

ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL INDUCIDA
POR ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS SPRAGUE-DAWLEYSTANDARDIZATION OF THE DIABETES TYPE 1 EXPERIMENTAL MODEL INDUCED BY
STREPTOZOTOCIN IN SPRAGUE-DAWLEY RATS.

Vélez, Sara*; Gómez, Leandra†; Tapia, Denis‡; Guerrero, Estela§; Morán, Juan²

* Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá.

† Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá.

‡ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá.

§ Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá.

² Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá.

Recibido: 26 de enero de 2015

Aceptado: 8 de octubre de 2015

Vélez S, Gómez L, Tapia D, Guerrero E, Morán J. "Estandarización del Modelo de Diabetes Experimental Inducida por Estreptozotocina en Ratras Sprague-Dawley". Rev méd cient. 2015; 28(1):4-13.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La estreptozotocina es un antibiótico exclusivo para la inducción de Diabetes tipo 1 a nivel experimental, usado ampliamente pero con numerosas variaciones de la técnica lo que hace necesario su estandarización.

OBJETIVO: Evaluar el modelo experimental de Diabetes tipo 1 con estreptozotocina en nuestro laboratorio.

METODOLOGÍA: Se utilizaron ratas Sprague-Dawley divididas aleatoriamente en dosis de 40, 50 y 65 mg/Kg de estreptozotocina y un grupo control. Los parámetros estudiados fueron glicemia en ayunas, diuresis, consumo de agua, alimento, peso corporal y valores de triglicéridos y colesterol plasmático. Además se evaluó durante un mes la sobrevida, glicemia, triglicéridos y colesterol plasmático, finalmente se realizaron cortes histológicos de páncreas.

RESULTADOS: Los animales del grupo que recibió la dosis más baja, regresaron a valores similares de glicemia con respecto al grupo control. Los grupos restantes mantuvieron diferencias significativas con el grupo control con aumento de la ingesta de agua, alimento y diuresis acompañada de pérdida de peso. Sin embargo, el grupo que recibió la dosis más alta presentó una mortalidad del 100%, mientras que con la dosis intermedia se alcanzó solo el 29%.

CONCLUSIÓN: A una dosis única de estreptozotocina de 50 mg/Kg en ratas Sprague-Dawley, se mantienen niveles de hiperglicemia superiores a 200 mg/dL durante un mes, con alta sobrevida, sin modificar niveles de colesterol ni triglicéridos. El análisis histológico del páncreas mostró reducción marcada de las células β en los islotes pancreáticos en los animales diabéticos comparados con el grupo control.

PALABRAS CLAVE: Estreptozotocina, Diabetes mellitus, modelo experimental.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Streptozotocin is an antibiotic used exclusively for the experimental induction of type 1 diabetes. It is widely used in investigation with several variations of techniques which need standardization.

OBJECTIVE: To evaluate the experimental model of type 1 diabetes induced by Streptozotocin in our laboratory.

METHODS: Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 dose groups of 40, 50 and 65 mg/Kg of streptozotocin and a control group. Parameters such as fasting glycaemia, diuresis, water consumption, food, body weight and plasma levels of triglycerides and cholesterol were evaluated. Also they were followed over a month to assess survival, glucose, triglycerides and plasma cholesterol levels. Finally, histological sections of the pancreas were performed.

RESULTS: Animals in the group that received the lowest dose, showed similar values of glycaemia compared to the control group; the remaining groups showed significant differences compared with the control group, and also increased ingestion of water, food and diuresis accompanied by weight loss. However, the group that received the higher dose presented a 100% of mortality, while the intermediate dose group reached only 29%.

CONCLUSION: A single dose of streptozotocin 50 mg/Kg in Sprague-Dawley rats maintained hyperglycemia levels above 200 mg/dL for a month, with high survival rates and unmodified cholesterol and triglyceride levels. Histological analysis of the pancreas showed an important reduction in β cells in the pancreatic islets in diabetic animals compared with the control group.

KEY WORDS: Streptozotocin, Diabetes mellitus, experimental model.

INTRODUCCIÓN

La Diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica caracterizada por hiperglicemia sostenida asociada a daño, disfunción y fallo de diferentes órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos¹. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por su sigla en inglés), por lo menos 366 millones de personas en el mundo son diagnosticadas con DM, y se espera que para el 2030 este número aumente a 552 millones². Según los datos aportados por el Ministerio de Salud de Panamá (MINSa), la DM tipo 2 se encuentra entre las principales causas de mortalidad, afectando predominantemente a mujeres³.

La DM ha sido clasificada en cuatro categorías clínicas, la primera denominada DM tipo 1, que es ocasionada por la destrucción autoinmune de las células β , usualmente seguida por una deficiencia absoluta de la producción de insulina. También existe en esta clasificación un tipo de diabetes caracterizada por un defecto progresivo en la secreción de insulina debido a una resistencia a la hormona, y que ha sido denominada como diabetes tipo 2. Por último, están la DM gestacional y la asociada a otras condiciones patológicas o genéticas, como otras categorías de Diabetes¹.

Los casos de DM tipo 1 representan el 10% de todos los casos de DM registrados⁴. Desde que se introdujo la insulina para el tratamiento de esta enfermedad a inicios del siglo pasado y décadas después se aprobaron los análogos de insulina tipo insulina glargina, solamente el pramlintide⁵ ha sido aprobado para el tratamiento de la DM tipo 1. Ante ello, el desarrollo de un modelo experimental para cada tipo de diabetes y sus complicaciones, que mimetice la patogénesis humana, es de gran importancia, no solo para un mejor entendimiento de la patología, sino también para el desarrollo de investigaciones preclínicas orientadas a la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades antidiabéticas².

La DM tipo 1 inducida por estreptozotocina (STZ, por su sigla en inglés) en roedores, ha sido un modelo popular de diabetes y que ocupa un número plural de publicaciones relacionadas en este tema. Sin embargo, y quizás relacionado con dicha cantidad, existe un número significativo de variaciones reportadas por diferentes autores (Tabla 1). Las principales diferencias radican en que no existe un criterio unánime del espécimen utilizado, dosis y dosificación del agente inductor de la DM, latencia y sobrevida, todo esto debido a que algunos animales pueden ser resistentes a la STZ o muy sensibles. En el primero de los casos, ocurre un fallo en el desarrollo del modelo, en tanto que animales con una alta sensibilidad, la STZ podría ocasionar una elevada tasa de mortalidad⁶.

Tabla 1. Diferencias entre artículos científicos recientes con respecto al método de inducción de la DM tipo 1 con STZ⁷⁻¹⁴.

Tipo de Especimen	Dosis (mg/Kg)	Dosificación	Latencia (días)	Autor y Año
Ratas Sprague-Dawley	30	Intraperitoneal Dosis única	5	Guo <i>et al.</i> , 2014
Ratas Sprague-Dawley	60	Intraperitoneal Dosis única	3	Yassa <i>et al.</i> , 2014
Ratas Sprague-Dawley	65	Intraperitoneal Dosis única	7	Langdale <i>et al.</i> , 2014
Ratas Wistar Albino	50	Intravenosa Dosis única	10	Chikhi <i>et al.</i> , 2014
Ratas Wistar Albino	50	Intramuscular Dosis única	3	Ayeleso <i>et al.</i> , 2014
Ratas Wistar Albino	100	Intraperitoneal Múltiples dosis	3	Jhun <i>et al.</i> , 2014
Ratas Swiss Albino	100	Intravenosa Dosis única	5	Vadla <i>et al.</i> , 2013
Ratón C57BL/6	50	Intraperitoneal Múltiples dosis	5	Wang <i>et al.</i> , 2011

Lo planteado explica la necesidad de validar el método, cada vez que requiera ser implementado en una unidad de investigación.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de DM tipo 1 inducida por STZ en ratas Sprague-Dawley, adaptándola a las condiciones del laboratorio, de tal forma que un modelo experimental para aquellos investigadores que busquen implementar una línea de investigación relacionada con la patología y abordaje farmacológico de la DM tipo 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley adultas, machos, de 150 - 230 gramos de peso corporal. Los animales fueron aclimatados, con acceso libre a comida y agua, según los criterios establecidos en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicado por el Nacional Health Institute¹⁵.

Reactivos

Estreptozotocina (Calbiochem®, número Cas 18883-66-4 EMD Chemicals), diluida en buffer citrato fresco al 0.1 mol/L a pH 4.5. Sevoflurano al 100 % (Sevorane®, de laboratorios Abbott), para anestesia.

Diseño experimental

Previo a la administración de la STZ, fármaco empleado como agente inductor de la DM, los animales fueron individualizados en cajas metabólicas. El día del ensayo los animales fueron marcados, pesados y aleatorizados en 4 grupos, manteniendo una n=6. Para la inducción de la Diabetes, tres grupos recibieron STZ por vía intraperitoneal una dosis única de 40, 50 y 65 mg/Kg. El cuarto grupo, que representa a los animales controles, recibió buffer citrato (0.1 mL/10g) por la misma vía. Después de la administración de los tratamientos, los animales se mantuvieron hidratados con glucosa al 5% durante 24 horas, para prevenir la hipoglicemia desencadenada por

liberación excesiva de insulina debido a la destrucción de las células β esperada con la administración de STZ. Posterior a este periodo, los animales se mantuvieron con agua y alimento ad libitum.

Mediciones diarias de consumo de comida, agua, diuresis, peso corporal y la determinación de glicemia en ayunas, fueron realizadas durante los tres días posteriores a la administración de la STZ. Aquellos animales que al tercer día no desarrollaron una hiperglicemia superior a 200 mg/dL, fueron descartados. Los animales que fueron seleccionados de esta forma, recibieron un seguimiento durante un mes, para valorar sobrevida y mantenimiento de la hiperglicemia. Culminado este periodo de observación, se realizaron determinaciones de perfil lipídico, glicemia en ayunas y peso corporal. En todos los casos, las muestras de sangre empleadas para la valoración de la glucosa y del perfil lipídico, se obtuvieron del seno orbital del animal, que se mantuvo bajo anestesia ligera inducida por Sevoflurano. Para la determinación de la glicemia se emplearon glucómetro (SD Check); en tanto que las valoraciones del nivel de colesterol y triglicéridos fueron realizadas por el Centro de Adiestramiento, Investigación y Consultoría de Análisis Clínicos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá.

Culminado el mes de observación, una vez obtenidas las muestras de sangre, los animales fueron sacrificados por exanguinación bajo anestesia para extraer el páncreas y realizar las evaluaciones histológicas del tejido. Las muestras fueron procesadas para obtener cortes histológicos de 4 μ m, y reservadas para las tinciones. Para observar la morfología del islote se empleó la tinción de Hematoxilina-Eosina y la tinción de tricrómico de Gomori para la identificación y diferenciación de las células β ¹⁶⁻²⁰.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados en Promedio $\pm$ SEM. El análisis estadístico entre los valores del grupo control y los que recibieron STZ fueron interpretados

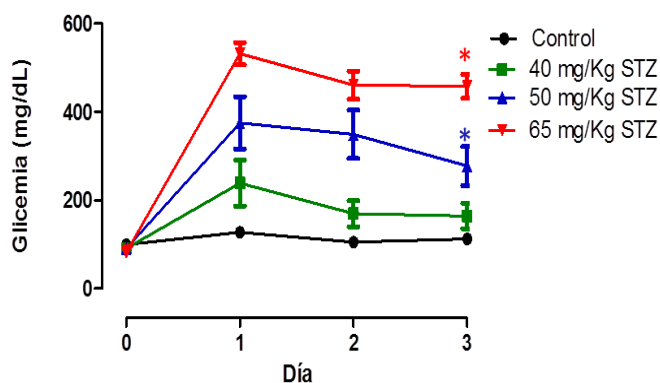
mediante la prueba t de Student, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. El análisis estadístico fue realizado empleando el programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

Niveles de glicemia

Se observó que la glicemia en ayunas, antes de la administración de STZ, en todos los grupos se mantuvo en un rango entre 82 y 99 mg/dL, sin mostrar diferencias significativas. Desde el primer día, después de la administración del agente inductor de la DM, se evidenció un incremento de la glicemia en los grupos que recibieron STZ, en una relación dosis dependiente. En la Gráfica 1 podemos observar que en los animales que recibieron las dosis mayores de STZ, este incremento se mantuvo por encima de los 200 mg/dL durante los tres primeros días de observación, de forma tal que al día 3 los valores de glucosa sanguínea fueron de $277,43 \pm 116,76$ y $457,71 \pm 70,88$ mg/dL para los grupos que recibieron las dosis 50 y 65 mg/Kg, respectivamente. Recordando que este era el principal criterio de inclusión para las evaluaciones posteriores.

Gráfica 1. Efecto de la administración de STZ sobre los valores de glicemia en ayunas obtenidas de ratas Sprague-Dawley.

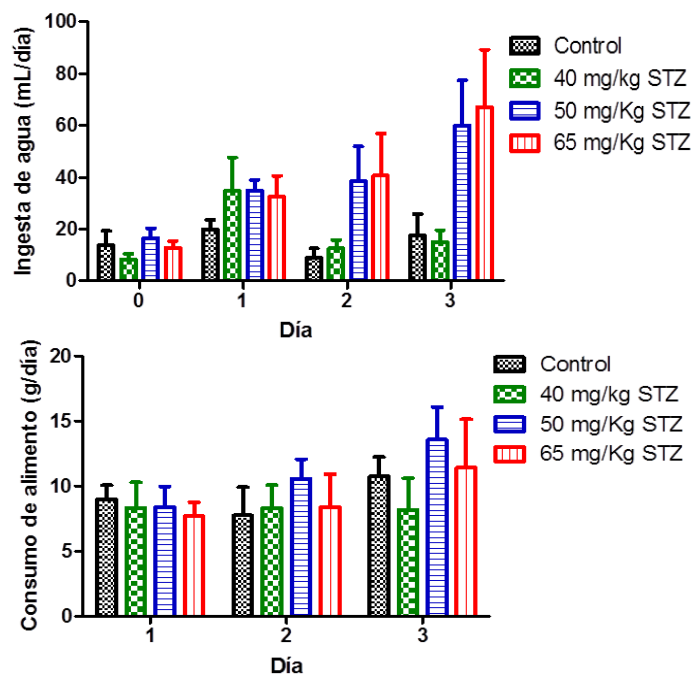


Nota: Los valores son presentados como promedio $\pm$ SEM; $n=6$; $p < 0,05$.

Consumo de comida y agua

Los valores de consumo de agua e ingesta de comida durante los tres primeros días de observación se muestran en la Gráfica 2. En lo que respecta al consumo de agua, se observó que en el grupo control no se registraron cambios significativos en este parámetro, en tanto que los grupos que recibieron STZ, al día 1 se observó una tendencia al incremento en la ingesta de agua, siendo esta de 34.83 ± 12.91 , 34.86 ± 4.21 y 32.57 ± 8.09 mL, para las dosis de 40, 50 y 65 mg/Kg respectivamente, frente a los 19.75 ± 3.82 mL de consumo de agua registrado en el grupo control. En relación a este parámetro, también se pudo observar que con respecto al valor inicial, el consumo de agua se incrementó en los días 2 y 3, en 22 a 43 mL para el grupo que recibió la dosis de 50 mg/Kg y un incremento de 28 a 54 mL en los animales con dosis de 65 mg/Kg de STZ.

Gráfica 2. Efecto de STZ sobre los valores de consumo de agua y alimento en ratas Sprague-Dawley.



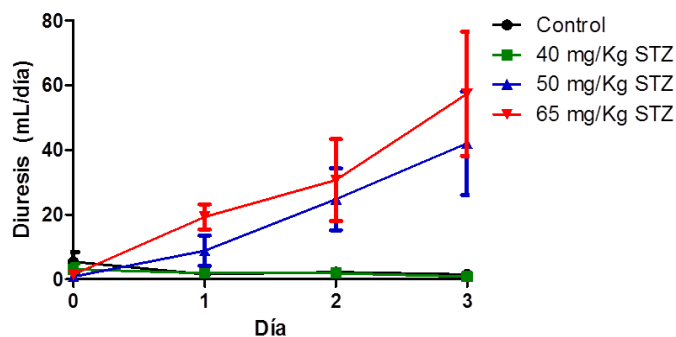
Nota: Los valores son presentados en promedio $\pm$ SEM; $n=6$.

El primer día, tras recibir el tratamiento inductor de la DM, se mantuvo un consumo similar, en términos de la ingesta de alimentos, en todos los grupos, con valores diarios entre 7 y 9 g/día aproximadamente. Sin embargo, para el día 3, las observaciones realizadas reflejaron que en los grupos que recibieron las dosis de 50 mg/Kg y la de 65 mg/Kg, el consumo presentó una ligera tendencia a incrementarse (13.57 ± 2.5 g/día, 11.43 ± 3.72 g/día respectivamente) en comparación con el grupo control (10.75 ± 1.49 g/día), sin alcanzar diferencias significativas.

Diuresis

Tal como se puede observar en la Gráfica 3, el volumen de orina excretado por día, fue similar entre el grupo control y el grupo que recibió STZ en dosis de 40 mg/Kg, observándose además, que no se registraron variaciones en este parámetro en las determinaciones realizadas los tres primeros días del estudio en ambos grupos. Así, podemos resumir que para el grupo control, la diuresis fue de 1.6 ± 0.23 mL el primer día y 1.5 ± 0.46 mL el día 3. Para estos mismos periodos, el grupo con dosis de 40 mg/Kg, la diuresis fue de 1.90 ± 0.66 mL y 0.88 ± 0.29 mL. La administración de STZ en dosis altas si modificó la diuresis en ratas, logrando incrementos en el volumen de orina que alcanzaron valores de más de 15 mL/día en el día 2 y de más de 25mL/día en el tercer día de evolución de la DM.

Gráfica 3. Efecto de la administración de dosis única de STZ sobre la diuresis diaria.

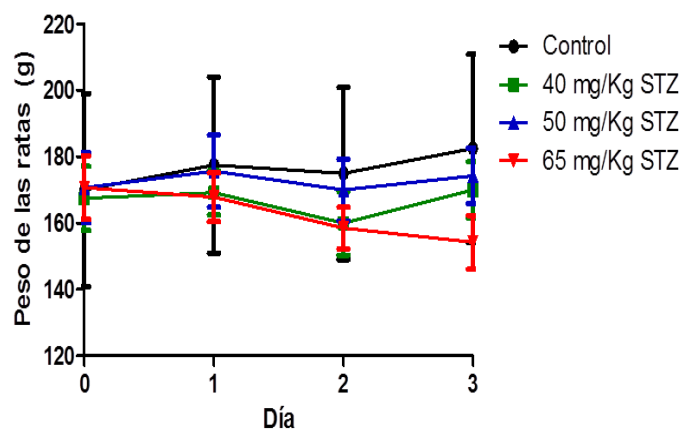


Nota: Los valores son presentados como promedio $\pm$ SEM; n=6.

Peso Corporal

De acuerdo a lo que se observa en la Gráfica 4, podemos decir que hubo un decremento de 28 ± 20 gramos en los tres primeros días del grupo con la dosis de 65 mg/Kg de STZ. Mientras que para el grupo de 40 y 50 mg/Kg de STZ no se evidenció esa pérdida de peso sin variación con respecto al grupo control.

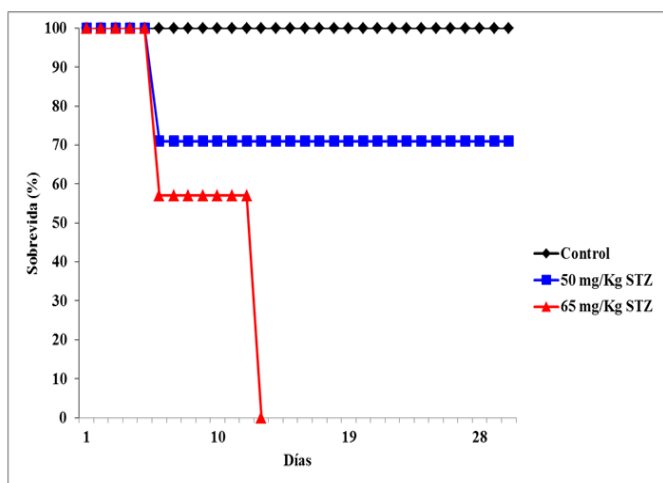
Gráfica 4. Efecto de la administración de dosis única de STZ sobre el peso corporal de ratas Sprague-Dawley.



Nota: Los valores son presentados como promedio $\pm$ SEM; n=6, P<0,05.

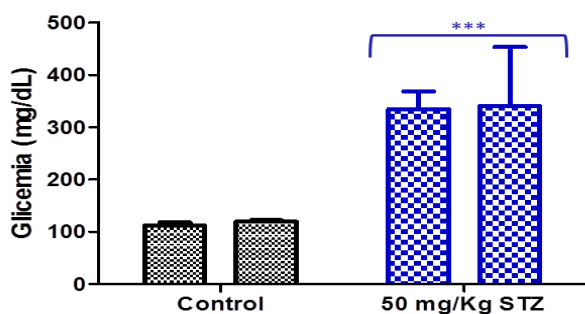
Monitoreo mensual

Sobrevida. Con respecto a la sobrevida, en la Gráfica 5 se observa que el grupo que recibió la dosis de STZ 50 mg/Kg registró mortalidad en la población al quinto día tras la administración de STZ, momento en el que se alcanzó una tasa de sobrevida del 71% que prevaleció hasta finalizar el estudio. Por otra parte, el grupo que recibió la dosis de STZ 65 mg/Kg, si bien es cierto, al tercer día sostenía valores por encima de 400 mg/dL, al quinto día de observación tras iniciar la inducción de la DM, se registró una reducción de la sobrevida; la mortalidad se inició desde el quinto día donde se registraron 4 animales muertos, y los días posteriores la sobrevida siguió disminuyendo, hasta el doceavo día donde la mortalidad fue del 100%.

Gráfica 5. Efecto de la administración de STZ a largo plazo en la sobrevivida.

Nota: Los valores son presentados como porcentaje.

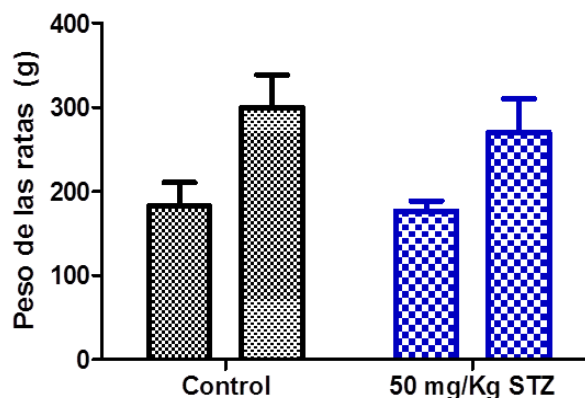
Hiperglicemia sostenida. En el grupo de ratas que recibieron la dosis de 50 mg/Kg, todos los animales que sobrevivieron hasta el día 30 (71% de la población inicial), mostraron una hiperglicemia sostenida y superior a los 200 mg/dL, tal como podemos ver en la Gráfica 6; registrando valores significativamente mayores que el grupo control para el mismo tiempo de observación.

Gráfica 6. Niveles de glicemia en ayunas registrados a los días 3 y 30 tras la administración de STZ 50 mg/Kg, en comparación con el grupo control.

Nota: Determinación de los niveles de glicemia al día 3 (primera barra) y al día 30 (segunda barra).

Los valores son presentados como promedio $\pm$ SEM, $n=4$.

Peso corporal a los 30 días tras la administración de STZ. A pesar de que el peso corporal a los 30 días posteriores a la inducción de la DM fue menor en el grupo de la dosis de STZ 50 mg/Kg en comparación al grupo control, las diferencias entre ambos grupos no fue significativa (Gráfica 7).

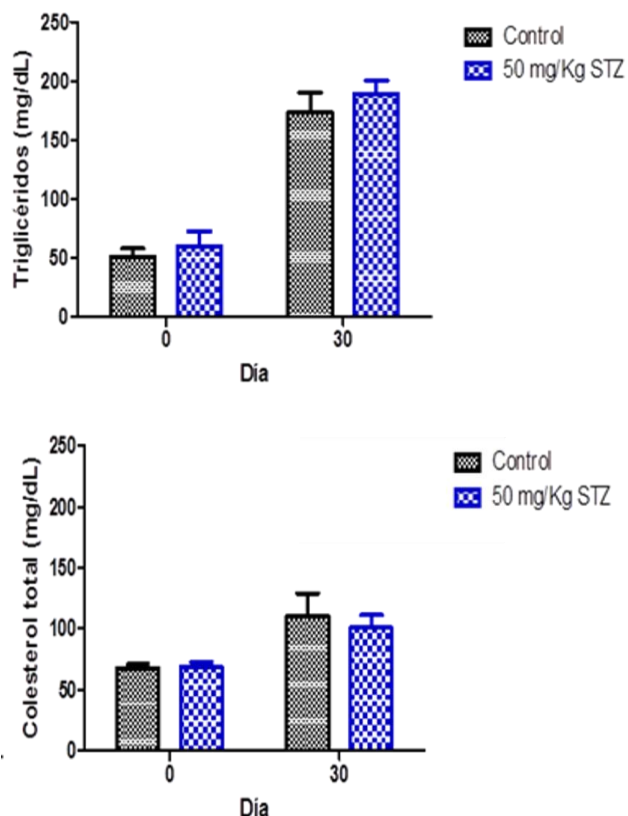
Gráfica 7. Valores de peso corporal registrados a los días 3 y 30 tras la administración de STZ 50 mg/Kg, en comparación con el grupo control.

Nota: Determinación del peso al día 3 (primera barra) y al día 30 (segunda barra).

Los valores son presentados como promedio $\pm$ SEM, $n=4$.

Triglicéridos y Colesterol. Con respecto a los niveles de lípidos plasmáticos, no se observaron diferencias entre los niveles de colesterol y triglicéridos del grupo de animales que recibieron la dosis de 50 mg/Kg de STZ con respecto al grupo control (Gráfica 8).

Gráfica 8. Efecto de la administración de dosis única de STZ sobre el valor de los triglicéridos y el colesterol total en ratas Sprague-Dawley.



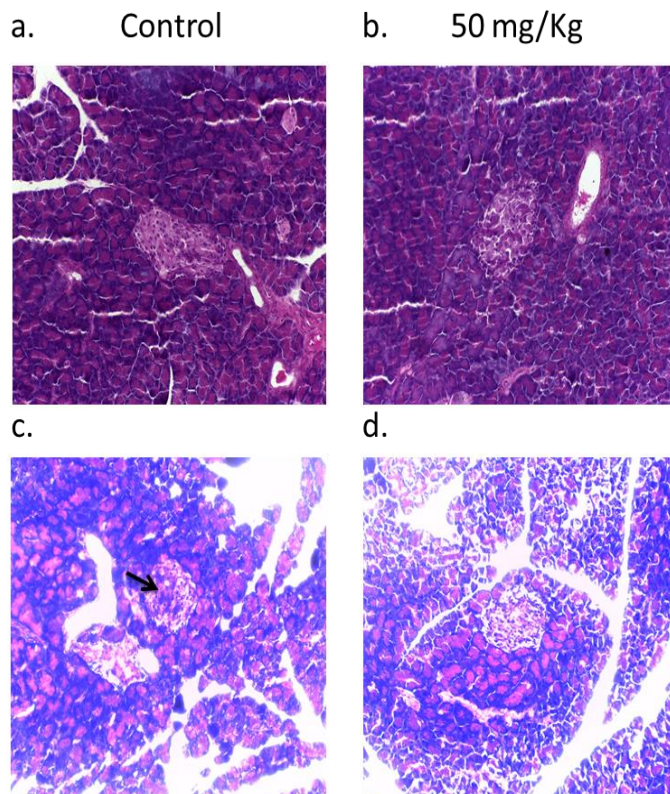
Nota: Los valores son presentados como promedio $\pm$ SEM, $n=4$.

Correlación Histológica

La tinción de Hematoxilina-Eosina fue empleada para corroborar la validez de los cortes histológicos a partir de la observación e identificación de los islotes pancreáticos (Imagen 1A). A los cortes histológicos tratados con la tinción de Gomori se les realizó un análisis cualitativo tanto en las muestras obtenidas de las ratas controles como en los cortes histológicos de los tejidos pancreáticos obtenidos a partir de las ratas hiperglicémicas. Las imágenes captadas permitieron identificar la integridad de las células β en las muestras controles, que se observan como un conglomerado teñido de azul-violáceo. En comparación, los cortes obtenidos de páncreas de ratas tratadas con STZ (50 mg/Kg) muestran una

disminución de estos, lo que demuestra destrucción de las células β (Imagen 1B).

Imagen 1. Cortes Histológicos de Páncreas obtenidos del grupo de la dosis de 50 mg/Kg STZ comparado con el grupo Control.



Islote Pancreático teñido con Hematoxilina-Eosina. 200X. (a,b) Tinción tricrómica de Gomori (c,d) en el cual se observa la presencia de grupos de células β las cuales su citoplasma toma una coloración azul-violeta (Flecha) en el islote del grupo control (c), en comparación al islote del grupo de las dosis de 50 mg/kg de STZ (d) en el cual se observan ausencias de las agrupaciones de células β . 200X.

DISCUSIÓN

Un modelo de DM tipo 1 debe contar con las características de destrucción parcial o total de las células β del páncreas con hiperglicemias sostenidas y cambios clínicos característicos como poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. Diversos modelos se emplean en farmacología experimental, sin embargo el de STZ es uno de los más

ampliamente utilizados. Este antibiótico de uso experimental, utiliza el GLUT2 para entrar a las células β del páncreas donde se descompone y genera estrés oxidativo, produciendo daño y muerte celular con el consecuente déficit funcional de estas células²¹. En el ejercicio de estandarizar el modelo experimental de DM tipo-1 inducido por STZ, se lograron obtener ratas con hiperglicemia sostenida, por lo menos durante un mes tras la administración del antibiótico en dosis de 50 mg/Kg. Después del mes de observación, las muestras de tejidos pancreáticos permitieron corroborar que en estos animales la hiperglicemia se hizo acompañar por destrucción de las células β . Es importante destacar que aunque se emplearon otras dosis (40 y 65 mg/Kg), estas no resultaron ser óptimas para la valoración del modelo. En el caso de la dosis más baja, la administración de STZ no generó cambios que modificaran la glicemia hasta valores que superaran los 200 mg/dL, como lo establecido por otros autores²²⁻²³. En tanto que Guo et al., 2014, lograron obtener animales hiperglicémicos administrando 30 mg/Kg de STZ en ratas Sprague-Dawley. Por su parte, la administración de STZ en dosis de 65 mg/Kg, aunque logra superar significativamente el valor de referencia, presentó una baja tasa de supervivencia en el grupo bajo este régimen, lo que sin duda representa un inconveniente para utilizar esta dosis en estudios diseñados a más largo plazo. Es así como los resultados discutidos hasta este punto, justifican la necesidad de validar el método, ajustándolo a las condiciones experimentales propias de cada laboratorio.

En este estudio, la determinación de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos tuvo como doble objetivo valorar la calidad inicial de los reactivos biológicos, además de verificar si la administración de STZ generaba algún tipo de modificación sobre estos parámetros. Con respecto al primer objetivo, de esta derivación protocolar pudimos observar que los animales mantuvieron valores de lípidos plasmáticos propios para la

especie, el sexo y la edad²⁴. Por otra parte, la administración del agente inductor de la lesión pancreática no parece modificar los valores de colesterol ni los de triglicéridos en el plasma de las ratas. Hallazgos similares a los observados en este estudio han sido descritos por Holmgren y Brown²⁵. Aquí también es apropiado señalar que el desarrollo de hiperlipidemia ha sido asociado al modelo de STZ cuando el antibiótico se ha administrado en dosis bajas repetidas²⁶.

En cuanto al porcentaje de sobrevida, se pudo corroborar la importancia de la administración oral de glucosa las 24 horas posteriores a la STZ, procedimiento que garantiza la sobrevida en los primeros días tras la inducción de la lesión. Esta observación también ha sido realizada en otros trabajos²⁷⁻²⁸, cuyos autores destacan la importancia de la suplementación con glucosa para contrarrestar la hipoglicemia inicial generada por la STZ como consecuencia de la liberación masiva de insulina por el daño provocado sobre las células β pancreáticas.

CONCLUSIÓN

En ratas Sprague-Dawley se logró una inducción efectiva de la DM tipo 1 con STZ al emplear 50 mg/Kg de STZ a dosis única, administrada por vía intraperitoneal. Bajo este protocolo se logró obtener ratas con valores de glicemias superiores a los 200 mg/Kg desde las 24 horas posteriores a la inducción, con sobrevida del 71% y mantenimiento de la hiperglicemia por 30 días. Adicionalmente se demostró la destrucción efectiva de las células β del páncreas con la administración de la STZ, así como la reproducción de la sintomatología característica de la DM.

RECOMENDACIONES

Al término de este trabajo, es posible recomendar la dosis de 50 mg/Kg en ratas Sprague-Dawley adultas; administrada en dosis única, intraperitoneal y compensando la hipoglicemia inicial con la administración de glucosa al 5% durante las primeras 24 horas posteriores a la inducción. Posibles variaciones de la técnica podrían ser consideradas, como la de administrar 40 mg/Kg de STZ en múltiples dosis para lograr un mantenimiento de la glicemia en el tiempo. De igual forma, se podría considerar trabajar con dosis de 65 mg/Kg de STZ, siempre que se deseen glicemias muy altas y que los estudios sean agudos; esto último dado que la sobrevida decrece a partir del quinto día de la administración del antibiótico. Una variación para cuando se requiera emplear dosis muy altas de STZ para estudios más prolongados, sería la de instaurar un tratamiento con insulina que mejore la sobrevida, siempre que el suplemento hormonal no afecte la consecución de los objetivos.

Dado que la sola administración de 50 mg/Kg de STZ no genera cambios en los lípidos plasmáticos, una variación del método que incluya la hiperlipidemia, sería asociar el desarrollo de la DM tipo-1 con la administración de una dieta aterogénica (Alta en grasa), o bien administrar STZ en un régimen de dosis bajas repetidas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) que financió el presente trabajo, a través de los proyectos INF11-054 y FID11-090. También agradecemos al Centro de Investigación e Información de Medicamentos y Tóxicos (CIIMET) y al personal técnico del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá.

REFERENCIAS

1. Damasceno DC, Netto AO, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, Sinzato YK, Bueno A, Calderón, IMP, Rudge MVC. Streptozotocin-Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes. BioMed Research International. 2014; 2014.
2. Islam MS, Koya D, Portha B. Animal Models of Diabetes and Its Associated Complications. Journal of Diabetes Research. 2013; 2013: 1.
3. Ministerio de Salud. Indicadores básicos de país. Panamá. 2014
4. Calderon. A. Epidemiología, genética y mecanismos patogénicos de la diabetes mellitus. Rev Esp Cardiol Supl. 2007; 7:3H-11H.
5. Ryan GJ, Jobe LJ, Martin R. Pramlintide in the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. Clin Ther 2005 Oct; 27(10):1500-12.
6. Lai AKW, Lo A. Animal Models of Diabetic Retinopathy: Summary and Comparison. Journal of Diabetes Research. 2013; 2013.
7. Guo C, Zhang C, Li L, Wang Z, Xiao W, Yang Z. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of oxymatrine in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats. Phytomedicine. 2014; 21: 807-14.
8. Yassa H, Tohamy A. Extract of Moringa oleifera leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats. Acta Histochemica. 2014; 116: 844-54.
9. Langdale CL, Thor KB, Marson L, Burgard EC. Maintenance of bladder innervation in Diabetes: A stereological study of streptozotocin-treated female rats. Autonomic Neuroscience. 2014; 185: 59-66.
10. Chikhi, I, Allali H, El Amine Dib M, Medjdoub H, Tabti B. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of Atriplexhalimus L. (Chenopodiaceae) in streptozotocin-induced diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2014; 4: 181-4.
11. Ayeleso A, Brooks N, Oguntibeju O. Modulation of antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic male wistar rats following intake of red

- palm oil and/or rooibos. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014; 7: 536-44.
12. Jhun H, Choi J, Hong J, Lee S, Kwak A, Kim E, Jo S, Ryoo S, Lim Y, Yoon D, Hong J, Kim T, Lee Y, Song K, Kim S. IL-32c overexpression accelerates streptozotocin (STZ)-induced type 1 Diabetes. *Cytokine*. 2014; 69: 1-5.
13. Vadla GPA, Vellaichamy E. Beneficial effects of aminoguanidine against streptozotocin-induced pathological changes in diabetic mice kidney. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2013; 3: 221-6.
14. Wang Z, Singh A, Leskova W, Harris N. Inhibition of 20-HETE attenuates Diabetes-induced decreases in retinal hemodynamics. *Experimental Eye Research*. 2011; 93: 108-13.
15. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington. National Academies Press. 2011.
16. Bennett HS, Wyrick AD, Lee SW, McNeil JH. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Biotechnic & Histochemistry*. 1976; 51: 71-97.
17. Clark G. Staining Procedures Used by the Biological Stain Commission, 3rd edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1973.
18. Demalsy P, Callebaut M. Plain water as a rinsing agent preferable to sulfurous acid after the Feulgen nuclear reaction. *Biotechnic & Histochemistry*. 1967; 42: 133-5.
19. Luna L. Manual of Histologic Staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd edition. New York. McGraw-Hill Book Company, 1968.
20. Preece A. A Manual for Histologic Technicians, 3rd edition. Boston Little, Brown and Co., 1972.
21. Leiter E, Schile A. Genetic and Pharmacologic Models for Type 1 Diabetes. *Current protocols in mouse biology*. 2013; 3: 9-19.
22. Ramachandran V, Saravanan R. Efficacy of asiatic acid, a pentacyclic triterpene on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2013; 20: 230-6.
23. Nisha P, Mini S. Flavanoid rich ethyl acetate fraction of *Musa paradisiaca* inflorescence down-regulates the streptozotocin induced oxidative stress, hyperglycaemia and mRNA levels of selected inflammatory genes in rats. *Journal of Functional Foods*. 2013; 5: 1838-1847.
24. Guerrero E, Morán-Pinzón JA, Espino CI. Calidad de las ratas del bioterio de la Universidad de Panamá. Editorial Académica Española. 2014.
25. Holmgren PR, Brown AC. Serum cholesterol levels of nondiabetic and streptozotocin-diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Artery*, 1992; 20: 337-45.
26. Komolafe OA, Adeyemi DO, Adewole SO, Obuotor EM. Streptozotocin induced Diabetes alters the serum lipid profiles of adult Wistar rats. *Internet J Cardiovasc Res*. 2009; 7.
27. Subramanian I, Sorimuthu S, Muthusamy K. Antidyslipidemic effect of a novel vanadium-3-hydroxy flavone complex in streptozotocin-induced experimental Diabetes in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2014; 4: 189-93.
28. Jain A, Nahata A, Lodhi S, Singhai A. Effects of *Tephrosia purpurea* and *Momordica dioica* on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2014; 4: 383-9.