



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

DURACIÓN DEL EFECTO DEL IMPLANTE LIOFILIZADO DE
PLACENTA COMO CONTROL DE DIABETES INDUCIDA
CON ESTREPTOZOTOCINA EN RATAS *WISTAR*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
PRESENTA:

KARINA DÍAZ DONATO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARTÍN PALOMAR MORALES

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO
2014.





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.

Este trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en el laboratorio de Inmunobiología (L-321), bajo la dirección de la **Dra. Silvia Leticia Verdín Terán** (Q.E.P.D)
Se recibió apoyo del programa PAPIIT 213713.

Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, mi casa de estudios, por albergar mi formación como Bióloga.

Al Dr. Martín Palomar Morales por su apoyo para la finalización de este trabajo. Y al Laboratorio de Biorregulación (L-511) de la FES Iztacala por la disposición para el uso de su equipo.

Al Dr. Marco A. Rodríguez Monroy y al Laboratorio de Inmunobiología (L-321) de la FES Iztacala, por las facilidades y apoyo para la realización de mi proyecto.

Al M.C. Miguel J. Reyes Campos por sus valiosas aportaciones y apoyo a lo largo del proyecto.

Al M. en C. Antonio Pineda Carranza por su ayuda para llevar a cabo diversas técnicas experimentales.

Al Biol. Francisco J. Martínez López por su tiempo, apoyo y dedicación para la revisión de esta Tesis.

A la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez por su apoyo y sus acertadas observaciones sobre el trabajo.

A la Biol. Ana F. Chávez Sánchez por sus revisiones y observaciones.

A mi compañera de laboratorio, Alejandra Angel Martínez, por ser parte de este proyecto y por el buen trabajo juntas.

A la Dra. Leticia Flores Sánchez y al Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por su colaboración y facilidades para realizar parte de la fase experimental.

¡Muchas Gracias!

Índice

	Página
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Definición Diabetes Mellitus	2
1.2 Clasificación	3
1.3 Diabetes Experimental	7
1.4 Estreptozotocina	7
1.5 Influencia del género	9
1.6 Proceso Histológico	9
2. Planteamiento del problema	11
3. Objetivos	12
4. Material y Método	13
4.1 Primera Fase	13
4.2 Análisis Histológico	15
4.3 Segunda fase	16
4.4 Tercera Fase	16
5. Resultados	17
5.1 Peso Corporal	17
5.2 Glucosa Sérica	18
5.3 Hemoglobina Glicosilada	18
5.4 Parámetros Bioquímicos	19
5.5 Análisis Histológico	24
5.6 Tiempo de Vida	35
5.7 Resultados Tercera Fase	36
6. Discusión	41
7. Conclusiones	45
8. Referencias Bibliográficas	46
9. Anexos	51
9.1 Parámetros Bioquímicos	51
9.2 Técnica Histológica Convencional	59
9.3 Tinción Hematoxilina- Eosina (H-E)	61
9.4 Técnica Inmunohistoquímica con peroxidasa	63

Índice de Figuras

Figura	Página
• Figura 1. Fórmula de la estreptozotocina (STZ).....	7
• Figura 2. Mecanismo de acción de la STZ.....	8
• Figura 3. Promedio de los valores de peso corporal de los tres grupos experimentales.....	17
• Figura 4. Promedio de los niveles de glucosa obtenidos de los tres grupos experimentales.....	18
• Figura 5. Promedio de concentración de hemoglobina glicosilada en dos de los grupos experimentales.....	19
• Figura 6. Promedio de niveles de glucosa de los tres grupos experimentales, obtenidos de pruebas de laboratorio.....	20
• Figura 7. Concentración de los niveles de triglicéridos obtenidos de pruebas de laboratorio para los tres grupos experimentales.....	21
• Figura 8. Concentración de los valores de colesterol para los tres grupos experimentales, obtenidos de pruebas de laboratorio.....	22
• Figura 9. Concentración de los niveles de urea de los tres grupos experimentales, obtenidos de pruebas de laboratorio.....	23
• Figura 10. Concentración de creatinina y ácido úrico obtenidos de muestras de sangre por punción cardiaca analizadas en pruebas de laboratorio.....	24

- Figura 11. Tinción H-E en hígado de rata *Wistar* Control, Diabética DSI y Diabética sometida a tratamiento DI.....25
- Figura 12. Riñón de rata *Wistar* con tinción H-E de los tres grupos experimentales C, DSI, y DI.....27
- Figura 13. Tinción H-E en bazo de rata *Wistar* Control, Diabética y Diabética sometida a tratamiento.....29
- Figura 14. Páncreas de rata *Wistar* con tinción H-E de los tres grupos experimentales C, DSI, DI.....31
- Figura 15. Tinción H-E en ojos de rata *Wistar* Control, Diabética y Diabética sometida a tratamiento.....33
- Figura 16. Inmunohistoquímica del implante liofilizado de placenta.....35
- Figura 17. Tiempo de vida de los grupos experimentales DSI y DI a partir de la inducción a DM1.....36
- Figura 18. Comparación en los valores de glucosa de la rata DI durante el primer y segundo implante liofilizado de placenta.....37
- Figura 19. Comparación de los valores de glucosa de la rata DSI con y sin implante liofilizado de placenta.....37
- Figura 20. Comparación aspecto de la Rata DSI, antes y después de la colocación del liofilizado de placenta. Tercera fase.....39

Índice de Tablas

- Tabla I. Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus (ADA 1997).....4
- Tabla II. Detección de marcadores de la técnica inmunohistoquímica....35

Resumen

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de alteraciones metabólicas de etiología múltiple, caracterizadas por hiperglucemia crónica resultantes de un defecto en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas. El caso de la DM1 postula que las células T específicas para moléculas propias de las células β pancreáticas existen normalmente pero están reprimidas por mecanismos de autocontrol. Durante su aparición existe delección inapropiada de células β por apoptosis lo que conduce a la deficiencia absoluta de insulina. Se ha dado a la tarea de buscar alternativas de tratamiento tal es el caso del implante liofilizado de placenta.

La placenta es un órgano temporal que acompaña el embarazo conectada al feto a través del cordón umbilical, y representa una reserva de células madre consideradas como fuente de células para medicina regenerativa debido a su plasticidad y fácil disponibilidad.

En el presente trabajo se realizó un estudio experimental utilizando ratas *Wistar* macho divididas en 3 grupos (Control, Diabéticas y Diabéticas con implante liofilizado de placenta) se les administró una dosis única de estreptozotocina 60 mg/Kg vía i.p. para inducir diabetes, y se consideraron diabéticas cuando la glucosa sérica fue mayor a 400 mg/dL. Posteriormente se sacrificaron y se obtuvieron muestras de sangre para determinar los niveles de glucosa, hemoglobina glicosilada, colesterol, creatinina y urea, así como muestras de tejido de hígado, riñón, bazo, páncreas y ojo para su evaluación histológica.

Los resultados nos indican que el implante liofilizado de placenta a pesar de no presentar cambios significativos en los niveles de glucosa sérica y peso corporal, si disminuye los niveles de hemoglobina glicosilada y daños histopatológicos, lo que indica un efecto protector, sin embargo aún se desconocen los mecanismos de tal efecto.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) se define como un grupo de alteraciones metabólicas de etiología múltiple, caracterizadas por hiperglucemia crónica, resultante de un defecto en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas. Por su elevada prevalencia, sus complicaciones crónicas y la alta mortalidad que produce, es una de las enfermedades con un mayor impacto social y sanitario (TECDCDM, 1997). Sus síntomas principales son la poliuria, la polidipsia, la pérdida de peso, polifagia y visión borrosa en algunos casos. Además, esta hiperglucemia crónica, se asocia con daño a largo plazo de distintos órganos; riñones (nefropatía), ojos (retinopatía), nervios (neuropatía), corazón (cardiopatía) y vasos sanguíneos (Gúzman-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003; Restrepo, 2000).

A lo largo de su evolución, la DM afecta a la totalidad de órganos y tejidos, y origina complicaciones crónicas tanto microvasculares, como macrovasculares (Triana, 2001). Las primeras se relacionan principalmente con daño al endotelio y músculo liso manifestándose como nefropatía, retinopatía y neuropatía diabéticas. Este tipo de complicaciones emerge por influencias genéticas seguidas de trastornos metabólicos y hemodinámicos, caracterizados anatómicamente por el engrosamiento de las membranas basales de los vasos capilares, lo que conduce a angiopatía oclusiva, hipoxia y daño al tejido. En la mayoría de los casos estas complicaciones se relacionan con la severidad y duración de la hiperglucemia crónica (Díaz, 2004).

Las complicaciones macrovasculares incluyen un grupo de trastornos que se caracterizan por aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón, y son una de las principales causas de muerte en el paciente diabético (Díaz, 2004). En gran medida las complicaciones de la diabetes inducida por hiperglucemia, se originan por cambios químicos y funcionales de las proteínas, alteración en la expresión de genes y daño al endotelio.

1.2. Clasificación

La clasificación actual de la DM está basada en su etiología, y conserva a la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Otro grupo incluido en esta clasificación hace referencia a otros tipos específicos de diabetes asociados a defectos genéticos de la célula β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades asociadas a procesos que afectan al páncreas exocrino, endocrinopatías, formas frecuentes de diabetes autoinmunes y otros síndromes asociados a la enfermedad (Conget, 2002); además de incluir a la diabetes mellitus gestacional, que se presenta por vez primera en el embarazo en mujeres aparentemente sanas (Tébar, 2009).

El tipo más frecuente es la DM2, se presenta de 90 a 95% de las personas con DM. Se caracteriza por la resistencia a la acción periférica de la insulina y en algunos casos déficit de su secreción; existe una mezcla de estas alteraciones con ausencia de destrucción de las células β . Está asociada a hipertensión arterial y obesidad, una baja tendencia a la cetosis así como una mayor tendencia a la hiperosmolaridad no cetósica (Islas y Revilla, 2004). En esta DM es importante tanto la carga genética, así como los casos de mujeres que hayan tenido una diabetes gestacional previa.

Clasificación de la Diabetes Mellitus

- | | |
|--|---|
| <p>1. Diabetes mellitus tipo 1</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Autoinmune B. Idiopática <p>2. Diabetes mellitus tipo 2</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Predomina la resistencia a la insulina sobre los defectos relativos en la secreción de hormona 2. Predominan los defectos en la secreción de insulina frente a la presencia de resistencia a la insulina <p>3. Otros tipos específicos de diabetes mellitus</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Defectos genéticos de la función de la célula β <ul style="list-style-type: none"> 1. Cromosoma 12, HNF-1α(MODY 3) 2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2) 3. Cromosoma 20, HNF-4α(MODY 1) 4. ADN mitocondrial 5. Otros B. Defectos genéticos en la acción de la insulina <ul style="list-style-type: none"> 1. Resistencia a la insulina tipo A 2. Leprechaunismo 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall 4. Diabetes lipotrófica 5. Otros C. Enfermedades del páncreas exocrino <ul style="list-style-type: none"> 1. Pancreatitis 2. Pancreatectomía/ traumatismo 3. Neoplasia 4. Fibrosis quística 5. Hemocromatosis 6. Pancreatopatía fibrocalculosa 7. Otras D. Endocrinopatías <ul style="list-style-type: none"> 1. Acromegalia 2. Síndrome de Cushing 3. Glucagonoma 4. Feocromocitoma 5. Hipertiroidismo 6. Somatostatínoma 7. Aldosterona 8. Otras | <ul style="list-style-type: none"> E. Inducidas por fármacos o sustancias químicas <ul style="list-style-type: none"> 1. Vacor 2. Pentamidina 3. Ácido nicotínico 4. Glucocorticoides 5. Hormonas tiroideas 6. Diazóxido 7. Agonistas β adrenérgicos 8. Tiazidas 9. Dilantín 10. Interferón α 11. Otros F. Infecciones <ul style="list-style-type: none"> 1. Rubéola congénita 2. Citomegalovirus 3. Otras G. Formas infrecuentes de diabetes autoinmunes <ul style="list-style-type: none"> 1. Síndrome del hombre rígido (Stiff-man syndrome) 2. Anticuerpos contra el receptor de la insulina 3. Otras H. Otros síndromes en ocasiones asociados a diabetes <ul style="list-style-type: none"> 1. Síndrome de Down 2. Síndrome de Klinefelter 3. Síndrome de Turner 4. Síndrome de Wolfram 5. Ataxia de Friedreich 6. Corea de Huntington 7. Síndrome de Lawrence-Moon-Biedel 8. Distrofia miotónica 9. Porfiria 10. Síndrome de Prader-Willi 11. Otros <p>4. Diabetes mellitus gestacional</p> |
|--|---|

MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young

Tabla I. Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus según la American Diabetes Association en 1997 (Tomada de Costa et al., 1999).

La DM1 se origina en la mayoría de los casos como consecuencia de una respuesta autoinmunitaria contra las células β pancreáticas (mediada por células T). El mecanismo propuesto postula que las células T específicas para moléculas propias de las células β pancreáticas existen normalmente, pero están reprimidas por mecanismos de autocontrol (Tébar, 2009). Durante su aparición existe supresión masiva e inapropiada de células β por apoptosis (Mandrup-Poulsen, 2001); lo cual conduce a una deficiencia absoluta de insulina (Tébar, 2009).

Este tipo de diabetes tiene predisposiciones multigénicas y puede estar asociado a desórdenes como en la enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison y vitíligo o anemia perniciosa (Wood, 2002). Sus primeras manifestaciones clínicas suelen ocurrir alrededor de la pubertad, cuando ya la función se ha perdido en alto grado y la insulino terapia es necesaria para que el paciente sobreviva (Tébar, 2009).

La clasificación de la DM1 propuesta por la American Diabetes Association (ADA) la divide en:

- DM1A. Mediada por procesos inmunitarios con destrucción de células β pancreáticas, aproximadamente el 90% de los casos de DM1.
- DM1B. No mediada por procesos inmunitarios, acompañada de una grave deficiencia de insulina, menos del 10% de los casos de DM1. También es llamada DM1 idiopática.

Se sabe además que los principales determinantes en la aparición de la DM1 son la susceptibilidad genética, el desencadenamiento de la autoinmunidad y la incidencia de factores ambientales (ADA, 2008).

En México, la diabetes ocupa el primer lugar dentro de las principales causas de mortalidad, y presenta un incremento ascendente con alrededor de 60 mil muertes y 400,000 casos nuevos al año (Secretaría de Salud, 2008). Se piensa que este rápido incremento en la prevalencia se debe al impacto de factores ambientales tales como la disponibilidad de alimentos y la disminución en la

oportunidad y motivación por la actividad física sobre individuos genéticamente susceptibles (Márquez, 2009).

Los factores de riesgo que inciden en la distribución y frecuencia de la diabetes y sus complicaciones son bien conocidos; no obstante y a pesar de que México cuenta con un programa de acción de prevención y control, aún existen serias limitaciones que impiden la contención efectiva y eficaz de este padecimiento.

La prevención y control de la diabetes representa un reto para el sector salud del país, ya que al igual que otras enfermedades crónicas es el resultado de estilos de vida no saludables como los hábitos de alimentación deficientes y el sedentarismo (Secretaría de Salud, 2008).

La etiología, evolución y fisiología de la DM aún es un enigma en muchos aspectos, por lo que este padecimiento, ha sido motivo de investigación científica y de gran cantidad de estudios en alternativas de tratamiento en las últimas décadas; un ejemplo de estos es el implante liofilizado de placenta humana.

La placenta es una estructura de origen fetal y temporal que acompaña el embarazo, conectada al feto a través del cordón umbilical. Tiene una función fundamental y esencial en el desarrollo fetal, la nutrición y la tolerancia; la placenta puede también representar una reserva de células madre derivadas de las células mesenquimales que tienen el potencial de diferenciarse en varios linajes celulares. Actualmente se considera que el tejido de la placenta es una gran promesa como fuente de células para medicina regenerativa debido a su plasticidad y fácil disponibilidad (Kadam, 2010).

En la FES Iztacala se ha utilizado el implante de liofilizado de placenta desde 1982 como una alternativa terapéutica en pacientes humanos, con buenos resultados, sin embargo no se habían realizado pruebas experimentales de sus efectos. Muy recientemente, en el Laboratorio de Inmunobiología de la FES Iztacala, se realizó un estudio con ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, a las cuales se les colocó el implante liofilizado de placenta; en dicho estudio se comprobó que la placenta contribuyó para el control glucémico y regulación de los niveles de citocinas proinflamatorias en las ratas diabéticas

(Verdín et al., 2012); estos resultados son alentadores para continuar estudiando esta alternativa terapéutica.

1.3. Modelos de Diabetes Experimental

Se han desarrollado varios modelos experimentales destinados a estudiar los eventos involucrados en la DM; entre estos modelos destaca el uso de agentes químicos para producir diabetes, que permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético (Ramos y Méndez, 1994). La diabetes permanente se ha desarrollado mediante la inyección de estreptozotocina (STZ) desde el año 1963, siendo uno de los modelos experimentales más utilizado (Tomlinson et al., 1992).

1.4. Estreptozotocina

La STZ (2-deoxy-2-(3-(metil-3-nitrosourea)-1-D-glucopiranososa) es una sustancia producida por el hongo *Streptomyces achromogenes*, que en ciertas especies de aves y mamíferos causa diabetes permanente, ya que provoca un daño irreversible en las células β pancreáticas (Tomlinson et al., 1992).

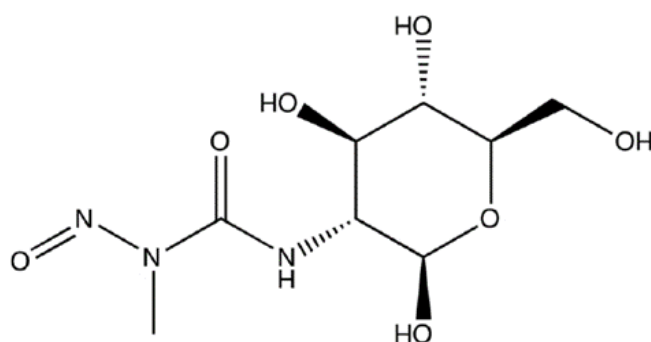


Figura 1. Fórmula de la estreptozotocina.

El mecanismo de acción de la STZ consiste en su entrada a la célula β por acción mediada por el transportador GLUT-2, y una vez dentro de la célula causa alquilación del DNA y ATP. Es un donador de ON (óxido nítrico) el cual contribuye a la destrucción de las células β del páncreas (Turk et al., 1993; Kroncke et al., 1995). La STZ inhibe el ciclo de Krebs y disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria, lo que provoca disminución del ATP y la subsecuente inhibición de la síntesis y secreción de insulina (Nakatsuka et al., 1990), como se aprecia en la figura 2.

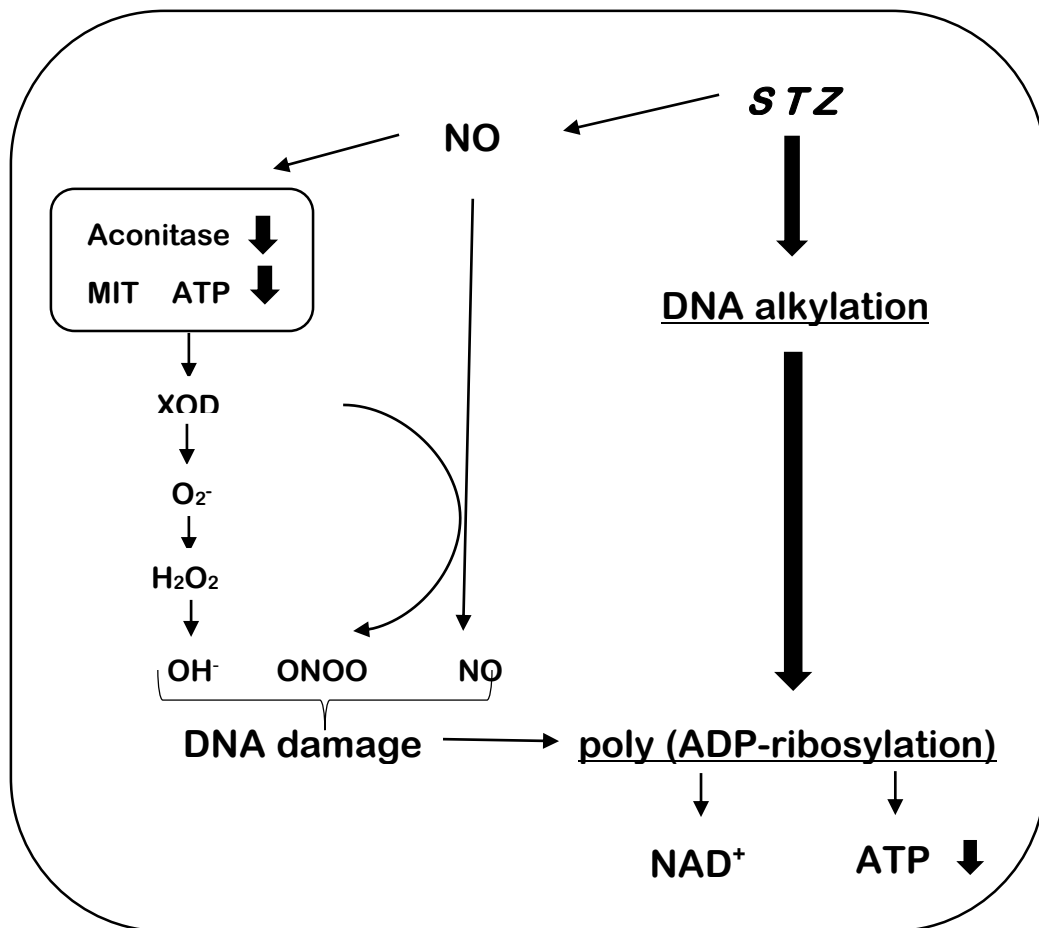


Figura 2. Mecanismo de acción de la STZ (Tomado de Szkudelski, 2001).

La administración de una dosis única de STZ en el intervalo de 50-100 mg/kg de peso, a ratas macho adultas causa aparición de un estado metabólico que semeja la DM1 en humanos (Ramos y Mendez, 1994), que además no muestra muchas de las inconveniencias de la aloxana, por lo cual es ampliamente usada en el mundo.

1.5. Influencia del género

En la mayoría de las cepas de rata existe una diferencia significativa entre hembras y machos en relación a la incidencia, evolución y severidad del síndrome diabético. En los machos la enfermedad se presenta en una proporción mayor que en las hembras. Al parecer la resistencia de éstas tiene relación con la producción de estradiol, ya que las ratas ovariectomizadas son menos resistentes al uso de agentes químicos (Olazo, 2010).

1.6. Técnica Histológica

Existen diversas maneras de analizar la evolución de la diabetes mellitus. Una de ellas es la realización de estudios histopatológicos para la observación microscópica de tejidos normales y tejidos lesionados con la finalidad de identificar lesiones y realizar diagnósticos más precisos, lo cual también facilitará una mejor realización de tratamientos para su control.

El proceso histológico utiliza diversos métodos para estudiar los tejidos; más que un procedimiento, es una serie de técnicas cuyo uso y elección depende de cuáles son las características celulares e histológicas que se desean observar (Molist, 2008).

La técnica histológica convencional (THC) es el método más utilizado para el procesamiento de tejidos; consiste en la transformación de una muestra en delgados cortes teñidos, capaces de ser observados al microscopio óptico (Martínez, 2011).

El método de Hematoxilina y Eosina (HE) es el procedimiento de tinción comúnmente más usado tanto en el estudio histológico normal como en el anormal o patológico; consiste en la aplicación de la hematoxilina de Harris o de Mayer para colorear los núcleos, seguido de aplicación de la eosina que es un colorante ácido y tiñe el citoplasma y las fibras colágenas (Bravo, 2011), lo que permite observar la topografía del tejido con buena resolución.

Las pruebas inmunohistoquímicas deben su especificidad al uso de anticuerpos contra antígenos tisulares según lo que deseemos demostrar; dicho anticuerpo tiene una marca fácil de visualizar, la cual puede ser un colorante fluorescente (fluorocromo) o una enzima que se demuestra por su actividad (Bravo, 2011). La utilización de anticuerpos específicos nos permite detectar la presencia de marcadores específicos de tipos celulares, o procesos celulares como apoptosis y proliferación entre muchos otros.

Durante la última década, diferentes estudios han identificado varias fuentes de células progenitoras, las cuales se reconocen por su capacidad de autorrenovación y su potencial de diferenciación a diversas estirpes celulares. Al parecer la función de estas está relacionada con la renovación de células que mueren en tejidos adultos, además de reparación de lesiones en estos (Garcia, 2009). Se han encontrado en numerosos órganos adultos, un ejemplo de esto es el tejido placentario. Para detectar la presencia de estas células, se propuso que al menos deberían tener un marcaje positivo para los Human Mesenchymal Stromal Cell Marker Panel: CD29, CD44, CD90 y CD105 (Garcia, 2009), que pueden ser detectados por inmunohistoquímica.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en consideración la problemática de salud pública que representa la diabetes a nivel mundial, se requieren estrategias de tratamiento que permitan controlar este tipo de enfermedades crónico-degenerativas que causan grandes estragos en la salud pública y los recursos empleados para su control, tratamiento y prevención. Por estas razones se realizó este trabajo que propone una alternativa de manejo para la diabetes en nuestro país.

Debido a que mediante el uso del implante liofilizado de placenta se han obtenido resultados favorables en distintas enfermedades, en el presente estudio, se pretende utilizar como alternativa de tratamiento de DM experimental del cual se espera una baja en los niveles de glucosa en los sujetos experimentales, así como cualquier cambio positivo que pueda existir en cuanto a los daños de dicho padecimiento.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la duración del efecto del implante liofilizado de placenta humana en ratas *Wistar* macho inducidas a diabetes con STZ.

Objetivos Particulares

- Medir y comparar el tiempo de vida entre los grupos experimentales a partir de la inducción a DM experimental por STZ.
- Observar y comparar cambios en los principales parámetros afectados por el padecimiento, como son los niveles séricos de glucosa, hemoglobina glicosilada, colesterol, triglicéridos, creatinina, urea y peso corporal por efecto del implante de placenta humana.
- Detectar los probables daños a nivel histológico de hígado, riñón, bazo, páncreas y ojos a través del tiempo por inducción con STZ y la protección que el liofilizado de placenta pudiese tener.
- Detectar la posible presencia de células troncales en el implante liofilizado de placenta humana recuperado de los organismos, mediante los marcadores CD44, CD90, CD29 y CD105 detectados por métodos inmunohistoquímicos.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Primera Fase

Sujetos experimentales

Se utilizaron 15 ratas *Wistar* macho, sanas, de 200-250 g, proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, las cuales se conservaron en condiciones controladas de luz, temperatura y alimentación en el mismo bioterio. Se eligieron machos debido a que se tomó en cuenta la mayor incidencia y severidad de la DM, así como la menor alteración hormonal que existe en estos con relación a las hembras (Ramos y Méndez, 1994). Se asignaron al azar a tres grupos experimentales (n=5).

- Grupo Control (C): Ratas sanas.
- Grupo DSI: Ratas Diabéticas sin implante liofilizado de placenta.
- Grupo DI: Ratas Diabéticas con implante liofilizado de placenta.

Diabetes Inducida

A las ratas de los grupos experimentales DI y DSI se les indujo DM experimental mediante la administración de una dosis única de STZ de 60 mg/kg de peso por vía intraperitoneal (i.p.), la cual se disolvió en un buffer de citrato pH 4.5 (Velázquez, 2008). A las 24 horas posteriores se corroboró la inducción de diabetes mediante la medición de glucosa con ayuda de tiras reactivas y un glucómetro (estuche comercial: ACCU-CHEK Active Roche ®), considerándose diabéticos los organismos que presentaron valores de 400 mg/dL o superiores.

Implante Liofilizado de Placenta

Se anestesió a un grupo de ratas diabéticas con Ketamina (60 mg/Kg) y Xilazina (7.5 mg/Kg) por vía i.p., una vez totalmente anestesiadas, se les realizaron dos pequeños cortes en la zona abdominal para la colocación del liofilizado de placenta humana.

A partir del día posterior a la colocación del liofilizado de placenta se realizó la medición de glucosa sanguínea con tiras reactivas y un glucómetro, y se pesaron dos veces por semana hasta que se observaron niveles de deterioro incompatibles con la vida, en cuyo caso los organismos fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (pentobarbital sódico 200 mg/Kg) por vía i.p.

El implante liofilizado de placenta, fue generosamente donado por el M.C. Miguel Jesús Reyes Campos (Material, Instrumental y Accesorios Reyes A.C.), quien posee la patente del procesamiento, obtención y aplicación del mismo.

Obtención de muestras

Una vez sobreanestesiadas las ratas, y antes de la muerte cardiaca, se obtuvo por punción cardiaca la mayor cantidad posible de sangre para determinar los niveles de glucosa, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, colesterol, creatinina, ácido úrico y urea mediante las pruebas de laboratorio pertinentes. La glucosa se determinó por el método de Trinder que utiliza glucosa oxidasa y peroxidasa; la hemoglobina glicosilada por un método espectrofotométrico posterior a la separación en mini-columna de intercambio iónico; el colesterol por la técnica de Liebermann-Burchard; la creatinina con la técnica cinética sin desproteinización según el método de Jaffe; la urea con la prueba enzimático uv; los triglicéridos con la prueba colorimétrico-enzimática utilizando Glicerol 3 fosfato oxidasa (GPO) y peroxidasa; el ácido úrico con la prueba enzimática-fotométrica utilizando 2,4,6 tribromuro -3- ácido hidroxibenzoico (TBHBA); y el péptido C por el método de ELISA. Para todos estos estudios se utilizaron estuches comerciales adquiridos de proveedores locales, y las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro clínico Thechnicon AMES RA-50 (Anexo 1), excepto el péptido C que se determinó en un lector de ELISA marca Tecan, modelo Sunrise.

Así mismo, se realizó la necropsia, y se obtuvieron muestras de tejido de hígado, riñón, páncreas, bazo y ojo.

4.2. Análisis histológico

Las muestras de tejido recuperadas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% pH 7.4. Se procesaron mediante la THC, seguida por inclusión en parafina, y cortes a 5 µm en un micrótopo de rotación, marca Leica, modelo RM2125RTS (Anexo 2). Posteriormente se les realizó la tinción con HE para observar los daños tisulares inducidos por los elevados niveles de glucosa (Anexo 3).

Para la búsqueda de marcadores celulares mediante inmunohistoquímica, se obtuvieron cortes histológicos de los implantes liofilizados de placenta que pudieron recuperarse al momento del sacrificio de las ratas del grupo DI. Se utilizaron los anticuerpos primarios Human Mesenchymal Stromal Cell Merker Panel: CD44 anti ratón monoclonal, CD90 anti ratón monoclonal, CD29 anti conejo monoclonal y CD105 anti ratón monoclonal marca ABCAM UK; como secundarios: burro anti ratón (donkey anti mouse) IgG-HRP y chivo anti conejo (goat anti rabbit) IgG-HRP, de acuerdo al primario utilizado, ambos de la marca Santa Cruz Biotech. CA USA. Ambos anticuerpos fueron usados en dilución 1:200, 1:400 y 1:800, y se revelaron con peroxidasa (Anexo 4).

Para la observación de los resultados de las técnicas histológicas y la captura de imágenes se utilizó un microscopio Leica ELZ (Leica Microsystems ,Germany), modelo DM500, con cámara digital Leica EC1.

Análisis estadístico

El análisis de los datos de peso corporal, glucosa sérica, hemoglobina glicosilada, así como los de parámetros bioquímicos, se llevó a cabo mediante la prueba de ANOVA simple, en el paquete estadístico SPSS para Windows.

4.3. Segunda Fase

Se utilizaron 10 ratas *Wistar* macho, de 200-250 g, que se mantuvieron en condiciones de bioterio y se asignaron al azar a dos grupos experimentales de cinco individuos (n=5) cada uno, denominados:

- Grupo DI: Ratas Diabéticas con implante liofilizado de placenta
- Grupo DSI: Ratas Diabéticas sin implante liofilizado de placenta

Las ratas fueron inducidas a DM experimental mediante inyección de STZ (60 mg/ kg vía i.p.) y a las del grupo DI se les colocó el implante liofilizado de placenta. Se realizaron mediciones de peso y glucosa sanguínea dos veces por semana hasta el día de su muerte, el cual fue registrado, de esta manera en cuanto al promedio de su tiempo de vida, se determinó la duración del efecto del implante liofilizado de placenta en la diabetes.

4.4. Tercera Fase

Transcurridas 34 semanas después de la inducción a DM experimental, se les colocó el implante liofilizado de placenta a las dos ratas *Wistar* que continuaban con vida. Una de las ratas pertenecía al grupo DI (el implante liofilizado de placenta durante todo el tratamiento), mientras que a la segunda rata perteneciente al grupo DSI se le colocó por primera vez. Se realizó medición de glucosa (glucómetro y tiras reactivas) y peso una vez a la semana hasta el día de su muerte. Esto con el fin de observar si una segunda colocación del liofilizado de placenta podría presentar nuevos cambios positivos en estos sujetos.

5. RESULTADOS

Primera fase

5.1. Peso corporal

Los resultados del peso corporal de los tres grupos experimentales; Grupo Control, Grupo de Ratas Diabéticas con Implante liofilizado de placenta (DI) y Grupo de Ratas Diabéticas sin tratamiento (DSI), registrado dos veces por semana hasta el sacrificio de los sujetos experimentales, y se muestran en la figura 3.

En estos resultados, de peso corporal, podemos observar que los promedios del grupo control y del grupo con Implante liofilizado de placenta (DI) son similares, con valores de 290.32 g y 289.47 g respectivamente; mientras que el grupo Diabético sin tratamiento (DSI) muestra un valor de 274.80 g, lo cual representa una ligera tendencia de pérdida de peso con respecto a los otros grupos; sin embargo no es una diferencia significativa.

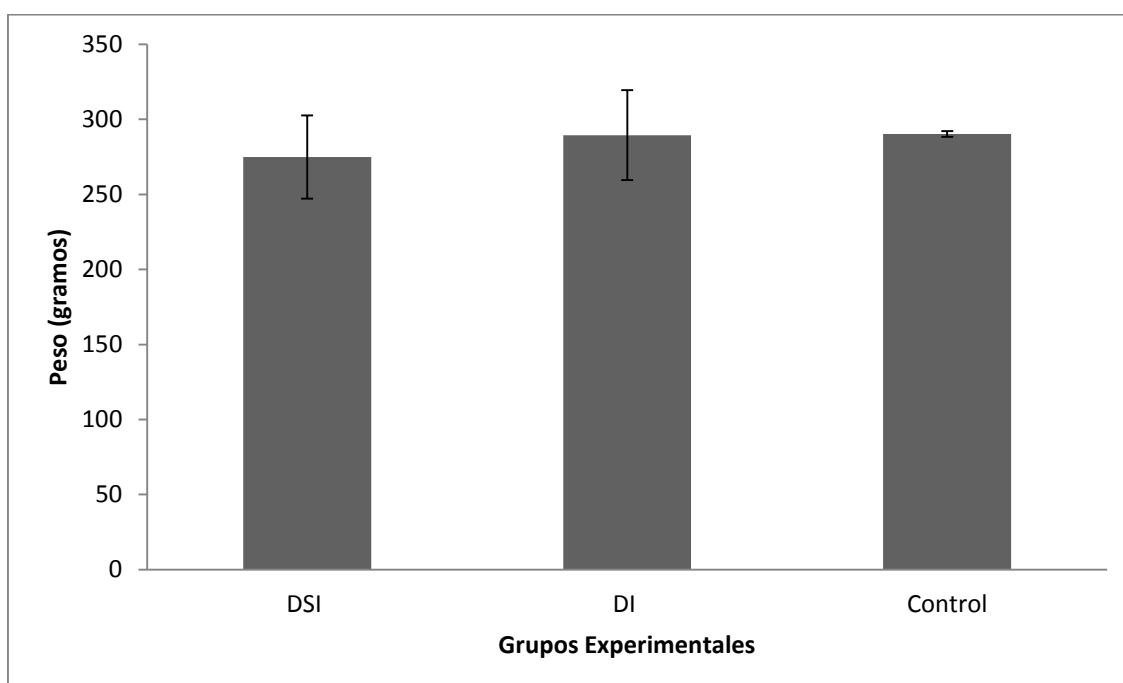


Figura 3. Peso en gramos de ratas macho inducidas a DM1 con y sin implante de placenta liofilizada, el día de sacrificio. No hay diferencias significativas entre los grupos ni con respecto al control por ANOVA simple (n = 5).

5.2. Glucosa Sérica

En los niveles de glucosa sérica se puede observar (figura 4) que el valor más alto corresponde al grupo DSI con un valor de 623.65 mg/dL seguido del grupo DI con 605.89 mg/dL, lo que contrasta con el grupo control, el cual presenta un valor de 122.13 mg/dL, valor que cae dentro de los niveles normales de glucosa para esta especie.

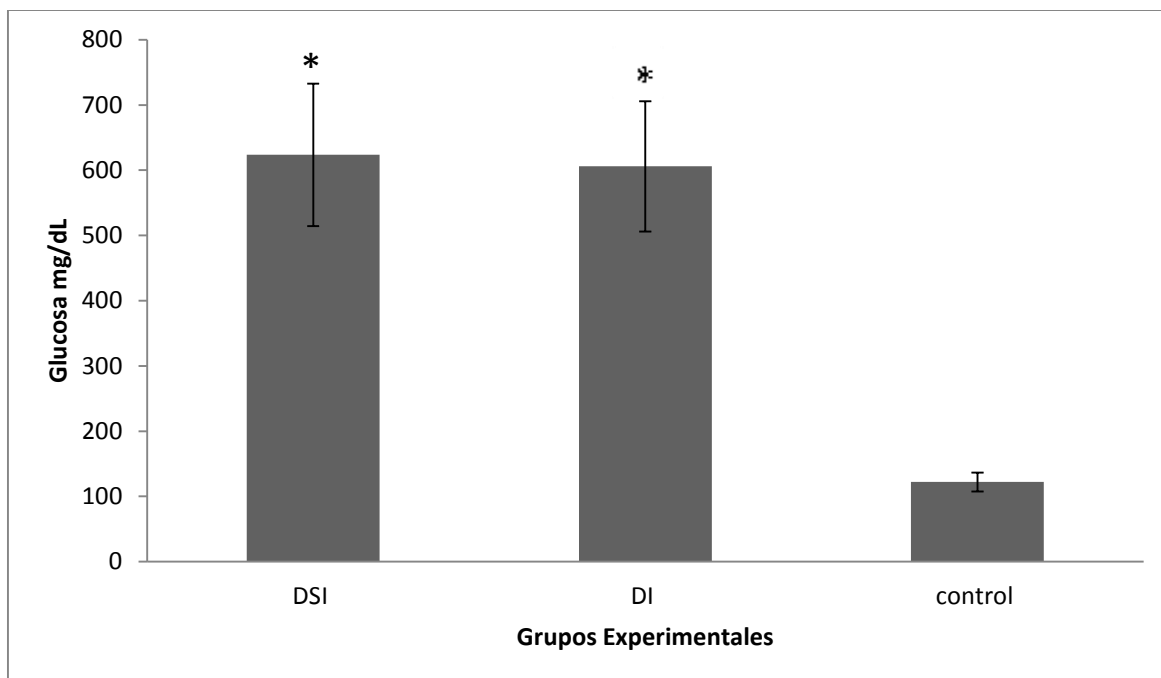


Figura 4. Niveles de glucosa sérica en ratas diabéticas con y sin implante abdominal de placenta; promedio \pm desviación estándar de 5 determinaciones independientes. * $P < 0.05$ con respecto al control, análisis estadístico realizado por ANOVA simple.

5.3. Hemoglobina glicosilada

En cuanto a los niveles de hemoglobina glicosilada, los resultados se muestran en la figura 5, en la que se representan los promedios de los valores de los dos grupos experimentales, DSI con un valor de 9.4 mg/dL y DI con 7.03 mg/dL respectivamente.

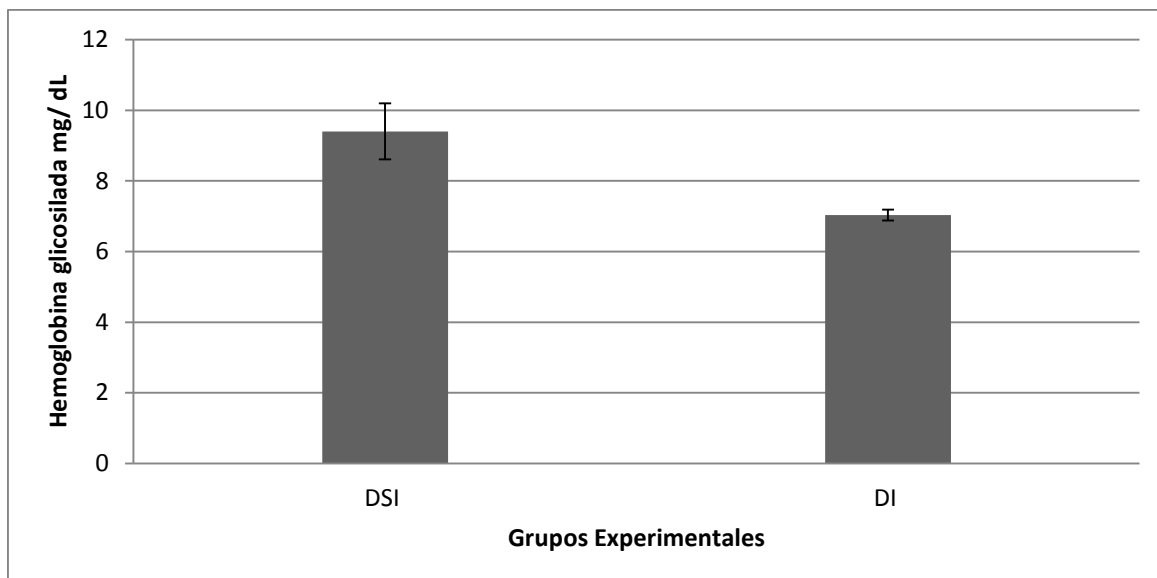


Figura 5. Niveles de Hemoglobina Glicosilada sérica en ratas diabéticas sometidas a implante liofilizado de placenta en comparación con ratas diabéticas a las que no se les colocó implante. Promedio \pm desviación estándar de 5 determinaciones independientes. No hay diferencias significativas entre grupos.

5.4. Parámetros bioquímicos

Los resultados de las pruebas de laboratorio para los parámetros bioquímicos de las ratas diabéticas con y sin implante abdominal de placenta se muestran en las siguientes figuras (6-10), en las que se puede observar la comparación de los resultados de los tres grupos experimentales, es notorio el contraste entre las ratas sanas con las de los otros dos grupos.

En cuanto a la glucosa (figura 6), los resultados son muy similares a los obtenidos con la medición tomada con glucómetro. Los grupos DSI y DI muestran un promedio de valores de 716.0 mg/dL y 530.4 mg/dL respectivamente, observándose un notable contraste con el grupo C que representa los valores normales.

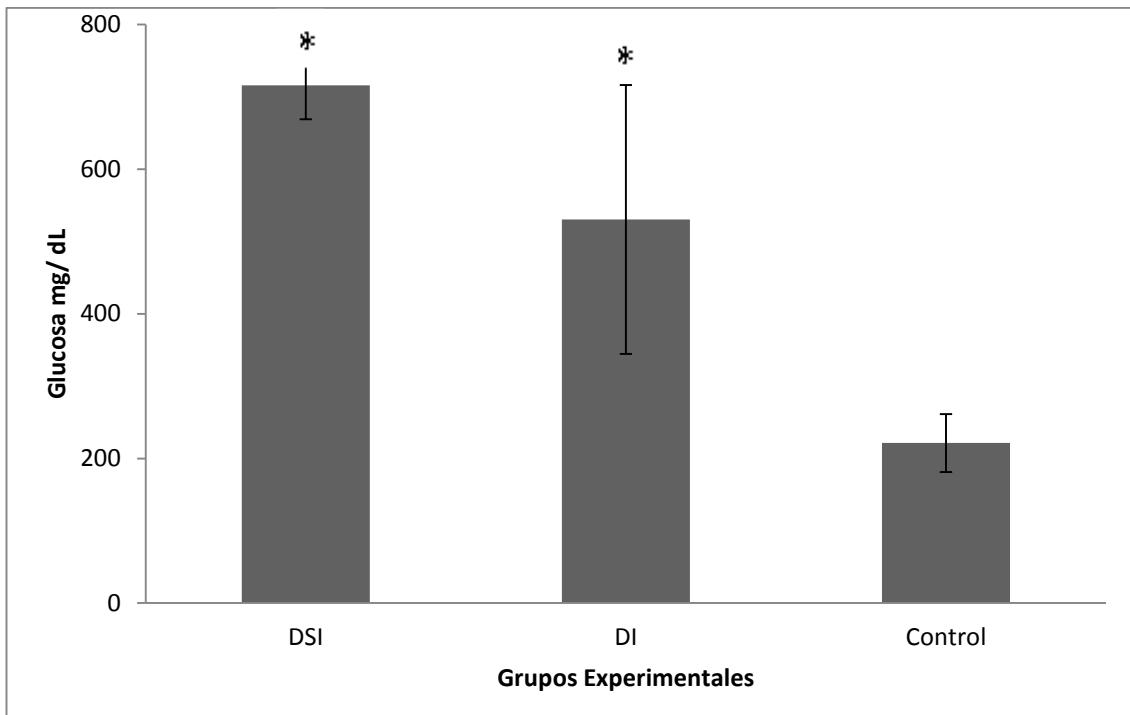


Figura 6. Niveles de glucosa sérica de ratas diabéticas con y sin implante abdominal de placenta, con respecto a ratas sanas. Promedio \pm desviación estándar de 5 determinaciones. * $P < 0.05$ con respecto al control (ANOVA simple).

Para los triglicéridos (figura 7) se puede observar un valor de 95 mg/dL en el grupo control, el cual está dentro de los valores normales en ésta especie. Por otro lado el grupo sometido a tratamiento (DI) a pesar de presentar un valor de 143.4 mg/dL, que representa un pequeño aumento, aún se encuentra dentro de los valores normales, mientras que en el grupo de ratas diabéticas (DSI) se puede apreciar un valor de 341 mg/dL, muy por arriba tanto de los otros dos grupos, como de los valores normales para triglicéridos, en esta especie.

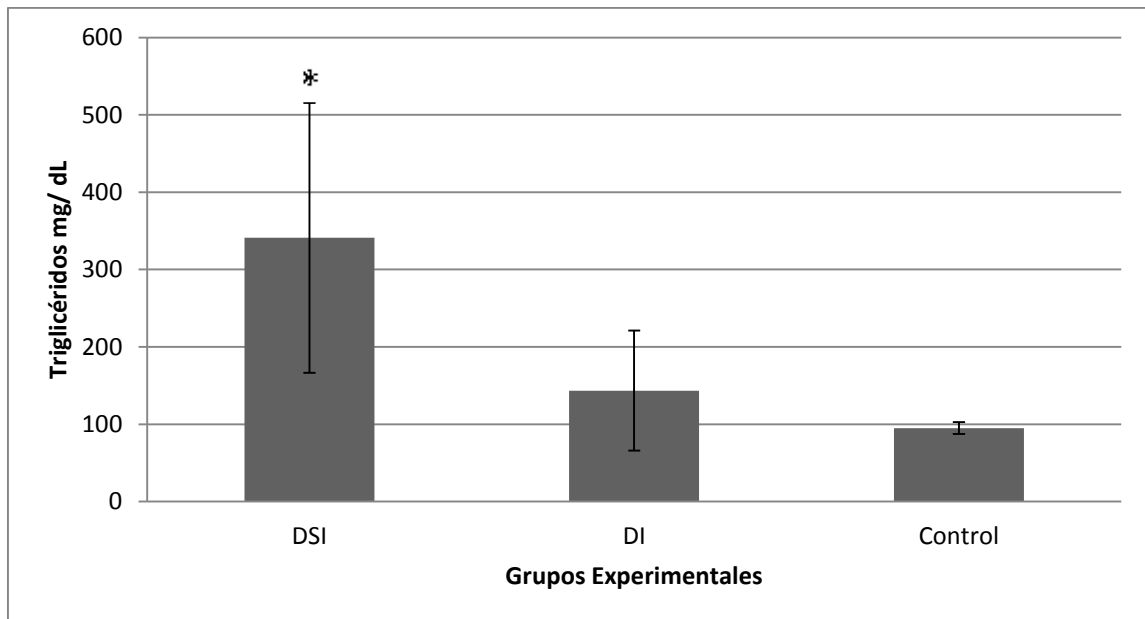


Figura 7. Concentración sérica de triglicéridos para los tres grupos experimentales. Promedio \pm desviación estándar de 5 determinaciones independientes. *P < 0.05 con respecto al control, determinado por ANOVA simple.

En la figura 8 se muestran los resultados de colesterol para los tres grupos experimentales. Se aprecia un valor de 93.63 mg/dL en el grupo control, y una pequeña disminución en el grupo DI con 79.4 mg/dL, mientras que el grupo DSI presenta una mayor diferencia en comparación con el grupo C, con un valor de 58.75 mg/dL.

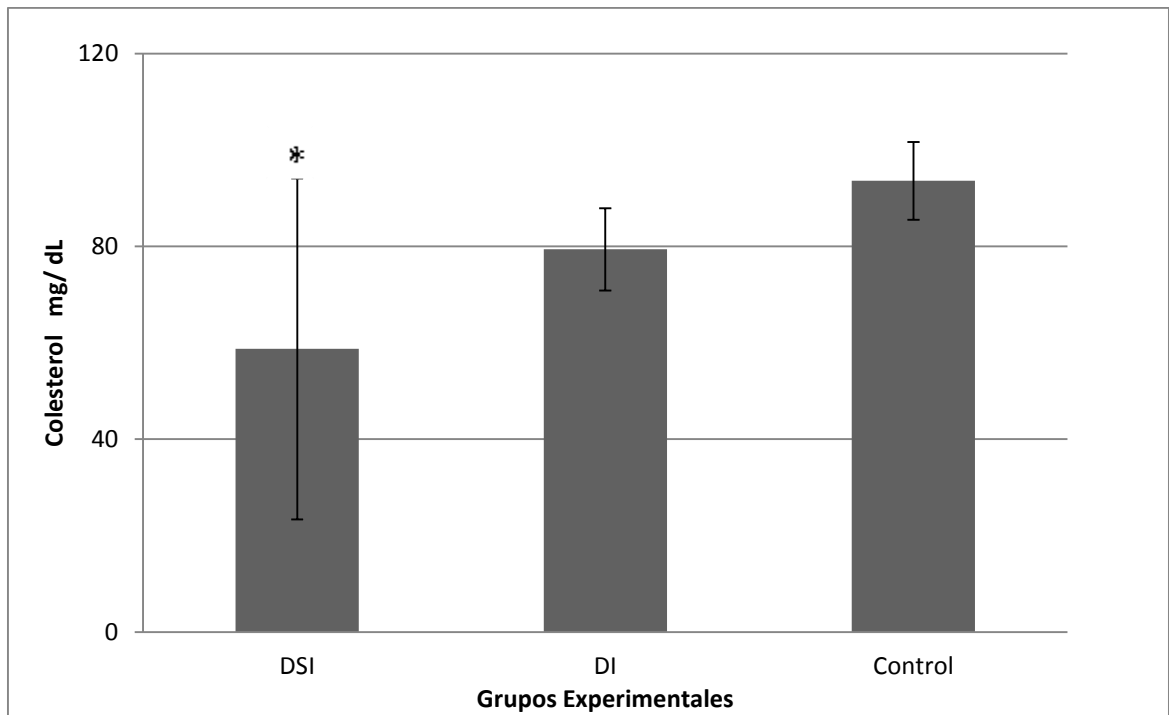


Figura 8. Concentración sérica de colesterol para los tres grupos experimentales empleados. Promedio \pm desviación estándar de 5 determinaciones independientes, * $P < 0.05$ con respecto al control (ANOVA simple).

En cuanto a los resultados de Urea (figura 9) se muestra un valor de 46.66 mg/dL para el grupo control, mientras que los grupos DI y DSI presentan valores de 65.0 mg/dL y 73.5 mg/dL respectivamente.

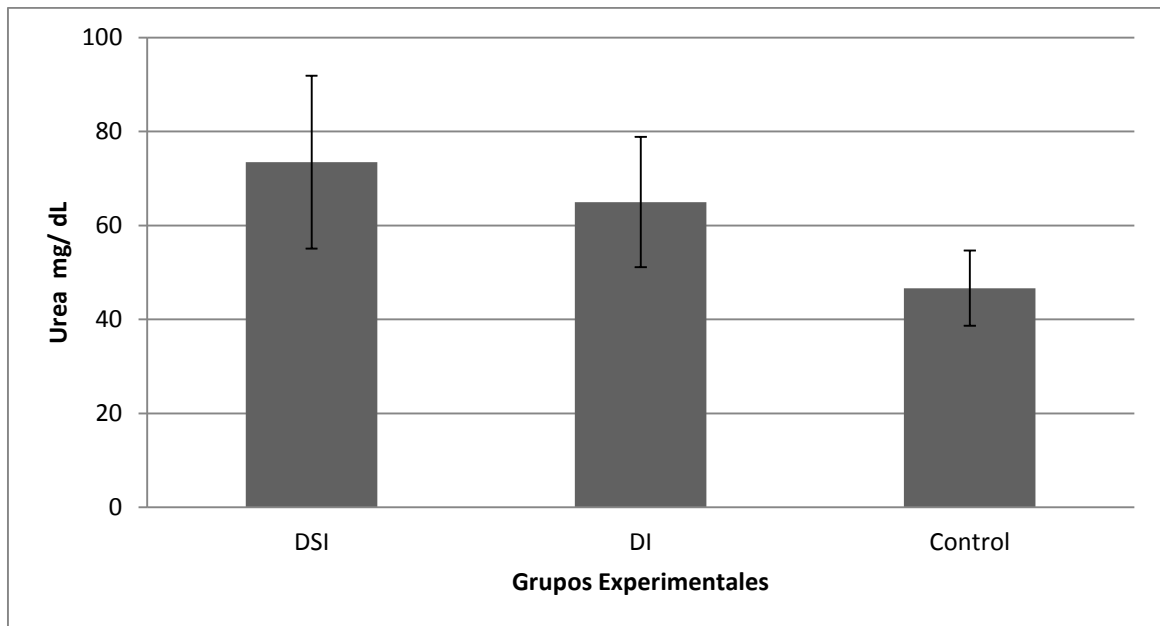


Figura 9. Niveles séricos de urea de los tres grupos experimentales, obtenidos de pruebas de laboratorio. Promedio \pm desviación estándar de 5 determinaciones independientes. No se observan diferencias significativas por ANOVA simple.

Los valores de los parámetros de creatinina y ácido úrico se muestran en la figura 10, en la cual podemos observar los valores para los tres grupos (C, DI y DSI). La creatinina presentó valores de 0.85 mg/dL para el grupo control, 0.84 mg/dL para DI y 0.96 mg/dL para el grupo DSI. Por otro lado los valores de ácido úrico fueron de 2.25 mg/dL para el grupo control, 2.42 mg/dL y 2.8 mg/dL para los grupos DI y DSI respectivamente.

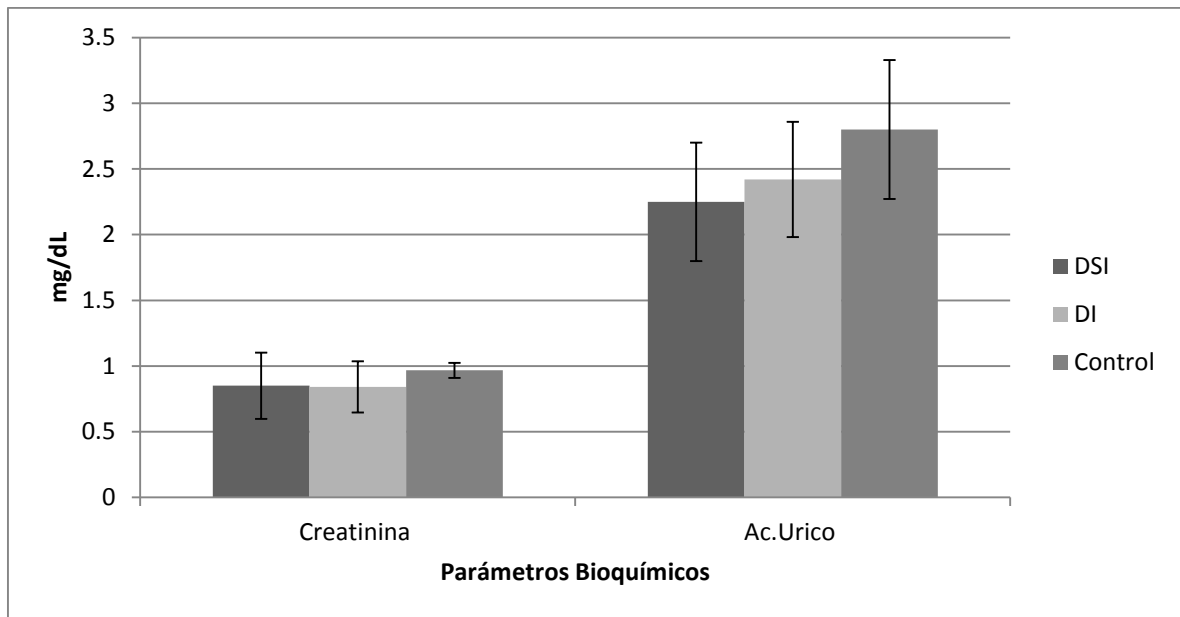


Figura 10. Concentración sérica de creatinina y ácido úrico de las ratas de los tres grupos experimentales. Promedio \pm desviación estándar de 5 determinaciones independientes. No hay diferencia entre grupos.

5.5. Estructura histológica

Los resultados obtenidos de las biopsias de tejido de hígado, riñón, bazo, corazón, páncreas, y ojo de ratas *Wistar* procesados por la técnica histológica convencional y teñidas con la Técnica de Hematoxilina y Eosina se muestran en las figuras 11-15. En la mayoría de los órganos se pudieron observar diferencias entre los tres grupos, siendo un poco más evidentes los daños en el grupo de ratas diabéticas sin implante (DSI).

En el caso del hígado se pueden observar grandes daños en hígado de las ratas del grupo DSI (figura 11b) el cual presenta signos de necrosis temprana, células binucleadas, así como reversión del volumen en algunos hepatocitos y disgregación de los cordones. También se observa una circulación de sangre detenida, disminución en el número de mitosis y proliferación de células de Kupffer, lo cual es un indicador de inflamación; mientras que en el grupo sometido a tratamiento de implante de placenta (figura 11c) a pesar de que también puede observarse daño, existe un número mayor de mitosis y al parecer una histología del órgano normal casi como el grupo Control (figura 11a).

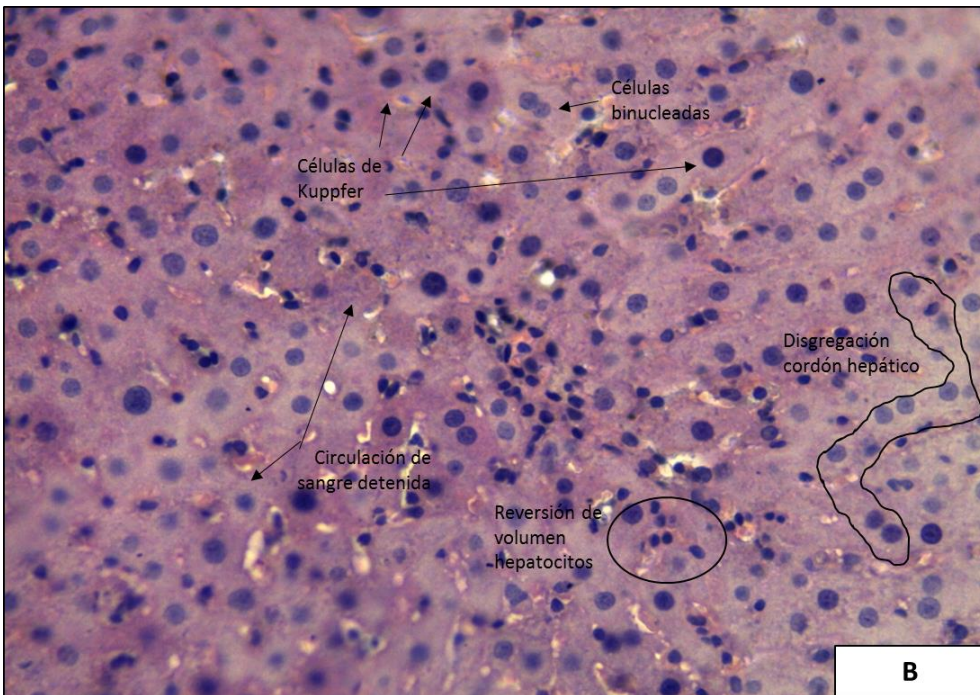
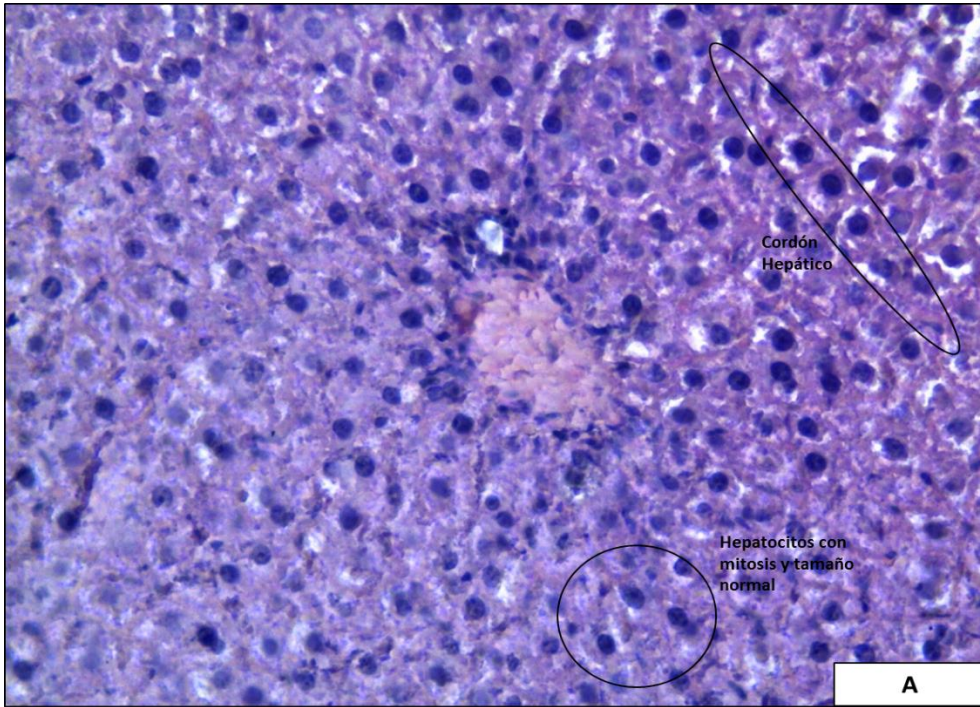
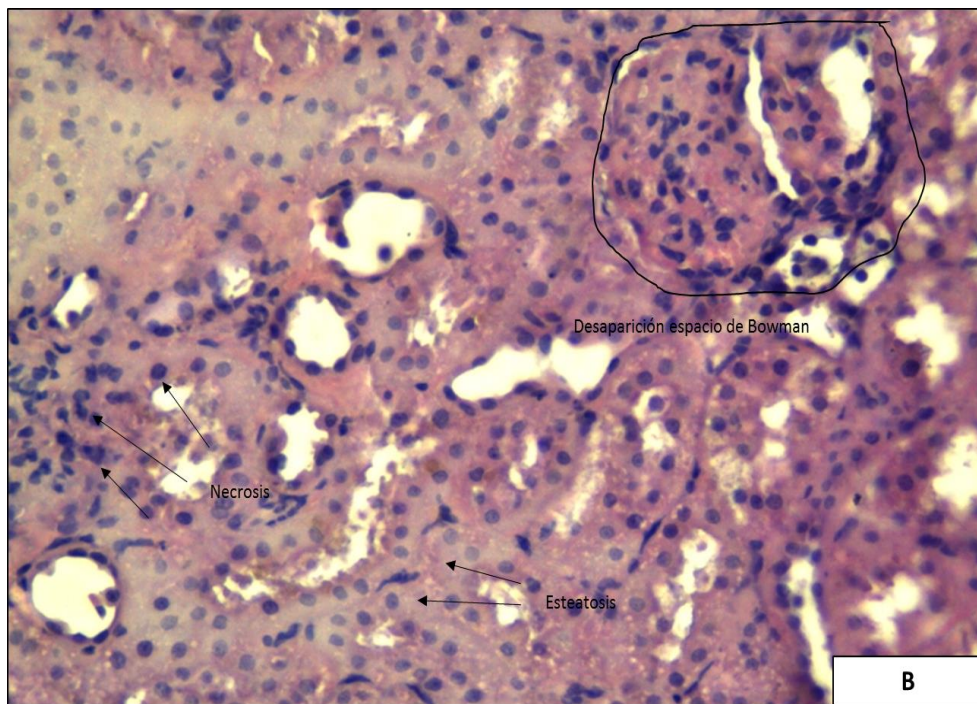
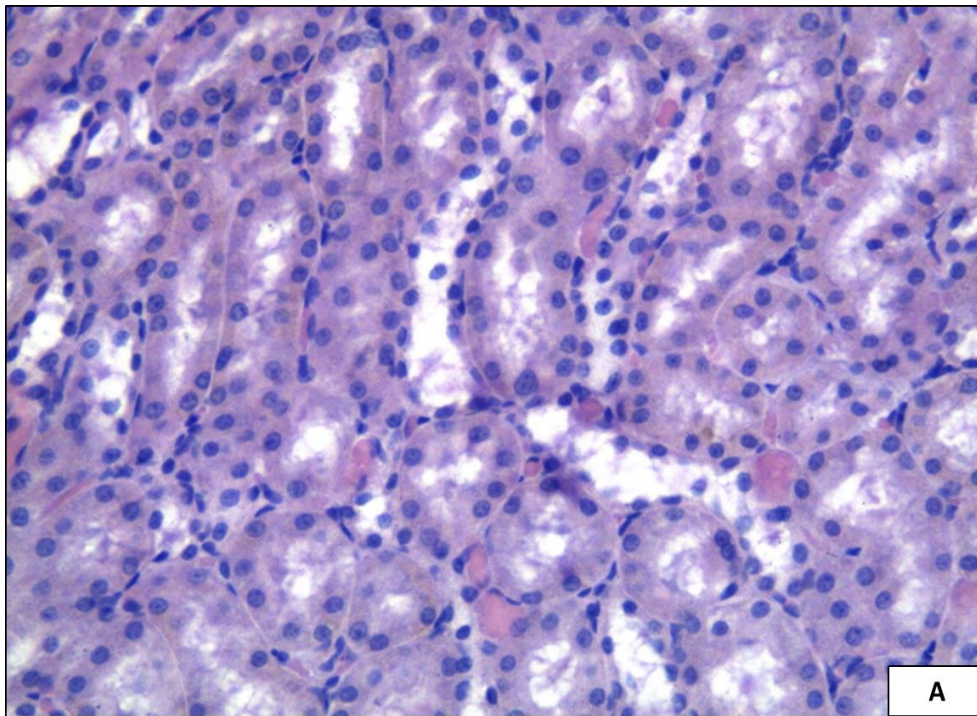




Figura 11. Cortes histológicos teñidos mediante el procedimiento H-E de hígado de rata *Wistar* Control C (a), Diabética DSI (b) y Diabética sometida a tratamiento DI (c), observadas a 400 aumentos.

En cuanto al riñón, se sugiere una necrosis tubular prevaleciente en el grupo DSI (figura 12b) así como una desaparición en el espacio de la capsula de Bowman debido a la proliferación de las células del mesangio, la cual se desarrolla por estímulos dañinos. En los dos grupos experimentales se puede observar esteatosis e hipertrofia en células epiteliales tubulares (figura 12).



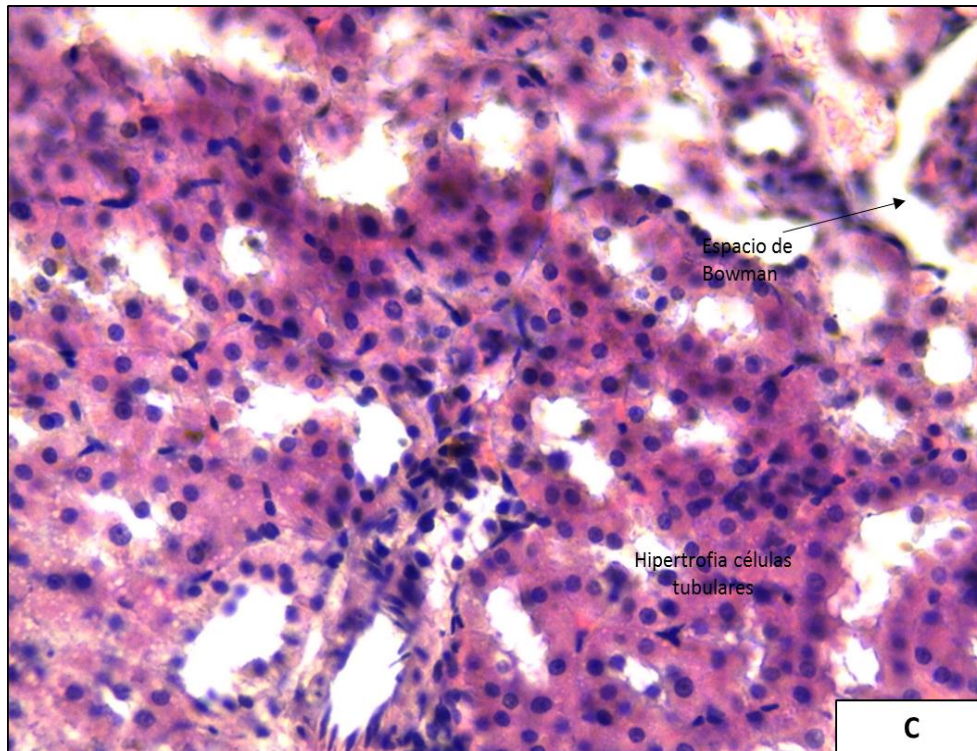
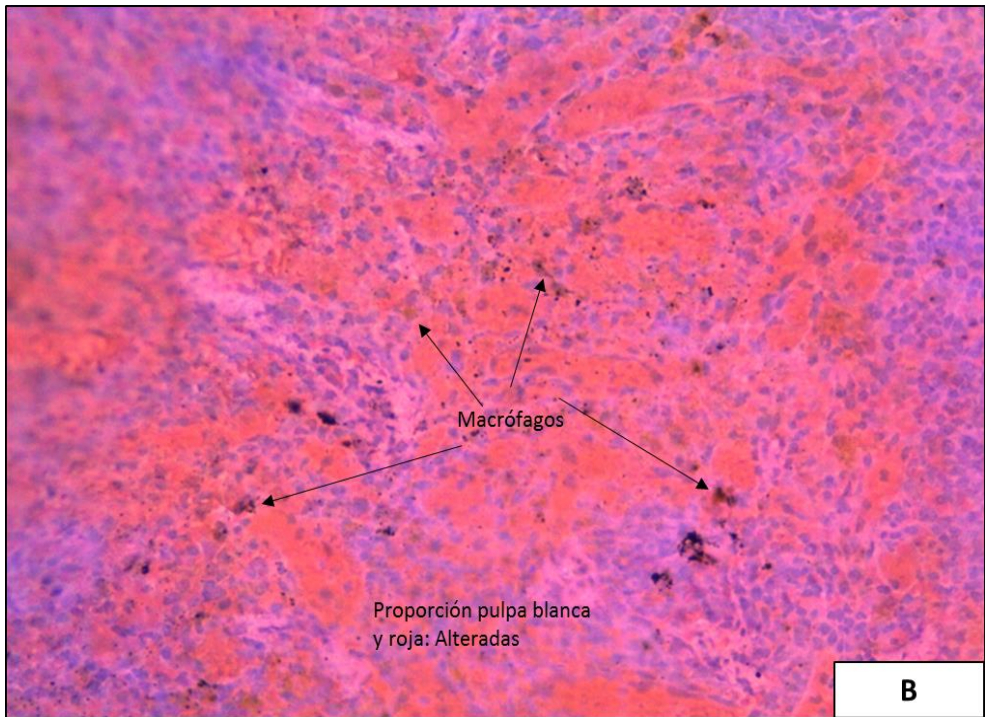
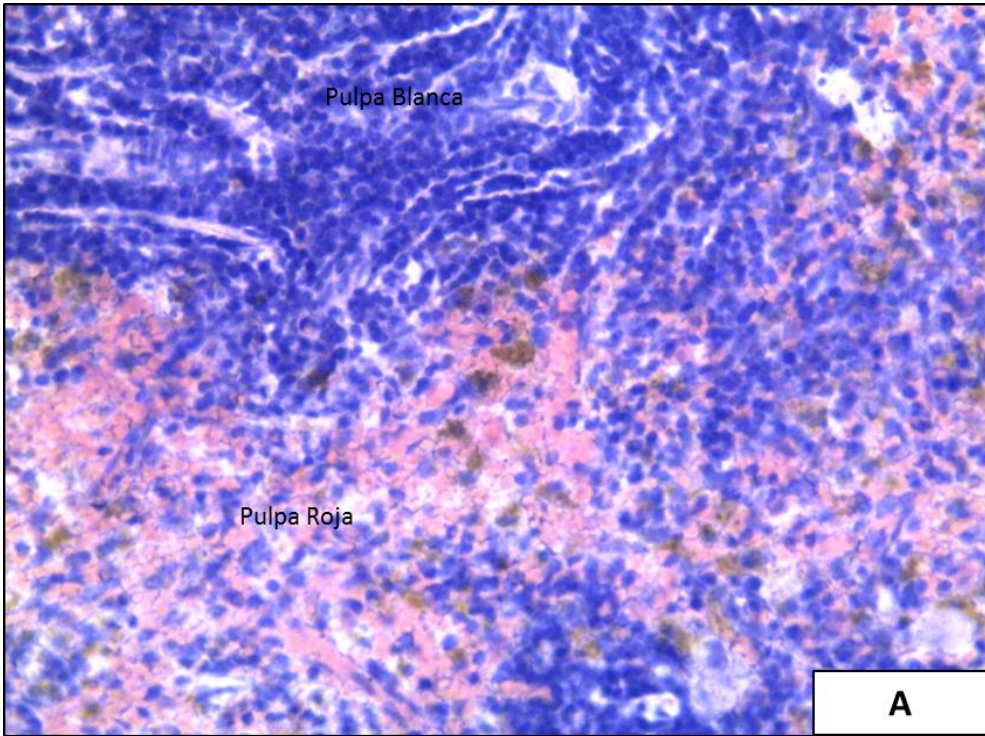


Figura 12. Cortes histológicos teñidos mediante el procedimiento H-E de riñón de Rata *Wistar* con Tinción H-E de los tres grupos experimentales DSI (b) DI (c), y su comparación con el control (a), observadas a 400 aumentos.

En el bazo se identificó infiltrado inflamatorio por neutrófilos, presencia de macrófagos, así como alteraciones celulares; presencia de algunas células gigantes y multinucleadas. Estas lesiones fueron observadas en los cortes de los dos grupos experimentales DSI (figura 13b) y DI (figura 13c), sin embargo en el primer grupo se observó un mayor daño.



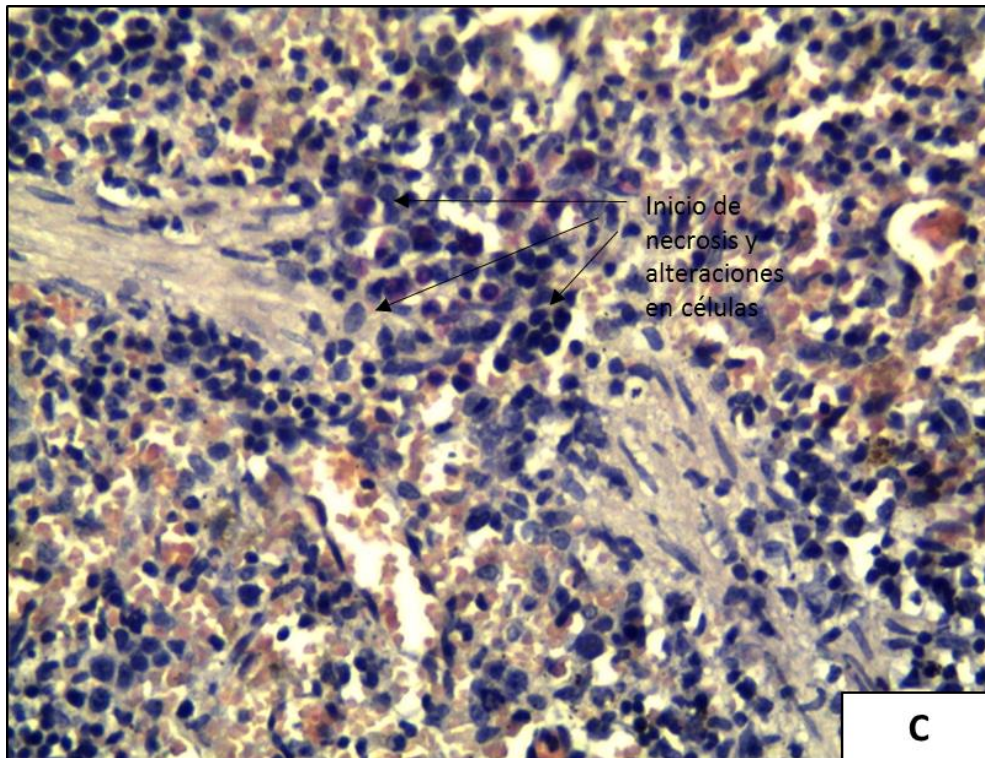
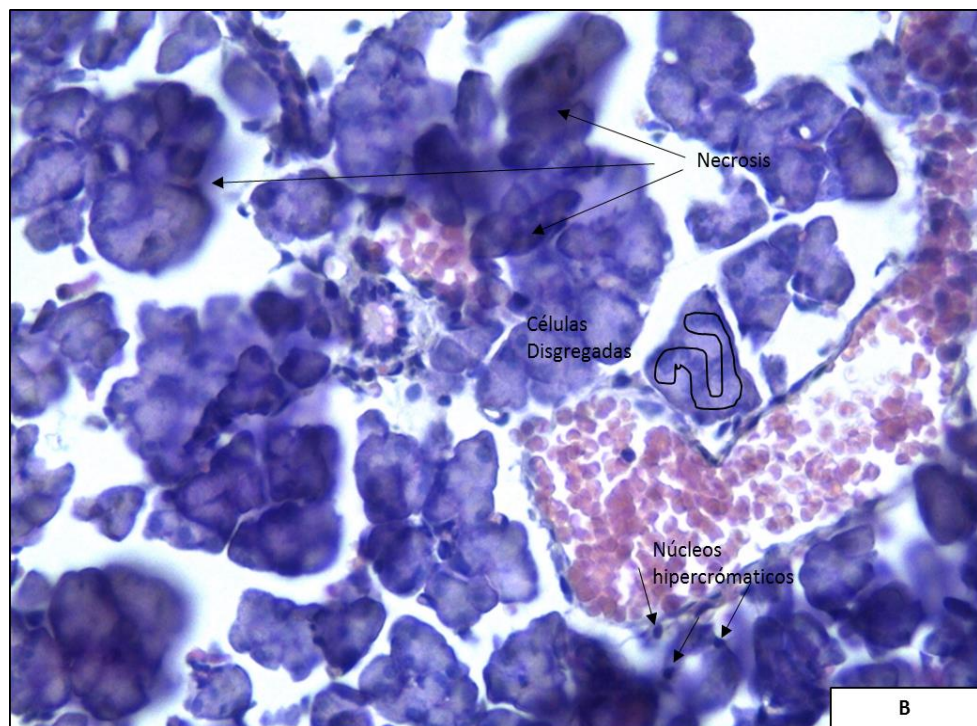
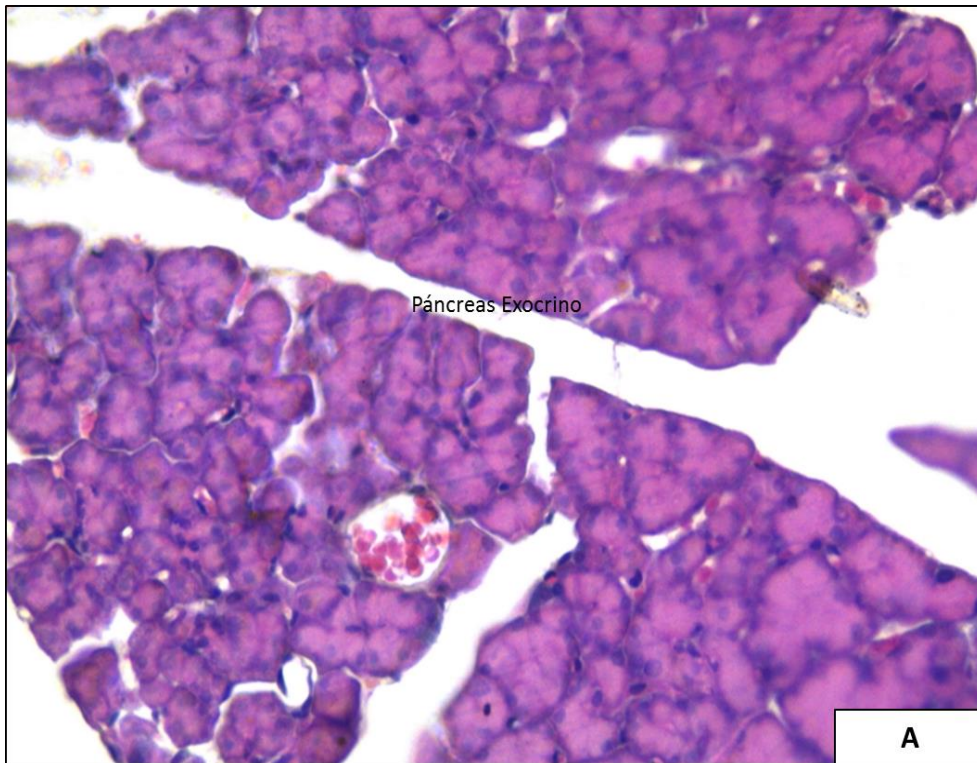


Figura 13. Cortes histológicos teñidos mediante el procedimiento H-E de bazo de rata *Wistar* Control (a), Diabética (b) y Diabética sometida a tratamiento (c), observadas a 400 aumentos.

En páncreas, en primer lugar podemos apreciar la recuperación de páncreas exocrino excepto en el grupo DI (figura 14c) en el que se logró observar islote de Langerhans con abundantes células conservadas. Los daños que se presentan en los dos grupos experimentales nos sugieren necrosis, núcleos hipercrómicos así como restos celulares de acinos. También se identificaron células disgregadas así como cambios degenerativos en el lóbulo pancreático, los cambios fueron más notables en el grupo DSI (figura 14b).



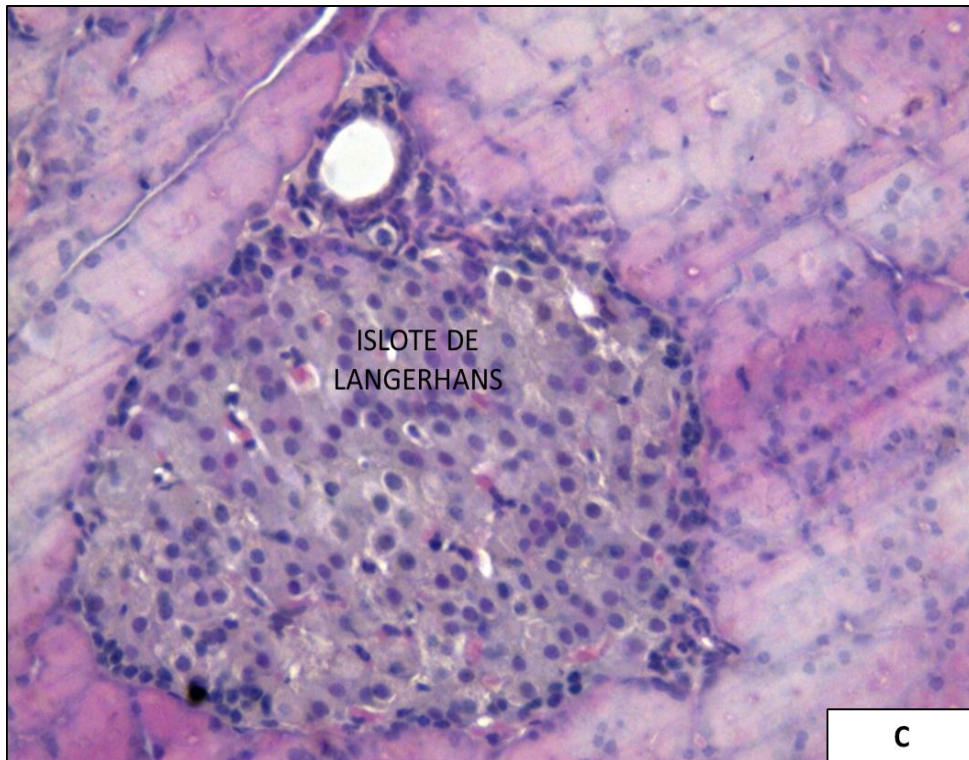
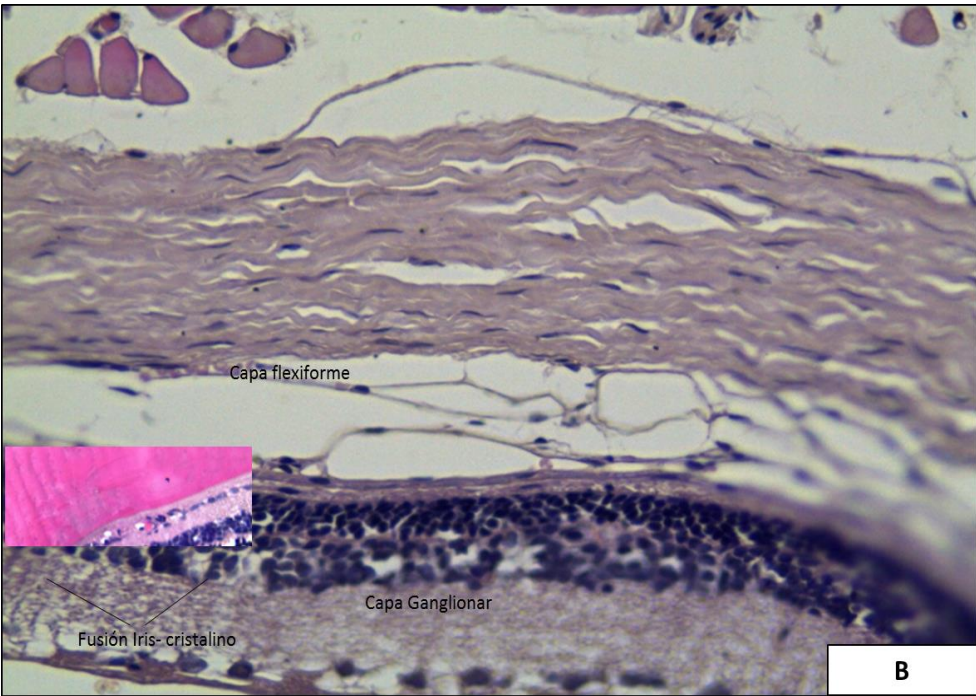
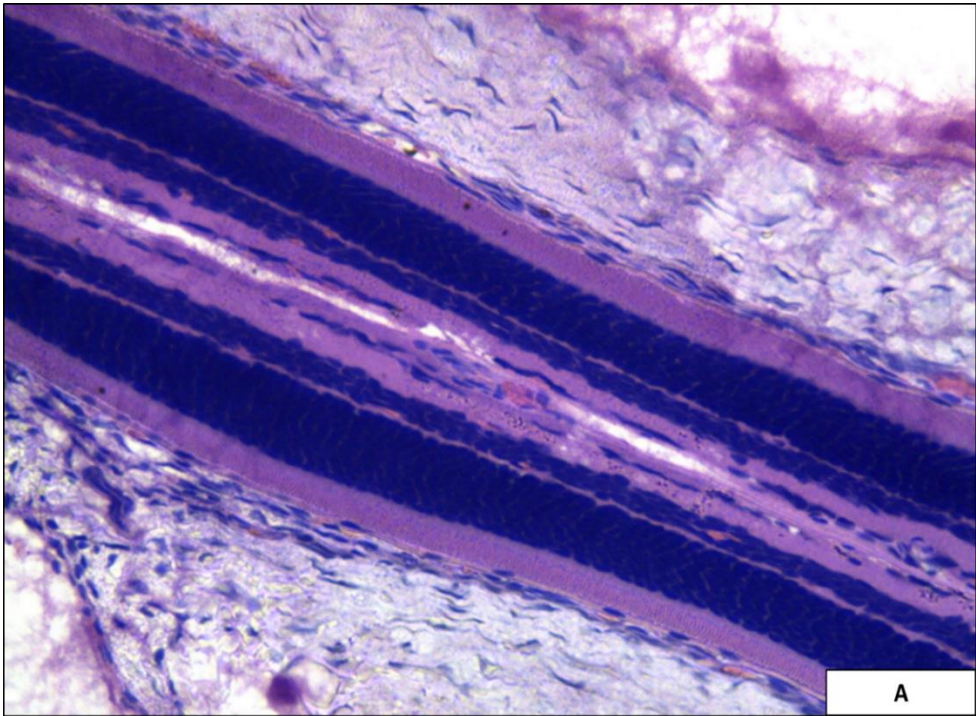


Figura 14. Corte histológico con tinción H-E de páncreas de Rata *Wistar*, de los tres grupos experimentales C (a) DSI (b) y DI (c), observadas a 400 aumentos.

En el ojo de ratas diabéticas sin implante, podemos observar un gran daño causado por la diabetes (figura 15b) en el que se aprecia una fusión del cristalino con la retina, desaparición de la capa ganglionar, plexiforme exterior e interior, así como la limitante interna. También se puede observar un blanquecimiento en el ojo lo cual sugiere cambios en la córnea, iris y cristalino. En comparación con el grupo DI (figura 15c) en el cual a pesar de existir un inicio de estos síntomas, el daño no prevaleció.



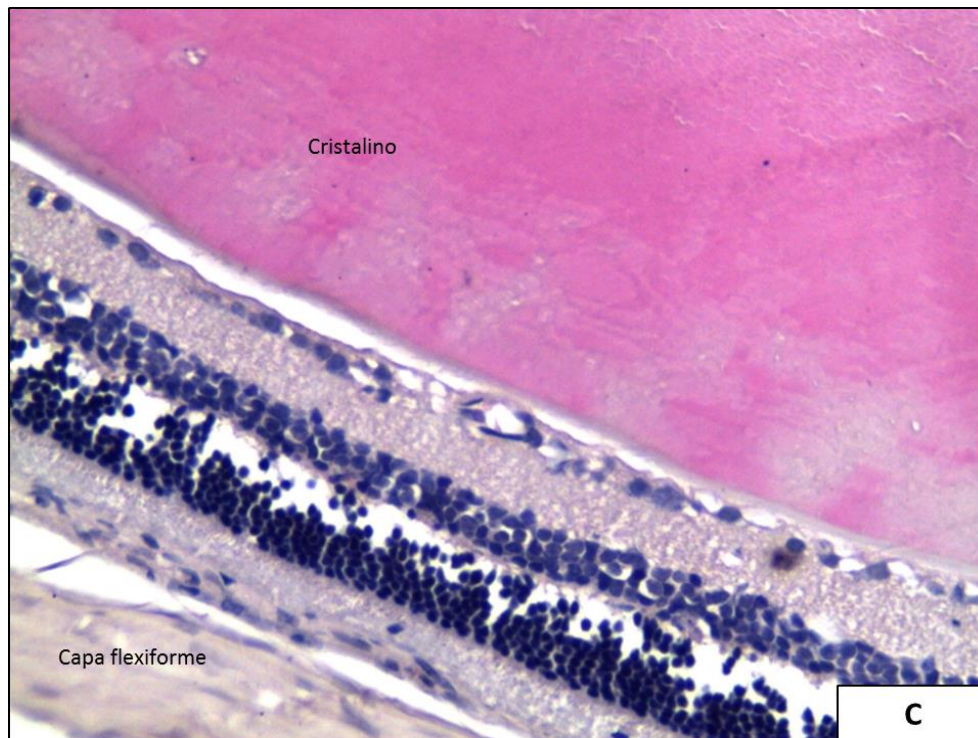


Figura 15. Cortes histológicos teñidos con H-E de ojo de rata *Wistar* Control (a), Diabética (b) y Diabética sometida a tratamiento (c), observadas a 400 aumentos.

Con respecto a la prueba de detección inmunohistoquímica, realizada en los implantes liofilizados de placenta recuperados de los organismos del grupo DI, no se pudieron apreciar los marcadores utilizados. Por lo que no se pudo detectar la presencia de las células madre en estos. Se recomienda la realización de otras técnicas que sean de ayuda para completar estos resultados (figura 16).

Marcador	Presencia
CD29	Negativo
CD44	Negativo
CD90	Negativo
CD105	Negativo

Tabla II. Presencia de marcadores de la técnica inmunohistoquímica, en cortes de implante liofilizado de placenta.

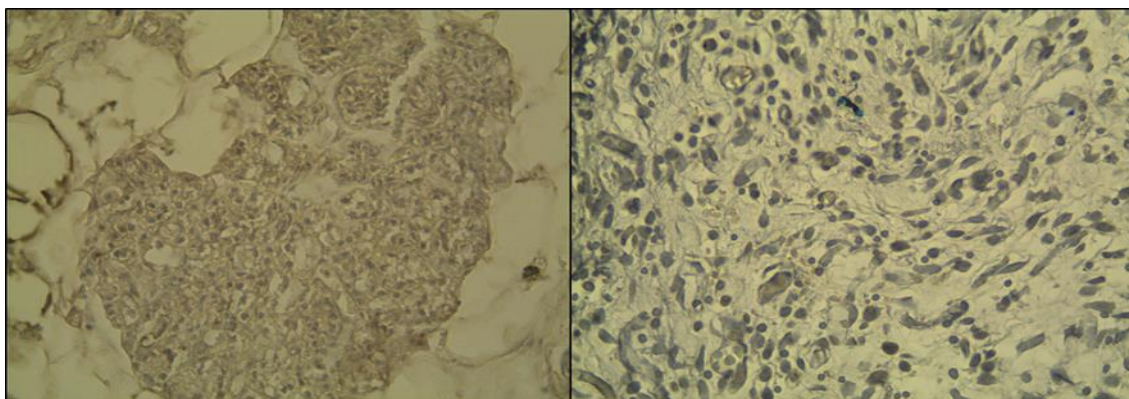


Figura 16. Técnica inmunohistoquímica en cortes de implante liofilizado de placenta para la detección de células madre. No se aprecia presencia de marcadores utilizados. Observadas a 400 aumentos

5.6. Segunda Fase

Para esta fase, se determinó la duración que tuvo el efecto del implante liofilizado de placenta en el grupo DI en cuanto a la duración de vida. Los individuos del grupo DSI presentaron un promedio de vida de 186 días, mientras que el grupo DI presentó un promedio de vida de 310 días a partir de la inducción a Diabetes Mellitus y la colocación del liofilizado de placenta (figura 17).

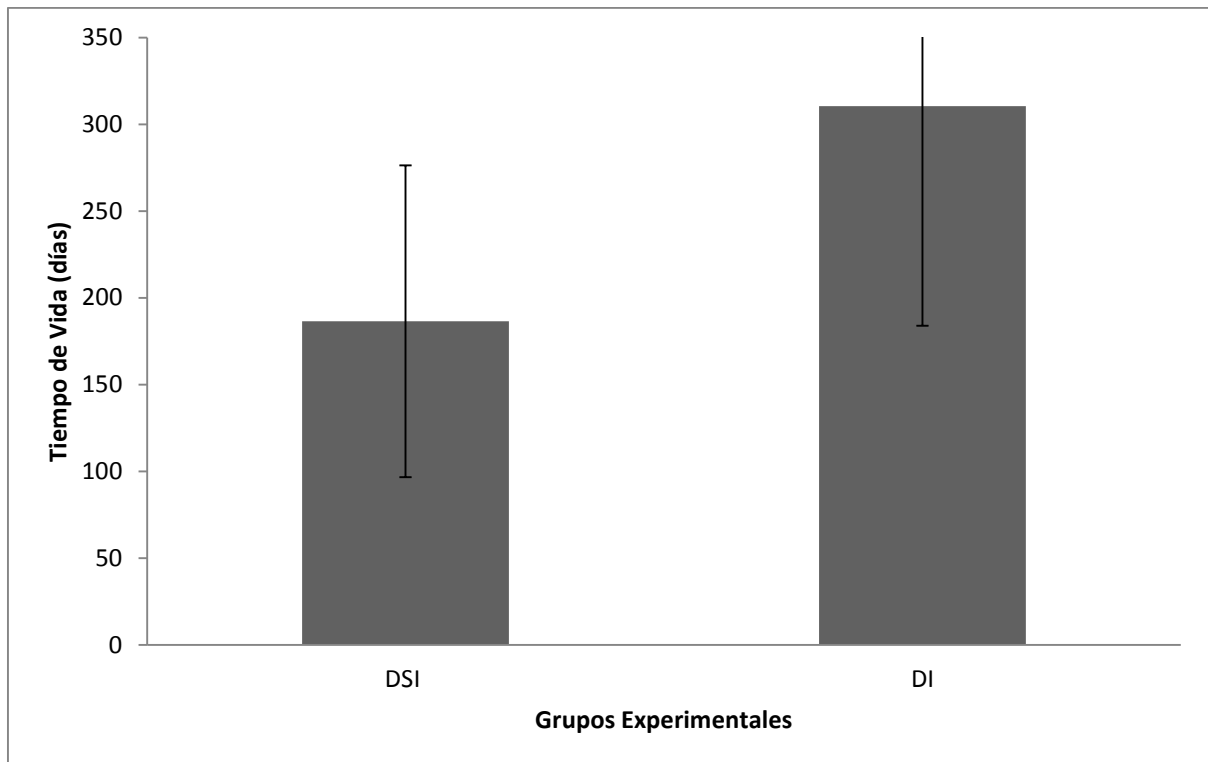


Figura 17. Tiempo de Vida de los grupos experimentales DSI y DI a partir de la inducción a DM1.

5.7. Tercera fase

En la figura 18 se observan los valores de los niveles de glucosa de la rata del grupo DI en la primera y segunda colocación del implante liofilizado de placenta. Se puede apreciar que los valores de glucosa por efecto de la primera colocación del liofilizado tuvieron un promedio de 537.72 mg/dL contra un 503.13 mg/dL de la segunda, siendo que los niveles de glucosa se mantuvieron ligeramente más bajos durante la colocación del segundo implante durante sus últimas semanas de vida. Su tiempo de vida fue de 400 días a partir de la inducción a DM.

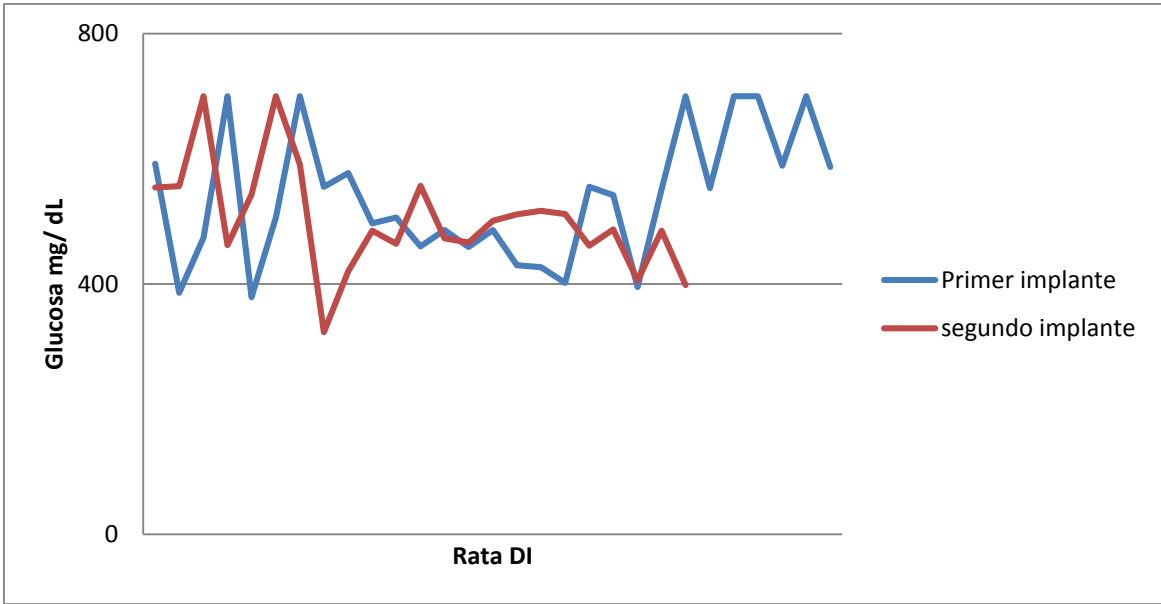


Figura 18. Comparación en los valores de glucosa de la rata DI durante el primer y segundo implante liofilizado de placenta.

En la figura 19 se presentan los valores de glucosa obtenidos de la rata del grupo DSI, desde la inducción a Diabetes y después de la colocación del implante liofilizado de placenta.

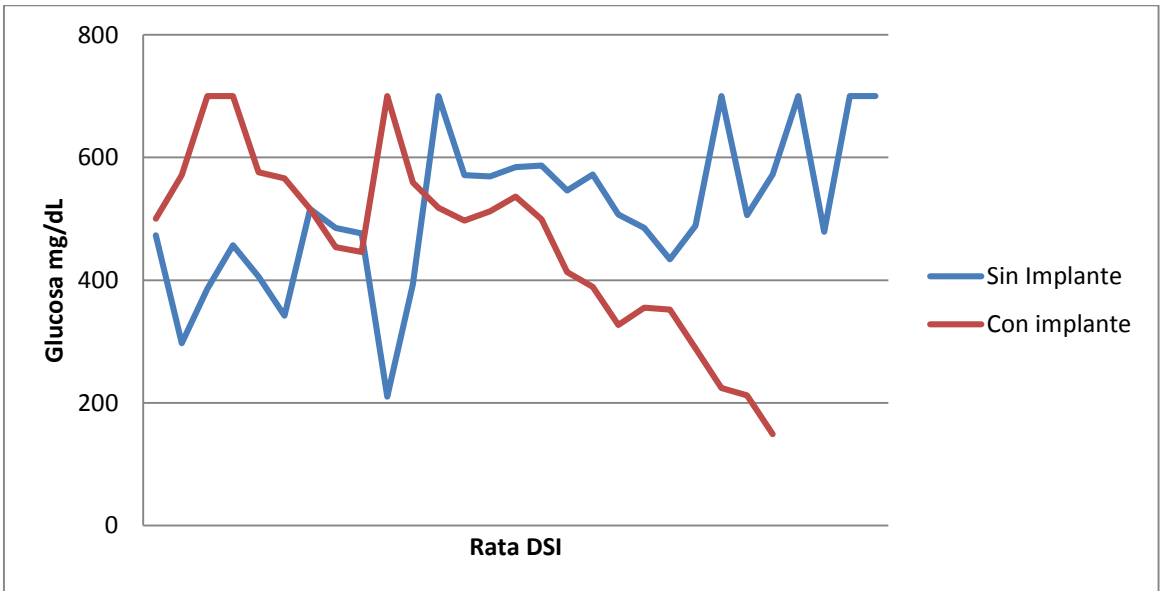


Figura 19. Comparación de los valores de glucosa de la rata DSI Con y Sin implante liofilizado de placenta, a lo largo del tiempo

En esta figura se observa que esta rata, al no estar sometida a ningún tratamiento, mostró niveles de glucosa en promedio de 511.79 mg/dL, hasta la colocación del implante liofilizado de placenta, cuando se pudo observar la disminución de estos niveles, hasta un valor promedio de 462.4 mg/dL. Se presenta una gran diferencia de valores entre el inicio del tratamiento con niveles de hasta 700 mg/dL, lo que contrasta con un valor de 149 mg/dL después de la colocación del liofilizado de placenta. Tuvo un tiempo de vida de 480 días a partir de la inducción a DM.

En esta tercera fase podemos resaltar al individuo perteneciente al grupo DSI en el cual se presentaron los mayores cambios a partir de la colocación del liofilizado de placenta. Desde los niveles de glucosa sérica y una ligera elevación en su peso, así como cambios en su apariencia física tal y como podemos observarlo en la figura 20.

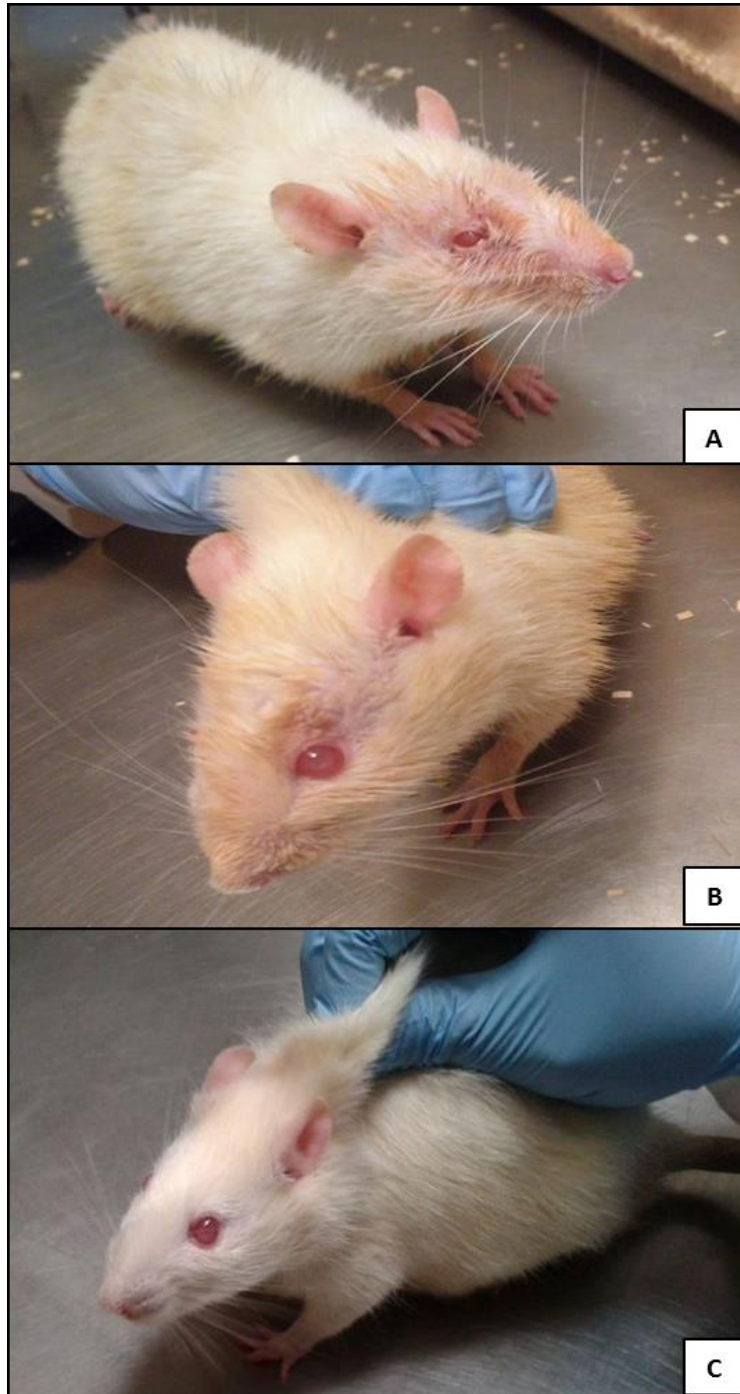


Figura 20. Aspecto de un sujeto experimental del grupo DSI antes y después de la colocación del liofilizado de placenta (Tercera fase).

En la primer imagen (figura 20a) podemos apreciar los primeros cambios después de la inducción a la diabetes, se pudo observar pérdida en el pelo así como en la coloración de éste y el comienzo de una infección en los ojos. Conforme el paso de los días se pudo notar el incremento en los niveles de glucosa, la pérdida de peso así como la presencia de ojos blanquecinos; debido a cambios en la córnea, iris y cristalino (figura 20b). Mientras que después de la colocación del implante liofilizado de placenta comenzaron a apreciarse los cambios (figura 20c) mejorando en todos los aspectos antes mencionados, inclusive mejorando el aspecto de los ojos.

6. DISCUSIÓN

En la DM, la causa primaria es la ausencia casi absoluta de insulina, debido a la inexistencia de células beta. El resultado es que se genera un exceso de glucosa en la sangre, lo que ocasiona daños a vasos sanguíneos y a ciertos órganos (Amaya, 2007). De esta manera la hiperglicemia crónica se asocia en el largo plazo al daño, disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Restrepo, 2000).

En este estudio se corrobora que la administración de STZ causa en ratas un estado de diabetes, ya que su administración causa en los modelos experimentales valores iguales o mayores a 700 mg/dL representativamente mayores a los del grupo control, lo que demuestra que la STZ en dosis única de 55-65 mg/ kg vía i.p. induce diabetes severa en ratas *Wistar* macho, ya que al no tener las mismas alteraciones hormonales que las hembras, presenta mayor severidad en la evolución del síndrome diabético, tal como lo reportan Lane (2000), y otros autores.

En cuanto a los resultados de peso corporal se pudo observar una ligera pérdida de peso después de la inducción a diabetes, según estudios el peso es un marcador importante del estado real de los grupos experimentales, ya que si baja de peso simultáneamente a la aparición de hiperglucemia, muy probablemente es indicador de DM (Olazo, 2010).

La prueba de hemoglobina glicosilada tiene un papel importante pues es un indicador indirecto de la glicemia a lo largo del tiempo. El valor generalmente establecido como normal está entre 4 a 6% en personas no diabéticas, y para los pacientes diabéticos se aconseja que el valor éste por debajo del 7%, sin embargo hasta 7.5% es considerado como un riesgo aceptable (Lino, 2009). En este estudio se reportan valores para los grupos DI y DSI de 7.03 y 9.4 respectivamente, por lo que podemos concluir que a pesar de que los valores no presentan una diferencia significativa, en nuestro estudio el valor obtenido con el implante de placenta está dentro de los niveles aceptables. Por lo que podemos concluir que este resultado es un buen indicador del estado metabólico general.

En cuanto a los parámetros bioquímicos podemos destacar los resultados de los triglicéridos, los cuales presentaron en el grupo DSI un valor de 341 mg/dL, contrastando tanto con el grupo control así como con los parámetros normales establecidos, lo que indica que no existe una buena síntesis de estos por parte del hígado, esto también podía estar relacionado con la disminución de los valores de colesterol del grupo DSI (58.75 mg/dL), que a pesar que está dentro de los valores normales, se observa una disminución en cuanto a los otros dos grupos. Si bien en los parámetros bioquímicos sólo se presentan diferencias significativas con los triglicéridos, muy probablemente hay menor daño en los organismos experimentales al disminuir los niveles de hemoglobina glicosilada.

Los pacientes con un mal control glicémico tienen mayor riesgo y una elevada incidencia no solamente de ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, sino que padecen con mayor frecuencia de ceguera, insuficiencia renal, amputaciones de los miembros inferiores y muerte prematura.

El hígado es la glándula más grande del cuerpo humano y manifiesta una gran diversidad de funciones que se relacionan entre sí, tales como hematopoyéticas, metabólicas, secretoras y excretoras. Desde el punto de vista histológico, el hígado no presenta discrepancia de consideración. Está compuesto de lóbulos hepáticos revestidos de células mesoteliales, en el interior está dividido en lobulillos y conductos biliares, mientras una red de fibras rodea las células y sinusoides (Stinson y Calhoun 1994).

En el presente estudio en los hígados de las ratas después de ser inducidas a DM1 se pudieron observar principios de necrosis, los hígados controles se conservaron de aspecto normal mientras que en los sometidos a tratamientos se observó daño histológico considerable en comparación de los hígados de sujetos diabéticos sin tratamiento (Flores, 2006). Después de las observaciones y análisis a los tejidos pancreáticos obtenidos, se puede notar que a pesar de tener daños presentes en pacientes diabéticos, el daño no prevalece ni tiene mayor severidad en las ratas sometidas al tratamiento (DI) por lo que se puede sugerir que de alguna manera este actúa dando protección al tejido.

La STZ induce neoplasia renal en ratas que han recibido una dosis, y han permanecido bajo observación de 8 a 16 meses después de la inyección, otras alteraciones se presentan a nivel del metabolismo del glucógeno en el riñón (Ramos, 1994). Así mismo, la DM, es una de las principales causas de insuficiencia renal terminal. La nefropatía diabética (ND) se presenta en el 25-35% de pacientes; histológicamente las lesiones iniciales son hipertrofia glomerular, expansión mesangial leve (matriz) y engrosamiento de las paredes capilares, aumento de la celularidad mesangial hasta la formación de nódulos. Además de que los glomérulos presentan incremento (esclerosis) de la matriz mesangial intercapilar, con aumento progresivo del engrosamiento de paredes capilares. Estas lesiones pueden observarse en este estudio en el corte de riñón del grupo de ratas diabéticas sin tratamiento (Kim, 2005).

En cuanto a los cortes histológicos de páncreas, en el único grupo que se pudo obtener páncreas endocrino fue del grupo DI en el cual se observa la presencia de islotes de Langerhans, así como abundantes células conservadas, mientras que en los otros grupos se obtuvo solo páncreas exocrino. El cual presentó alteraciones en células y núcleos; siendo el grupo sin tratamiento (DSI) en el que se presentó mayor cantidad de daño (Flores, 2006). Con esto podemos sugerir que el tratamiento logró una mayor conservación del páncreas como de sus células β en comparación con el grupo sin tratamiento (DSI).

La retinopatía diabética es una de las complicaciones más comunes y está presente tanto en la DM1 como en la DM2, especialmente en pacientes que llevan mucho tiempo con este padecimiento y con un mal control de la glucemia. En este estudio pudo observarse la fisiopatología de los cambios microvasculares de la retina relacionados con la hiperglucemia crónica tales como la pérdida del tono vascular, flujo sanguíneo alterado, edema y finalmente vasos frágiles que se rompen causando hemorragia y desprendimiento de retina (Bosco, 2005), siendo el grupo DSI en el que la mayoría de las ratas presentó ceguera adquirida.

La elevación de la glucosa en la sangre produce pequeñas lesiones en todas las arterias del cuerpo, fundamentalmente en las del cerebro, riñón, retina y corazón.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal y más frecuente complicación de la diabetes y producen la mayoría de las dolencias y muertes asociadas, lo que afecta la calidad de vida de los pacientes (Palma, 2005).

En cuanto a la prueba inmunohistoquímica, los marcadores utilizados no fueron identificados en los cortes de los implantes liofilizados recuperados. Estos resultados sugieren que no hay presencia de células troncales mesenquimales.

Para la determinación de la duración del efecto del implante, en cuanto al tiempo de vida, se obtuvieron unos resultados para el grupo DSI de 186 días en contraste con el grupo DI en cuyos organismos se presentó un promedio de vida de 310 días. En estos resultados se puede destacar el efecto protector que pudiera el liofilizado de placenta (Verdín et, al., 2012) ya que además de que los organismos vivieron una mayor cantidad de días fueron notables las diferencias en cuanto a apariencia y a los síntomas que presentaron.

Los resultados de la tercera fase en la que se le colocó el liofilizado a un organismo del grupo DSI, el cual presentaba una diabetes avanzada (más de 240 días), con niveles de glucosa superiores a los 500 mg/dL nos permite destacar los resultados después de la colocación del implante ya que fue el único organismo en el que la disminución de los niveles de glucosa sérica se vio muy reflejada, y llegó a un nivel de 149 mg/dL, lo que reproduce el estudio de Verdín et al. (2012) en el que se presentó una tendencia de disminución muy parecida. Así como un tiempo de vida de aproximadamente 475 días a partir de su inducción a diabetes; un resultado muy alto en comparación con los otros sujetos experimentales. Además de presentar grandes cambios favorables tanto en su apariencia física como en síntomas propios de la DM1.

Por todo lo anterior, podemos plantear que el implante liofilizado de placenta presenta un efecto protector en los organismos inducidos a Diabetes Mellitus por STZ, sin embargo se desconocen los mecanismos de dicho efecto, por lo que en un futuro podrían realizarse distintos estudios empleando otras técnicas que puedan complementar estos resultados, y que pudieran ayudar a una mejor comprensión de la forma en que se llevan a cabo estos eventos.

7. CONCLUSIONES

1. La duración del efecto del implante liofilizado de placenta en cuanto al tiempo de vida del grupo DI fue de 310 días.
2. A pesar de que con la colocación del implante liofilizado de placenta se observó una disminución en los niveles de glucosa sérica como en los de peso corporal, el análisis de los resultados no presentó cambios significativos en estos.
3. Se pudieron observar cambios tanto en parámetros bioquímicos como en los daños a nivel histológico de los órganos en los dos grupos inducidos a DM experimental. Presentando mayor severidad y prevalencia el grupo sin tratamiento DSI.
4. Se desconocen los mecanismos del efecto del implante liofilizado de placenta, sin embargo se pueden realizar estudios utilizando otras técnicas que nos ayuden a complementar estos resultados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaya, C.A., Ledezma, E.D., Alvarez, S.P., Ferreira, R.G., Gómez, O.M.L., Galar, M.M. 2007. Evaluación de un modelo de diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglicemiante de la glibenclamida. *Rev Mex Cien Farm* 30(3): 5-11.

American Diabetes Association. 2008. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 31(1): S12-S54.

Bancroft, D.J., Gamble, M. 2008. Theory and practice of histological techniques. Churchill livingstone. Philadelphia 6ed.

Bosco, A., Lerário, A.C., Soriano, D., Ferreira dos Santos, R., Massote, P., Galvão, D., Franco, A.C.H.M., Purisch, S., Rodrigues, F.A. 2005. Retinopatía Diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab* 49(2): 217-227.

Bravo, G.M. 2011. Manual de procedimientos y técnicas histopatológicas. Servicio profesional para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.. 76pp.

Cavallari, G., Olivi, E., Bianchi, F., Neri, F., Foroni, L., Valente, S., La Manna, G., Nardo, B., Stefoni, S., Ventura, C. 2012. Mesenchymal stem cells and islet cotransplantation in diabetic rats: improved islet graft revascularization and function by human adipose tissue- derived stem cells preconditioned with natural molecules. *Cell Transplant* 21: 2771-2781.

Conget, I. 2002. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes Mellitus. *Rev Esp Cardiol* 55(5): 528-35.

Costa, A., Ríos, M., Fernández, M., Gomis, R., Conget, I. 1999. The 1997 ADA diabetes diagnostic categories: impact on employees' annual medical examination. *Diabet Med* 16: 528-529.

Díaz, F.M., Baiza, G.L.A., Ibáñez, H.M.A., Pascoe, L.D., Guzmán, G.A.M., Kumate, R.J. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac Méd Méx* 140(4): 438-448.

Flores, C., Márquez, Y., Lopez-Ortega, Mendoza, C., Colmenarez, V., Salas, Y. 2006. Caracterización de la diabetes mellitus experimental inducida con estreptozotocina en ratones nmri. *Gac Cienc Vet* 12(1): 13-18.

García, F., Solís, J., Calderón, J., Luque, E., Neyra, L., Manrique, H., Cansino, R., Castillo, O., Cornejo, S.P., Rodríguez, E., Freundt, J., Escudero, R., Zacarías, E. 2007. Prevalencia de diabetes mellitus y factores de riesgo relacionados en una población urbana. *Rev Soc Peru Med Int* 20(3): 90-94.

García, O.D., García, A.M., 2009. Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. 221 pp.

Guo, T., Hebrok, M. 2009. Stem cells to pancreatic β - cells: new sources for diabetes cell therapy. *Endocr Rev* 30(3): 214-227.

Gúzman, J. N., Madrigal, B.E. 2003. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica* 28(2):14-23.

Islas, A.S., Revilla, M.M.C. 2004. Diabetes Mellitus. 3ª Mc Graw Hill. México. 524pp.

Kadam, S., Muthyala, S., Nair, P., Bhonde, R. 2012. Human placenta-derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as novel sources for stem cell therapy in diabetes. *Rev Diabet Stud* 7(2): 168-182.

Kim, N.H., 2005. Podocyte hypertrophy in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 10 Suppl 2: S14-S16.

- Kroncke, K.D., Fehsel, K., Sommer, A., Rodríguez, M.L., Kolb-Bachofen V. 1995. Nitric Oxide generation during cellular metabolization of the diabetogenic streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376: 179-185.
- Lane, P.H. 2000. Age of onset of streptozotocin diabetes determines the renal structural response in the rat. *Ped Res* 41(6): 912-915.
- Lino, V.R., Ayaviri, M.M, Caballero, R.J. 2009. Prueba de hemoglobina glucosilada. *Rev Peceña Med Fam* 6(9): 18-20.
- Mandrup-Poulsen T. 2001. Beta-cell apoptosis. Stimuli and signaling. *Diabetes* 50 (Suppl. 1): S58-S63.
- Márquez, A.J.L, Salazar, N.L.A. 2009. Influencia epigenómica de la actividad/inactividad física en el origen de la Diabetes mellitus tipo 2. *Rev Int Cienc Dep* 16(5):1-20.
- Martínez, R.P., 2011. Comparación histológica e inmunohistoquímica de muestras de tejido procesadas por la técnica convencional o por el método simplificado de acetonas. *Rev Int J Morphol* 29(2): 575-580.
- Molist, P. 2008. Técnicas Histológicas, atlas de histología vegetal y animal. Facultad de Biología. 208pp.
- Moreno, A.L. 2001. Epidemiología y Diabetes. *Rev Fac Med UNAM* 44(1): 35-37.
- Nakatsuka, M., Yoshimura, Y., Nishida, M., Kawada, J. 1990. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin- induced cytotoxicity. *J Endocrinol* 127: 161-165.
- Olazo, M.A. 2010. Efecto de la obesidad y la inducción a diabetes sobre los valores de glucosa, colesterol y triglicéridos en modelo de rata. Tesis para obtener título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Veracruzana 68pp.

Palma, G.J.L., Calderón M.A., De la Calle, B.H. 2005. Diabetes y Corazón. Fundación Española del Corazón. Madrid. 106pp.

Paniagua, C.G.L. 2010. Manual de Análisis Clínicos Hematología, bioquímica e inmunología clínicas. UNAM. FES Iztacala. 132pp.

Ramos, R.H.G., Méndez, J.D., 1994. Diabetes Mellitus Experimental. *Cien Vet* 6: 347-377.

Restrepo, O.O. 2000. Diabetes y embarazo. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 51(1): 1-32.

Samar, M.E., Ávila, R.E. 2000. Técnicas histológicas fundamentos y aplicaciones. Universidad de Córdoba, Argentina.

Secretaria de Salud. 2008. Diabetes Mellitus. PROGRAMA DE ACCIÓN ESPECÍFICO 2007-2012. 84pp.

Stinson, A.W., Calhoun, M.L. 1994. Sistema Digestivo. Dellmann, D. H. Histología Veterinaria. Zaragoza, Editorial Acribia, pp. 213-217.

Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 536-546.

Tébar M.F.J., Escobar J.F. 2009. La Diabetes Mellitus en la práctica clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid, 550 pp.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197.

Tomlinson, K.C., Gardiner, S.M., Hebden, R.A., Bennet, T. 1992. Funcional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 44: 103-150.

Triana, M.M.E. 2001. La hiperglucemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol Circ Vasc* 2(2): 131-141.

Turk, J., Corbett, J.A., Ramanadham, S., Bohrer, A., McDaniel, M.L. 1994. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1458-1464.

Vázquez, C.J.L., Panduro, C.A. 2001. Diabetes Mellitus Tipo 2: Un problema epidemiológico y de emergencia en México. Investigación en salud. Universidad de Guadalajara, pp. 18-26.

Velázquez, R.J.A. 2008. Papel del embarazo complicado con Diabetes Mellitus tipo 1 en la expresión de receptores vasculares a la angiotensina II. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Farmacología. Escuela Superior de Medicina. IPN. México D.F.

Verdín, T.S.L., Pineda, C.A., Reyes, C.M.J., Díaz, T.L.G. 2012. Efecto del implante liofilizado de placenta en los niveles de citocinas pro inflamatorias en ratas diabéticas. Coloquio de Investigación FES IZTACALA UNAM.

Wood S.L., Sauve R., Love E.J. 2002. Prediabetes and perinatal mortality. *Diabetes Care* 23: 1753-1754.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1. Parámetros Bioquímicos

GLUCOSA BASAL (Metodo de Trinder)

Fundamento

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa según la reacción siguiente:



El peróxido de hidrogeno formado reacciona, en presencia de peroxidasa (POD), con 4- aminoantipirina y 2,4-diclorofenol. Por copulación oxidante se forma antipirilquinonimina roja.

La cantidad de colorante formado es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.

Reactivos

- De coloración:
 - 0.1 mol/L de amortiguador de fosfatos
 - 0.1 mol/L de amortiguador Tris-HCl, pH 8.0
 - 6 kU/L de GOD
 - 3.8 kU/L de POD
 - 0.25 mmol/L de 4-aminoantipirina
 - 0.2 mmol/L de 2,4-diclorofenol

Disolver el contenido del frasco con 100ml de agua destilada. Se conserva 4 semanas entre +2 ± +8°C

- Solución patrón
Contiene 100 mg% de glucosa (lista para usarse).

Método

Adición	P (problema)	ST (patrón)
Suero	10 µl	-----
Solución Patrón	-----	10 µl
Reactivo de Color	2 mL	2 mL

Incubar a temperatura ambiente 30 min

Leer a 546nm, ajustando a cero de absorbancia con agua destilada

Cálculo. Utilizando Ley de Lambert-Beer

$$\text{Concentración de Glucosa} = (\text{Conc. ST} / \text{D.O. ST}) \times \text{D.O. problema}$$

Cifra de Referencia: 50 a 100 mg/dL en ayuno

HEMOGLOBINA A1C

Fundamento

Las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio catiónico, eluyéndose de forma específica la hemoglobina A1c (HbA1c) previa eliminación por lavado de la Hemoglobina A1a+b (HbA1a+b)¹. La estimación del porcentaje de la Hb A1c se realiza por lectura de la absorbancia a 415 nm.

Reactivos

1. Reactivo. Ftalato de potasio 50 mmol/L, detergente 5 g/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 5,0.
2. Reactivo. Tampón fosfatos 30 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L.
3. Reactivo. Tampón fosfatos 72 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L.
4. Microcolumnas. Contienen resina de intercambio catiónico equilibrada con tampón fosfatos 72 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L.

Método

Sangre	50 µL
Reactivo (1)	200 µL

Agitar y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 min.

Hemolizado	50 µ	Desechar el eluido
Reactivo (2)	200 µ	Desechar el eluido
Reactivo (2)	2,0 mL	Desechar el eluido
Reactivo (3)	4,0 mL	Recoger eluido (Fracción HbA1c)

Agitar bien y leer la absorbancia de la fracción HbA1c a 415 nm frente a agua destilada (AHbA1c). La absorbancia es estable durante al menos una hora.

Cálculo

Obtener factor $F = \text{Conc. St.} / \text{D.O. St.}$

$\text{Conc. de Hb.} = \text{Factor} \times \text{D.O. problema (g\%)}$

Cifras de referencia

- 4,0 - 6,0 No diabético
- 6,0 - 6,5 Objetivo
- 6,5 - 8,0 Buen control
- > 8,0 Tratamiento necesario

TRIGLICERIDOS (Método de Soloni)

Fundamento

Los triglicéridos extraídos se saponifican con etilato de sodio (etóxido de sodio), lo que libera al glicerol, el cual es oxidado con ácido peryódico a formaldehído, que se cuantifica colorimétricamente a 410 nm por la formación de un complejo de color amarillo (reacción de Hantzsch).

Reactivos

1. Solución extractora
2. Etilato de sodio
3. Sol. Oxidante (Ác. peryódico en solución sulfúrica)
4. Amortiguador
5. Acetil acetona
6. Patrón de trioleína (equivalente a 200 mg/100 mL de triglicéridos)

Método

1. Depositar en tubo de ensaye 0.5 mL del suero problema más 4.0 mL de la solución extractora. Agitar vigorosamente durante 10 segundos. Dejar en reposo hasta que se formen y separen dos capas.
2. Etiquetar tres tubos de ensaye (Blanco, Muestra, Patrón) depositar en el fondo las alícuotas del extracto (capa superior), etilato de sodio y patrón, según la siguiente tabla:

Adición	Blanco	Muestra	Patrón
Extracto capa sup	---	0.1 mL	---
Patrón (R 6)	---	---	0.1 mL
Etilato de sodio	2 gotas	2 gotas	2 gotas

3. Mezclar bien y colocar tubos en baño maría a 56°C por 1 minuto. Agregar a cada tubo la solución oxidante (reactivo 3). Mezclar bien y poner a baño maría 30 segundos.
4. Agregar a cada tubo 2.5 mL del reactivo de color, mezclar y colocarlos a baño maría 5 minutos. Sacarlos y colocarlos en agua fría.
5. Leer las absorbancias a 410 nm en el espectrofotómetro, ajustando a cero con el blanco.

Cálculo

$$\text{Lípidos totales mg/dL} = (\text{Conc. Patrón} / \text{D.O. patrón}) \times \text{D.O. muestra}$$

Cifras de referencia

Después de un ayuno de 12-14 horas, los valores en personas sanas expresados en mg de trioleína son los siguientes:

Mujeres: de 37 a 189 mg/100 mL

Hombres: de 34 a 252 mg/100 mL

COLESTEROL (Método de Liebermann- Burchard)

Fundamento

La reacción del ácido sulfúrico con el anhídrido acético y el ácido sulfúrico forma compuestos color verde pardusco intenso, la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración del colesterol.

Reactivos

Reactivo de colesterol (Anhídrido acético 6.33 M en ácido acético 99-100%)

Ácido sulfúrico concentrado (95-97%)

Solución patrón de colesterol (300 mg/dL)

Método

Adición	Problema	Patrón
Suero	50 µL	---
Sol. Patrón colesterol	---	50 µL
Reactivo de colesterol	2 mL	2 mL

Pipetear 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado en la pared interna de cada tubo.

Mezclar vigorosamente y colocar los tubos en baño de agua fría

Después de 10-30 minutos medir la absorbancia del problema y del patrón a 578 nm, calibrando a cero con un blanco de agua

Cálculo

$$\text{Conc. del problema} = (\text{Conc. patrón} / \text{D.O. patrón}) \times \text{D.O. problema}$$

Cifras de referencia

Edades de 30 a 60 años: hasta 239 mg/100 mL

>300 se requiere tratamiento

UREA (Método Diacetil monoxima)

Fundamento

La urea reacciona con la diacetilmonoxima en presencia de tiosemicarbazida en medio ácido, formando un derivado diazínico de color rosa púrpura. La concentración de la urea presente en la muestra es proporcional a la intensidad del color formado.

Reactivos

1. Diacetilmonoxima
2. Tiosemicarbazida
3. Reactivo ácido
4. Patrón de urea (80 mg/100 mL)

Método (plasma o suero)

Adición	Problema	Patrón
Reactivo de color	2.5 mL	2.5 mL
Suero o plasma	20 µL	---
Patrón	---	10 µL
Reactivo ácido	2.5 mL	2.5 mL

Mezclar e incubar a baño maría durante 10 minutos, transferir a baño de agua fría por tres minutos. Leer absorbancia a 520 nm calibrando a cero con agua destilada.

Cálculo

$$\text{Urea (mg/100 mL)} = \text{Conc. patrón} / \text{D.O. patrón} \times \text{D.O. problema}$$

Cifras de referencia

Suero o plasma: 15 a 40 mg/100mL

CREATININA (Metodo de Jaffe)

Fundamento

En solución alcalina la creatinina forma ácido pícrico (de color anaranjado amarillento). La intensidad del color producida a un determinado tiempo de reacción es una medida de la concentración de creatinina.

Reactivos

- Solución amortiguadora: hidróxido de sodio 313 mmol/L; fosfato 12.5 mmol/L
- Solución ácido pícrico (8.73 mmol/L)
- Solución patrón de creatinina (1 mg/100 mL)

Método

	Problema	Patrón
Suero	0.5 mL	---
Solución patrón	---	0.5 mL
Ácido pícrico	1.0 mL	1.0 mL

Mezclar y dejar reposar durante 5 minutos

Solución amortiguadora	1.0 mL	1.0 mL
-------------------------------	---------------	---------------

Mezclar, pasar inmediatamente a la cubeta y medir la D.O₁ a 492 nm antes de que transcurra 1 minuto. Medir la D.O₂ a 492 nm 5 minutos después de la primera medición.

Cálculo

$$\text{Creatinina mg/100 mL} = \frac{D.O.2\text{prob} - D.O.1\text{prob}}{D.O.2\text{St} - D.O.1\text{St}}$$

Cifras de referencia

Suero: Mujeres de 0.5 a 1.0 mg/100mL

Hombres de 0.7 a 1.2 mg/100 mL

ÁCIDO ÚRICO

Fundamento

En medio alcalino, el ácido úrico reduce al reactivo fosfotúngico (reactivo de color) a azul tungsteno, el cual es determinado fotométricamente a 700 nm.

Reactivos

- Reactivo desproteinizante: Ácido túngstico estabilizado
- Carbonato de sodio
- Reactivo de color
- Patrón de ácido úrico

Método (para suero)

Agua destilada	4.0 mL
Reactivo desproteinizante	0.5 mL
Muestra	0.5 mL

Centrifugar durante 5 minutos a 2500-3000 rpm

	Muestra	Patrón
Sobrenadante (paso1)	2.5 mL	---
Agua destilada	---	2.5 mL
patrón	---	0.025 mL
Carbonato de sodio	0.5 mL	0.5 mL

Mezclar y esperar 10 minutos después agregar

Reactivo de color	0.5 mL	0.5 mL
--------------------------	---------------	---------------

Agitar bien y dejar en reposo durante 20 minutos. Determinar las absorbancias a 700nm, ajustando a cero con agua destilada.

Cálculo

$$\text{Ácido úrico mg/100 mL} = (\text{D.O. muestra} / \text{D.O. patrón}) \times 10$$

Cifras de referencia

Suero: Mujeres de 1.5 a 6 mg/100 mL

Hombres de 2.5 a 7 mg/ 100 mL

9.2. Anexo 2. Técnica histológica convencional (THC)

1. Paraformaldehído al 4%, pH 7.4

Con este fijador se obtiene una muy buena preservación ultraestructural, es decir los resultados en la morfología son buenos pero la preservación de la antigenicidad es pobre.

Procedimiento

Paraformaldehído (Sigma)	4 gr
PBS o H ₂ O	80 mL

Calentar a 60° C con agitación, al alcanzar la temperatura adicionar unas gotas de Hidróxido de amonio (NH₃OH) al 1 M acuoso hasta que se disuelva el paraformaldehído, y dejar enfriar.

Ajustar el pH con ácido clorhídrico (HCl) 1 N o Hidróxido de sodio (NaOH) 1 N según el caso hasta ajustar a pH 7.4 y aforar a 100 mL.

Guardar a 4° C; no usar después de 15 días de elaborado.

2. Inclusión en Parafina

La inclusión en parafina se lleva a cabo calentándola un poco por encima de su punto de fusión para que esté en estado líquido y pueda infiltrarse en el interior de la muestra. Su elección depende de la consistencia del tejido y de la temperatura ambiente del laboratorio. Una vez infiltradas las muestras con parafina, se confeccionan bloques con moldes adecuados. Al enfriarse, la parafina se solidifica y el bloque adquiere una dureza adecuada para ser cortado con el microtomo de parafina (de deslizamiento o de rotación) (Samar, 2000).

Los tiempos en parafina son mínimos, se pueden quedar por mucho más tiempo siempre y cuando la parafina este entre 60-62° C.

Las altas temperaturas para la infiltración de la parafina y los tiempos muy prolongados pueden provocar destrucción de los antígenos perdiendo los tejidos la inmunoreactividad.

Los bloques de parafina pueden almacenarse indefinidamente hasta que son cortados, de preferencia en el refrigerador a 4°C, cuando se vaya a usar inmunohistoquímica.

Procedimiento de Deshidratación e impregnación en parafina

Agua corriente 30 min

Alcohol 70% 30 min

Alcohol 80%	30 min
Alcohol 90%	30 min
Alcohol absoluto	30 min
Alcohol amílico	60 min (Alcohol isobutilico o Butanol mínimo 24 hrs.)
Parafina I *	60 min (tiempo mínimo)
Parafina II *	60 min (minimo)
Inclusión en bloque (parafina fundida a 60° C)	

Los tiempos de deshidratación se determinan dependiendo del tamaño de la muestra, para muestras muy pequeñas de entre 0.3-0.5 cm se sugieren los tiempos anteriores. Aumentar tiempos según el tamaño del bloque.

Nota: NO dejar más de 1 h en alcohol absoluto pues se endurece y contrae el tejido.

Hay que ser muy cuidadoso al utilizar el xilol como líquido intermedio, se debe controlar el tiempo de impregnación, en cuanto el tejido se transparente cambiar la muestra a parafina para evitar endurecimiento excesivo del tejido.

Para tejidos muy hidratados como los fetales empezar a deshidratar desde alcohol al 50% aumentando concentraciones 10% cada vez (50, 60, 70, 80, 90 y 100 %).

Para bloques de tejido muy pequeños se utiliza teñir el tejido con eosina de trabajo y poder localizarlo al manejo.

9.3. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E)

La tinción de hematoxilina eosina (H-E) es la tinción histológica más ampliamente utilizada. Su popularidad está basada por su simplicidad y capacidad de demostrar claramente un enorme número de estructuras tisulares. La hematoxilina tiñe componentes nucleares desde azul con buen detalle intranuclear, mientras que la eosina tiñe el citoplasma de las células y la mayoría de fibras de tejido conectivo variando en intensidad entre rosa, naranja y rojo (Bancroft y Gamble, 1996).

Procedimiento. Desparafinar las laminillas en la canastilla por 30 min a 60° C antes de teñir para mejorar el pegado, dejar enfriar.

Xilol I	5 min
Xilol II	5 min
Alcohol-Xilol*	3 min
OH 100%	3 min
OH 90%	2 min
OH 80%	2 min
OH 70%	1 min
Agua corriente	3 min
Hematoxilina de Harris	5 min
Agua corriente	2 min
Alcohol ácido	lavado
Agua corriente	2 min
Agua amoniacal	lavado
Agua corriente	1 min
Eosina alcohólica	10 min
Agua corriente	lavado
OH 70%	1 min
OH 90%	1 min
OH 100%	2 min

OH 100%	3 min
Xilol:Alcohol	3 min
Xilol I	5 min
Xilol II	5 min

Montaje en resina (Entellan, resina sintética, Bálsamo de Canadá, etc.).

9.4. Anexo 4. Técnica Inmunohistoquímica con peroxidasa

Usar laminillas silanizadas o poli-lisinadas. Los cortes deben ser entre 3-5 micras de grosor, aumentar la adhesividad con Ruyter y después incubar 30 min en horno a 60° C para aumentar adhesión.

Xilol I	3 min
Xilol II	1 min
OH-100%	1 min
OH-90%	1 min
OH-80%	1 min
OH-70%	1 min
Agua destilada	3 min
PBS 1X	1 min
PBS	3 lavados de 1min c/u

Metanol*	15 min
PBS 1X	3 lavados de 1min c/u
PBS-tritón (0.05%)	1 min
Albúmina de huevo al 6% **	1 hora (o suero al 5% en PBS-Tx)
PBS tritón	3 lavados
Anticuerpo peroxidado diluido en PBS-tritón	mínimo 2 hr a 4° C; máximo toda la noche
PBS-tritón	3 lavados
PBS 1X	1 min
Solución de DAB***	Tiempo según coloración observada (1-10min)
Lavado PBS	(con pizeta)
Lavado PBS	1 min
Contra-tinción con Hematoxilina de Harris	

* Inactivación peroxidasa endógena, preparar al momento

** Bloqueo de proteínas

*** Revelado de peroxidasa del anticuerpo marcado preparar al momento

Reactivos:

Metanol =>9 mL +H₂O₂ 1 mL puro.

Albúmina de huevo => 1.2 mL en PBS-tritón 8.8 mL

Solución de DAB => PBS 10 mL + DAB 0.006 g + 10 µL H₂O₂ al 30%.

H₂O₂ al 30% = 967 µL de agua destilada + 33 de H₂O₂ µL comercial.

Esta técnica está estandarizada para intestinos de ratón fijados con paraformaldehído por 2 h. Son indispensables todos los pasos.

Resultados:

Núcleos: azul

Reacción positiva a la molécula detectada: diversos tonos de café.

Cuando se trabaja con diaminobencidina (DAB) es importante inactivar el complejo DAB-H₂O₂ antes de lavar o tirar, para esto se deja remojar el material usado con hipoclorito de sodio por 24 h.