

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Cambios histológicos en la rata Wistar hiperglucémica tratada con insulina a dosis no normoglucemiantes

Miguel Chimal-Muñoz<sup>1,2</sup>, Araceli Hernández-Lagunes<sup>3</sup>, José de Jesús Daniel López-Muñoz<sup>2</sup>, María Luisa Moreno-Cortés<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Veracruzana, Instituto de Investigaciones Biológicas, Xalapa, Veracruz, México

<sup>2</sup>Universidad Veracruzana, Facultad de Bioanálisis, Xalapa, Veracruz, México

<sup>3</sup>Servicios de Salud de Veracruz, Centro de Alta Especialidad, Xalapa, Veracruz, México

## RESUMEN

**Introducción:** el empleo de insulina en modelos de diabetes experimental aún es controversial. **Objetivo:** evaluar el efecto de la hiperglucemia por tiempo prolongado a nivel sistémico en sujetos hiperglucémicos tratados con insulina a dosis no normoglucemiantes. **Métodos:** se efectuó un estudio de tipo experimental (analítico), longitudinal. Se indujo hiperglucemia (niveles de glucosa ~500mg/dl) en ratas Wistar (grupo hiperglucémico, n=4); se les administró aloxan (intraperitoneal, 150mg/kg) y se les protegió, simultáneamente, con insulina (0,25-0,5U/kg) durante 42 días. Se obtuvieron muestras de hígado, páncreas, riñón y retina que fueron teñidas con la técnica de hematoxilina y eosina. Se identificaron cambios histológicos y recuento celular al comparar con ratas normoglucémicas (grupo normoglucémico, n=4) mediante la prueba t de Student,  $p < 0,05$ . **Resultados:** se obtuvo un modelo de hiperglucemia. En el grupo hiperglucémico se observaron, a nivel hepático, dilatación de sinusoides, esteatosis de gota gruesa y bajo recuento celular ( $t_7 = 3,52$ ;  $p < 0,009$ ); a nivel renal lisis tubular, infiltrado eritrocitario y bajo recuento celular ( $t_7 = 3,74$ ;  $p < 0,007$ ); a nivel pancreático dilatación de unidades ducto-acinares de la porción exocrina y sin cambios en el recuento celular ( $t_7 = -2,05$ ;  $p = 0,078$ ) y la retina no mostró cambios estructurales ni en el recuento celular ( $t_5 = -1,86$ ;  $p = 0,120$ ). **Conclusiones:** la insulina empleada a dosis no normoglucemiantes no inhibe los efectos histológicos, bioquímicos y conductuales de la hiperglucemia a largo plazo, pero si promueve la sobrevida de los sujetos de estudio.

**Palabras clave:** diabetes mellitus; aloxan; insulina; cambios histológicos; rata Wistar

## ABSTRACT

**Introduction:** the use of insulin in models of experimental diabetes is still controversial. **Objective:** to evaluate the effect of hyperglycemia for a long time at a systemic level in hyperglycemic subjects treated with insulin at non-normoglycemic doses. **Methods:** an experimental (analytical), longitudinal study conducted. Hyperglycemia (glucose levels ~ 500mg/dl) was induced in Wistar rats (hyperglycemic group, n=4); they were administered aloxan (intraperitoneal, 150mg/kg) and were protected, simultaneously, with insulin (0.25-0.5U/kg) for 42 days. Samples of liver, pancreas, kidney and retina were obtained and stained with the hematoxylin and eosin technique. Histological changes and cell count were identified when compared with normoglycemic rats (normoglycemic group, n=4) by Student's t-test,  $p < 0.05$ . **Results:** a hyperglycemia

model was obtained. In the hyperglycaemic group, at the hepatic level, it was observed dilatation of sinusoids, thick-film steatosis and low cell count ( $t_7=3.52$ ,  $p<0.009$ ); at renal level, tubular lysis, erythrocytic infiltrate and low cell count ( $t_7=3.74$ ,  $p<0.007$ ) were found; at the pancreatic level, it was observed a dilation of duct-acinar units of the exocrine portion without changes in the cell count ( $t_7=-2.05$ ,  $p=0.078$ ), and the retina showed no structural changes or in the cell count ( $t_5=-1.86$ ;  $p=0.120$ ). **Conclusions:** the insulin used at non-normoglycemic doses does not inhibit the long-term histological, biochemical and behavioral effects of hyperglycemia, but does promote the survival of the study subjects.

**Key words:** diabetes mellitus; alloxan; insulin; histological changes; rats, Wistar

## INTRODUCCIÓN

La inducción de hiperglucemia en modelos experimentales se ha logrado a través de técnicas que van desde la remoción quirúrgica del páncreas,<sup>(1)</sup> las modificaciones a la dieta<sup>(2)</sup> y la inducción farmacológica<sup>(3)</sup> hasta modificaciones genéticas.<sup>(4)</sup> Los agentes farmacológicos más utilizados son el aloxano y la estreptozotocina, que poseen citotoxicidad selectiva de las células  $\beta$  pancreáticas,<sup>(3,5)</sup> y que han sido empleados en distintos protocolos experimentales que, en dependencia de la especie animal, varían la ruta de administración y la dosis empleada.<sup>(6)</sup> En tales modelos se monitorean las manifestaciones clínicas de la enfermedad durante períodos de tiempo que van desde semanas hasta meses.<sup>(7,8)</sup> Hay informes sobre el estudio de la diabetes experimental durante períodos de tiempo sumamente cortos, sobre todo, los encaminados a evaluar el posible efecto normoglucemiante de compuestos orgánicos<sup>(9,10)</sup> y que, más que estudiar el efecto que ejerce la hiperglucemia para el desarrollo de complicaciones a largo plazo, observan los efectos bioquímicos de fase aguda tras la administración del fármaco, y otros que contemplan tiempos prolongados de la evolución de la enfermedad, tal como ocurre en el humano<sup>(11,12)</sup> aunque, particularmente, la inducción farmacológica tiene la desventaja de dar lugar a una alta incidencia de cetosis y mortalidad.<sup>(13)</sup> En este sentido se han implementado estrategias metodológicas como la administración de insulina en dosis no normoglucemiantes.<sup>(14,15)</sup> A través de sus acciones anabólicas, que promueven la captación y el almacenamiento de glucosa en los tejidos periféricos, la insulina regula las concentraciones de glucosa y promueve la sobrevida de los sujetos de estudio. Si bien la administración de insulina ha sido caracterizada por su efecto protector, puede retrasar o restituir el daño renal,<sup>(16,17)</sup> revertir alteraciones neurofisiológicas<sup>(18)</sup> y prevenir, incluso, lesiones cutáneas latentes;<sup>(19)</sup> no obstante, también puede dar lugar a cambios neuropáticos importantes como la degeneración axonal.<sup>(19)</sup> Debido a que existe controversia sobre el empleo de insulina en modelos de diabetes experimental se llevó a cabo el presente estudio, con la finalidad de demostrar que el uso de insulina en dosis no normoglucemiantes en estos modelos permite evaluar el efecto de la hiperglucemia por tiempo prolongado a nivel sistémico, particularmente, a través de la observación de cambios histológicos y de recuento celular (o de ambos) en el páncreas, el hígado, el riñón y el globo ocular de la rata Wistar.

## MÉTODOS

### Tipo y sujetos de estudio

Se efectuó un estudio de tipo experimental (analítico), longitudinal que se derivó de los procedimientos llevados a cabo para la publicación de Moreno y colaboradores en el año 2016<sup>(14)</sup> y acorde a los procedimientos señalados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y en las especificaciones técnicas para la producción, el cuidado y el uso de los animales de laboratorio. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados.

### Grupos experimentales

Se seleccionaron aleatoriamente ratas de aproximadamente de 250 a 300gr de peso para formar dos grupos experimentales: grupo control (GC, n=4) y grupo hiperglucémico tratado con insulina (GHI, n=4).

### Inducción de hiperglucemia

A las ratas del GHI, con ayuno previo de 12 horas, les fue administrado aloxano monohidratado (Corporación Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) vía intraperitoneal -ip- (200mg/kg de peso corporal). Inmediatamente después de la administración las ratas recibieron solución de dextrosa al 5% (PiSA®) para prevenir la hipoglucemia transitoria inducida por el aloxano como resultado de la liberación masiva de insulina pancreática.<sup>(5,20)</sup> La hiperglucemia se confirmó 48 horas después de la administración; se utilizó un medidor de glucosa Accu-chek performa, de la marca Roche, Indianápolis, Indiana, Estados Unidos. Las ratas del GC recibieron un volumen equivalente de solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% en la primera sesión y ningún tratamiento posterior. Se verificó que el GHI mantuviera niveles de glucosa en plasma  $>250\text{mg/dl}$  y el GC  $\leq 120\text{mg/dl}$ .

### Administración de insulina

Para mantener la hiperglucemia por tiempo prolongado y promover la supervivencia el GHI recibió insulina subcutánea diaria (0,25-0,5U/kg de peso corporal; Lantus, Sanofi- Aventis, París, Francia).

### Mediciones biológicas

Los niveles de glucosa fueron monitoreados a los tres, siete, 14, 21, 28, 35 y 42 días en ambos grupos. La glucosuria y la cetonuria fueron determinadas mediante tiras Multistix 10 SG (marca Siemens, Tarrytown, New York, Estados Unidos). Adicionalmente fueron monitoreados el peso corporal y el consumo de agua y alimento.

### Obtención y tinción histológica

Las ratas fueron eutanizadas con pentobarbital sódico (50mg/kg vía ip). Inmediatamente después se removieron el páncreas, los riñones, el hígado y los globos oculares para ser colocados en formol al 10%. Los órganos fueron fijados e incluidos en parafina y se eligió una porción representativa para seccionar a

5µm en un micrótopo Leica Biosystems RM2245 Nussloch GmbH, Alemania, para ser teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina.

### **Análisis microscópico**

Las variaciones morfológicas de cada órgano fueron analizadas utilizando un microscopio de campo claro (Olympus CX41); adicionalmente, se contabilizó el número de células en cinco campos por cada sección (ImageJ Software, versión 1.46) en un total de nueve secciones por cada órgano, las que fueron seleccionadas al azar, a fin de obtener una distribución representativa de cada órgano. Se capturaron fotografías digitales, tanto del GC como del GHI, y bajo el objetivo 40x. Dos revisores analizaron el material.

### **Análisis estadístico**

El estudio de los valores de glucosa y peso corporal fue realizado empleando el análisis de varianza ANOVA y la comparación entre el número de células y la condición de estudio se realizó con la utilización de la prueba t de Student. Las diferencias consideradas estadísticamente significativas fueron con un valor de  $p < 0,05$ . Para el análisis se utilizó el software Statistica versión 7.

## **RESULTADOS**

### **Mediciones biológicas**

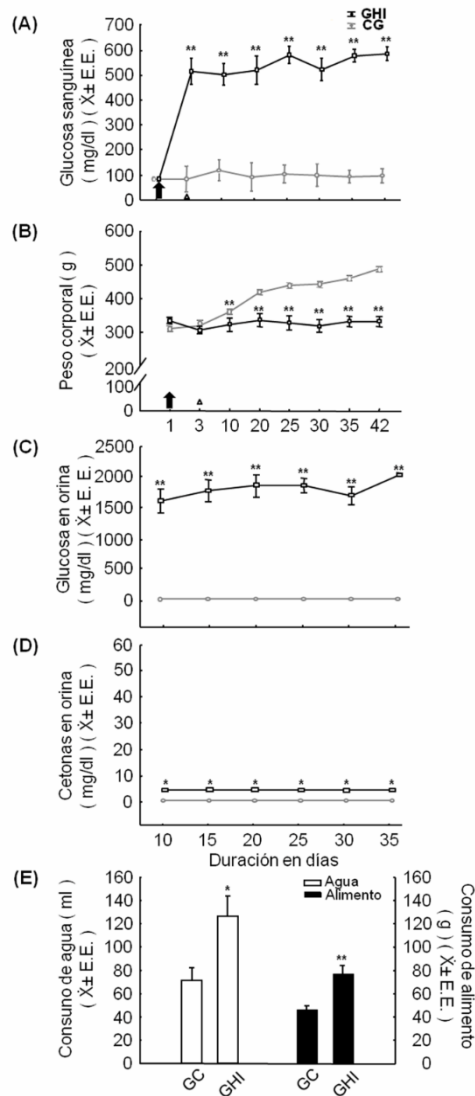
Con este procedimiento experimental se alcanzó el 84% de supervivencia de los sujetos de estudio y se mantuvieron valores de glucosa de  $\geq 250$ mg/dl. Se observaron diferencias en los niveles de glucosa: en el GHI fueron de  $\geq 500$ mg/dl, mientras que en el GC fueron de  $\leq 120$ mg/dl ( $F_{7,95}=7,057$ ;  $p < 0,001$ ) -figura 1A-. El GHI reveló menor peso corporal comparado con el grupo control cerca de los 10 días posteriores a la administración del aloxano ( $F_{7,95}=12,190$ ;  $p < 0,001$ ) - figura 1B-. El GHI mostró glucosuria y cetonuria, no así el GC ( $F_{5,71}=124,878$ ;  $p < 0,001$ ) -figuras 1C y 1D-. Adicionalmente, el GHI reveló incremento en el consumo de agua y de alimento ( $t_{16}=-2,677$ ;  $p < 0,017$ ) comparado con el GC ( $t_{16}=-3,933$ ;  $p < 0,001$ ) -figura 1E-.

### **Cambios histológicos en el hígado**

En el GHI se observó dilatación de los sinusoides hepáticos (figura 2B), además de esteatosis de gota gruesa (figura 2B), a diferencia del GC (figura 2A). Adicionalmente, se observó menor número de células en el GHI respecto del GC ( $t_7=3,52$ ;  $p < 0,009$ ) -figura 3A-.

### **Cambios histológicos en el riñón**

En el GHI se observaron lisis tubular e infiltración eritrocitaria (figuras 2D1 y 2D2), a diferencia del GC (figura 2C). Adjuntamente, se observó menor número de células en el GHI respecto del GC ( $t_7=3,74$ ;  $p < 0,007$ ) -figura 3B-.



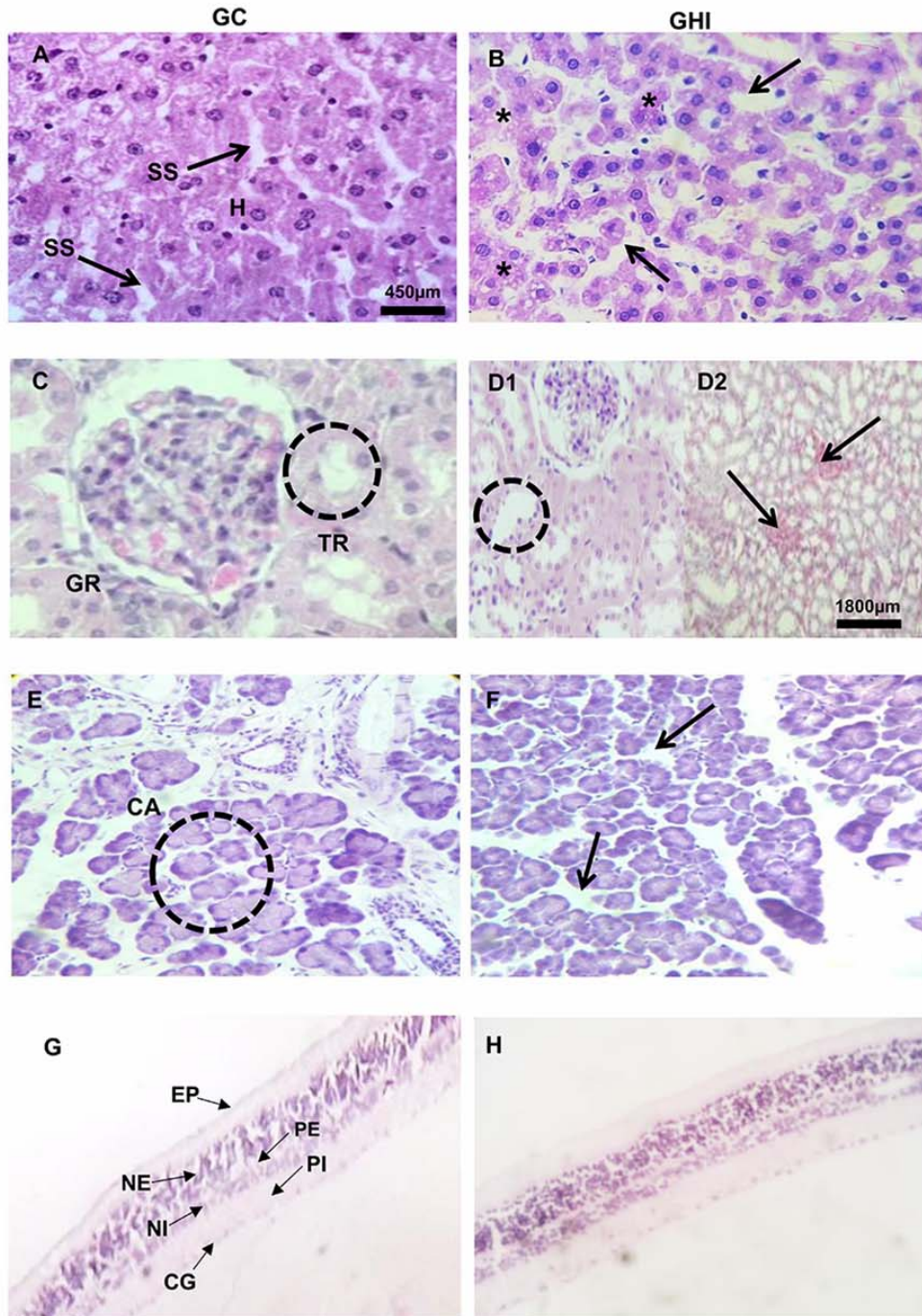
**Figura 1.** Mediciones biológicas de los grupos experimentales. El grupo hiperglucémico administrado con insulina (A) mostró incremento en los niveles de glucosa sanguínea desde el tercer día de la inducción (triángulo), (B) decremento del peso corporal, (C) glucosuria, (D) cetonuria, además de mayor consumo de agua y alimento (E). Los datos están presentados en media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ . Fuente: resultados del estudio.

### Cambios histológicos en el páncreas

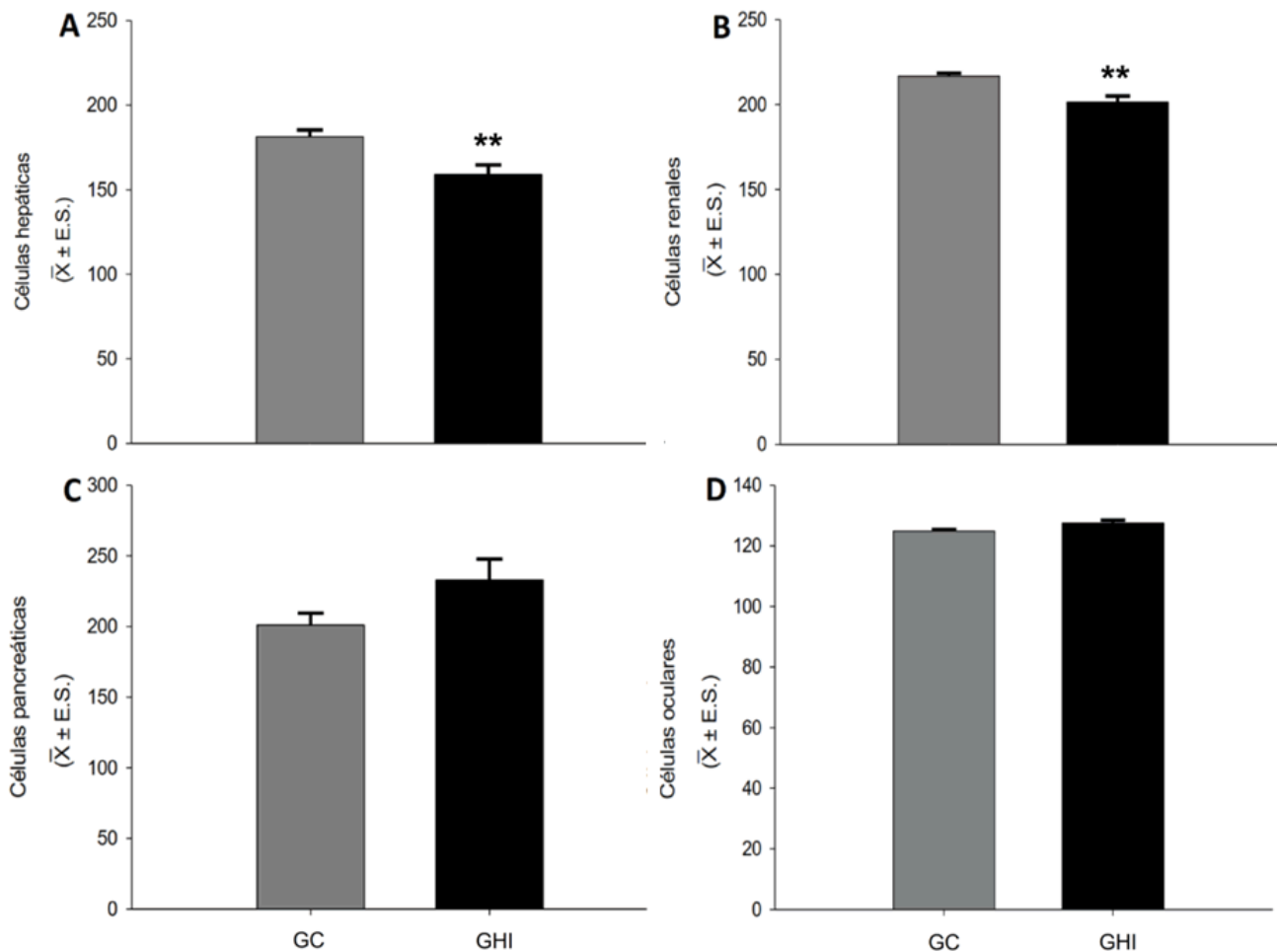
Se observó atrofia pancreática difusa en el GHI, con dilatación de las unidades ducto-acinares, de la porción exocrina (figura 2F); en el GC no se observaron cambios histológicos (figura 2E). Adicionalmente, en el GHI se observó un aumento significativo en número de células pancreáticas ( $t_7 = -2,05$ ;  $p = 0,078$ ) - figura 3C-.

### Cambios histológicos en la retina

En el GHI no se observaron cambios histológicos en la retina (figuras 2G y H); tampoco se observaron cambios en el recuento celular ( $t_5 = -1,86$ ;  $p = 0,120$ ) - figura 3D-.



**Figura 2.** Cambios histológicos del hígado, el riñón, el páncreas y la retina. (A) microfotografías de sinusoides hepáticos de morfología normal (flechas). (B) sinusoides con mayor dilatación (flecha) y esteatosis de gota gruesa (\*) del GHI. (C) túbulos renales de morfología normal. (D1, D2) lisis tubular (delimitación circular) e infiltración eritrocitaria (flechas). (E) unidades ductoacinares del páncreas exocrino del GC (delimitada por círculo). (F) dilatación ductoacinar del GHI (flecha). (G, H) capas de córnea, sin cambios estructurales aparentes en ambos grupos. SS: sinusoides, H: hepatocitos, TR: túbulo renal, GR: glomérulo, CA: conductos acinares, EP: epitelio pigmentado, NE: nuclear externa, NI: nuclear interna, PE: plexiforme exterior, PI: plexiforme interior, CG: capa ganglionar. Fuente: resultados del estudio.



**Figura 3.** Conteo celular del hígado, del riñón, del páncreas y de la retina. El grupo hiperglucémico administrado con insulina (GHI, barras negras) mostró (A) disminución de la cantidad de hepatocitos (\*\* $p < 0,009$ ) y (B) menor cantidad de células renales, mientras que no se observaron cambios en la cantidad celular de páncreas (C) y de retina (D) respecto del grupo control (barras grises). El eje X muestra la condición experimental y el eje Y el número de células expresada por la media  $\pm$  error estándar. Fuente: resultados del estudio.

## DISCUSIÓN

Se indujo un modelo de diabetes experimental caracterizado por hiperglucemia, pérdida del peso corporal, glucosuria y cetonuria, además de mayor consumo de agua y de alimento.

Fueron observados cambios histológicos a causa del daño oxidativo por hiperglucemia, particularmente, las alteraciones de la arquitectura hepática, que incluyen dilatación sinusoidal (figura 2B). Este hallazgo es concordante con el hecho de que el óxido nítrico, un potente agente oxidante, ejerce un efecto vasodilatador y de daño a la vasculatura,<sup>(21)</sup> además de que está informado que en el curso de la diabetes el sistema no se encuentra alterado.<sup>(22)</sup> Otras consecuencias, tanto de la resistencia insulínica como del estrés oxidativo mitocondrial, son la necrosis celular y la inflamación hepática,<sup>(23)</sup> lo que explica que se hallara pérdida de masa celular por glucotoxicidad, es decir, menor

recuento de células hepáticas y renales (figuras 3A y B). Otro indicador de alteraciones tóxico-metabólicas<sup>(24)</sup> asociado a la resistencia a la insulina y a la diabetes mellitus tipo 2 en el humano es la grasa ectópica de los hepatocitos,<sup>(25)</sup> que coincide con la esteatosis de gota gruesa encontrada (figura 2B).

En condiciones de hiperglucemia sostenida también ocurre daño pancreático, que se detecta a través de la pérdida de células  $\beta$  pancreáticas;<sup>(26)</sup> sin embargo, en este estudio se observó un efecto contrario (figura 3C), además de dilatación ductoacinar (figura 2F). El incremento en el número de las células pancreáticas coincide con otros informes que señalan que existe regeneración celular pancreática en condiciones de hiperglucemia, mientras que en condiciones normales las células  $\beta$  pancreáticas tienen un índice de regeneración de 3% por día en el individuo adulto, lo que disminuye con la edad;<sup>(27)</sup> incluso, esta capacidad proliferativa y de autoreplicación es uno de los mecanismos compensatorios de expansión de células  $\beta$  en roedores<sup>(28,29)</sup> y se ha demostrado que la recuperación de la función pancreática se debe no solamente a la división de las células  $\beta$  residuales o preexistentes, sino también a procesos de neogénesis.<sup>(30)</sup> En tanto que la dilatación ductoacinar es debida al efecto tóxico metabólico, tal como ocurrió en el hígado.

Las alteraciones de la función de los túbulos renales pueden ocurrir en etapas tempranas de la diabetes y se relacionan también con el control glucémico; en el caso de los sujetos del GHI que mantuvieron niveles de glucemia por encima de 500mg/dl era esperado encontrar disfunción tubular renal, específicamente, lisis tubular e infiltrado eritrocitario (figura 2, D1 y D2), en conformidad con la disfunción endotelial, que tiene lugar por mecanismos intracelulares tales como el aumento de las especies reactivas a oxígeno y a sustancias proinflamatorias.<sup>(31)</sup>

En el globo ocular no se encontraron alteraciones histológicas ni cambios en el recuento celular (figuras 2H y 3D). Aunque la retinopatía es una de las más comunes complicaciones de la diabetes, que incluye la apoptosis de la célula neural retiniana, es observable en roedores con hasta 32 semanas de evolución de la enfermedad;<sup>(32)</sup> incluso, la acidosis de la retina comienza en uno o hasta tres meses de hiperglucemia en la rata,<sup>(33)</sup> motivo por el que se considera que no se observaron cambios. Como las ratas de este estudio se mantuvieron por 42 días, se considera una desventaja. En futuros experimentos se considerará un mayor tiempo de evolución de la enfermedad.

El aloxano da lugar a carencia insulínica y, como resultado el modelo animal, manifiesta hiperglucemia; no obstante, para mantener la hiperglucémica por tiempos prolongados, como ocurre en el humano, se emplea insulina, administrada en dosis no normoglucemiantes que permiten la sobrevida de los sujetos y, a su vez, evaluar el efecto de la hiperglucemia por tiempo prolongado a nivel sistémico.

## CONCLUSIONES

En virtud de los hallazgos presentados este estudio demuestra que la insulina empleada en dosis no normoglucemiantes promueve la sobrevida de los sujetos hasta en un 84% y permite evaluar los efectos de glucotoxicidad sostenida a nivel



sistémico, tal como ocurre en el humano, como daño renal, hepático, pancreático y oftálmico. Es una contribución para las mejoras metodológicas para inducir modelos de diabetes experimental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yu S-L, Han S, Kim HR, Park JW, Jin DI, Kang J. Phosphorylation of carboxypeptidase B1 protein regulates  $\beta$ -cell proliferation. *Int J Mol Med* [Internet]. 2017 Nov [citado 3 Jul 2018];40(5):1397-404. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5627887/>
2. Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav* [Internet]. 2016 Dic [citado 3 Jul 2018];167:382-91. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27705750>
3. Bequer L, Gómez T, Molina JL, Artiles D, Bermúdez R, Clapés S. Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomédica* [Internet]. 2016 [citado 3 Jul 2018];36(2):230. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2686/3184>
4. Hans-Georg Joost, Hadi Al-Hasani, Annette Schürmann, editores. *Animal Models in Diabetes Research* [Internet]. Human Press: Springer; 2012. [citado 3 Jul 2018]. Disponible en: <http://www.springer.com/gp/book/9781627030670>
5. Al-awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental Diabetes Mellitus in different animal models. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016 [citado 3 Jul 2018];2016:9051426. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993915/>
6. Mostafavinia A, Amini A, Ghorishi SK, Pouriran R, Bayat M. The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type1 diabetes mellitus and mortality rate in rats. *Lab Anim Res* [Internet]. 2016 Sep [citado 3 Jul 2018];32(3):160-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27729932>
7. AbunasefSK, Amin HA, Abdel-Hamid GA. A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine. *Folia Histochem Cytobiol* [Internet]. 2014 [citado 3 Jul 2018];52(1):42-50. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24802960>
8. Abdullah KM, Alam MM, Iqbal Z, Naseem I. Therapeutic effect of vitamin B3 on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced diabetic rat model. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018 Sep [citado 20 Ene 2019];105:1223-31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30021358>
9. Birru EM, Abdelwuhab M, Shewamene Z. Effect of hydroalcoholic leaves extract of *Indigoferaspicata*Forssk. On blood glucose level of normal, glucose loaded and diabetic rodents. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2015 [citado 3 Jul 2018];15(1). Disponible en: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-015-0852-8>
10. Shalini Adiga K, Bairy L Meharban A, Punita ISR. Hypoglycemic effect of aqueous extract of *trichosanthesdioica* in normal and diabetic rats. *Int J Diabetes Dev Ctries* [Internet]. 2010 Jan-Mar [citado 3 Jul 2018];30(1):38-42. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2859283/>

11. Pourghasem M, Nasiri E, Shafi H. Early renal histological changes in alloxan-induced diabetic rats. *Int J Mol Cell Med* [Internet]. 2014 [citado 3 Jul 2018];3(1):11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927393/>
12. Lucchesi AN, Cassettari LL, Spadella CT. Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in Rat Liver that Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans. *Journal of Diabetes Research* [Internet]. 2015 [citado 3 Jul 2018];2015:1–11. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2015/494578/>
13. Diab RAH, Fares M, Abedi-Valugerdi M, Kumagai-Braesch M, Holgersson J, Hassan M. Immunotoxicological effects of streptozotocin and alloxan: In vitro and in vivo studies. *Immunol Lett* [Internet]. 2015 Feb [citado 3 Jul 2018];163(2):193-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25573197>
14. Moreno-Cortés ML, Gutiérrez-García AG, Guillén-Ruiz G, Romo-González T, Contreras CM. Widespread blunting of hypothalamic and amygdala-septal activity and behavior in rats with long-term hyperglycemia. *Behav Brain Res* [Internet]. 2016 Sep [citado 3 Jul 2018];310:59–67. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27173433>
15. Alarcón-Sotelo A, Espinosa-Sevilla A, Díaz-Greene E, Rodríguez-Weber FL. Glucosa y riñón: Ruptura del paradigma. *Med Int Méx* [Internet]. 2015 [citado 3 Jul 2018];31(3):296–300. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2015/mim153j.pdf>
16. Yoshida M, Kimura H, Kyuki K, Ito M. Effect of combined vitamin E and insulin administration on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2005 Nov [citado 3 Jul 2018];28(11):2080-6. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/d557/3b705705198b91882886e24fcb0326d8e963.pdf>
17. Michael ST, Ganesh RN, Viswanathan P. Effect of long acting insulin supplementation on diabetic nephropathy in Wistar rats. *Indian J Exp Biol* [Internet]. 2012 Dec [citado 3 Jul 2018];50(12):867-874. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23986970>
18. Ramírez-Delgado JU. Neuropatía diabética y su tratamiento. *Dol Clin Ter* [Internet]. 2015 [citado 3 Jul 2018];1(6):5-9. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenidoover.asp?contenidoID=30085&pagina=3>
19. Chen X, Lin W, Lu S, Shi Y, Zou J, Liu Z, et al. Insulin prevents latent skin lesions by inhibiting the generation of advanced glycation end products in streptozotocin-induced diabetic rats. *Endocr Pathol* [Internet]. 2009 [citado 3 Jul 2018];20(3):163-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19488861>
20. Rohilla A, Ali S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *IJRPBS* 2012;3(2):819-823.
21. Calderón Salinas JV, Muñoz Reyes EG, Quintanar Escorza MA. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Educ Bioquim* [Internet]. 2013 [citado 3 Jul 2018];32(2):53-66. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v32n2/v32n2a2.pdf>
22. Gagliano LA, Ochoa GJ, Aldo Manso D, Genero G, Boeris MA. El órgano endotelial. *Clínica Veterinaria* [Internet]. 2012 [citado 3 Jul 2018];14(1):126-140. Disponible en: <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1849/1807>
23. García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, González-González JA, Lavalle-González FJ, Villarreal-Pérez JZ, Maldonado-Garza HJ. La diabetes en la cirrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2013 [citado 3 Jul 2018];36(7): 473-482. Disponible en: [https://www.clinicalkey.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0210570513000770.pdf?locale=es\\_ES](https://www.clinicalkey.es/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0210570513000770.pdf?locale=es_ES)

24. Ridaura-Sanz C. La biopsia hepática. Acta Pediatr Mex [Internet]. 2008 Jul-Ago [citado 3 Jul 2018];29(4):216-226. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4236/423640312007.pdf>
25. Sattar N, McConnachie A, Ford I, Gaw A, Cleland SJ, Forouhi, NG, et al. Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. Diabetes [Internet]. 2007 Apr [citado 3 Jul 2018];56(4): 984-991. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395744>
26. Cubillos V, López C, Alberdi A. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de páncreas en perros diabéticos inducidos con aloxano. Arch Med Vet [Internet]. 2008 [ciatdo 3 Jul 2018];40(2):169-177. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2008000200009](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2008000200009)
27. Hellerström C, Swenne I. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. Diabetes [Internet]. 1991 Dec [citado 3 Jul 2018];40(Suppl 2):89-93. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1748274>
28. Wang P, Fiaschi-Taesch NM, Vasavada RC, Scott DK, García-Ocaña A, Stewart AF. Diabetes mellitus-advances and challenges in human  $\beta$ -cell proliferation. Nat Rev Endocrinol [Internet]. 2015 Apr [citado 3 Jul 2018];11(4): 201-212. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687999>
29. Remedi MS, Emfinger C. Pancreatic  $\beta$ -cell identity in diabetes. Diabetes Obes Metab [Internet]. 2016 Sep [citado 3 Jul 2018];18(Suppl 1):110-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27615139>
30. Cano DA, Rulifson IC, Heiser PW, SwigartLB, Pelengaris S, German M, et al. Regulated beta-cell regeneration in the adult mouse pancreas. Diabetes [Internet]. 2008 Abr [citado 3 Jul 2018];57(4):958-66. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083786>
31. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. J Formos Med Assoc [Internet]. 2018 Ago [citado 20 Ene 2019];117(8):662-75. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29486908>
32. Dmitriev AV, Henderson D, Linsenmeier RA. Development of diabetes-induced acidosis in the rat retina. Ex Eye Res [Internet]. 2016 Ago [citado 3 Jul 2018];149:16-25. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27262608>
33. Danilova I, Medvedeva S, Shmakova S, Cheresheva M, Sarapultsev A, Sarapultsev P. Pathological changes in the cellular structures of retina and choroidea in the early stages of alloxan-induced diabetes. World J Diabetes [Internet]. 2018 Dec [citado 20 Ene 2019];9(12):239-51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6304297/>

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

MCM: realizó el trabajo experimental y análisis histológico

AHL: Especialista revisora de los cortes histológicos y redacción

JJDLM: Análisis de datos y redacción

MLMC: Diseño del estudio, análisis de resultados y redacción

Todos los autores hemos revisado y aprobado la versión final del manuscrito.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

Recibido: 3/8/2018

Aprobado: 20/2/2019

**María Luisa Moreno-Cortés.** Área de Biomedicina, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana.

[lumoreno@uv.mx](mailto:lumoreno@uv.mx)

<https://orcid.org/0000-0003-1047-2581>