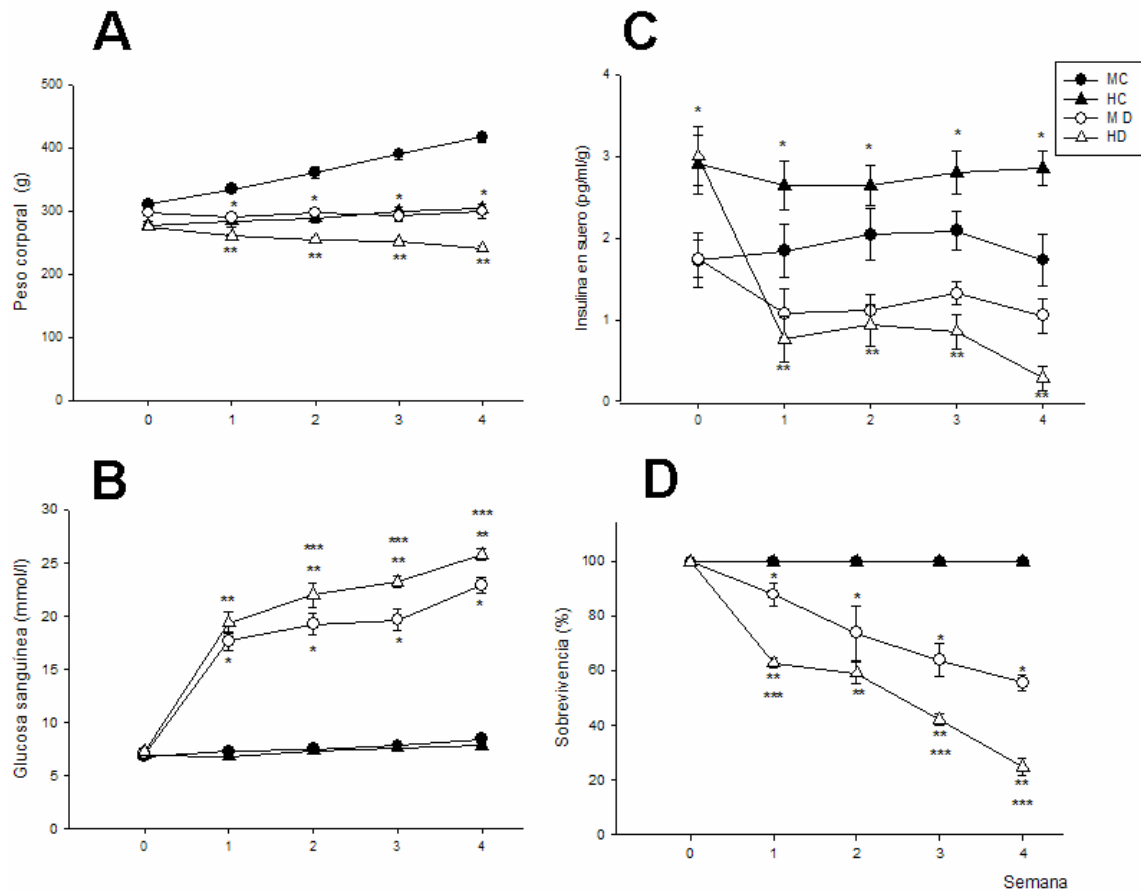


Figura 10. Efecto del tratamiento con STZ y nicotinamida sobre: peso corporal A); glucosa sanguínea B); insulina sérica C) y supervivencia D), en ratas control y diabéticas. Los datos representan la media y error de al menos 10 ratas por condición. Hembras control: triángulos cerrados, machos control: círculos cerrados; hembras diabéticas: triángulos abiertos; machos diabéticos: círculos abiertos. * $P \leq 0.01$ vs macho control, ** $P \leq 0.01$ vs hembra control, *** $P \leq 0.01$ vs macho diabético.

La característica principal de diabetes es la hiperglucemia. Todos los animales experimentales desarrollaron hiperglucemia. Sin embargo, los valores de glucosa sanguínea en hembras fueron más altos que en los machos, como se muestra en la figura 10B este aumento fue progresivo a lo largo de la experimentación.

Concentraciones de insulina en suero en ratas diabéticas. La figura 10C muestra los niveles de insulina de suero en ratas control y diabéticas.

Claramente en los diabéticos, las concentraciones de insulina fueron menores que en sus respectivos controles y la mayor disminución se observó en las hembras (cerca del 80%).

Debido a que los valores de insulina en suero en hembras y machos controles fueron diferentes, no se puede comparar estos valores entre los diabéticos (Figura 10C).

La supervivencia de las hembras diabéticas. De manera interesante, mientras que los machos diabéticos sobrevivieron en un 88% la primera semana de tratamiento, solo un 63% de las hembras diabéticas continuaron viviendo. Esta tendencia prevaleció a lo largo del experimento (Figura 10D).

Cambios en el área de células β pancreáticas. Después de cuatro semanas de la inducción de diabetes comparamos la morfología de islotes pancreáticos, y la distribución de células positivas a insulina y glucagon por doble inmunohistoquímica en las hembras y machos control y diabéticos.

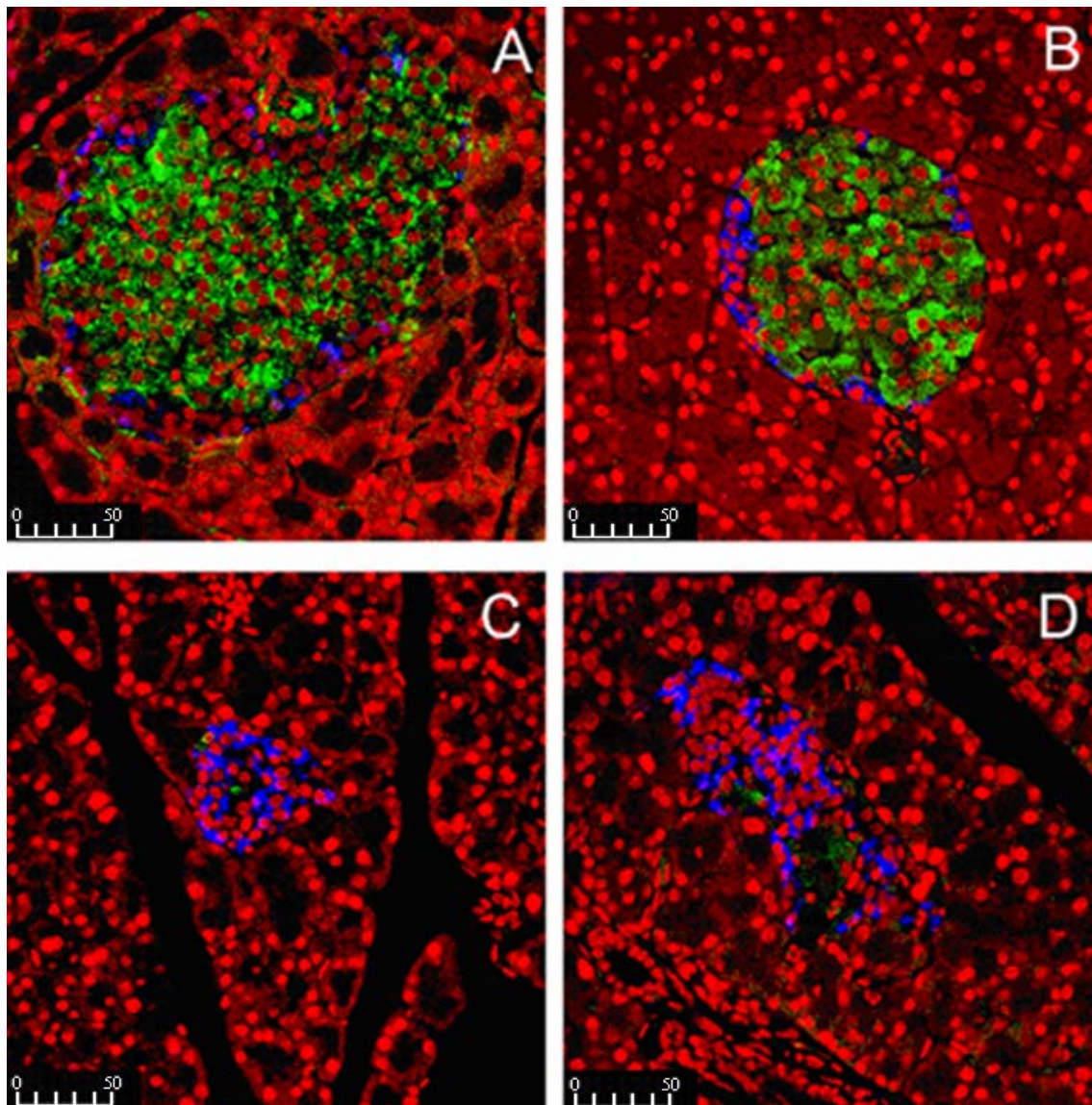


Figura 11. Inmunofluorescencia representativa de dos islotes pancreáticos de ratas control hembra A) y macho B), y dos islotes de ratas diabéticas hembra C) y macho D), después de 4 semanas de inducción de diabetes. Insulina en verde, glucagon en azul, núcleos en rojo, barra 50 μm .

Los islotes pancreáticos de ratas control de ambos sexos son redondos y están compuestos principalmente por 80% de células β localizadas predominantemente en el centro de los islotes. Las células α rodean en su mayoría a las células β y representaban aproximadamente el 10 % de las células del islote. Ver figura 11A y B.

El tejido pancreático de hembras y machos controles presenta las siguientes diferencias:

- a) El área ocupada por los islotes fue 51 % mayor en las hembras que en los machos (Figura 12A).
- b) Los islotes pancreáticos en las hembras fueron 20 % más grandes que en los machos (Tabla 2).
- c) El número de islotes en las hembras fue 20 % mayor que en los machos (Tabla 2).
- d) El área ocupada por las células β el páncreas de las hembras fue 38 % mayor que en los machos (Figura 12B).
- e) El área ocupada por las células α fue 61 % mayor en el páncreas de las hembras, que en los machos (Figura 12C).

Tabla2. Morfometría de los islotes pancreáticos ratas control y diabéticas de ambos sexos

	Macho Control	Hembra Control	Macho Diabético	Hembra Diabética
Tamaño de los islotes (μm^2)	14180 \pm 1320	17156 \pm 1311 ^a	9174 \pm 1224 ^a	8073 \pm 1055 ^b
Número de Islotes pancreáticos (en 10 mm²)	4.78 \pm 0.61	6.40 \pm 0.06 ^a	3.10 \pm 0.77 ^a	2.75 \pm 0.52 ^b

Los datos representan la media \pm SEM de al menos 6 ratas en cada condición. a) $P \leq 0.01$ con respecto a machos control; b) con respecto a hembra control.

Mientras que los islotes pancreáticos en los animales diabéticos de ambos sexos fueron escasos, alargados y desorganizados, como se muestran en la figura 11C y D. En los islotes que no fueron destruidos, las células α se ubicaron en el centro del islote, rellenando el espacio anteriormente ocupado por las células β . Debido a que la morfología de los islotes de las hembras y los machos controles son diferentes, no comparamos directamente macho y hembra diabético.

El tejido pancreático de hembras y machos diabéticos presenta las siguientes diferencias:

- a) El área ocupada por los islotes en hembras y machos fue 78 % y 65 % menor comparado con sus controles respectivos (Figura 12A).
- b) Los islotes pancreáticos en hembras y machos fue 52 % y 35 % menores comparados con sus respectivos controles (Tabla 2).
- c) El número de islotes en hembras y machos fue 57 % y 35 % menor comparado con sus respectivos controles (Tabla 2).
- d) El área ocupada por las células β fue aproximadamente 95 % menor que sus respectivos controles en hembras y machos (Figura 12B).
- e) El área ocupada por las células α en hembras fue 52 % menor que su control. Por el contrario, ningún cambio se encontró en machos (Figura 12C).

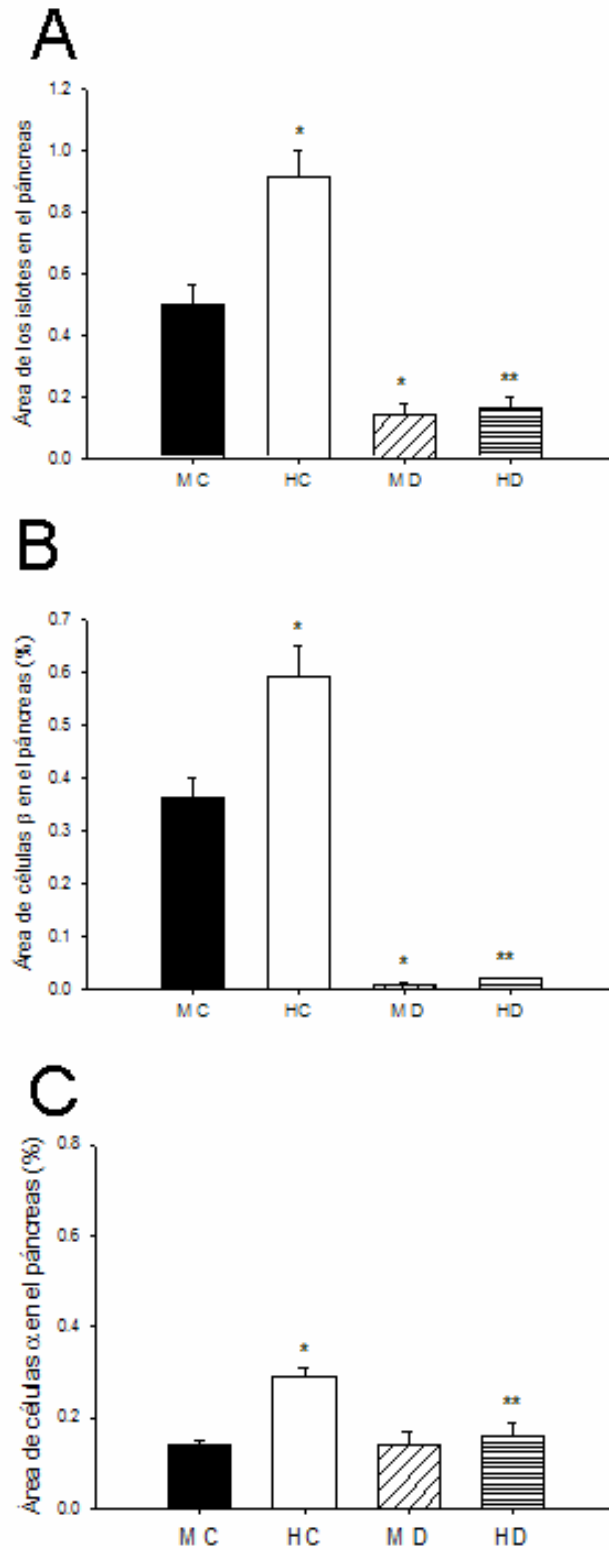


Figura 12. Área de tejido endocrino en el páncreas de ratas macho control (MC), hembra control (HC), macho diabético (MD) y hembra diabética (HD). Los datos representan la media y SEM de al menos 6 ratas en cada condición. * $P \leq 0.01$ vs macho control, ** $P \leq 0.01$ vs hembra control.

Resumiendo, los cambios morfológicos después de cuatro semanas de diabetes, observamos que las hembras tuvieron una mayor disminución en: el número, tamaño y área de islotes, así como también en el área de las células β y α comparado con los machos.

Discusión

No se sabe si existe dimorfismo sexual en la fisiología de las células β pancreáticas. En este estudio observamos dimorfismo sexual en la fisiología de las células β pancreáticas en tres etapas del desarrollo y en la susceptibilidad al desarrollo de diabetes.

Este es el primer trabajo que muestra concentraciones de insulina en suero más altos en las ratas hembras prepúberes, púberes y adultas comparadas con sus respectivos machos control (Tabla 1). Demostramos además, que el área y el número de islotes pancreáticos son significativamente más grandes en las hembras que en machos (Tabla 2). El hecho de que, las hembras tengan más insulina circulante que los machos durante toda su vida, mientras que ambos sexos mantengan similares concentraciones de glucosa en sangre, indica que la sensibilidad a la insulina es más baja en las hembras que los machos y podría reflejar dimorfismo sexual en la fisiología de las células β pancreáticas. Además, la respuesta a la captura de glucosa plasmática por insulina exógena (con una dosis farmacológica) es menor en las hembras que en los machos, lo cual directamente refleja la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Figura 9).

Datos preeliminares, demuestran que la secreción de insulina en células β pancreáticas aisladas de ratas macho y hembra en respuesta a glucosa basal (5.6 mmol) es similar (75.0 ± 9.3 y 81.6 ± 17.1 ng/ml) en ambos sexos. Lo que sugiere que la secreción de insulina por célula es similar en ambos sexos y que la secreción de insulina aumentada en las hembras se debe al mayor número y tamaño de los islotes pancreáticos y consecuentemente a un mayor número de

células β pancreáticas por islote. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para confirmar estos resultados.

Por otro lado, encontramos que las ratas hembras y machos siguen una curva de crecimiento similar a la reportada por Engelbregt et al. (2000). Sin embargo, aunque las ratas hembra prepúberes tienen el mismo peso corporal que los machos, tienen más grasa por gramo de peso que los machos, y esta diferencia continúa a lo largo de la vida (Clegg et al. 2003; woods et al. 2003). Estos resultados junto con los altos niveles de insulina de suero en las hembras, sugieren que la baja sensibilidad a la insulina observada, podría deberse a la alta proporción de grasa corporal (Schwartz & Porte, 2005).

En los últimos años se ha establecido de manera contundente que el tejido adiposo es un órgano endocrino que secreta hormonas como la leptina y la adiponectina entre otras (Kershaw y Flier, 2004).

La leptina activa la señal de almacenamiento de energía, inhibe la ingesta de alimentos y acelera el metabolismo energético (Unger, 2003). En la obesidad los niveles de leptina permanecen elevados, posiblemente se debe a que se presenta simultáneamente resistencia a la insulina y resistencia a la leptina (Lazar, 2005). Interesantemente las ratas hembras adultas tienen más tejido adiposo por gramo de peso corporal, que los machos, y sus niveles de leptina en plasma por gramo de grasa son mayores que en los machos (Pinilla et al. 1999; Engelbregt et al. 2000; Smith & Waddell, 2003; Clegg et al. 2003).

La homeostasis de la glucosa se mantiene principalmente por el balance entre las concentraciones séricas de insulina y glucagon, sin embargo, además de

las adipocinas las hormonas sexuales también intervienen en la homeostasis de la glucosa.

Se ha demostrado que el estrógeno puede modular la secreción de la insulina y de glucagon (Sutter-Dub 1976, 2002, Faure et al. 1988, Nadal et al. 1998), a través de un aumento de la actividad eléctrica de las células β y como consecuencia la secreción de insulina (Nadal et al. 1998). Se ha sugerido además, que las hormonas esteroideas sexuales están relacionadas con variaciones de insulina en suero y del mRNA de insulina en el páncreas durante el ciclo estral en la rata (Morimoto et al. 2001). Datos preliminares de este trabajo sugieren que la testosterona protege a las células β pancreáticas del efecto tóxico de la STZ, en ratas macho castradas tratadas con nicotinamida (87.5 mg/dl) y STZ (90 mg/dl) los valores de glucosa sanguínea fueron significativamente mayores comparado con machos intactos (463 ± 12 y 358 ± 31 mg/dl), después de una semana de inyección. Interesantemente, la testosterona, protege a las células β pancreáticas contra la apoptosis inducida por STZ en ratas macho (Morimoto et al. 2005).

Por otro lado, en este estudio observamos que la respuesta diabética a STZ bajo protección de nicotinamida de las hembras es más intensa que la presentada por los machos, ya que éstas desarrollan la enfermedad más rápido, la hiperglucemia es más alta y hay mayor daño de células beta que en los machos, sugiriendo que las hembras son más susceptibles al desarrollo de diabetes que los machos. Igualmente en las hembras diabéticas los niveles de insulina en suero son menores y los islotes pancreáticos son más pequeños y menos numerosos, además presentaron menor supervivencia que los machos

(Vital et al. 2006). Finalmente, las hembras perdieron peso corporal a diferencia de los machos que mantienen el mismo peso durante el experimento.

La insulina promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas, por lo tanto, una profunda disminución en los niveles de insulina en suero y como consecuencia la disminución en la entrada de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos a las células lleva irremediablemente a la pérdida de peso corporal. En las ratas diabéticas disminuye el peso corporal y la grasa, además de los niveles de insulina (Vital et al. 2006) y leptina en suero (Havel et al. 1998; 2000).

En la figura 13 se resumen las observaciones que indican diferencias entre hembras y machos derivadas de este estudio.

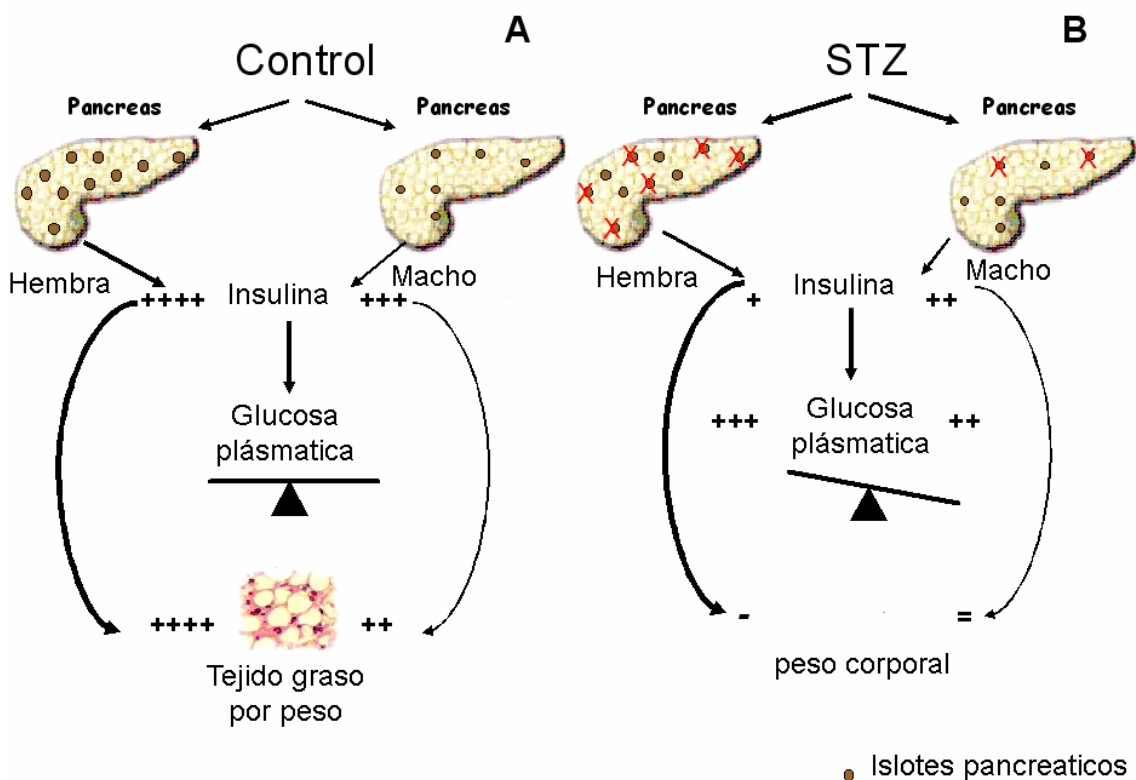


Figura 13. Modelo que describe el dimorfismo sexual en la sensibilidad a la insulina. A) Las hembras tiene más isletos y son más grandes, además tienen concentraciones de

insulina mayores que los machos. La insulina estimula la entrada de glucosa y su metabolismo en tejido adiposo. Además, las hembras en todas las edades tienen más tejido adiposo por gramo de peso corporal que los machos, sin embargo, los valores de glucosa sanguínea son iguales. B) Después de dañar a las células β pancreáticas, las ratas hembras tienen menos islotes y son más pequeños, además, tienen concentraciones de insulina menores que los machos y consecuentemente tienen valores de glucosa sanguínea mayores además de perder peso corporal.

Nosotros también mostramos que el área de las células α , positivas a glucagon no presentó cambios importantes por el área total de páncreas. Este resultado confirma informes previos del páncreas en rata (Patel et al. 1978), ratón (Li et al. 2000), y humano (Rahier et al. 1983) donde muestran que el área de las células α no se modifica en la diabetes.

Nuestros datos contribuyen a la comprensión de las diferencias sexuales en la incidencia de diabetes y pueden apoyar al futuro desarrollo de nuevas y mejores estrategias terapéuticas para el tratamiento de la diabetes mellitus. El dimorfismo sexual observado en el presente estudio puede relacionarse también con las diferencias hormonales (Galipeau et al. 2002; Sugden & Holness 2002). Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprender la relación entre hormonas sexuales y el control metabólico de la glucosa, puesto que nosotros también encontramos diferencias en los niveles de insulina entre sexos en ratas prepúberes.

De acuerdo con todo esto, se ha mostrado que las niñas y las adolescentes son más resistentes a la insulina que los niños y los adolescentes (Hoffman et al. 2000). Además, las niñas menores de cinco años tienen niveles de insulina más alta pero similares concentraciones de glucosa en sangre que los

niños, y la resistencia de insulina calculada es 35% más alta en las niñas (Murphy et al. 2004).

En el estudio "Early Bird study" (Wilkin et al. 2004) se muestra que la resistencia a la insulina está relacionada con las madres pero no con los padres. En concordancia con lo anterior, los resultados obtenidos por el "DECODE Study Group" (DECODE study group 2003) sugieren que las mujeres son intrínsecamente más resistentes a la insulina que hombres a lo largo de la vida. Además en modelos en animales no primates se ha observado que la obesidad materna induce intolerancia a la glucosa únicamente en su descendencia femenina (Han et al. 2005).

Se sabe que existe dimorfismo sexual en el metabolismo de lípidos que tiene importancia clínica, cuando se presenta triglicéridos elevados en plasma se predice enfermedad cardiovascular en mujeres, sin embargo en hombres las lipoproteínas de baja densidad predicen mejor el riesgo cardiovascular (Blaak 2001; Mittendorfer 2005).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que, además de dimorfismo sexual en el metabolismo de lípidos (Blaak 2001), existe dimorfismo sexual en el metabolismo de la glucosa (carbohidratos).

Conclusiones

Las ratas hembra prepúberes, púberes y adultas tienen niveles de insulina en suero más altos que los machos, sin embargo, mantienen los mismos valores de glucosa sanguínea, además presentan intolerancia a la insulina en una prueba de sensibilidad a la insulina, por lo tanto las ratas hembra son menos sensibles a la insulina que las ratas macho. Esto podría indicar que existen diferencias sexuales en el metabolismo de la glucosa.

Los altos niveles de insulina en las hembras control podrían deberse a que el número y el tamaño de islotes en el páncreas es mayor en las hembras control comparado con los machos. Además la secreción de insulina en células β pancreáticas aisladas no difiere por sexo.

En las hembras diabéticas existe una mayor disminución en el área de islotes en el páncreas, el número y el tamaño así como en el área de células beta, esto tiene como consecuencia niveles de insulina menores, lo cual se refleja en mayor hiperglucemia y mortalidad.

Las ratas hembra desarrollan diabetes más severa después de la administración de STZ que las ratas macho debido posiblemente a su menor sensibilidad a la insulina.

Referencias

1. American Diabetes Association (2005) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28, Supplement 1:S5-S10
2. Ashcroft FM, Rorsman P (1989) Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog BiophysMol Biol* 54:87-143.
3. Bergman RN, Ader M (2000) Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 11:351-356
4. Blaak E (2001) Gender differences in fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 4:499-502
5. Boden G, Shulman GI (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 3:14-23
6. Bolzan AD, Bianchi MS (2002) Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 512:121-134
7. Clegg DJ, Riedy CA, Smith KA, Benoit SC, Woods SC (2003) Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* 52:682-687
8. Dulin WE, Wyse BM (1969) Reversal of streptozotocin diabetes with nicotinamide. *Pro Soc Exp Biol Med* 130:992-994
9. Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C & Delemarre-van de Waal HA 2000 The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research* 48 803-807.

10. Farooqi IS, Keogh JM, Kamath S, Jones S, Gibson WT, Trussell R, Jebb SA, Lip GY, O'Rahilly S (2001) Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature* 414:34-35
11. Faure A, Haouari M, Sutter BC (1988) Short term and direct influence of oestradiol on glucagon secretion stimulated by arginine. *Diabetes Metab* 14:452-454
12. Fernández-Mejía C (2006) Molecular basis of type-2 diabetes. *Molecular Endocrinology. Research Signpost Kerala, India.* 87-108
13. Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G (1997) Insulin resistance and hypersecretion in obesity. *J Clin Invest* 100:1166-1173
14. Friedman JM (2002) The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60:S1-S14
15. Galipeau DM, Yao L & McNeill JH (2002) Relationship among hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypertension is dependent on sex. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 283 H562-H567
16. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, Ye J (2004) Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology* 18:2024-2034
17. Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML (2000) Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J Clin Invest* 105:271-278

18. Goren HJ, Kulkarni RN, Kahn CR (2004) Glucose homeostasis and tissue transcript content of insulin signaling intermediates in four inbred strains of mice: C57BL/6, C57BLKS/6, DBA/2, AND 129X1. *Endocrinology* 154:3307-3323
19. Gui Y, Silha JV, Murphy LJ (2004) Sexual Dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obesity Research* 12:1481-1491
20. Han J, Xu J, Epstein PN & Liu YQ 2005 Long-term effect of maternal obesity on pancreatic beta cells of offspring: reduced beta cell adaptation to high glucose and high-fat diet challenges in adult female mouse offspring. *Diabetologia* 48 1810-1818.
21. Havel PJ, Hahn TM, Sindelar DK, Baskin DG, Dallman MF, Weigle DS, Schwartz MW (2000) Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *Diabetes* 49:244-252.
22. Havel PJ, Uriu-Hare JY, Liu T, Stanhope KL, Stern JS, Keen CL, Ahren B (1998) Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol* 274:R1482-R1491
23. Hawkins T, Gala RR, Dunbar JC (1993) The effect of neonatal sex hormone manipulation on the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 202:201-205
24. Herr RR, Jahnke AD, Argoudelis AD (1967) The structure of Streptozotocin. *J Am. Chem Soc* 89:4808-4809

25. Hoffman RP, Vicini P, Sivitz WI, Cobelli C (2000) Pubertal Adolescent Male-Female Differences in Insulin Sensitivity and Glucose Effectiveness Determined by the Compartment Minimal Model. *Pediatric Research* 48:384-388
26. Hosokawa M, Dolci W, Thorens B (2001) Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing beta cells to streptozotocin. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1114-1117
27. Houdijk EC, Engelbregt MJ, Popp-Snijders C, Delemarre-Vd Waal HA. (2000) Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats. *J Endocrinol.* 166:599-608
28. Ishaque A, Al-Rubeai M (2002) Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. *Apoptosis* 7:231-239
29. Kershaw EE & Flier JS 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 2548-2556.
30. King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global Burden of Diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431
31. Kolb H, Burkart V (1999) Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care* 22:B16-B20
32. Laakso M (1993) How good a marker is insulin level for insulin resistance? *Am J Epidemiol* 137:959-965
33. Lampeter E, Signore A, Gale E, Pozzilli P (1989) Lessons from the NOD mouse for the Pathogenesis and immunotherapy of human type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 32:703-708

34. Lazar MA 2005 How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307 373-375.
35. LeDoux SP, Hall CR, Forbes PM, Patton NJ, Wilson GL. (1988) Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan and streptozocin toxicity. *Diabetes*. 37:1015-1019
36. Li Z, Karlsson FA, Sandler S (2000) Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *J Endocrinology* 165:93-99
37. Like AA, Rossini AA (1976) Streptozotocin induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193:415-417
38. Lodish H, Berk A, Zipursky, SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE *Molecular Cell Biology* 4th ed New York: W. H. Freeman & Co.; 2000
39. Lopes Da Costa C, Sampaio De Freitas M, Sanchez Moura A (2004) Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats. *J Nutr Biochem* 15:236-241
40. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Katagiri K (1981) Effect of Castration on the Appearance of Diabetes in NOD mouse. *Exp Anim* 30:137-140
41. Mari A, Ahrén B, Pacini G (2005) Assessment of insulin in relation to insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab* 8:529-533
42. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G (1998) Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47:224-229

43. McAuley KA, Williams SM, Mann JI Walker RJ, Lewis-Barned NJ, Temple LA, Duncan AW (2001) Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care* 24:460–464
44. Mittendorfer B (2005) Sexual dimorphism in human lipid metabolism. *J Nutri.* 135: 681-886
45. Morimoto S, Cerbón MA, Alvarez-Alvarez A, Romero-Navarro G, Díaz-Sánchez V (2001) Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. *Life Sci* 68:2979-2985
46. Morimoto S, Mendoza-Rodríguez CA, Hiriart M, Larrieta ME, Vital P, Cerbón MA (2005) Protective effect of testosterone *J Endocrinol.* 187:217-224
47. Murphy MJ, Metcalf BS, Voss LD, Jeffery AN, Kirkby J, Mallam KM, Wilkin TJ; The EarlyBird Study (EarlyBird 6) (2004) Girls at five are intrinsically more insulin resistant than boys: The programming hypotheses revisited. *The EarlyBird Study (EarlyBird 6). Pediatrics* 113:82-86
48. Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B (1998) Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J* 12:1341-1348
49. Norman AW, Litwack G (1997) Hormones. *Pancreatic Hormones: Insulin and glucagons. Second Edition. Academic Press. Unites States of America* 193-227
50. Nussey S, Whitehead S (2001) *Endocrinology. An integrated approach, BIOS Scientific Publishers Ltd London, UK*

51. Olson AL, Pessin JE (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 16:235-256
52. Papaccio G, Pisanti FA, Latronico, MV, Ammendola E, Galdieri M (2000) Multiple Low-Dose and Single High-Dose Treatments with Streptozotocin do not Generate Nitric Oxide. *Journal of Cellular Biochemistry* 77:82-91
53. Patel YC, Cameron DP, Bankier A et al (1978) Changes in somatostatin concentration in pancreas and other tissues of streptozotocin diabetic rats. *Endocrinology* 103:917-923
54. Patti ME, Kahn CR (1998) The insulin receptor -a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9:89-109
55. Pessin JE, Saltiel AR (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:165-169
56. Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH (1999a) Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 96:3059-3064
57. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH (1999b) Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 20:171-181
58. Pinilla L, Seoane LM, Gonzalez L, Carro E, Aguilar E, Casanueva FF, Dieguez C (1999) Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. *Eur J Endocrinol* 140:468-473
59. Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC (1983) Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 24:366-371

60. Rakieten N, Rakieten MC, Nadkarn MV (1963) Studies on the diabetogenic action of Streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherapy Res* 29:91-98
61. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806
62. Scheepers A, Joost HG, Schurmann A (2004) The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28:364-367
63. Schein PS, Cooney DA, Vernon ML (1967) The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res* 27:2324-2332
64. Schwartz MW & Porte Jr. D 2005 Diabetes, obesity, and the brain *Science* 307 375-379.
65. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL (1999) Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401:73-76
66. Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171-176
67. Sima AAF y Shafrir E (2001). *Animal Models of Diabetes*. Harwood Academic Publishers. Singapore.
68. Smith JT y Waddell BJ 2003 Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. *The Journal of Endocrinology* 176 313-319

69. Sugden MC & Holness MJ (2002) Gender-specific programming of insulin secretion and action. *J Endocrinol.* 175:757-767
70. Sutter-Dub MT (1976) Preliminary report: effects of female sex hormones on insulin secretion by the perfused rat pancreas. *J Physiol (Paris)* 72:795-800
71. Sutter-Dub MT 2002 Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 67 77-93.
72. Unger RH (2003) Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 14:398-403
73. Vital P, Larrieta E, Hiriart M (2006) Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol.* 190:1-9
74. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053
75. Wilkin TJ, Voss LD, Metcalf BS, K, Jeffery AN, Alba S, Murphy MJ (2004) Metabolic risk in early childhood: the EarlyBird Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:S64-S69
76. Winer S, Astsaturon I, Gaedigk R, Hammond-McKibben D, Pilon M, Song A, Kubiak V, Karges W, Arpaia E, McKerlie C, Zucker P, Singh B, Dosch HM (2002) ICA69(null) nonobese diabetic mice develop diabetes, but resist disease acceleration by cyclophosphamide. *J Immunol* 168:475-482

77. Woods SC, Gotoh K, Clegg DJ (2003) Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med* 228:1175-1180
78. Xu G, Stoffers DA, Habener JF & Bonner-Weir S 1999 Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48 2270-2276.
79. Yamamoto, H., Uchigata, Y. y Okamoto, H (1981) Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 19:284-286
80. Zimmet P, Alberti KG Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787

Anexo 1.

El clamp euglicémico hiperinsulinémico, es la principal prueba para investigar y cuantificar la resistencia a la insulina, se llama así porque mide la cantidad de glucosa necesaria para compensar por un incremento en los niveles de insulina sin causar hipoglucemia. Fue reportado por primera vez por DeFronzo et al 1979. Esta prueba se realiza muy raramente en la atención clínica, pero se usa algunas veces en la investigación médica, para probar los efectos de diferentes medicamentos.

El procedimiento toma cerca de 2 horas. A través de una vena periférica, se inyecta insulina a 0.06 unidades por minuto por kg de peso corporal. Para compensar la inyección de insulina, se administra glucosa al 20% para mantener los niveles de glucosa sanguínea entre 5 y 5.5 mmol/l. El tiempo de la administración de glucosa se determina midiendo la glucosa sanguínea cada 5 minutos.

La relación de la glucosa administrada durante por lo menos 30 minutos de la prueba determina la sensibilidad a la insulina. Si se requiere niveles de 7.5 mg/min o mayores, el paciente es sensible a la insulina. Si se requiere niveles de 4.0 mg/min o menores, esto indica que el cuerpo es resistente a la acción de la insulina. Sin embargo, si se requieren niveles entre 4.0 y 7.5 mg/min, estos no son definitivos sugiere intolerancia a la glucosa, que es un síntoma inicial de la resistencia a la insulina.

Anexo 2.

La medición de glucosa se realizó por el método de glucosa oxidasa usando un glucómetro automático. Brevemente, cuando se aplica la muestra de sangre a la tira de prueba, la glucosa reacciona con los productos químicos presentes en la tira de prueba, produciendo una pequeña corriente eléctrica. Esta corriente se mide y el resultado se indica en el monitor. El tamaño de la corriente depende de la cantidad de glucosa presente en la muestra de sangre.

La zona del reactivo de cada tira de prueba contiene:

Glucosa dehidrogenasa (microbial)	0.05 u
NAD + (como sal de sodio)	7.2 µg
Fenantrolina quinona	0.4 µg
Ingredientes no reactivos	16.0 µg
Margen de ensayo: 20 - 500 mg/dl (1.1 - 27.8 mmol/L)	