



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE Y DE
REGENERACION DE CELULAS- β DEL PANCREAS
PRODUCIDO POR EL COMPUESTO THELZAN 101 EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE RATONES DIABETICOS
INDUCIDOS POR ALLOXAN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

OMAR MORALES RAMIREZ

ASESORA: DRA. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO
COASESOR: DR. CARLOS GERARDO GARCIA TOVAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



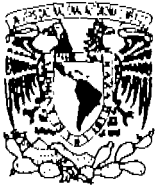
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



INSTITUTO NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio del efecto hipoglucemiante y de regeneración de células
beta del páncreas producido por el compuesto Thelzán 101 en un
modelo experimental de ratones diabéticos inducidos por Alloxán.

que presenta el pasante: Omar Morales Ramírez
con número de cuenta: 09855098-0 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Septiembre de 2005

PRESIDENTE	<u>Dra. Luisa Martínez Aguilar</u>	<u>L.M.A.</u>
VOCAL	<u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	<u>E.R.P.</u>
SECRETARIO	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	<u>S.D.B.A.</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	<u>E.R.M.</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	<u>R.B.S.</u>

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los siguientes Laboratorios:

Laboratorio de Citogenética L-521 del Departamento de la Sección de Ciencias Bioquímicas y Farmacología Humana, FES-Cuautitlán, UNAM, en donde se realizaron los estudios del efecto hipoglucemiante y regenerador de células- β pancreáticas, bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

Laboratorio L-711 de Morfología Veterinaria y Biología Celular de la Sección de Ciencias Morfológicas Agropecuarias, FES-Cuautitlán, UNAM, en donde se realizaron los estudios histopatológicos y de Inmunohistoquímica, bajo la dirección del Dr. Carlos Gerardo García Tovar y colaboración de los MVZ Alberto Chávez Enríquez y Germán Garrido Farfán.

Laboratorio del Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, en donde se realizaron los estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión, bajo la dirección de la Dra. Ma. De Lourdes Juárez Mosqueda.

Este trabajo fue apoyado por:

Cátedra de Genética y Citogenética Básica y Aplicada (IN1-18)

Cátedra de Morfología Veterinaria y Biología Celular (IN1-33)

AGRADECIMIENTOS:

A la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Gracias a la Máxima Casa de Estudios por permitirme el honor de pertenecer a la familia universitaria, gracias a todos mis maestros que jugaron un papel importante en mi formación profesional.

Las palabras algunas veces poco pueden hacer para resolver y mucho más para agradecer a todas aquellas personas a las que les debemos ese apoyo incondicional, leal, sincero y desinteresado, de ese don divino que ellos poseen, que es el verdadero intercambio del libre pensamiento, por lo que quiero agradecer a mis asesores por su invaluable ayuda en la realización y conclusión de este trabajo:

A mis directores de tesis

Dra. Sandra Díaz Barriga y el Dr. Carlos Gerardo García Tovar, gracias por su orientación, paciencia y consejos, por compartir conmigo parte de sus conocimientos y sobre todo el inculcarme esa pasión por la investigación.

Dra. Lourdes Juárez Mosqueda, gracias por su interés, disposición y todas las facilidades otorgadas para la realización experimental de este trabajo.

Al equipo de trabajo de Histología

MVZ. Alberto Chávez Enríquez, gracias por todo el apoyo y tiempo que me brindó en el análisis histopatológico.

MVZ. Germán Garrido Fariña, gracias por la ayuda y el asesoramiento en el procesamiento de las muestras para los estudios de histología.

Al histotecnólogo Francisco López López, gracias por el apoyo en el procesamiento de las muestras para los estudios de histopatología,

Inmunohistoquímica y microscopia electrónica, pero sobre todo por esa gran calidad humana que lo caracteriza.

MC. Pascual Portilla Pérez, gracias por confiar en mí para la realización de este proyecto sin siquiera conocerme, por todas las vivencias durante el desarrollo de este trabajo, por sus consejos, sugerencias, por todas las complicidades que hemos compartido y por que además de ser una gran persona eres un excelente amigo.

A mis sinodales

Gracias por su atención, su tiempo y su valiosa contribución durante la revisión de este trabajo.

A todos ustedes solo les quiero decir: que sí pude ver más allá que los demás, es por que siempre estuve sobre hombros de gigantes.

DEDICATORIAS:

Son tantas las personas a las que tengo que agradecer que me apoyaron física, moral y económicamente para la realización de este trabajo que no me alcanzarían los 28 años de sacrificio, esfuerzo, ahínco y ni siquiera las hojas que llevo esta misma tesis para reconocer su invaluable ayuda, a todos ustedes: mil gracias.

Papa dice que las cosas no se terminan hasta que no se acaban, que cuando se siembra la cosecha, la paciencia es amarga pero el fruto es dulce, y que el comienzo es la parte más importante del trabajo.

Dedico esta tesis a mi siempre amada esposa la Ingeniera en Alimentos Hatzel Citlali Reyes Arreguin que fue el principal motor para este sustento, sin olvidar a mis nobles niños que fueron el alma principal de este acometido, y que el grande y único tenga en su santa gloria.

A mi padre el Señor Manuel Morales Ruiz que me dio el apoyo moral que todo hijo necesita en esos momentos difíciles y el cual me preparo a lo largo de mi vida para hacerle frente a la misma.

A mi suegra la Señora Sandra Luz Arreguin Tovar quien me brindo un segundo hogar y lo más importante el cariño de la madre que siempre me faltó, sin olvidar el apoyo moral, físico, económico y sobre todo incondicional: a la que le quiero decir gracias totales.

A mis 11 hermanos que siempre fueron como una luna que eclipsó mi soledad cuando los necesite especialmente: Araceli, Elisa, Manuel y Carlos.

A mis asesores que me apoyaron en la conclusión de este trabajo:

A la Dra. Sandra Díaz, a la Dra. Lourdes Juárez, al Dr. Carlos Gerardo García Tovar, al MVZ. Alberto Chávez, al MC. Pascual Portilla y al Sr. Francisco López, a los que les quiero decir: que si pude ver más allá que los demás es por que siempre estuve sobre hombros de gigantes.

A los amigos que siempre creyeron en mí y que fueron como mis propios hermanos, a los que les quiero dedicar las siguientes líneas: si tienes un amigo,

has merecido un don divino, la amistad leal, sincera, desinteresada, es la verdadera comunión de las almas. Es mas fuerte que el amor, por que este suele ser celoso, egoísta y vulnerable. La verdadera amistad perdura y se fortalece a través del tiempo y la distancia. No se necesita ver frecuentemente al amigo para que la amistad perdure. Basta saber que este responderá cuando sea necesario, con un acto de afecto, de comprensión y aún de sacrificio. La amistad no se conquista, no se impone; se cultiva como una flor; se abona con pequeños detalles de cortesía, de ternura y sobre todo de lealtad; se riega con las aguas vivas de desinterés y de cariño silencioso. No importan las distancias, los niveles sociales, los años y las culturas: la amistad lo borra todo. El recuerdo del amigo lejano, del amigo de la niñez o de la juventud, produce la íntima alegría de haberlos conocido. Pues mi vida se enriqueció con su acto por breve que haya sido. La felicidad del amigo nos da felicidad en donde sus penas se vuelven nuestras, por que hay un maravilloso lazo invisible y que pocos pueden ver, que une a los amigos. Por lo que la amistad se hace bella sobre toda ponderación. Gracias por contar con todos ustedes; Francisco Velásquez Agullar, Fernando Compagny Macias, Raúl Galindo Rodríguez, David Carmona Guerrero, Gustavo Agustín Morales, Carolina Romero Díaz, Amalia, Virginia, Ana y los demás que me faltaron de la generación 25 de Q.F.B. Por que el que tiene un amigo, no conoce la soledad.

ENCONTRANDOME CON MI CONCIENCIA

Es acaso un pecado llegar al límite cuando has dado el último paso, siendo que dar el primero siempre es el más difícil, aun cuando no se puede seguir adelante. Algún tiempo atrás pensé en escribir esto. Es difícil encontrarte a ti mismo y hoy día me acabo de encontrar con mi conciencia y no se va la maldita. Ese es el lado oscuro que todos llevamos dentro y del cual tratamos de escapar. Donde la voz no tiene sentido, donde se olvida el mundo del cual procedemos y se tiene que adoptar el mundo en el cual vivimos. Cuando entras al juego de la vida, es decir, el juego que todos jugamos, nunca puedes sortear las cartas, te crees un ganador, sin embargo cuando te sometes a su mismo juego, solo eres un perdedor.

Muchos piensan que el obtener un título es como una ley suprema o una necesidad imperiosa. Después de un tiempo ganas dinero, te vuelves importante, pero también te vuelves insensible, te olvidas de lo que fue, te preocupas por lo que deja y lo que viene, pero yo no puedo olvidar.

Finalmente todos escapamos pero de distintas formas, a veces intento olvidar de donde vine y como llegue hasta aquí y lo que esto ha costado, quisiera olvidar mi infancia. Cuando somos niños creemos todo lo que dicen los adultos, pero todo es una burda mentira, que dejan una serie de cicatrices y estas si son para siempre....

Te enseñan a distinguir lo complicado de lo simple, lo que esta bien y lo que esta mal, a final de cuentas la gente dice una cosa y hace otra, casi todos sabemos que la mascara tras la cual nos escondemos es una simple y baja mentira, tarde o temprano cae, es entonces cuando descubrimos la persona que realmente somos y para cuando esto llega ya es demasiado tarde.

Para mi la vida misma comenzó a los veintitrés, tuve esposa e hijos, entonces era feliz, quizás no haya nada mas poderoso que la felicidad que da el placer de sentirse amado por una mujer y los ya cálidos, pero sin ellos todo es tristeza, era mi mundo entero, ahora todo es vacío, es como una pesadilla que ahoga mi voz, siento que el destino me ha cobrado mas de la cuenta y sin compasión, los días

son grises y no puedo ver la luz del sol, es probable que los rayos de sol no se hicieran para mí. Será que pedí demasiado para que no se me haya dado nada, pues eso es todo lo que tengo ahora. Nada de esto mejora pues yo sigo sintiendo lo mismo, creo que todo es más fácil cuando tienes a alguien a quien culpar, sin embargo yo sigo siendo el mismo y no veo la forma de cómo salir de esta nueva situación que me domina.

No cabe la menor duda que todos llevamos un ángel dentro, ese ser divino que nos cuida y nos protege, afortunadamente yo tengo a dos que me ayudaron a hacer lo que hice para cambiar lo que soy.

Papa dice que el futuro del existo se rige por cinco reglas básicas: decir siempre la verdad aunque las consecuencias tengan el mismo efecto que una mentira por malas que estas sean, no morder la mano que te da de comer, cuando bebas agua no te olvides de la fuente, no dudar en decir a alguien que lo quieres, que a las cosas se les tiene que dar el valor pues si no las cuidas te dejan.

Yo agrego una más, que me mantuvo mirando siempre adelante y sin tropezar y es: Que no siempre puedes obtener lo que quieres, pero si lo intentas algún día podrás lograrlo. Hoy día me gusta andar pero no sigo el camino, pues lo seguro ya no tiene misterio.

Debes encunado recuerdo que todos los momentos buenos y malos no son otra cosa mas que experiencias que nos ayudan día a día a ser grandes personas, por lo que trato siempre de recurrir a mis recuerdos para darle sentido a mi vida, la mayoría de mis metas y propósitos los he logrado a base de mis sueños y si mi felicidad esta en los sueños, por favor que nadie me despierte, soñar es lo único que no cuesta nada, razón por la cual nunca dejo de soñar, por que tarde o temprano alguno se cumple y sobre todas estas cosas pienso que yo no nací para perder, así de simple...

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	I
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	V
1.-INTRODUCCIÓN	1
2.-GENERALIDADES	1
2.1.-DIABETES MELLITUS	1
2.1.1-Definición	1
2.1.2.-Causas	2
2.1.3.-Tipos	2
2.1.4.-Síntomas	3
2.1.5.-Diagnóstico	5
3.-PÁNCREAS	7
3.1.-Anatomía y fisiología del páncreas (Islotes pancreáticos)	7
3.2.-Fisiopatología del páncreas	9
4.-INSULINA	11
4.1.1.-Función de la insulina	11
4.1.2.-Gen de insulina	11
4.1.3.-Estructura de la insulina	13
4.1.4.-Biosíntesis de la insulina	14
4.1.5.-Mecanismo de secreción de Insulina	15

4.1.6.-Modo de acción fisiológica de la Insulina	17
5.-INDUCTORES DE DIABETES MELLITUS	18
5.1.-Alloxán	18
5.2.-Estreptozotocina	22
6.-HIPOGLUCEMIANTES	23
6.1.-Clasificación general de los hipoglucemiantes	23
6.1.2.- Mecanismo de acción de los hipoglucemiantes orales	23
7.-JUSTIFICACIÓN	25
8.-OBJETIVOS	26
5.1.-Objetivo general	26
5.2.-Objetivos particulares	26
9.-METODOLOGIA	27
9.1.-Métodos	27
9.2.-Tratamiento de animales	27
9.2.1.-Fase I Diabetogénesis	27
9.2.2.-Fase II Efecto hipoglucemiante	28
9.2.3.-Fase III Efecto regenerativo	29
9.2.4.-Tinción de Hematoxilina-Heosina	29
9.2.5.-Inmunofluorescencia Indirecta	29
9.2.6.-Microscopía Electrónica de Transmisión	30
9.3.-Diagrama de flujo experimental	31

10.-RESULTADOS	32
10.1.-Fase I Diabetogénesis	32
10.2.-Fase II Efecto hipoglucemiante	33
10.3.- Fase II Efecto hipoglucemiante durante 18 días	33
10.4.-Fase III Efecto regenerativo	34
11.-ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL PÁNCREAS	35
11.1.-Grupo control	35
11.2.-Grupo control con Thelzán	36
11.3.-Grupo Alloxán control	37
11.4.-Grupo Alloxán con Thelzán	38
12.-DISCUSIÓN	39
13.-CONCLUSIONES	42
14.-REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Páginas
Fig.1.Representación esquemática de un islote de Langerhans	9
Fig.2.Ideograma del cromosoma 11	12
Fig.3. Esquema de las moléculas de pre-proinsulina, proinsulina e insulina	13
Fig.4.Conversión de pre-pro-insulina a insulina I y II	15
Fig.5.Mecanismo de secreción de la Insulina	17
Fig.6.Representación esquemática del receptor de insulina	18
Fig.7.Estructura química del Alloxán	19
Fig.8.Representación esquemática del mecanismo de acción del Alloxán	21
Fig.9.Estructura química de la Estreptozotocina	22
Fig.10.Valores promedio de la concentración de glucosa en sangre en una POTG en ratones tratados con Alloxán y con agua	32
FIG.11a. Valores promedio de la concentración de glucosa en sangre en una POTG de los animales alloxanados , el grupo control y control Thelzán 101	32
FIG. 11b. Determinación de glucosa en sangre en una POTG de los animales alloxanados y alloxanados que fueron administrados con los hipoglucemiantes Metformina y Thelzán 101	33
FIG.12. Valores promedio de la concentración de glucosa en sangre en ratones administrados con los diferentes tratamientos. (18 días)	33

FIG.13. Valores promedio \pm error estándar del efecto del compuesto Thelzán 101 en ratones administrados con los diferentes tratamientos	34
Fig.14. Microfotografía que representa el tejido pancreático de un ratón control sano sin ningún tratamiento y que fue teñido con H-E y tomado a 240X	35
Fig.15. Microfotografía que representa el tejido pancreático de un ratón control teñido con H-E y tomado a 2400X	35
Fig.16. Microfotografía marcada con anticuerpos anti-insulina en tejido pancreático de un ratón control sano sin ningún tratamiento 2400X	35
Fig.17. Corte de páncreas de ratón del grupo Control observado por MET a 2.5 μ m	35
Fig.18. Microfotografía que representa el tejido pancreático de un ratón control tratado con Thelzán 101 que fue teñido con H-E y tomado a 600X	36
Fig.19. Microfotografía que representa el tejido pancreático de un ratón control tratado con Thelzán 101 que fue teñido con H-E y tomado a 2400X	36
Fig.20. Microfotografía marcada con anticuerpos anti-insulina (verde) en tejido pancreático endocrino de un ratón control tratado con Thelzán 101. (Islote de Langerhans), a 2400X	36
Fig.21. Corte de páncreas de ratones del corte de páncreas de ratón del grupo Control Thelzán 101 observado por MET a 2.5 μ m	36
Fig.22. Microfotografía que representa el tejido pancreático de un ratón control inducido con Alloxán que fue teñido con H-E y tomado a 600X	37
Fig.23. Microfotografía que representa el tejido pancreático de un ratón control inducido con Alloxán que fue teñido con H-E y tomado a 2400X	37

Fig.24. Microfotografía marcada con anticuerpos anti-insulina (verde) en tejido pancreático endocrino de un ratón control inducido con Alloxán (Islote de Langerhans), a 2400X	37
Fig.25. Corte de páncreas de ratones del de ratón del grupo Control Alloxán observado por MET a 2.5 μm	37
Fig.26. Microfotografía que representa el tejido pancreático endocrino de un ratón Inducido con Alloxán y tratado con Thelzán 101 que fue teñido con H-E y tomado a 240X	38
Fig.27. Microfotografía que representa el tejido pancreático endocrino de un ratón inducido con Alloxán y tratado con Thelzán 101 que fue teñido con H-E y tomado a 2400X	38
Fig.28. Microfotografía marcada con anticuerpos anti-insulina (verde) en tejido pancreático endocrino de un ratón inducido con Alloxán y tratado con Thelzán 101 (islote de Langerhans), a 2400X	38
Fig.29. Corte de páncreas de ratones del grupo Control Alloxán-Thelzán 101 observado por MET a 2.5 μm	38
Tabla No.1. Distribución de animales en la fase II	28

ABREVIATURAS

AL	Alloxán
AMPc	Adenin monofosfato cíclico
ATP	Adenin trifosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina
DM	Diabetes mellitus
DMID	Diabetes mellitus Insulinodependiente
DMNID	Diabetes mellitus no insulinodependiente
Gk	Glucocinasa
GLUT2	Transportador de glucosa 2
GSH	Glutatión
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
PDX-1	Duodeno Pancreático Homeobox-1
PAF	Paraformaldehído
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
POTG	Prueba oral de tolerancia a la glucosa
SAPK2	Proteín quinasa-2 activada por estrés
STZ	Estreptozotocina

RESUMEN

Estudios clínicos de fase II han demostrado que el compuesto Thelzán 101 posee características hipoglucemiantes. El objetivo de este estudio fue probar si Thelzán 101 disminuía los niveles de hiperglicemia y su posible poder regenerador de células β pancreáticas en ratones CD-1 tratados con Alloxán. Para poder observar el estado de hiperglicemia se realizó una POTG a 8 ratones controles y 12 ratones que recibieron Alloxán, en el cual obtuvimos niveles de hiperglicemia en ayuno de 169.5 mg/dl, con diferencias estadísticamente significativas. Para poder evaluar el efecto hipoglucemiante a corto plazo del Thelzán 101 por medio de una POTG, lo comparamos con Metformina. Estos resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas a los 30, 60 y 90 minutos con respecto al tiempo 0. Sin embargo al realizar el efecto hipoglucemiante durante 18 días de cuatro grupos y sin el grupo de Metformina con lecturas de glucosa en ayuno, los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte para demostrar el efecto regenerador se sacrificaron a los 16 ratones de los cuatro grupos, a los cuales se les realizó un estudio de histopatología, en el cual se observó que los que fueron tratados con Thelzán 101 mostraron una histomorfología similar a los ratones controles (sin cambios patológicos aparentes), sin embargo en los ratones alloxanados, se observaron cambios patológicos. Cuando realizamos el conteo de células pancreáticas positivas a anticuerpos dirigidos contra insulina por inmunofluorescencia, los grupos de ratones que fueron tratados con Thelzán 101 siempre presentaron una mayor cantidad de células pancreáticas con diferencias estadísticamente significativas, y en el caso de los otros grupos

que no recibieron Thelzán 101 se observó todo lo contrario (comparativamente contra el control, Thelzán 101 con más islotes y Alloxán con menos Islotes). Por otra parte, en las imágenes de MET se encontró daño severo a nivel de retículo endoplásmico en los ratones que se trataron con Alloxán, en cambio en los ratones alloxanados que se trataron con Thelzán 101 presentaron un daño menor y una mejoría notable. Los resultados presentados sugieren que Thelzán 101 juega un papel importante en la regeneración de células β . Y una reconversión estructural del páncreas en la degeneración inducida por Alloxán en este tejido en ratones, por lo que se sugiere estudios a futuro.

1.-INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus en todo el mundo es un problema de salud debido a que poco menos de 150 millones de personas están afectadas por lo cual ha sido considerada como una de las epidemias a las cuales la población le tiene temor, no sólo por ser una enfermedad crónica sino por los cuidados médicos que ésta requiere que van más allá del control de la glicemia (10,24,25,). Los datos estadísticos indican que el número de adultos con diabetes se ha incrementado en México entre 1992-2002, representando la tercera causa de muerte a nivel nacional con una tasa de mortalidad total del 81.90 por cada 100.000 habitantes, según datos de la base de mortalidad INEGI-SSA y proyecciones de población (35,38). La etiología de la diabetes mellitus todavía no está totalmente aclarada. Seguramente se trata de una enfermedad multifactorial compleja. Para su manifestación deben coincidir factores de herencia e influencias externas. La producción de insulina puede faltar o ser insuficiente, o bien, se produce pro-insulina o una insulina diferente de la normal. Puede estar trastornada la dinámica de la secreción, de manera que la respuesta a un estímulo de glucosa no corresponde a la demanda o no es suficientemente rápida (5,10, 16, 31,).

2.-GENERALIDADES

2.1.-DIABETES MELLITUS

2.1.1.-Definición

La diabetes mellitus (DM) es una alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono debida a una falla o defecto en la acción de una hormona segregada por el páncreas, la insulina (2).

2.1.2.-Causas

Pueden estar involucrados diversos factores como:

- Factores genéticos
- Factores autoinmunes
- Virus
- Bacterias
- Irritantes químicos

2.1.3.-Tipos de diabetes

- Diabetes tipo 1

En este tipo de diabetes el páncreas no produce insulina o produce muy poca. Aunque las causas exactas aún no se conocen realmente, los científicos saben que el propio sistema de defensa del organismo (*sistema inmunológico*) ataca y destruye las células productoras de insulina (*células beta*) y éstas no pueden producir más insulina. Esto generalmente ocurre en niños y jóvenes, por eso también se le conoce como *diabetes juvenil*.

Debido a que la insulina es necesaria para poder vivir, las personas, con diabetes tipo 1 deben inyectarse insulina todos los días para poder metabolizar los alimentos que consumen, es por eso que también se le llama Diabetes insulino-dependiente (DMID).

- Diabetes tipo 2

En la diabetes tipo 2 el páncreas produce insulina, pero por alguna razón, el organismo no es capaz de usarla adecuadamente, por lo que a pesar de que

existe insulina en cantidades adecuadas, los niveles de glucosa en la sangre no son normales.

La diabetes tipo 2, es conocida también como "Diabetes de adultos" ó (DMNID), ya que generalmente ocurre en personas mayores de 40 años, aunque últimamente se ha incrementado el número de casos en adolescentes y niños.

Este tipo de diabetes, generalmente también ocurre en personas con sobrepeso. La probabilidad de presentar diabetes tipo 2 se duplica con cada 20% de exceso de peso. Se cree que el exceso de grasa en el organismo, disminuye la función efectiva de la insulina (1,18, 25).

2.1.4.-Síntomas de la Diabetes

Los síntomas de la diabetes tipo 1 generalmente aparecen repentinamente y son:

- Orina frecuente y en grandes cantidades.
- Sed excesiva.
- Hambre excesiva a toda hora.
- Pérdida de peso repentino sin causa aparente.
- Debilidad y somnolencia.
- Cambios repentinos en la visión o visión borrosa.
- Náuseas y vómitos.

Síntomas de la diabetes tipo 2

Los síntomas de la diabetes tipo 2, generalmente aparecen gradualmente y son:

- Orina frecuente y en grandes cantidades.
- Sed excesiva.
- Hambre excesiva a toda hora.
- Sensación de cansancio.
- Cambios repentinos en la visión o visión borrosa.
- Náuseas y vómitos.
- Infecciones frecuentes, generalmente en las encías u orina.
- Hormigueo, entumecimiento en manos y pies.
- Picazón en la piel y genitales.
- Cortaduras y heridas que tardan en cicatrizar.
- Piel seca.

La diabetes tipo 2 (*no insulino dependiente*), puede pasar inadvertida por muchos años, y en algunos casos es diagnosticada cuando ya se han producido daños irreversibles en el organismo. Por eso es recomendable que todas las personas se realicen un examen de *glucemia* por lo menos una vez al año (2,12, 18, 32,).

2.1.5.-Diagnóstico

2.1.5.1.-Glucosa plasmática.

La presencia de glucosa en concentración superior a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en plasma venoso, en ayunas, es compatible con el diagnóstico de Diabetes mellitus, sí se ha presentado al menos en dos ocasiones sin otra causa que lo justifique.

Los valores inferiores a 115 mg/dL (6.4 mmol/L) descartan el diagnóstico. Conviene destacar que el nivel sanguíneo de glucosa es inferior en sangre venosa que en sangre arterial y capilar (sangre obtenida por punción de la yema del dedo), de modo que el nivel de glucosa esta determinado por el punto de extracción de la sangre (2,39).

2.1.5.2.-Curva de sobrecarga oral de glucosa.

Es la principal prueba de diagnóstico al someter al organismo a una cantidad estándar de glucosa que se debe administrar en un tiempo de dos horas. Se efectúa con 75 g de glucosa oral o con 1.75 g/Kg de peso hasta 75 g, en el caso de niños. Se acompaña con 400 ml de agua y se ingiere en 5-10 minutos. Según los grupos de expertos, se debe extraer una muestra basal y otra a las 2 horas. Normalmente la curva, sí hay buena absorción, debe superar en algún punto los 200 mg/dL, y normalizarse a los 120 minutos, con valores inferiores a 140 mg/dL. Se considera estado de intolerancia a la glucosa, situación que es reversible con el tratamiento adecuado, sí en el punto de los 120 minutos, la concentración plasmática de glucosa está entre 140 y 200 mg/dL. Por encima

de este límite, el resultado es compatible con un estado de Diabetes mellitus (2,39,).

2.1.5.3.-Glucosa urinaria.

La glucosa urinaria refleja en ausencia de daño renal, la superación del umbral renal, concentración sanguínea de la glucosa por encima de la cual aparecería en orina. Este límite se sitúa entre 160-180 mg/dl de glucosa en sangre. Como prueba diagnóstica tiene un valor muy limitado por el cambiante grado de dilución que puede presentar. Sin embargo, su análisis tiene interés dentro de las pruebas urinarias de carácter rutinario para la detección de alteraciones (39).

2.5.1.4.-Test de O'Sullivan.

Se realiza durante el sexto o séptimo mes de embarazo y se utiliza para descartar o detectar precozmente los estados de Diabetes durante la gestación que en un número muy significativo desembocarán a lo largo de la vida en cuadros de Diabetes mellitus. Se extrae una muestra de sangre una hora después de ingerir 50g de glucosa y no debe superar los 140 mg/dl. Si es para diagnóstico, se administran 200g y se obtienen muestras básales a la 1, 2, y 3 hora. Los niveles máximos de la normalidad son de 105, 190, 165 y 145 mg/dl.

2.5.1.5.-Insulina o péptido C.

Tanto en la extracción basal como tras la sobrecarga puede ser interesante conocer los cambios de la insulina plasmática. Puede emplearse el péptido C

para valorar la producción pancreática residual de Insulina si el paciente se inyecta insulina. Este péptido C es un fragmento inactivo liberado por el páncreas en proporción 1:1. En la Diabetes tipo 1, la producción de la hormona es prácticamente nula, mientras que en la Diabetes tipo 2 tiende a ser elevada para vencer la resistencia de los tejidos a su acción.

2.1.5.6.-Anticuerpos.

La diabetes mellitus tipo 1 se debe a la destrucción de origen autoinmune de las células β del páncreas y conlleva a la deficiencia absoluta de Insulina. En un elevado porcentaje de los pacientes, se detectan anticuerpos anti-células β , anticuerpos anti-insulina y anticuerpos anti-descarboxilasa de ácido glutámico. Estos anticuerpos se pueden detectar en ocasiones antes de la aparición de la enfermedad, lo que les da un gran Interés predictivo (2,39).

3.-PÁNCREAS

3.1.-Anatomía y fisiología del páncreas

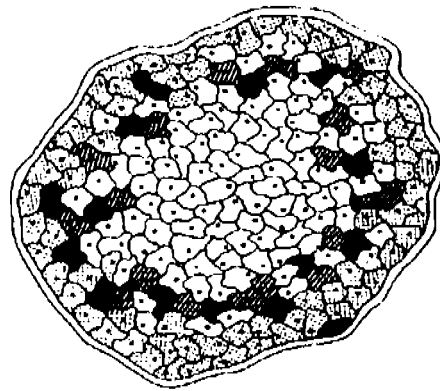
La palabra páncreas deriva de las raíces griegas "pan" que significa "todo" y "creas" que significa carne. Está alojado profundamente en la cavidad abdominal y en el adulto, mide alrededor de 12 a 20 cm de largo y pesa de 70 a 120 gramos. Está conectado al duodeno por el Divertículo duodenal, en donde el conducto pancreático principal se une con el conducto colédoco. Los términos cabeza, cuello, cuerpo y cola son utilizados para designar las regiones del órgano de proximal a distal. En los roedores la forma del páncreas es menos definida que en humanos (32, 33,37).

El páncreas es un órgano esencialmente importante para la digestión y la homeostasis de la glucosa en organismos superiores. Comprende tejido endocrino como exócrino. Endocrinamente libera enzimas al tracto digestivo que son requeridas para el balance nutricional, mientras que exocrinamente se secretan diferentes hormonas al torrente sanguíneo para coordinar y regular el uso de la glucosa (8).

Microscópicamente el páncreas exocrino es una glándula acinar lobulada y ramificada en la que las células secretoras están agrupadas dentro de acines. Son de forma piramidal con núcleos basales; presentan un arreglo regular de retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi prominente y numerosos gránulos que contienen enzimas digestivas en forma zimogénica.

La luz de los acines es pequeña y puede ser terminal o intercalar. En la unión de los acines y los ductos están las células centroacinares que son cuboidales bajas, ricas en mitocondrias; estas células secretan los componentes no enzimáticos del jugo pancreático, incluyendo bicarbonato.

Las células endocrinas están agrupadas dentro de los islotes pancreáticos, que son pequeños grupos celulares esferoidales compactos embebidos en el tejido exócrino. Existen cuatro principales tipos de células endocrinas. Las α (alfa) que secretan glucagón, β (beta) las que secretan insulina y también un antagonista de la insulina denominado amilina, y constituyen la mayoría de células en el islote, las δ (delta) que secretan somatostatina y las PP (ó F) que secretan el polipéptido pancreático (Ver Figura 1). (33)



Cel-lulas α		→ Glucagón
Cel-lulas β		→ Insulina
Cel-lulas γ		→ Somatostatina
Cel-lulas PP		→ Polipéptido pancreático

Fig.1.Representación esquemática de un Islote pancreático (I. Langerhans 4).

3.2.-Fisiopatología del páncreas

La compleja maquinaria que utiliza el páncreas para cumplir con sus funciones, emplea una cadena de eventos especializados que requieren de un proceso altamente coordinado y adecuadamente controlado. Para tal fin utiliza barreras de protección o semáforos de tránsito, que laborando ordenadamente contribuyen a que el funcionamiento se adapte y trabaje eficazmente para mantener la homeostasis, cualquier desequilibrio conduce a diferentes fisiopatologías, una de ellas es la Diabetes mellitus (29):

- La diabetes resulta de un desorden en el metabolismo de la glucosa relacionado con la ausencia, administración inadecuado o de una pobre utilización de la insulina disponible.
- Si hay deficiencia de insulina, la glucosa no puede entrar a la célula.
- Aumenta la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo se produce (**hiperglicemia**).
- El aumento en la concentración de glucosa produce un gradiente osmótico que causa el movimiento de fluido del espacio intracelular al espacio intersticial, de donde es eliminado por los riñones.
- Cuando el nivel de glucosa sérico excede el potencial renal (± 180 mg/dl), se comienza a perder en la orina (**glicosuria**), junto con el agua (**polluria**).
- La pérdida de fluidos causa sed excesiva (**polidipsia**).
- Durante la insuficiencia de insulina se pierden proteínas.
- Las proteínas y las grasas se rompen y se convierten en glucosa (**glucogénesis**) por el hígado.
- Esto contribuye a la hiperglicemia.
- Se activa el mecanismo del hambre (**polifagia**), pero la ingesta de alimentos agrava el problema.
- Cuando la insulina está ausente, la glucosa detiene el metabolismo celular y el cuerpo selecciona fuentes de energía alterna, principalmente la grasa.
- Las grasas se rompen en ácidos grasos y glicerol, para ser convertida en cuerpos cetónicos (ácido β -hidroxibutírico, ácido acético y acetona).

- Los cuerpos cetónicos pueden usarse como fuente de energía, pero su uso es limitado.
- El exceso es eliminado en la orina (**cetonuria**) o por los pulmones (**respiraciones cetónicas**).
- Los cuerpos cetónicos en la sangre (**cetonemia**) son ácidos fuertes que bajan el pH (cetoacidosis).
- El sistema respiratorio intenta eliminar el exceso de CO₂ aumentando la frecuencia y profundidad de las respiraciones (**Respiraciones Kussmaul**).
- La hiperventilación es característica de acidosis metabólica
- La muerte celular causa que las células liberen potasio al espacio intersticial y a la circulación para luego ser excretado por los riñones.
- Hipokalemia (37).

4.-INSULINA

4.1.1.-Función de la Insulina

La insulina es la hormona sintetizada por las células β del páncreas, la cual es básica para la homeostasis metabólica (4,6).

4.1.2.-Gen de Insulina

El gen responsable de la síntesis de la Insulina humana se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 (p15.5), que consta de tres intrones y exones (Ver Fig.2). Existen dos genes que codifican para dos moléculas: proinsulina I y II. Estos genes en la rata se encuentran localizados en el cromosoma 11. El gen promotor de la Insulina consta de una serie de secuencias para los elementos A,

E, C1 y Z que se unen a proteínas de unión a secuencias específicas de DNA ó factores de transcripción. El transcrito de RNA tiene unos 1500 nucleótidos y los niveles de RNA están modulados por glucosa, AMPc. Las citocinas, Iones y aminoácidos que también son capaces de regular la expresión del gen (4,36).

La glucosa regula la transcripción del gen de insulina actuando sobre diversas proteínas del complejo de activación de la transcripción. La glucosa estimula la unión del factor de transcripción PDX-1 al elemento A del promotor, fosforilando a PDX-1 a través de la acción de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K) y la proteín quinasa-2 activada por estrés(SAPK2).

La regulación de la síntesis de insulina por la glucosa se realiza principalmente por medio de un control post-transcripcional del RNA y de la traducción a pre-proinsulina (10,16, 31).

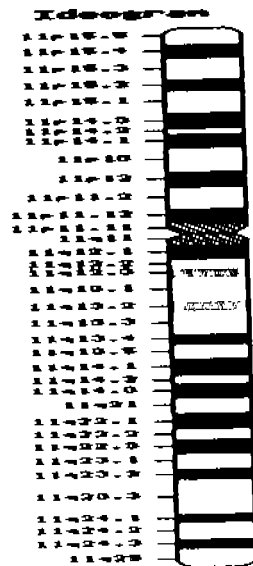


Fig.2.Ideograma del cromosoma 11 humano (36).

4.1.3.-Estructura de la Insulina

La molécula de la Insulina esta constituida por dos cadenas polipeptídicas y una masa molecular cercana a 6000 Daltons. Una de las cadenas designada A, está compuesta por 21 aminoácidos; la otra, cadena B, posee 30 aminoácidos. Ambos polipéptidos están unidos entre sí por dos puentes disulfuro que se extienden desde las cisteínas en las posiciones 7 y 20 de la cadena A a las cisteínas 7 y 19 de la cadena B, respectivamente. Entre las dos cisteínas de la cadena A (la 6 y la 11) se establece un tercer puente disulfuro (puente Intracatenario). La presencia de estos puentes disulfuro es indispensable para la actividad biológica de la hormona; Sin embargo, aunque los más importantes son los extremos de la cadena A y la parte intermedia de la B (Ver Fig.3). Además para que haya un buen reconocimiento del receptor y una efectiva función biológica de la insulina, depende también de la estructura tridimensional y en el caso de la Insulina, de la tendencia espontánea a la autoagregación (4,6).

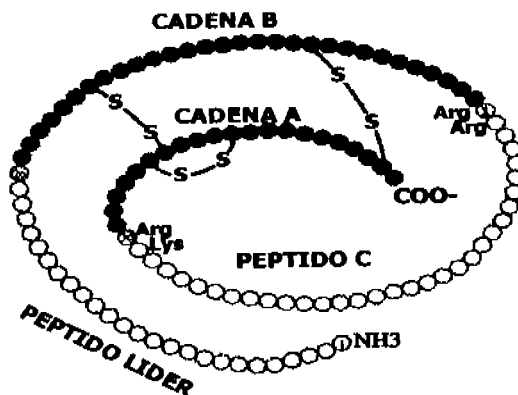


Fig.3. Esquema de las moléculas de pre-insulina (NH₃-1 al aminoácido 26 péptido líder), proinsulina (cadena A, B y péptido C), e insulina (cadena A y B), (6).

4.1.4.-Biosíntesis de la insulina

La insulina se sintetiza en las células β de los islotes pancreáticos como un precursor. El primer compuesto en la secuencia de su síntesis es la "pre-proinsulina", péptido resultante de la transcripción aminoacídica transmitida por el RNA mensajero en el ribosoma.

La pre-proinsulina es transportada al retículo endoplásmico rugoso, en donde se pliega espacialmente y sufre una sulfo-oxidación apareciendo 2 puentes disulfuros en la molécula, generándose en esta forma la "proinsulina", compuesta de cadenas tipo A y B. En el aparato de Golgi se estructura una membrana alrededor de un número determinado de moléculas, constituyéndose un gránulo.

En el gránulo, bajo la acción de enzimas de naturaleza proteolítica, se escinde progresivamente la molécula de pro-insulina, dando lugar como producto final a cantidades equimolares de insulina y péptido C, proceso que no se completa totalmente quedando un pequeño porcentaje de proinsulina. Adicionalmente, existe captación de zinc, formándose gránulos de zinc-insulina.

Los gránulos son transportados a la membrana plasmática y una vez ahí se fusionan a ésta, liberando su contenido al espacio extracelular, así la insulina en forma de monómero, junto al péptido C, es difundida hacia los capilares en forma equimolar (4,6,12).

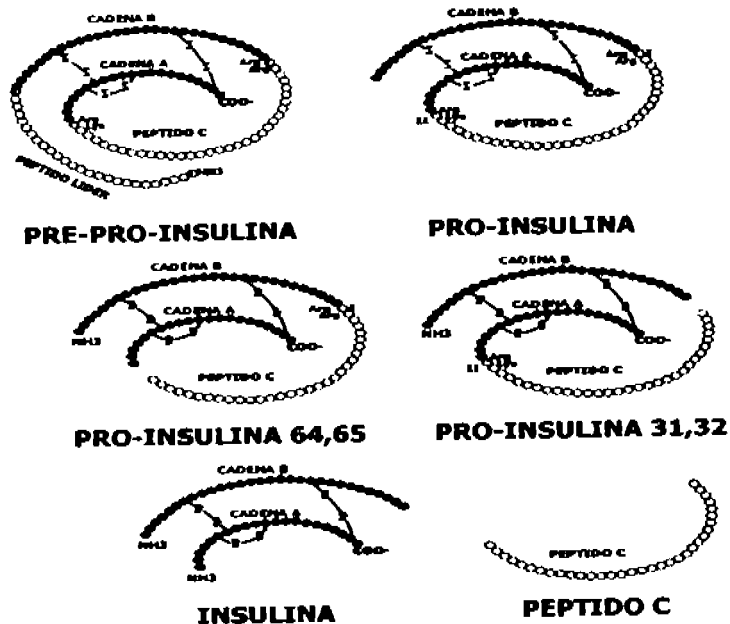


Fig.4. Conversi3n de pre-pro-Insulina a insulina. I y II: corresponden a las endopeptidasas 1 y 2 (4).

4.1.5.-Mecanismo de secreci3n de Insulina

Hay diferentes factores que regulan la secreci3n de insulina pero la glucosa es el de mayor importancia fisiol3gica, la secreci3n es regulada por la interacci3n de sustratos, del sistema nervioso aut3nomo, de hormonas y de se1ales intercelulares (paracrinas). Las c3lulas β tienen la capacidad de transportar a trav3s de la membrana plasm3tica grandes cantidades de glucosa mediante el transportador espec3fico GLUT2 y es gracias a esta capacidad de transporte que hay equilibrio entre la concentraci3n de glucosa en sangre y citosol, se inicia la glucolisis oxidativa generando ATP, equivalentes de oxidaci3n y reducci3n y la

movilización de calcio, proceso que regula finalmente la exocitosis de insulina. El ATP generado origina la salida de K^+ dependiente de ATP, la despolarización de la célula, la apertura de canales de Ca^{++} dependiente del voltaje y finalmente la movilización de los gránulos de insulina, que salen de la membrana por el proceso de exocitosis (Ver Fig.5).

El tiempo de vida media de la insulina es de 4.8 minutos y el de la proinsulina es de 17.5 minutos.

La degradación de la insulina se realiza en hígado y riñón, pero de preferencia a nivel hepático y la del péptido C y proinsulina a nivel renal. La insulina en un alto porcentaje es captada en su primer paso por el hígado, no así el péptido C.

El catabolismo se inicia con la ruptura de los puentes disulfuros por la acción de la *glutación insulíntransferasa*, para luego iniciarse la proteólisis, liberando péptidos inactivos (4,10).

hormonas, entre las que destacan las catecolaminas, glucagón, hormona de crecimiento, corticoides, estrógenos, progesterona y lactógeno placentario (6).

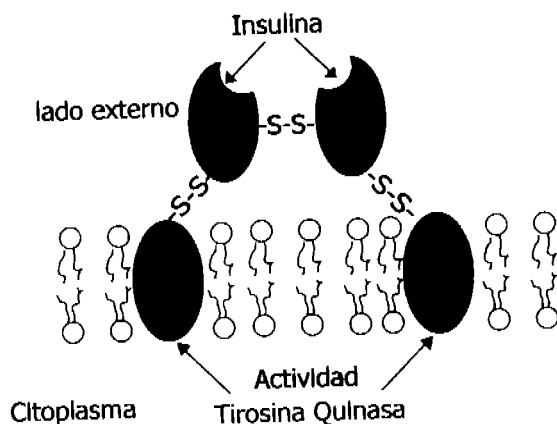


Fig.6.Representación esquemática del receptor de Insulina, cuando la Insulina se fija a las unidades α produce un cambio conformacional, que se transmite a la unidad β y activan a la tirosina-quinasa, adquiriendo el receptor la capacidad de autofosforilarse (6).

5.-INDUCTORES DE DIABETES MELLITUS

5.1.-Alloxán

La inducción experimental de diabetes en ratas se logra usando químicos que selectivamente destruyen células β pancreáticas, las sustancias más usadas para inducir diabetes son el alloxán y la estreptozotocina. La acción citotóxica de ambos agentes diabéticos es mediada por especies reactivas de oxígeno, sin embargo, el origen de su generación es diferente (20,22, 23, 26).

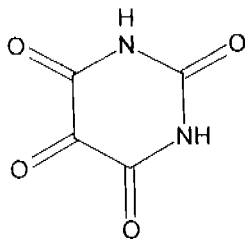


Fig.7.Estructura química del alloxán (9).

Alloxán [2,4,5,6-(1H,3H)-pirimidinatetrona, $C_4H_2N_2O_4$], es un sustancia hidrofílica e inestable, el pH es neutral y su tiempo de vida media es de 1.5 minutos y se prolonga a temperaturas por debajo de $37^{\circ}C$. Fue descrita por primera vez por Brugnatelli en 1818. Wohler y Liebig usaron el nombre "alloxán" y describieron su síntesis por oxidación del ácido úrico, las propiedades diabetogénicas de este fármaco fueron reportadas muchos años después por Dunn. Sheehan y Mc Leite en 1943, quienes estudiaron los efectos de su administración en conejos y reportaron una necrosis específica de islotes pancreáticos. Desde entonces, el alloxán ha sido comúnmente utilizado en modelos animales de diabetes mellitus insulino dependientes (7,9).

La dosis que se utiliza de este compuesto para poder inducir diabetes por vía intravenosa en ratas es de 65 mg / kg. Cuando el alloxán se administra por vía i.p o subcutánea su dosis efectiva debe ser 2-3 veces mayor, dosis administradas por vía i.p por debajo de 150 mg / Kg. pueden ser insuficientes para inducir diabetes en ratas. Cuando los animales están en ayuno suelen ser más susceptibles al alloxán (26).

La acción del Alloxán en el páncreas es precedida por su rápida captación por las células β . Formando especies reactivas de oxígeno debido a su reducción. El alloxán reacciona con dos grupos SH de la glucocinasa, resultando la formación de enlaces disulfuro e inactivación de la enzima. El ácido dialúrico se forma como resultado de la reducción del Alloxán, éste es entonces re-oxidado generando radicales superóxido. La reacción entre el Alloxán y el ácido dialúrico provoca radicales intermediarios del Alloxán (HA) y un compuesto no identificado que absorbe a 305 nm es formado. El último aparece cuando el Alloxán es reducido por glutatión (GSH). Los radicales superóxido son capaces de liberar iones férricos desde ferritina y reducirse entonces a iones ferrosos. Fe^{3+} puede también ser reducido por radicales de Alloxán. También los radicales superóxido sufren dismutación a peróxido de hidrógeno:



Esta reacción puede ocurrir espontáneamente o puede ser catalizada por superóxido dismutasa. En la presencia de Fe^{2+} y peróxido de hidrógeno, el aumento de radicales hidroxil reactivos son entonces formados de acuerdo a la reacción de Fenton.



Uno de los objetivos de las especies reactivas de oxígeno es el DNA de las células de los islotes pancreáticos. Su fragmentación toma lugar en las células β expuestas a Alloxán. El daño al DNA estimula la poli-ADP-ribosilación, un proceso que participa en la reparación de DNA.

El Alloxán eleva libremente la concentración de calcio en el citosol de las células β del páncreas, induce la entrada del calcio desde fluidos extracelulares, exagerando la movilización de calcio desde almacenamientos celulares y su ilimitada eliminación desde el citoplasma. La entrada de calcio se intensifica debido a la despolarización que ejerce el alloxán, abriendo los canales de calcio de las membranas de las células β pancreáticas. Las exageradas concentraciones de calcio contribuyen a la liberación suprafisiológica de insulina y especies reactivas de oxígeno, que causan el daño de las células β pancreáticas (24, 26,27).

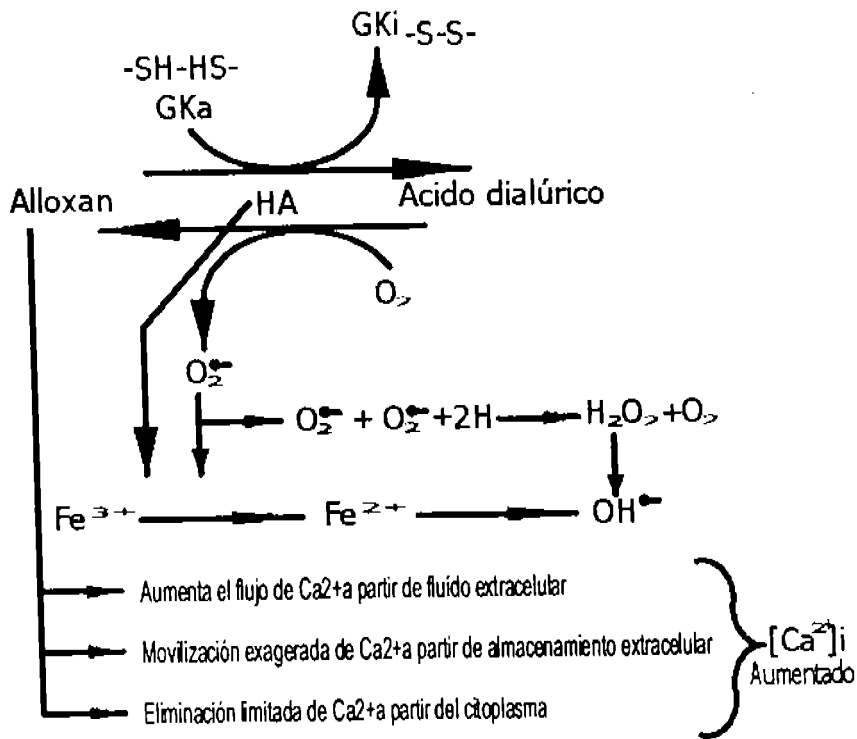


Fig.8. Representación esquemática del mecanismo de acción del alloxán (26).

5.2.-Estreptozotocina

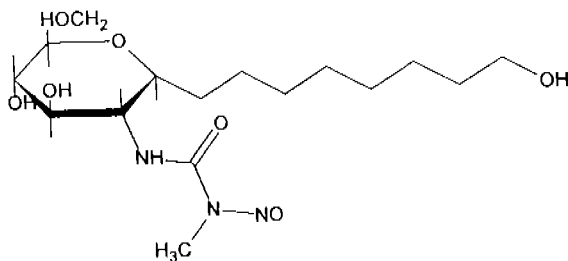


Fig.9. Estructura química de la estreptozotocina (9).

Estreptozotocina (STZ, 2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopirranosa), $C_8H_{15}N_3O_7$, es sintetizada por *Streptomyces achromogenes* y usada para inducir ambos tipos de diabetes DMID, DMNID, es usada frecuentemente por vía intravenosa para inducir en ratas DMID las dosis son entre 40 y 60 mg / Kg, altas dosis también son usadas así como también puede ser dado en múltiples dosis.

La estreptozotocina entra en las células β vía transportador de glucosa (GLUT2) y causa alquilación de DNA, el DNA dañado induce la activación de la poli-ADP-ribosilación, conduciendo al agotamiento del NAD^+ y ATP. Mejorando la defosforilación de ATP después del tratamiento con estreptozotocina, abasteciendo un sustrato para la xantina oxidasa resultando en la formación de radicales superóxido. Consecuentemente. Los radicales superóxido e hidroxilo son también generados. La estreptozotocina libera cantidades tóxicas de óxido nítrico que inhibe la actividad de la aconitasa y participa en el daño del DNA.

Como resultado de la acción de la estreptozotocina, las células β sufren destrucción por necrosis (16, 26,28).

6.-HIPOGLUCEMIANTES

Los hipoglucemiantes orales son un conjunto heterogéneo de fármacos que se caracterizan por producir una disminución de los niveles de glucemia, cumpliendo con este propósito a través de mecanismos pancreáticos y/o extrapancreáticos (12,15).

6.1.-Clasificación general de hipoglucemiantes orales

Los medicamentos existentes para el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2 pueden clasificarse de acuerdo a su efecto hipoglucemiante en:

a) Secretagogos de insulina:

➤ Sulfonilureas:

Primera generación: Tolbutamida, cloropropamida

Segunda generación: Glibenclamida, glipizida y glimepirida

➤ Meglitinidas (glinidas): Nateglinida y repaglinida

b) Sensibilizadores de insulina:

➤ Biguanidas: Metformina, fenformina

➤ Tiazolidinedionas (Glitazonas): rosiglitazona, pioglitazona

c) Inhibidores de la Alfa-glucosidasa:

➤ Acarbosa y miglitol.

6.1.2.-Mecanismo de acción de los hipoglucemiantes orales

a) Secretagogos de insulina:

Son medicamentos que, después de acoplarse con su receptor, en la célula- β , son capaces de provocar cierre de los canales de potasio ATP-dependientes de la membrana celular, que causa despolarización de la célula β y apertura de los canales de calcio, lo que permite el Influjó de éste al Interior de la célula y causa secreción de insulina por exocitosis. La rapidez del efecto de las glinidas, así como su corta duración, hacen la diferencia, cuando se comparan con los derivados de la sulfonilurea.

b) Sensibilizadores a la acción de la insulina:

- Biguanidas. Tienen efecto en la supresión de la producción hepática de glucosa. Para su acción requieren de la presencia de insulina y se considera que favorecen las acciones periféricas de la hormona. No tienen efecto secretagogo.
- Tiazolidinedionas. Ejercen su acción hipoglucemiante a través de sus efectos estimuladores de los receptores en la superficie nuclear (PPAR-Gama). La estimulación de estos receptores lleva a la reducción de la glucemia por un mecanismo todavía no bien conocido.

c) Inhibidores de la alfa-glucosidasa:

Disminuyen la conversión de los disacáridos en monosacáridos, a nivel intestinal, reduciendo la absorción de glucosa. Disminuyen, principalmente, la glucemia postprandial, aunque también tienen un efecto modesto en la glucemia de ayuno (6,30).

7.-JUSTIFICACIÓN

La Diabetes mellitus es una enfermedad pandémica, que representa en la historia de la humanidad la tercera causa de mortalidad en todo el mundo. Los números lo dicen todo: la incidencia global de diabetes tipo 2 se proyecta a 300 millones de personas para el año 2025, y muchos de aquéllos afectados serán adultos jóvenes.

Actualmente existen medicamentos que sólo controlan los niveles de hiperglicemia como son la metformina, glibenclámda y cuando no es así, se tiene que recurrir a la misma insulina y sus análogos teniendo el inconveniente de que su administración es traumática, existe riesgo de posibles alergias y el problema de intolerancia, por lo que es necesario descubrir y desarrollar nuevos medicamentos que nos brinden cada día más y mejores soluciones para la prevención de la enfermedad, aplicar un tratamiento adecuado así como la rehabilitación de los enfermos que incluso nos permita un día hacer realidad el sueño de curar la Diabetes mellitus. Así, el propósito del presente trabajo es validar el efecto hipoglucemiante y regenerador del compuesto Thelzán 101 que en estudios previos de fase II ha demostrado tener características hipoglucemiantes, razón por la cual diseñamos un modelo experimental de diabetes en ratones CD1 con la utilización de Alloxán como sustancia inductora.

8.-OBJETIVO GENERAL

Inducir diabetes a ratones de la cepa CD-1 por medio de alloxán para evaluar los efectos hipoglucemiantes del compuesto Thelzán 101, así como su efecto regenerador de las células- β del páncreas.

8.1.-Objetivos particulares:

8.1.1.- Desarrollar un modelo experimental de diabetes en ratones de la cepa CD1 utilizando como sustancia inductora el alloxán.

8.1.2.- Evaluar el efecto hipoglucemiante del compuesto Thelzán 101 comparándolo con metformina por medio de una POTG.

8.1.3.- Evaluar el poder regenerador del compuesto Thelzán 101 por medio del estudio histológico y conteo de Islotes en páncreas de ratones a los que se les produjo daño experimental del órgano por medio de la administración i.p del Alloxán.

9.-METODOLOGÍA

9.1.-Métodos

El compuesto Thelzán 101 fue amablemente proporcionado por los laboratorios Thelzán de México, S.A. de C.V. y todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co(St Louis MO), Biomeda, y Santa cruz.

El material biológico consistió en 20 ratones machos de la cepa CD1 de un peso promedio de 25 ± 3 g, que fueron facilitados por la ENCB-IPN, los cuales se mantuvieron a condiciones de temperatura de 20-25°C y alimentados con Purina Standard Chow.

9.2.-Tratamiento de animales

A todos los ratones se les determinó su nivel de glucosa en sangre de la manera siguiente:

Los animales fueron puestos en ayuno durante 8 horas y posteriormente se les cortó 3mm por arriba de la porción terminal de la cola. Se colocó una gota de su sangre en una tira reactiva para determinar la concentración de glucosa por medio del aparato Accutrend GCT Typ 1537954 con rango de medición de 20 a 600 mg/dl. Esta primera determinación se hizo con el objetivo de conocer los niveles normales de la cepa de ratones con la cual se trabajó.

9.2.1.-FASE I Diabetogénesis

A un lote de 12 ratones se les administró por vía i.p 150 mg/Kg de Alloxán por 3 días consecutivos y en ayuno. Posteriormente se determinó su nivel de glucosa; paralelamente, esto se realizó para un lote de 8 ratones los que fungieron como lote control.

Para ambos lotes de animales (aloxanados y controles) se les realizó una prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) que consistió en administrarles dextrosa 3g/Kg vía i.p para posteriormente determinar, de la forma descrita anteriormente, los niveles de glucosa en sangre a los 30, 60, 90, 120,150 y 180 minutos. Con estos datos se realizó la figura No.10, la prueba que se aplicó a todos estos datos fue una t de student para datos no pareados en la cual resultó una diferencia estadísticamente significativa.

9.2.2.-FASE II Efecto hipoglucemiante

Los animales de la fase I se distribuyeron en lotes de 4 ratones cada uno, formando así los siguientes grupos:

Tabla.1 Distribución de animales en la fase II

Grupo No	Tratamiento
1	Control
2	Control + Thelzán
3	Alloxanados
4	Alloxanados + Thelzán
5	Alloxanados + Metformina

Los tratamientos se aplicaron una vez que todos los animales estuvieron en ayuno de 8 horas y al término de éstas se les administró en el tiempo "cero" 3g/Kg de dextrosa vía i.p. Después de 30 minutos a los grupos 2 y 4 se les administró vía i.p el hipoglucemiante Thelzán 101 a la dosis de 51 mg/Kg y al grupo 5 el hipoglucemiante metformina a la dosis de 51 mg/Kg .

La determinación de los niveles de glucosa se realizó antes y después de la administración de dextrosa y los hipoglucemiantes, abarcando desde el tiempo "cero" hasta 180 minutos de tiempo transcurrido del experimento. Con estos

datos se construyó la figura No. 11a y 11b así como su análisis estadístico con ANOVA y la prueba de comparación de medias de Tuckey-Kramer ($p=0.05$).

El tratamiento con Thelzán 101 continuó por 18 días en los grupos 2 y 4 aplicando este hipoglucemiante diariamente por vía oral a la dosis de 51 mg/Kg. Los lotes 1 y 3 tuvieron también este seguimiento, a excepción del grupo tratado con metformina. Durante este periodo se determinaron los niveles de glucosa semanalmente. Estos datos se presentan en la figura No.12. ANOVA.

9.2.3.-FASE III Efecto regenerativo

Para evaluar el efecto regenerativo del Thelzán 101, a los 18 días de tratamiento los animales de los grupos 1-4 se sacrificaron y se les extrajo el páncreas. Los órganos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS. Cada páncreas se dividió en dos muestras. A la primera se le practicaron cortes histológicos, algunos de los cuales se tiñeron con H-E para los estudios de histopatología y otros se utilizaron para los estudios de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). La segunda muestra se utilizó para realizar los estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET).

9.2.4.-Tinción de Hematoxilina-Eosina

Se deshidrataron las muestras e incluyeron en parafina, se realizaron los cortes histológicos y se desparafinaron, posteriormente se hidrataron las muestras para ser teñidas con Hematoxilina-Eosina de Harris y así poder efectuar el estudio histopatológico con ayuda de un microscopio óptico.

9.2.5.-Inmunofluorescencia Indirecta

Se deshidrataron las muestras e incluyeron en parafina, se realizaron los cortes histológicos y se desparafinaron, se lavaron con PBS dos veces antes de cada

tratamiento, primero se permeabilizaron con tritón al 5% 5 minutos, y se bloquearon las muestras con BSA al 1% 20 minutos, se aplicó a las muestras el anticuerpo primario 30 µl dejándolo toda la noche en cámara húmeda, transcurrido este tiempo se aplicó 30 µl del anticuerpo secundario 3 horas, posteriormente se lavaron las muestras con PBS y agua desionizada dos veces, las cuales se montaron con gelvatol + pfenilendiamina, y por último se observaron las muestras en un microscopio de fluorescencia y confocal en donde se evaluaron las células positivas a insulina presentes en los islotes pancreáticos.

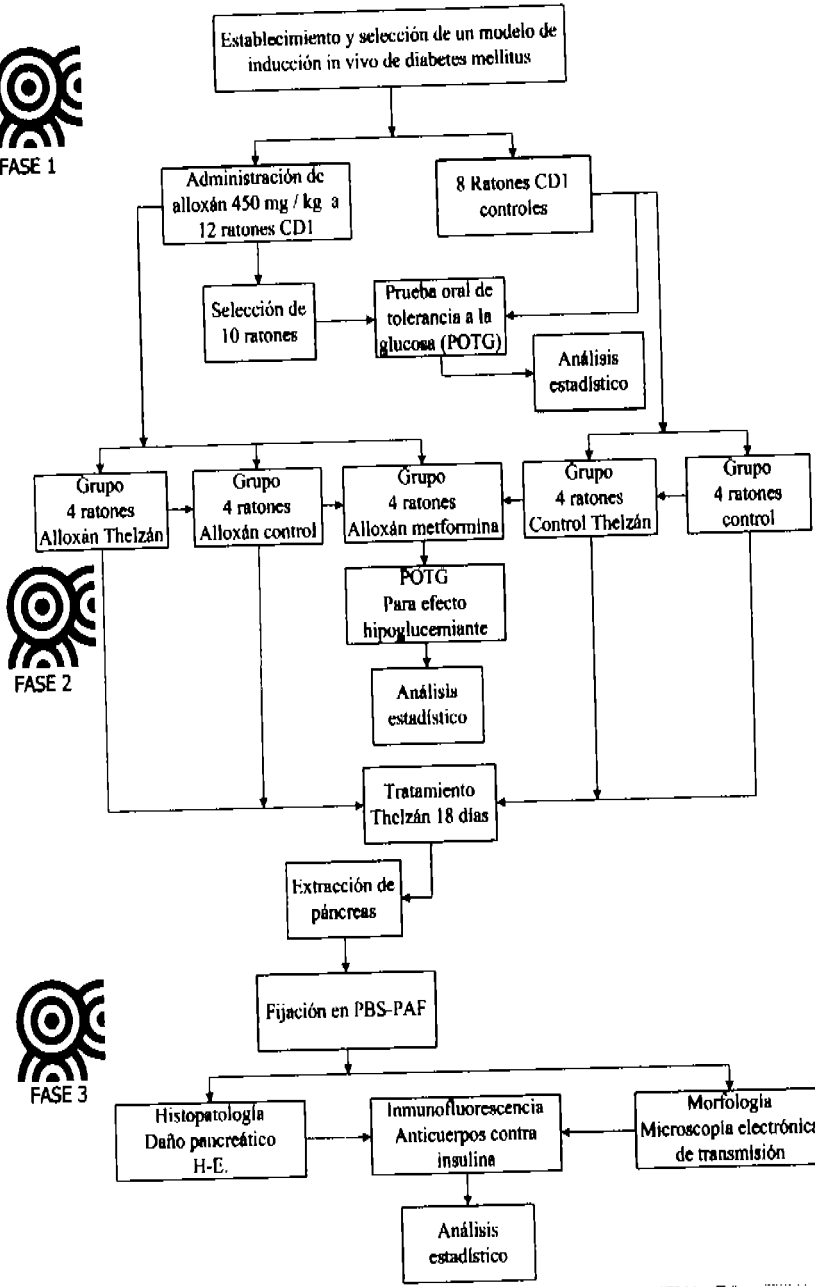
9.2.6.-Microscopía Electrónica de transmisión

Las muestras de tejido pancreático primero se fijaron en glutaraldehído 2 horas, se realizaron lavados con PBS y agua destilada 3 veces 15 minutos c / u , y dejaron en tetraóxido de osmio al 1% 1 hora, transcurrido este tiempo se procesaron las muestras en alcohol al 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 % por 15 minutos, posterior a esto se dejaron las muestras en un preparación de resina-alcohol 1:3, 2:2, 3:1, por 2 horas, y se dejaron en resina pura toda la noche, al día siguiente se preparó resina pura fresca dejando las muestras 1 hora, se depositaron en moldes de plástico y se incubaron a 60°C por 36 horas, y por último se realizó el estudio de la morfología del tejido pancreático por microscopia electrónica de transmisión.

9.3.-Diagrama de Flujo Experimental



FASE 1



FASE 2



FASE 3

10.-RESULTADOS

10.1.-Fase I Diabetogénesis

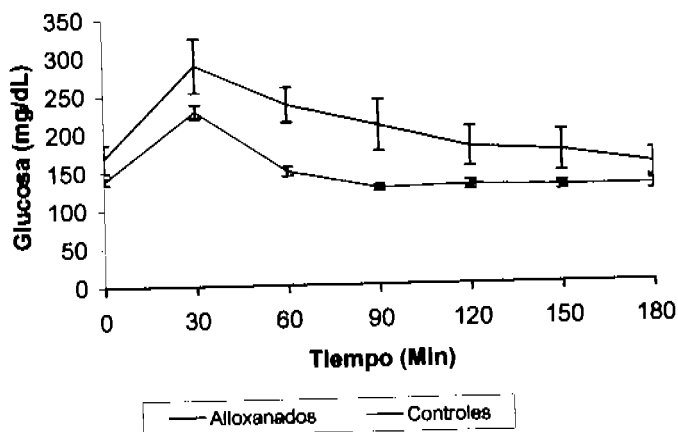


FIG.10 Determinación de glucosa en sangre en una POTG de 10 animales alloxanados y 8 del grupo control. Cada punto representa el promedio de glucosa \pm error estándar. Hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, prueba t de student $p=0.0135$.

10.2.-FASE II Efecto hipoglucemiante

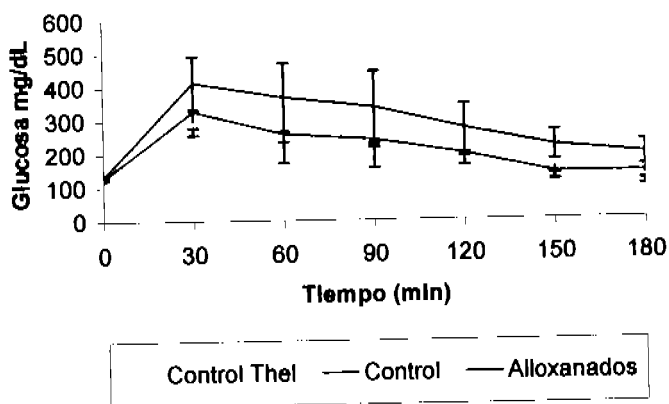


Fig.11a Determinación de glucosa en sangre en una POTG de los animales alloxanados, el grupo control y control Thelzán 101. Cada punto representa el promedio de glucosa \pm error estándar de 4 animales.

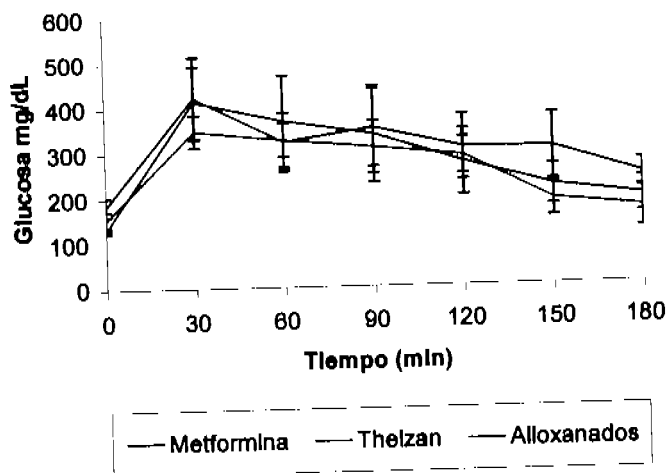


FIG.11b Determinación de glucosa en sangre en una POTG de los animales alloxanados y alloxanados que fueron administrados con los hipoglucemiantes Metformina y Thelzán 101. Cada punto representa el promedio de glucosa \pm error estándar de 4 animales.

10.3.-FASE III Efecto hipoglucemiante durante 18 días

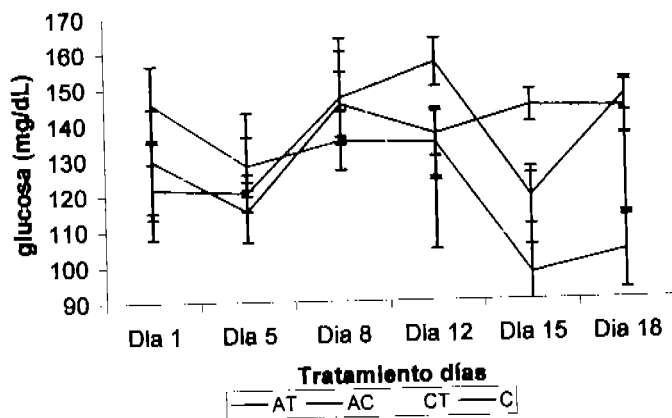


FIG.12 Valores promedio de la concentración de glucosa en sangre en ratones administrados con los diferentes tratamientos. No hay diferencias estadísticamente significativas.

10.4.-FASE III Efecto regenerativo

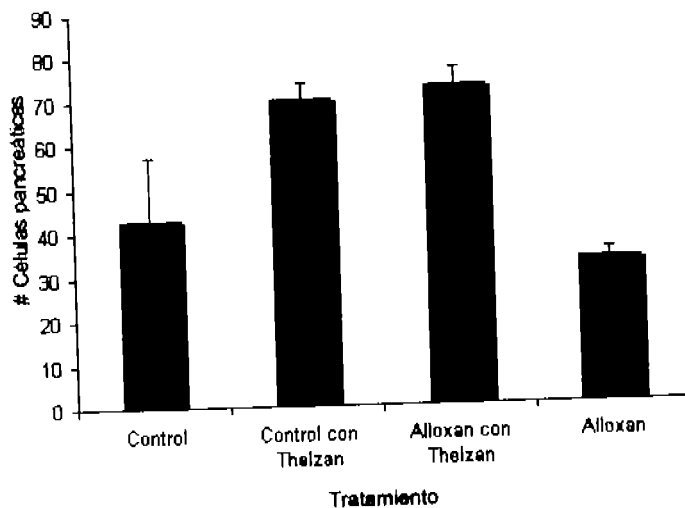


FIG.13 Valores promedio \pm error estándar del efecto del compuesto Thelzan 101 en ratones administrados con los diferentes tratamientos. *Existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Alloxanado. ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Tukey Kramer. $p < 0.05$.

11.-ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL PÁNCREAS

11.1.-Grupo control



Fig.14 Corte histológico de páncreas de ratón del grupo Control teñidos con H-E y tomados a 240X.



Fig.15 Corte histológico de páncreas de ratón del grupo Control teñidos con H-E y tomados a 2400X.

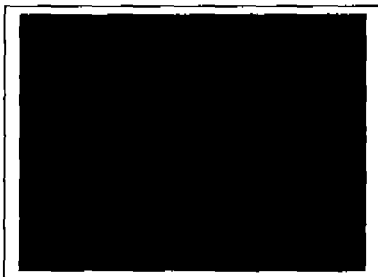


Fig.16 Inmunofluorescencia Indirecta de un corte de páncreas de ratón del grupo Control marcado con un anticuerpo dirigido contra Insulina y tomado a 2400X.

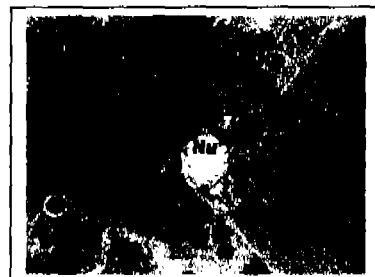


Fig.17 Corte de páncreas de ratón del grupo Control observado por MET a 2.5 μ m. RE (retículo endoplásmico), GS (granulo de secreción), Nu (núcleo).

En el corte de páncreas de las figuras 14 y 15 se observan que tienen bien delimitados los lobulillos "ε", pero con algo de congestión entre ellos, poca cantidad de tejido conectivo inter lobulillar "φ" cerca de los vasos sanguíneos "η", se observan muchos islotes pancreáticos "ι" y de morfología variable, muchos de ellos son pequeños, su núcleo es redondo y bien delimitado "ω". Las β no tienen límites celulares precisos, en lo que respecta a los acinos "μ" éstos si están bien delimitados y no hay alteraciones patológicas notorias.

11.2.-Grupo control con Thelzán



Fig.18 Corte histológico de páncreas de ratón del grupo Control-Thelzán teñido con H-E y tomados a 600X.



Fig.19 Corte histológico de páncreas de ratón del grupo Control-Thelzán teñidos con H-E y tomados a 2400X.



Fig.20 Inmunofluorescencia Indirecta de un corte de páncreas de ratón del grupo Control-Thelzán marcado con un anticuerpo dirigido contra insulina y tomado a 2400X.



Fig.21 Corte de páncreas de ratón del grupo Control-Thelzán observado por MET a 2.5 μ m. RE (retículo endoplásmico), GS (granulo de secreción), Nu (núcleo).

En el corte de páncreas de las figuras 18 y 19 se observa que hay poca presencia de adipocitos "θ", la morfología nuclear es más homogénea "ω", con mayor cantidad de células. La morfología acinar "μ" es casi normal con poco congestionamiento "v", los vasos se encuentran normales "η" y sin cambios morfológicos. En los Islotes "ι" se observa mayor cantidad de núcleos y mejor definidos, la morfología celular en los Islotes más pequeños tiende a ser más uniforme y sin alteraciones, los acines "μ" están bien delimitados.

11.3.-Grupo Alloxán control

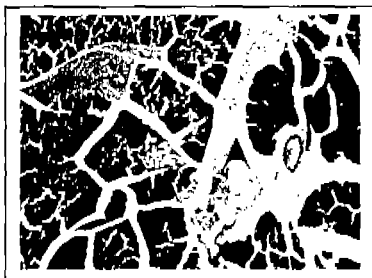


Fig.22 Corte histológico de páncreas de ratón del grupo Alloxán-Control teñido con H-E y tomados a 600X.



Fig.23 Corte histológico de páncreas de ratón del grupo Alloxán-Control teñidos con H-E y tomados a 2400X.



Fig.24 Inmunofluorescencia indirecta de un corte de páncreas de ratón del grupo Alloxán-Control marcado con un anticuerpo dirigido contra insulina y tomado a 2400X.

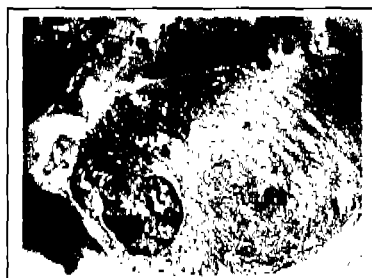


Fig.25 Corte de páncreas de ratón del grupo Alloxán-Control observado por MET a 2.5 μ m. RE (retículo endoplásmico), GS (granulo de secreción), Nu (núcleo).

En el corte de páncreas de las figuras 22 y 23 se encuentra presente gran cantidad de tejido conectivo "ϕ", existe congestión "v", panorámicamente no se observa muchos islotes por que son muy pequeños "ι", las células de algunos de los islotes presentan núcleo de cara cerrada "m", de cara abierta "ω" picnóticos, y son de diferente tamaño, no hay ya límites precisos entre las células, con presencia de destrucción, los cuales no están delimitados y son de diferente forma, muy pequeños, sin delimitación con respecto a la porción exócrina.

11.4.-Grupo Alloxán con Thelzán



Fig.26 Corte histológico de páncreas de ratón del grupo Alloxán-Thelzán teñido con H-E y tomados a 240X.



Fig.27 Corte histológico de páncreas de ratón del grupo Alloxán-Thelzán teñidos con H-E y tomados a 2400X.



Fig.28 Inmunofluorescencia indirecta de un corte de páncreas de ratón del grupo Alloxán-Thelzán marcado con un anticuerpo dirigido contra insulina y tomado a 2400X.

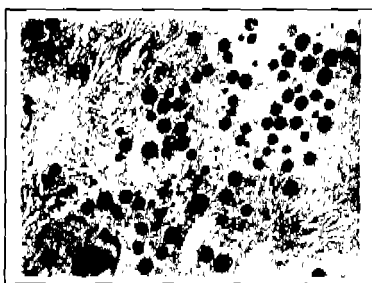


Fig.29 Corte de páncreas de ratón del grupo Alloxán-Thelzán observado por MET a 2.5 μ m. RE (retículo endoplásmico), GS (granulo de secreción), Nu (núcleo).

En el corte de páncreas de las figuras 26 y 27 se observa que los lobulillos pancreáticos están bien definidos "e", con adenómeros sin cambios patológicos aparentes "π", se observa entre lobulillos un poco de congestión "v", baja cantidad de tejido interconectivo e interlobulillar "φ". Los islotes pancreáticos presentan diferente forma y tamaño, se encuentran bien delimitados, sin embargo la morfología celular no presenta límites precisos "ψ".

12.-DISCUSIÓN

El compuesto thelzán 101 fué sintetizado por los Laboratorios Thelzán de México S.A. de C.V., debido a su trámite de patente se ha mantenido en reserva todo lo referente a su síntesis y características físico-químicas. Dichos laboratorios han realizado algunos estudios clínicos donde el compuesto ha demostrado que tiene acción hipoglucemiante y dado que después de varios meses de tratamiento los pacientes diabéticos estabilizan sus valores de glucosa, se sospecha de un posible efecto regenerativo de las células β del páncreas.

Los estudios preclínicos a este compuesto que en esta investigación hemos abordado hicieron necesario utilizar un modelo de diabetogénesis Inducida por Alloxán en ratones machos jóvenes de la cepa CD1. El lote de animales después de haber sido administrados con una dosis total de 450 mg/Kg alcanzó una concentración promedio de glucosa de 169.5 mg/dl que mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al lote control. En otros estudios donde se ha realizado la diabetogénesis con Alloxán (23,24) se asume al animal diabético cuando alcanza niveles de glucosa igual o superiores a 200 mg/dl. Nosotros observamos en un estudio que realizamos con pocos ratones (datos no mostrados) que dosis mayores a 450 mg/Kg de Alloxán causaban un deterioro importante en la salud general de los animales y encontramos que la DL_{100} para esta cepa fue de 750 mg/Kg. Por lo cual decidimos realizar la POTG bajo las condiciones de glicemia anteriormente mencionadas. En esta primer POTG se vuelve a manifestar que existe una diferencia en los niveles de glucosa de los animales alloxanados y los del grupo control, pero vale la pena mencionar que la disminución de glicemia a través del tiempo sigue el mismo comportamiento en ambos grupos de animales, o sea, se eleva a los 30 minutos después de haber recibido la dextrosa para posteriormente comenzar su descenso hasta alcanzar los niveles de glucosa inicial al mismo tiempo para cada uno de los grupos. Sería de esperar que en los animales diabéticos la disminución de la glucosa hubiera sido más tardía ya que es lo característico en este tipo de pruebas (2)

Entonces cuando los animales se someten a los diversos tratamientos para determinar el efecto hipoglucemiante del Thelzán 101, se observa que en general todos los animales que fueron alloxanados, o sea diabéticos, tienen valores de glucosa más elevados que cualquiera de los grupos control, a los 30 minutos de haber sido administrados con dextrosa, pero cuando se les aplica el hipoglucemiante thelzán 101, el efecto no es claramente manifestado. Se utilizó también otro grupo de animales alloxanados a los cuales se les administró metformina, un medicamento ya aprobado por la Secretaría de Salud como hipoglucemiante, sin embargo, ni este ni el grupo anterior mostraron diferencias en los niveles de glucosa a través del tiempo, con respecto al lote de animales alloxanados que no recibieron ningún hipoglucemiante. Por lo que suponemos que la acción hipoglucemiante del Thelzán 101 y la metformina fue enmascarada porque los niveles de glucosa de los animales diabéticos son desde el principio solo ligeramente superiores a los de los controles. Con respecto al grupo control que recibió Thelzán 101 si se observó un descenso en los niveles de glucosa.

Por otra parte, cuando se realizó el efecto hipoglucemiante a largo plazo (18 días) a los animales que se sometieron a los diferentes tratamientos, se observa que los animales alloxanados aumentan progresivamente sus niveles de glucosa pero estos niveles siguen siendo inferiores a los que mostraron los animales controles. Los animales que fueron tratados con Thelzán 101 tendieron siempre a la baja los niveles de glucosa hasta el día 15 y aumentando ligeramente el día 18 pero siempre por debajo de los controles y alloxanados en el intervalo del día 12 a 18, haciéndonos pensar que el Alloxán como agente inductor de diabetes no nos permitió estudiar posteriormente (a largo plazo) el efecto del tratamiento hipoglucemiante (13). Cuando sacrificamos a los animales para el estudio de histopatología y analizamos los cortes de páncreas, nosotros observamos que en los animales alloxanados mostraron panorámicamente un claro daño del tejido pancreático endocrino y exocrino, y escasos indicios de islotes pancreáticos y de menor tamaño, al realizar la comparación con los animales controles, encontramos una mayor cantidad de islotes pancreáticos de diferente tamaño y morfología, por otra parte, los animales que se trataron

con Thelzán 101 mostraron una mayor cantidad de islotes pancreáticos y sin cambios patológicos aparentes, este conteo de islotes pancreáticos en los animales de los diferentes tratamientos posteriormente se confirmó mediante IFI utilizando anticuerpos dirigidos contra insulina, tomando en cuenta las células positivas, se hizo el análisis por medio de microscopía de fluorescencia y confocal, demostrando así que el daño ocasionado por el Alloxán si existe y que probablemente son necesarias dosis mayores para observar su poder diabetogénico.

Por otro lado en los estudios realizados por Microscopía Electrónica de Transmisión, en los animales alloxanados se observaron cambios graves a nivel de retículo endoplásmico. Sin embargo en los animales tratados con Thelzán 101 los cambios a nivel de retículo endoplásmico también están presentes pero en menor grado, para nosotros estos resultados son muy importantes ya que por un lado, presenta evidencias de reversión del daño ocasionado por el Alloxán o un ajuste metabólico por parte de las células e incluso fenómenos degenerativos por toxicidad. Nosotros pensamos que el Thelzán 101 juega un papel importante en la regeneración de células β y reconversión estructural del páncreas. Aunque datos sobre las imágenes de MET no son concluyentes y debido a que a la dosis de 51 mg/kg de Thelzán 101 y Metformina no mostraron efectos hipoglucemiantes, nosotros sugerimos que se lleve a cabo una curva dosis efecto a ambos hipoglucemiantes para determinar la dosis efectiva de los hipoglucemiantes. Además de un seguimiento de por lo menos el doble del tiempo que llevó este estudio con los diferentes tratamientos e incluso pensar en estudios que abarquen dos terceras partes del tiempo de vida media de los animales de experimentación, "Muy importante sería también evaluar todos los cambios celulares en función del tiempo y utilizar otros marcadores de toxicidad así como tener un seguimiento con un hipoglucemiante comercial".

13.-CONCLUSIONES

13.1.- Se logró establecer un modelo experimental de diabetes en los ratones CD1 mediante la administración de Alloxán, ya que los animales mostraron cambios histopatológicos característicos en páncreas y un promedio de glucosa en sangre de 169.5 mg/dL que fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control.

13.2.- No pudo ponerse de manifiesto el efecto hipoglucemiante en la POGT de los compuestos Thelzán 101 y Metformina debido a que los animales diabéticos control mostraron similares niveles de glucosa. Sin embargo, en el grupo de animales control que recibió Thelzán 101 si se evidenció este efecto a partir de los 120 minutos.

13.3.-El compuesto Thelzán 101 incrementó el número de células β pancreáticas tanto en el grupo control como en los animales diabéticos, sin embargo los cambios a nivel de retículo endoplásmico, observados con microscopia electrónica en ambos grupos, indican que deben de realizarse otros estudios antes de considerarlo un regenerador pancreático.

14.-REFERENCIAS

1. A. Mitchell, Lazar. How Obesity Causes Diabetes: Not a Tall Tale. 2005. Science.307:373-375.
2. Alpízar Salazar Melchor. Guía para el Manejo Integral del Paciente Diabético. Editorial el Manual Moderno, S.A. 2001, pp 5-70.
3. B. Bradford, Lowell and I Gerald. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. 2005. Science. 307:384-387.
4. Biarnes Montse, Mecanismo de lesión de las células beta en el trasplante de islotes de Langerhans, Universidad de Barcelona, Año 2002, pp 1-198.
5. Boehringer. Mannheim, Diagnóstico de la Diabetes. 1998. p.p 3-27.
6. Blanco Antonio. Química Biológica. Editorial El Ateneo. Edición Quinta. 1998. pp 441-447.
7. Dunn D, Sheehan H, Mc Letchin N. Necrosis of Islets of Langerhans Produced Experimentally. 1943. Lancet. 244:484-487.
8. Edlund Helena. Developmental Biology of the Pancreas. 2001. Diabetes. 50: 5-9.
9. Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals, The Merck Index, Twelfth Edition, 1996, p.p 52.
10. Guz Yelena, Nasir Irem and Teltelman Gladis. Regeneration of pancreatic β -Cells From Intra-Islet Precursor Cells in an Experimental Model of Diabetes. 2001. Endocrinology.142:4956-4958.
11. Heikkila R, Winston B, Cohen G, Alloxan Induced Diabetes Evidency for Hydroxyl Radical as a Cytotoxic Intermediate.1976. Biochemical Pharmacology. 25:1085-1092.

12. Insulina e Hipoglucemiantes Orales, Universidad Autónoma de Madrid, pp 34-38.
13. Islas Sergio, Andrade María, Revilla Monsalve Cristina, Escobedo de la Peña Jorge, Polanco ana, Palomino Miguel, Velasco Feria Alfredo, Streptozotocin and alloxan in Experimental Diabetes comparison of two Models in Rats. 2000. *acta Histochem. Cytochem.* 33:201-208.
14. J. Christopher, Rhodes. Type 2 Diabetes-a Matter of β -Cell Life and Death?. 2005. *Science.* 307:380-383.
15. Kraft Florencia María, Elbert Alicia Ester. Farmacoclnética de los hipoglucemiantes orales en las distintas etapas de la Insuficiencia renal crónica. 2004. *Rev. Nefrología. Diálisis. y Transplantes.* 24:189-204.
16. Lei Li, Zhanohong Yi, Masaharu Seno and Itaru Kojima. Activin A and Betacellulin Efects on Regeneration of Pancreatic β -Cell in Neonatal Streptozotocin-Treated Rats. 2004. *American Diabetes Association.* 53:608-615.
17. Leng San-hua, Lu Fu-er, Li-jun Xu. Therapeutic effects of berberine in Impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. 2004. *Acta Pharmacologica Sinica.* 25:496-502.
18. Mokdad Et al. Unravelling the Causes of Diabetes. 2002. *Science.* 296:686-689.
19. O'Rahilly Stephen, Barroso Inés, Wareham Nicholas. Genetic Factors In Type 2 Diabetes: The End of the Beginning?. 2005. *Science.* 307:370-372.

20. Özbek Anefi, Ceylan Ebubekir, Kara Mehmet, Özgökçe Fevzi, Koyuncu Mehmet. Hypoglycemic effect of Rheum ribes roots in alloxan induced diabetic and normal mice. 2004. *Scand. J. Lab. Anim.* 31: 1-3.
21. Porte Daniel and E. Steven, Kahn. β Cell Dysfunction and Failure in Type 2 Diabetes, Potential Mechanisms. 2001. *Diabetes.* 50:160-163.
22. Rossini Aldo A, A. Michael, B. Arcangeli and Cahill George. Boston M.D. Studies of Alloxan Toxicity on the Beta Cell. 1975. *American Association of Diabetes.* 24:516-522.
23. S Andrés, Estévez Fleitas, Carballo Simón Rafael, Almeida Gisela, Quintela Pena Ana y Alfonso María Antonia. Modelo Experimental de Diabetes en Conejos. 2000. *Cubana Angiol y Cir Vasc.*1:1-4.
24. Soto C, Mena R, Cerbón M, Larrieta E, Vital P, Uriá M, Sánchez R. Barrón H Recoba, Favari L, Lara A. Silymarin Induces Recovery of pancreatic Function after Alloxan Damage in Rats. 2004. *Life Science.* 75:2167-2180.
25. Standards of Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus. 2003. *American Diabetes Association.* 26:33-50.
26. Szkudelski. T, The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β Cells of the Rat Pancreas. 2001. *Physiology Research.* 50:536-546.
27. Szkudelski. T. Alloxan In vivo Does Not Only Exert Deleterious Effects on Pancreatic β Cells. 1998. *Physiology Research.* 47:343-346.
28. Tomita Tatsuo, E. Paul. Lacy, M. Franz, Matschinsky, M.D and L. Michael. Effect of Alloxan on Insulin Secretion in Isolated Rat Islets Perfused in Vitro. 1974. *American Association of Diabetes.* 23:517-524.

29. Trucco Massimo. Regeneration of the pancreatic β cell. 2005. The American Society for Clinical Investigation. 115: 5-12.
30. Villa señor Ruiz Alfonso, Lozano Castañeda Oscar, Declaratoria de posición sobre el uso de combinaciones fijas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. 2002. Revista de la sociedad mexicana de nutrición y endocrinología. 10:1-10.
31. Waguri Masako, Yamamoto Koji, Miyagawa Jun-ichiro, Tochino Yoshihiro, Yamamoto Katsumi, Kajimoto Yoshitaka, Nakajima Hiromu, Watada Hirotsuka, Yoshiuchi Issei, Itoh Naoto, Imagawa Akihisa, Namba Mitsuyoshi, Kuwajima Masamichi, Yamasaki Yoshimitsu, Hanafusa Toshiaki and Matsuzawa Yuji. Demonstration of Two Different Processes of β -Cell Regeneration in a New Diabetic Mouse Model Induced by Selective Perfusion of Alloxan. 1997. American Association of Diabetes. 46:1281-1290.
32. [www. Facmed.unam.mx](http://www.Facmed.unam.mx).
33. www.Fisiología del páncreas.com.mx.
34. www.Historia de la diabetes.com.mx.
35. www. Inegi.gob.mx.
36. www.ncbi.nih.gov.mx.
37. www.Proc_Diabetes_Mellitus.com.mx.
38. www.ssa.gob.mx.
39. www.vitalud.com.mx.