



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL IMPLANTE LIOFILIZADO  
DE PLACENTA EN RATAS WISTAR GESTANTES CON  
DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G A**

PRESENTA:

**ALEJANDRA LIZBETH ANGEL MARTÍNEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MARTÍN PALOMAR MORALES**

**TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO**

**2015.**





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.

Éste trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunobiología (L-321), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Dra. Silvia Leticia Verdín Terán (Q.E.P.D.).

Se recibió apoyo parcial del programa PAPIIT, proyecto IN213713.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y 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 poder finalizar 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 Aurelio Rodríguez Monroy y al laboratorio de Inmunobiología (L-321) de la FES Iztacala, por el apoyo y las facilidades para la realización de este proyecto.

A la Biól. Ana Federica Chávez Sánchez por sus revisiones y observaciones sobre el trabajo.

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

Al Biól. Francisco Javier Martínez López por su gran apoyo, el tiempo y la dedicación para la revisión y la realización de esta tesis.

Al M.C. Miguel Jesús Reyes Campos por sus valiosas aportaciones y el apoyo incondicional a lo largo de la realización de este trabajo.

Al M. en C. Antonio Pineda Carranza por su ayuda para realizar diversas técnicas experimentales.

A mi compañera de laboratorio Karina Díaz Donato, por ser parte de este trabajo y por haberlo hecho mucho más agradable, gracias por todo el tiempo compartido te quiero.

A la Dra. Leticia Flores Sánchez y al Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por las facilidades brindadas a este trabajo durante la fase experimental.

Al Biól. José del Carmen Benítez Flores por su ayuda en la revisión de las muestras histológicas.

A la Biól. Saharay Cruz Miranda, por ser la excelente profesora que es y por brindarme su amistad.

Al resto de los profesores que formaron parte de mi enseñanza,

**¡A Todos Ustedes Muchas Gracias!**

## Dedicatoria

A mis padres Carmen Martínez Arce y Alejandro Angel Larios, a ustedes más que a nadie les dedico este trabajo, gracias por el apoyo, la confianza, el ejemplo y el amor que me han dado, porque este logro es tan mío como de ustedes, gracias por apoyarme en cada una de mis decisiones y por ser siempre mi soporte porque cada uno de mis logros no es más que el reflejo de sus esfuerzos. Papá gracias por enseñarme que con esfuerzo y dedicación puedo lograr cada una de mis metas, mamá gracias por ser la mujer luchona y la mejor madre que pude tener, porque sin ustedes yo no sería la persona que soy ahora. Los amo infinitamente y no me queda más que dar gracias a la vida por los padres que tengo.

A mi hermano Edgar Angel Martínez, por pelear siempre conmigo y soportarme hasta en mis peores momentos, por preocuparte por mí y estar siempre ahí cuando es necesario. Te amo “bibicha” y sé que algún día tú estarás de este lado.

A mis abuelos Filemón Martínez Ramos y Carmen Arce Ramírez, gracias por su infinito amor y por ser mis segundos padres. Abuelita gracias por cuidarme y consentirme siempre pero sobre todo gracias por ser mi amiga, mi confidente, mi consejera, mi madre y mi ejemplo de vida, por estar siempre ahí para decirme que si puedo cuando yo me quería rendir, gracias por enseñarme a sonreír hasta en los peores momentos. Los amo con todo mí ser.

A mis tíos Leticia Macías, Fernando Martínez, Ana Martínez, Héctor Cruz, Gilberto Martínez, Guadalupe Ramírez, Adriana Martínez, Luis Flores, Juan Martínez, Simón Martínez y Helena, gracias a todos ustedes por su amor, por confiar siempre en mí y echarme constantemente porras para seguir adelante. Siempre han sido un ejemplo para mí. Son la mejor familia que se puede tener, los amo.

A mis primos desde Oscar hasta Juanito, gracias por hacer mi vida mil veces más divertida, los quiero a todos. “Morena” eres como una hermanita siempre me haces muy feliz “love u”. Y por supuesto gracias a ti Karla, porque más que mi

prima eres mi hermana, no sabes cuánto agradezco que siempre estés cuando más te necesito, ¡simplemente te amo!

A mis amigos Gabriela Morales y Alan Roldán, ustedes saben cuan importantes son ambos en mi vida y lo que representan para mí, no me queda más que seguir dando gracias a la vida por haberlos puesto en mi camino. Gracias por las risas, las lágrimas, los momentos divertidos, los consejos, los jalones de oreja pero sobre todo gracias por seguir formando parte de mi vida. Aún nos queda mucho camino por recorrer y me alegra saber que ustedes seguirán siempre ahí.

A mis babies queridas Karina Díaz, Yadira Rivero, Andrea Hernández, Graciela Ramos, Diana Ocampo, Lidia Juárez, Tzitzí Marín, Miriam Chimil y a mi Rod Rodríguez mis locas y loco favoritos, ¿Qué habría sido de mi sin nuestra locura? no puedo imaginar mi vida universitaria sin ustedes, gracias por tantas horas de debraye, por las infinitas risas y los buenos momentos, y por ser las excelentes personas que son definitivamente los mega amo. Al resto de mi “familia loca” gracias a todos por ser parte de esta familia, los quiero. Y por supuesto a Betty Vargas Lara mi querida mala mujer, gracias por haber formado parte de mi vida, gracias por enseñarme lo que puede lograr una guerrera como tú. Sé que desde donde estás sigues cuidando de nosotros y algún día te volveremos a ver para seguir riendo a carcajadas. ¡Los quiero familia loca!

“Si no escalas la montaña jamás podrás disfrutar el paisaje”

Pablo Neruda

*A la memoria de la Dra.  
Silvia Leticia Verdín Terán*

Gracias porque este trabajo no habría sido posible sin usted, gracias por ser la persona extraordinaria que siempre fue con nosotras, por ser una guía, por la amistad brindada, por las horas de pláticas y enseñanzas que solo usted nos podía brindar, gracias por ser una maestra no solo académicamente sino también una maestra de vida y un ejemplo a seguir.

Hasta siempre

# Índice

## Resumen

	<b>Página</b>
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Diabetes Mellitus (DM).....	1
1.2 Clasificación.....	2
1.3 Diabetes Mellitus tipo 1.....	3
1.4 Diabetes Mellitus tipo 2.....	3
1.5 Diabetes Mellitus Gestacional.....	4
1.6 Daños de la hiperglucemia durante el desarrollo.....	5
1.7 Modelos de diabetes experimental.....	5
1.8. Estreptozotocina como modelo experimental.....	6
1.9 Influencia de Género.....	8
1.10 Placenta humana y células troncales.....	8
<b>2. Antecedentes</b> .....	9
<b>3. Justificación</b> .....	10
<b>4. Hipótesis</b> .....	11
<b>5. Objetivos</b> .....	12
<b>6. Materiales y Métodos</b> .....	13
6.1 Primera Fase.....	13
6.2 Segunda Fase.....	13
6.3 Tercera Fase.....	15
6.4 Análisis estadístico.....	16
<b>7. Resultados</b> .....	17
7.1 Glucosa sérica.....	17
7.2 Peso Corporal.....	18
7.3 Hemoglobina glicosilada.....	18
7.4 Número de fetos por camada.....	19
7.5 Parámetros bioquímicos.....	20
7.6 Tallas y Pesos de fetos.....	24
7.7 Malformaciones fetales.....	26
7.8 Histología.....	30
7.9 Inmunohistoquímica.....	38

8. <b>Discusión</b> .....	41
9. <b>Conclusiones</b> .....	46
10. <b>Referencias Bibliográficas</b> .....	47
11. <b>Anexos</b> .....	53
11.1 Parámetros Bioquímicos.....	53
11.2 Técnica Histológica Convencional.....	62
11.3 Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	64
11.4 Técnica para inmunohistoquímica con Peroxidasa.....	66

## Índice de Figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Mecanismo de acción de la STZ en células $\beta$ pancreáticas de ratas.....	7
<b>Figura 2.</b> Niveles de Glucosa Sérica en ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta.....	17
<b>Figura 3.</b> Peso corporal en gramos de ratas gestantes control y diabéticas preñadas con y sin implante de placenta.....	18
<b>Figura 4.</b> Niveles de Hb glicosilada en ratas gestantes control y diabéticas preñadas con y sin implante de placenta.....	19
<b>Figura 5.</b> Tamaño de camada de ratas gestantes diabéticas con y sin implante de placenta y ratas control.....	20
<b>Figura 6.</b> Niveles de creatinina en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta.....	21
<b>Figura 7.</b> Niveles de ácido úrico en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante.....	21
<b>Figura 8.</b> Niveles de urea en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta.....	22

<b>Figura 9.</b> Niveles de colesterol en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta.....	23
<b>Figura 10.</b> Niveles de triglicéridos en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta.....	24
<b>Figura 11.</b> Pesos de fetos por camada de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta.....	25
<b>Figura 12.</b> Tallas de fetos por camada de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta.....	25
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de viabilidad en ratas gestantes control y diabéticas con y sin placenta.....	26
<b>Figura 14.</b> Fetos de ratas control y diabéticas con y sin implante de placenta A-1) Diferencias entre cada grupo. A-2) Diferencias entre grupos diabéticos. A-3) Feto rata diabética. A-4) Feto rata no diabética.....	27
<b>Figura 15.</b> Fetos de ratas diabéticas con y sin implante, B-1) Hipoplasia de extremidad en feto de rata. B-2) Hematoma dorsal en feto de rata.....	29
<b>Figura 16.</b> Hígado de ratas gestantes diabéticas con y sin implante de placenta C-1) Grupo diabéticas sin implante. C-2) Grupo diabéticas con implante.....	31
<b>Figura 17.</b> Riñón de ratas gestantes diabéticas con y sin implante de placenta D-1) Grupo diabéticas sin implante. D-2) Grupo diabéticas con implante.....	33
<b>Figura 18.</b> Riñón del grupo diabético sin implante.....	34
<b>Figura 19.</b> Bazo de ratas diabéticas gestantes con y sin implante de placenta E-1) Grupo diabéticas con implante. E-2) Grupo diabéticas sin implante.....	35
<b>Figura 20.</b> Corazón de ratas diabéticas gestantes con y sin implante F-1) Grupo diabéticas con implante. F-2) Grupo diabéticas sin implante.....	36
<b>Figura 21.</b> Páncreas de ratas gestantes diabéticas con y sin implante G-1) Grupo diabéticas con implante. G-2) Grupo diabéticas sin implante.....	38
<b>Figura 22.</b> Inmunohistoquímica de los implantes de placenta recuperados de ratas gestantes diabéticas.....	39
<b>Figura 23.</b> Corte histológico de liofilizado de placenta humana sin implantar....	40

## Resumen

La Diabetes Mellitus (DM) es reconocida como una grave enfermedad metabólica a medida que el número de pacientes diabéticos crece mundialmente. Los principales síntomas de la DM son la poliuria, la polidipsia, la pérdida de peso y la hiperglucemia crónica con daño del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, que se asocia con daño a largo plazo de varios órganos, especialmente riñones, ojos, corazón y vasos sanguíneos. Puede existir una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  de los Islotes de Langerhans del páncreas, lo que causa déficit absoluto de insulina; o bien, intervenir agentes que condicionan una resistencia a la acción de la misma. Esto deriva en una clasificación que incluye a la DM tipo 1 y la DM tipo 2, además de introducir por separado a la diabetes gestacional. La hiperglucemia durante la gestación origina múltiples alteraciones, las cuales afectan la ovulación, el desarrollo embrionario, placentario y fetal. Estas anomalías dan como resultado un incremento en el índice de abortos espontáneos y de morbi-mortalidad perinatal, y en la ocurrencia de malformaciones congénitas. Por otra parte, la placenta humana es recientemente considerada como una fuente rica en células troncales, importantes como recurso renovable fuente de tejido. En el presente trabajo se realizó un estudio experimental utilizando ratas Wistar gestantes. Se formaron 4 grupos de 4 ratas Wistar preñadas [(Control con Implante, Control sin implante, Diabéticas con implante (DI) y Diabéticas sin implante (DSI)]; a las ratas de los grupos DI y DSI se les aplicó una dosis única de 60 mg/Kg de estreptozotocina vía i.p. para diabetizarlas, al cuarto día de gestación. A un grupo control y un grupo diabético, se les colocó el implante liofilizado de placenta en la región abdominal al quinto día de gestación. Durante la gestación se determinó peso y glucosa sanguínea. Se sacrificaron al día 19 de gestación y se contó el número de fetos por camada. Así mismo se obtuvieron muestras hígado, corazón, páncreas, riñón y bazo para realizar un análisis histopatológico, y se tomó una muestra de sangre para realizar química sanguínea.

En las ratas diabéticas con implante se observa una disminución en los niveles de glucosa sérica y de Hb glicosilada en comparación con el grupo de diabéticas sin implante; los pesos corporales no presentan diferencia significativa y el número de camada es muestra una tendencia a la baja en los grupos diabéticos. En cuanto a la química sanguínea los resultados no muestran diferencias significativas, a excepción del colesterol y triglicéridos que muestran una tendencia a la baja en el grupo diabético con implante con respecto a las diabéticas sin implante. El estudio histopatológico muestra que los órganos que presentan mayor daño son el riñón e hígado y el daño es más evidente y mayor en las ratas diabéticas sin implante. En cuanto a los fetos el mayor daño fue observado en el grupo diabético sin implante tanto en malformaciones como en reabsorciones. Esto sugiere que el implante, ayuda a controlar moderadamente algunos parámetros bioquímicos como triglicéridos y colesterol, pudiendo ejercer así un papel protector tanto para los órganos como para los fetos de ratas diabéticas, aunque aún se desconoce el mecanismo de acción del implante por lo que se sugiere realizar estudios más a fondo.

# 1. INTRODUCCIÓN

La palabra *diabetes* deriva del griego *diabeinen* “pasar a través” o “salir con fuerza”; mientras que *mellitus* deriva del latín y significa “dulce como la miel” (Greespan, 1998). La diabetes mellitus se presenta como un trastorno primario del metabolismo de carbohidratos, de etiología multifactorial, aunque destaca la influencia genética sobre la susceptibilidad para presentar deficiencia absoluta o relativa de insulina, resistencia a esta última o ambas, lo que lleva finalmente a hiperglucemia con las consecuencias a largo plazo de esta alteración (De Andaturati y cols., 2000).

## 1.1 Diabetes Mellitus (DM)

La diabetes mellitus ha sido reconocida como la más frecuente y grave enfermedad metabólica a medida que el número de pacientes diabéticos está creciendo en todo el mundo cada vez, es decir, es un problema de salud pública a nivel mundial. En México existen de 6.5 a 10 millones de personas diabéticas, mientras que se estima que para el año 2025 cerca de trescientos millones de personas padecerán esta enfermedad en el mundo, asociado todo esto a un incremento de las complicaciones vasculares, oftalmológicas y neurológicas y en respuesta una menor calidad de vida y muertes prematuras (Caja Costarricense de Seguro Social, Organización Panamericana de la Salud, 2007).

Los principales síntomas de la DM son la poliuria, la polidipsia, la pérdida de peso, algunas veces polifagia y visión borrosa además, la hiperglucemia crónica con daño del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, que se asocia con daño a largo plazo de varios órganos, especialmente riñones, ojos, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Espinoza, 2013).

El término “diabetes mellitus” engloba un conjunto heterogéneo de síndromes hiperglucémicos con características genofenotípicas diferentes y donde intervienen múltiples factores. Puede existir una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  de los Islotes de Langerhans del páncreas, lo que causa déficit absoluto de insulina; o bien, intervenir agentes que condicionan una resistencia a la acción de la misma. Esto deriva en una clasificación que incluye a la DM tipo 1 y la DM tipo 2, además de introducir por separado a la diabetes gestacional y otras categorías de intolerancia a la glucosa (American Diabetes Association, 2011).

## 1.2 Clasificación

Clasificar la DM de un individuo depende con frecuencia de las circunstancias en el momento del diagnóstico; muchas personas con diabetes no encajan fácilmente en una sola clase. Por ejemplo, una persona con DM gestacional (DMG) puede seguir con hiperglucemia después del parto y posteriormente mostrar los signos y síntomas propios de diagnóstico de DM tipo 2 (American Diabetes Association, 2011).

Actualmente la clasificación aceptada por la OMS para la DM está basada en la propuesta del National Diabetes Data Group en 1979. En dicha propuesta se utilizan números arábigos en lugar de romanos, por lo que ahora conocemos la DM tipo 1 antes conocida como diabetes insulino dependiente y la DM tipo 2 antes llamada diabetes no insulino dependiente. En 1997 la American Diabetes Association dio a conocer nuevos criterios para su clasificación dando como resultado cuatro grupos: DM tipo 1, DM tipo 2, Diabetes de tipo específico y DM Gestacional (Tébar y Escobar, 2009).

Dentro de la clasificación de la DM el tipo más frecuente es la DM tipo 2 ya que esta se presenta entre el 90 y 95% de las personas que son diagnosticadas con DM (Islas y Revilla, 2004).

### **1.3 Diabetes Mellitus tipo 1**

La DM tipo 1 corresponde a la entidad anteriormente denominada diabetes mellitus insulino dependiente o juvenil, en la que la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas conduce a una deficiencia absoluta de insulina.

En este padecimiento, las células  $\beta$  se destruyen, lo que conduce a la deficiencia absoluta de insulina. 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 y Escobar, 2009). Los factores ambientales pueden actuar a uno o varios niveles del suceso dinámico de la autodestrucción de las células  $\beta$  como iniciadores, participantes o aceleradores del comienzo de la larga historia de la autoagresión a la célula  $\beta$ . Se conoce con certeza que la DM1 se origina como consecuencia de la respuesta autoinmunitaria contra las células  $\beta$  mediada por células T (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidir, 2003).

### **1.4 Diabetes Mellitus tipo 2**

La DM tipo 2, es el tipo más frecuente, representa del 90 al 95% de las personas con DM. Patogénicamente se caracteriza por la resistencia a la acción periférica de la insulina, secreción de insulina defectuosa o ambas. Se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina pero se requiere también que exista una deficiencia en la producción de insulina, que puede o no ser predominante. Ambos fenómenos deben estar presentes (Tébar y Escobar, 2009). Estos componentes tiene una carga genética importante, pero sin la participación de factores ambientales, sobre todo, del sedentarismo, no se ponen en marcha los mecanismos que provocan la aparición clínica del cuadro (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidir, 2003)

## 1.5 Diabetes Mellitus Gestacional

Se tiene conocimiento de que las hormonas secretadas durante el embarazo tienen un efecto diabetogénico ya que producen alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos. Los estrógenos, la progesterona, el lactógeno y el cortisol, son antagonistas de la insulina; por lo tanto la captación periférica y la utilización de la glucosa disminuyen. Además de lo anterior, la placenta capta y destruye la insulina, lo que contribuye a agravar el problema; sin embargo, el páncreas tiende a producir mayor cantidad de insulina para mantener una buena tolerancia a la glucosa (Malacara, 1990).

Por otro lado, se sabe que el embarazo es una condición metabólica de tipo oxidativa en que la unidad feto-placentaria se forma a expensas de la madre (Acevedo et al., 2007). El ambiente hiperglucémico e hiperlipémico que rodea al embrión genera sustancias oxidantes con alta capacidad para dañar la estructura de las biomoléculas y alterar las funciones en que ellas participan. Dichas sustancias pudieran provocar cambios en eventos de señalización cruciales durante determinados períodos del desarrollo, afectar la expresión de genes relacionados con la morfogénesis y producir daño estructural del material genético, mecanismos que han sido implicados en la embriopatía diabética (Loeken, 2006).

La descompensación de la enfermedad alrededor del período de organogénesis ha sido relacionada con un espectro de alteraciones del desarrollo que incluye: anomalías del sistema nervioso, cardiovascular, renal, sistema esquelético, retardo en el crecimiento y aborto (García y García, 2009).

La inaccesibilidad para estudiar la etiología de la DM en humanos, y la imposibilidad de identificar en las pacientes diabéticas gestantes los teratógenos que afectan la embriogénesis, supone un obstáculo en el conocimiento de estas causas. Por esta razón se hace necesario recurrir a modelos experimentales, ya que las características generales de la diabetes en animales son similares a las de la diabetes humana.

## **1.6 Daños de la hiperglucemia durante el desarrollo**

La hiperglucemia durante la gestación origina múltiples alteraciones, las cuales afectan la ovulación, el desarrollo embrionario, placentario y fetal. Estas anomalías dan como resultado un incremento en el índice de abortos espontáneos y de morbi-mortalidad perinatal, y en la ocurrencia de malformaciones congénitas, de dos a cinco veces más frecuentes en los hijos de madres diabéticas que en el resto de la población (Carpenter, 2007).

Si nos referimos al daño inducido por la hiperglucemia materna durante el desarrollo temprano y la organogénesis embrionaria, observaremos que la exposición a un entorno diabético dentro de las primeras siete semanas de embarazo en humanos podría resultar en la pérdida de embriones preimplantatorios, en un incremento en el índice de reabsorciones, en la aparición de malformaciones congénitas y en retrasos en el desarrollo y en el crecimiento embrionarios. Durante la vida fetal, las principales alteraciones inducidas por la diabetes pregestacional o gestacional están relacionadas con la aparición de macrosomía, bajo peso intrauterino, la presencia del síndrome de dificultad respiratoria neonatal, hipoglucemia, hipocalcemia o hipomagnesemia neonatal. También existen complicaciones a largo plazo, relacionadas con una producción anómala de insulina o con una resistencia a la hormona por parte de los tejidos periféricos (González, 2005).

## **1.7 Modelos de diabetes experimental**

Como se mencionó anteriormente, existen impedimentos técnicos y éticos que impiden el estudio de estos eventos en la especie humana, por lo que el investigador debe recurrir al uso de modelos, ya sea naturales (diabetes espontánea en varias especies de mamíferos) o artificiales (inducción de diabetes en animales por métodos quirúrgicos, químicos o biológicos) para el estudio de la interacción entre la diabetes y la gestación (Ramos y Méndez, 1994).

Uno de estos modelos es la diabetes química, en la que la administración de ciertas sustancias químicas a animales provoca síntomas similares a la diabetes. Entre estos químicos, la aloxana y la estreptozotocina (STZ) han mostrado ser los más efectivos, razón por la cual son los más comúnmente utilizados. Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células  $\beta$  pancreáticas. Ambas sustancias actúan destruyendo las células  $\beta$ -pancreáticas; sin embargo, aunque los niveles de insulina en los animales tratados son muy bajos, no hay ausencia total de la hormona por lo que pueden sobrevivir durante meses sin tratamiento con insulina (Mora et al., 2009).

La diabetes permanente se ha desarrollado mediante la inyección de estreptozotocina (STZ) desde el año 1963, siendo uno de los modelos experimentales más utilizado actualmente (Tomlinson et al., 1992).

### **1.8 Estreptozotocina como modelo experimental**

La STZ es un antibiótico producido por el hongo *Streptomyces achromogenes*, su denominación química es 2-deoxy-2(metil-3-nitrosourea)-1-D-gucopiranososa, y se utiliza para inducir tanto diabetes dependiente de insulina como no dependiente de insulina, de acuerdo al esquema de administración. En ciertas especies de mamíferos y aves al ser administrada causa diabetes permanentes, ya que provoca un daño irreversible en las células  $\beta$  pancreáticas (Tomlinson et al., 1992).

La STZ produce insulinismo pancreático por la destrucción progresiva de las células  $\beta$ . La STZ es absorbida por las células  $\beta$  pancreáticas a través del transportador de glucosa GLUT2, es un agente metilante que daña al DNA, dado que opera como donador de óxido nítrico en los islotes pancreáticos, induciendo la muerte de la célula  $\beta$ . La principal razón para la muerte de las células  $\beta$ , inducida por la STZ, es la alquilación del DNA. Esta actividad está relacionada con su residuo nitrosourea, especialmente en la posición del oxígeno-6 de la guanina. Durante el metabolismo de la STZ, se producen una gran variedad de intermediarios tóxicos, entre los que se encuentran agentes alquilantes como los

radicales metilo, así como especies reactivas de oxígeno; además de esto la STZ libera óxido nítrico (NO) (Turk et al., 1993). Por efecto citotóxico de este metabolito, las células  $\beta$  del páncreas sufren un proceso de apoptosis que lleva a que el organismo presente una sintomatología que semeja la que se presenta en la DM1 (Szkudelski, 2001).

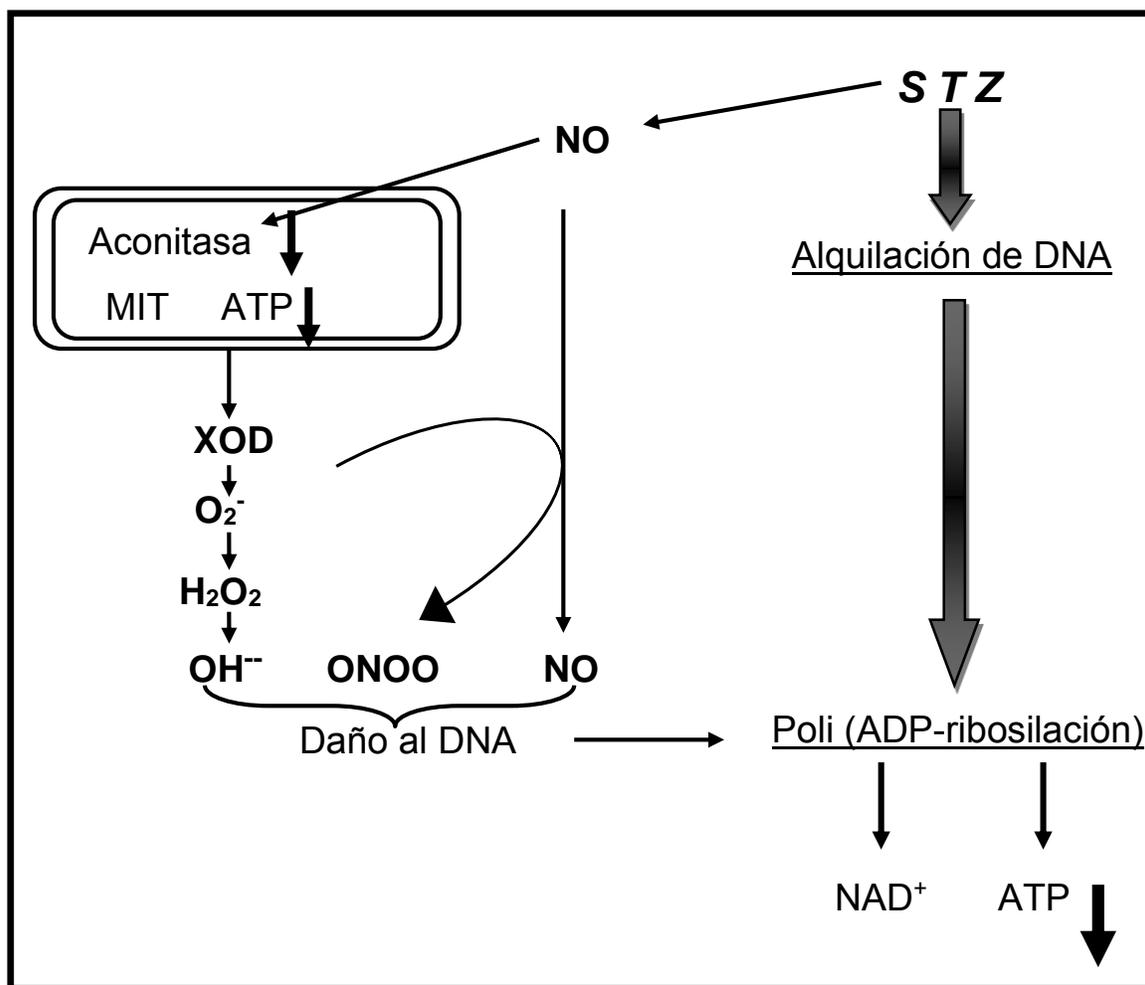


Figura 1. Mecanismo de acción de la STZ en células  $\beta$  pancreáticas de ratas (Tomado de Szkudelski, 2001).

## **1.9 Influencia de Género**

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

## **1.10 Placenta humana y células madre**

La placenta humana a término es generalmente considerada como desecho médico en la sala de partos. Recientemente, las células troncales multipotentes derivadas de placenta humana (PDMSCs) a término han sido aisladas y han demostrado poseer la capacidad de una diferenciación multi-linaje (Chiou et al., 2009). Además de jugar un papel fundamental y esencial en el desarrollo fetal, la nutrición, y la tolerancia, la placenta puede también representar una reserva de células madre o progenitoras. Las células troncales embrionarias (HESCs) han recibido mucha atención en los últimos años, debido a su potencial como un recurso renovable fuente de tejido para la diferenciación de las células beta, sin embargo, las cuestiones éticas que rodean el uso de las HESCs limitan su uso en la aplicación clínica de células. Se sabe que el saco vitelino, la placenta y el páncreas de humano y ratón son los únicos tejidos que producen insulina. Basándose en esto Kadam, et al. (2012) propusieron que las PDMSCs pueden actuar como sustitutos de las células  $\beta$ , por lo tanto se supone que es probable que puedan ayudar a reducir la hiperglucemia a través de secreción de insulina.

## 2. ANTECEDENTES

En la clínica de acupuntura de la FES Iztacala desde 1988 se ha utilizado el implante de placenta liofilizada en pacientes con diversas patologías como diabetes, hipertensión y artritis reumatoide, y se han obtenido buenos resultados en mejoría clínica de la mayoría de los pacientes. De acuerdo a lo observado por el M.C. Miguel Jesús Reyes Campos los mejores resultados se han visto en pacientes diabéticos. Para descartar el efecto placebo, recientemente, en el Laboratorio de Inmunobiología de la FES Iztacala, se realizó un estudio con ratas Wistar 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); resultados que son alentadores para continuar estudiando esta alternativa terapéutica.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido al alto índice de daños provocados por la DM tanto en individuos no gestantes como en la gestación y conociendo las propiedades que puede llegar a tener el uso de la placenta como una terapia para la diabetes, así como el hecho de que hasta la fecha no se han reportado trabajos de investigación básica o en pacientes diabéticos con implante subcutáneo de placenta humana, además de que no se conocen los mecanismos que desencadena el implante para poder lograr un control de la diabetes, son importantes los trabajos que proporcionen información acerca de cómo es que actúa dicho implante ante tal padecimiento.

#### 4. HIPÓTESIS

Considerando la precedencia del implante liofilizado de placenta humana y que pudiera conservar propiedades de las células troncales, y estas pueden tener potencial como progenitoras de células  $\beta$  y así ser probable que puedan ayudar a reducir la hiperglucemia y los daños que causa ésta durante la gestación, se espera que dicho implante tenga un efecto positivo tanto en la regulación del nivel de glucosa de las ratas Wistar gestantes como en el daño teratogénico de la hiperglucemia sobre las crías, asimismo que ayude a reducir el daño a los órganos.

## 5. OBJETIVOS

### General

Evaluar el efecto del implante liofilizado de placenta en ratas *Wistar* gestantes, con diabetes inducida por STZ.

### Particulares

- Evaluar los niveles de glucosa y peso corporal en ratas *Wistar*, gestantes, con diabetes inducida por STZ.
- Medir los niveles de Hb glicosilada en ratas *Wistar*, gestantes, con diabetes inducida por STZ.
- Cuantificar los niveles de triglicéridos, colesterol, urea y creatinina en sangre, de ratas *Wistar*, gestantes, con diabetes inducida por STZ.
- Determinar el daño en páncreas, hígado, riñón, bazo y corazón mediante histología, en ratas *Wistar*, gestantes, con diabetes inducida por STZ.
- Estimar el efecto de la hiperglucemia y así mismo el efecto del implante de liofilizado de placenta sobre los fetos de ratas diabéticas.
- Detectar la posible presencia de células troncales en el implante liofilizado de placenta humana recuperado de los organismos, mediante la técnica de inmunohistoquímica.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El periodo de experimentación constó de tres fases.

### 6.1 Primera Fase

Se utilizaron 16 ratas hembra, de la cepa *Wistar*, de entre 200 y 250 g de peso corporal, y 8 ratas machos, de la misma cepa en edad reproductiva, de entre 350 y 400 g, que se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los sujetos experimentales se conservaron en condiciones controladas de luz, temperatura y alimentación en dicho bioterio. Se aparearon por el método de trío y al día siguiente entre las 7:00 y 8:00 am se les realizó un frotis vaginal con ayuda de una micropipeta y solución salina. Los frotis fueron observados en el microscopio óptico para determinar si la fertilización fue realizada, y se asignó como día 0 de gestación el día en que se observó presencia de espermatozoides en el frotis vaginal.

### 6.2 Segunda Fase

#### Inducción de Diabetes

Las ratas hembras en el día 0 de gestación se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de cuatro ratas. A dos grupos, en el cuarto día de gestación, se les aplicó una dosis única de 60 mg/Kg de estreptozotocina vía i.p., disuelta en un buffer de citrato pH 4.5 (Velázquez, 2008), y a las 24 h se midió la glucosa con ayuda de tiras reactivas y un glucómetro (estuche comercial: ACCU-CHECK Active Roche®), al ser los niveles de glucosa mayores a 400 mg/dL, fueron consideradas como ratas diabéticas. Los otros dos grupos se inyectaron con el vehículo (buffer de citratos).

### Colocación del Implante Liofilizado de Placenta

Para la colocación del implante se anestesió a las ratas 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 región abdominal para la colocación del liofilizado de placenta humana (500 mg/Kg).

Dicho implante fue colocado a uno de los dos grupos diabéticos, en el quinto día de gestación, y el otro grupo fue considerado como control con diabetes. De los otros dos grupos que se mantuvieron sanos, a uno de ellos se le colocó de igual manera el implante liofilizado de placenta humana en el quinto día de gestación, y el otro grupo fue tomado como control sin diabetes.

Posterior a la colocación del implante se realizó la medición de glucosa sanguínea con tiras reactivas y un glucómetro, y se determinó peso cada tercer día durante 14 días. Al día 19 de gestación las ratas fueron sacrificadas mediante sobredosis de anestesia (pentobarbital sódico 200 mg/Kg) por vía i.p.

El implante liofilizado de placenta humana fue 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 que las ratas estuvieron sobreanestesiadas, y antes de la muerte cardíaca, se tomó directamente del corazón la mayor cantidad de sangre posible, que fue dividida en dos partes, una de ellas se destinó para realizar la determinación de Hb glicosilada, la otra fue centrifugada en una microcentrifuga a 10,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, para obtener el suero y medir niveles de triglicéridos, colesterol, urea y creatinina. 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 desproteización 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 ácido 2,4,6 tribromo -3- 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.

Además se tomó una muestra de páncreas, hígado, riñón, bazo y corazón para realizar cortes histológicos y determinar el daño que tienen cada uno de estos órganos. Dichos órganos fueron fijados en paraformaldehído al 4% en frío.

Se obtuvieron los fetos por laparoscopia de cada una de las ratas y se obtuvo el tamaño de camada por rata. Cada feto fue pesado y medido con una regleta vernier. Las crías fueron fijadas en paraformadehído al 4% en frío. Se hicieron observaciones a nivel macroscópico para tratar de encontrar probables malformaciones. Las placentas fueron medidas y pesadas y se fijaron en fijador de zinc.

### **6.3 Tercera Fase**

#### Análisis Histológico

Las muestras de los tejidos se procesaron con la técnica histológica de rutina de inclusión en parafina (Anexo 2), y se realizaron cortes de 5 µm en un micrótomo de rotación marca Leica, modelo RM2125 RTS y posteriormente se realizó la tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (Anexo 3). Se observó el daño tisular en dichas muestras.

De los implantes de placenta liofilizados que fueron recuperados de las ratas, se realizaron también cortes histológicos para la determinación de marcadores de

células troncales mediante inmunohistoquímica. Se usaron 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 (Reino Unido); como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpo de burro anti IgG de ratón (donkey anti Mouse) IgG-HRP y anticuerpo de chivo anti IgG de conejo (Goat anti Rabbit) IgG-HRP ambos de la marca Santa Cruz Biotech. (CA USA), en dilución 1:200, 1:400 y 1:800 en ambos casos, y se reveló con peroxidasa (Anexo 3).

La observación de las muestras y la captura de imágenes se realizaron en un microscopio óptico Leica DM500, con cámara digital EC3 (Leica Microsystems, Germany), y se analizaron con el software Leica LAS EZ.

#### **6. 4 Análisis estadísticos**

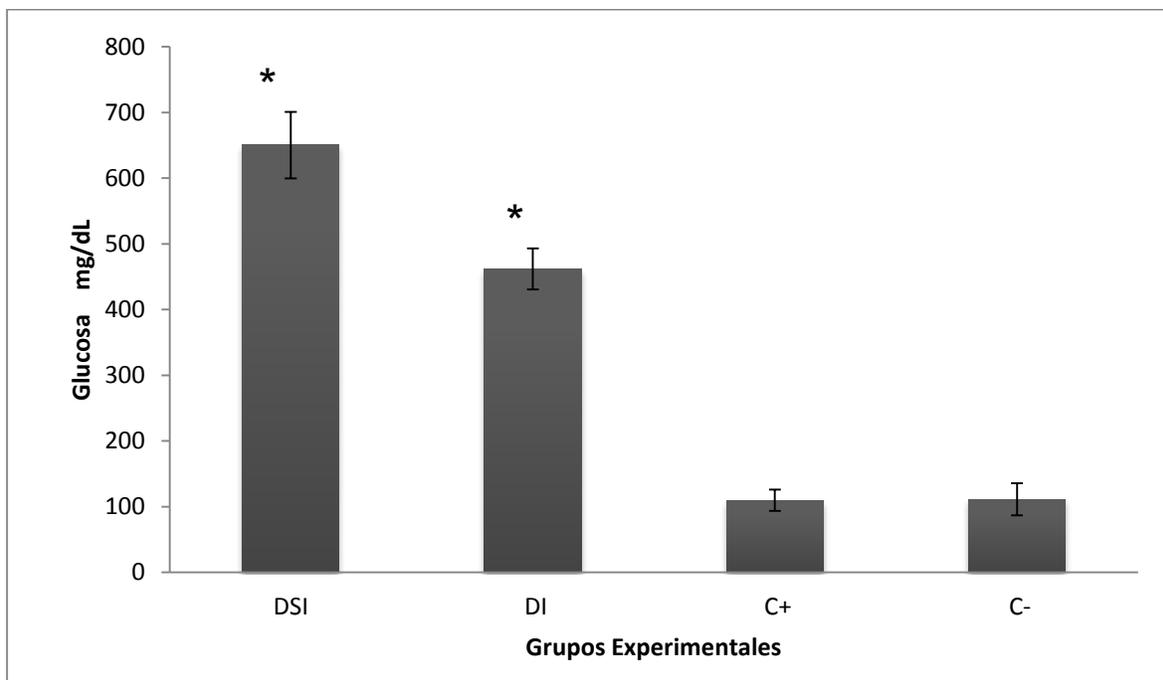
El análisis de los datos de peso corporal, glucosa sérica, hemoglobina glicosilada, y otros parámetros bioquímicos se llevó a cabo mediante la prueba de ANOVA de dos factores, en el paquete SAS 9.0. El análisis de la frecuencia de reabsorciones se llevó a cabo mediante una prueba de chi-cuadrada.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Glucosa sérica

En cuanto a la glucosa sérica, la medición cada tercer día durante el periodo de gestación, tanto de los grupos control con implante (C+) y control sin implante (C-) como del grupo Diabético con implante (DI) y Diabético sin Implante (DSI) son presentados en la gráfica que se realizó para observar mejor las diferencias entre cada grupo y se muestran en la Figura 2.

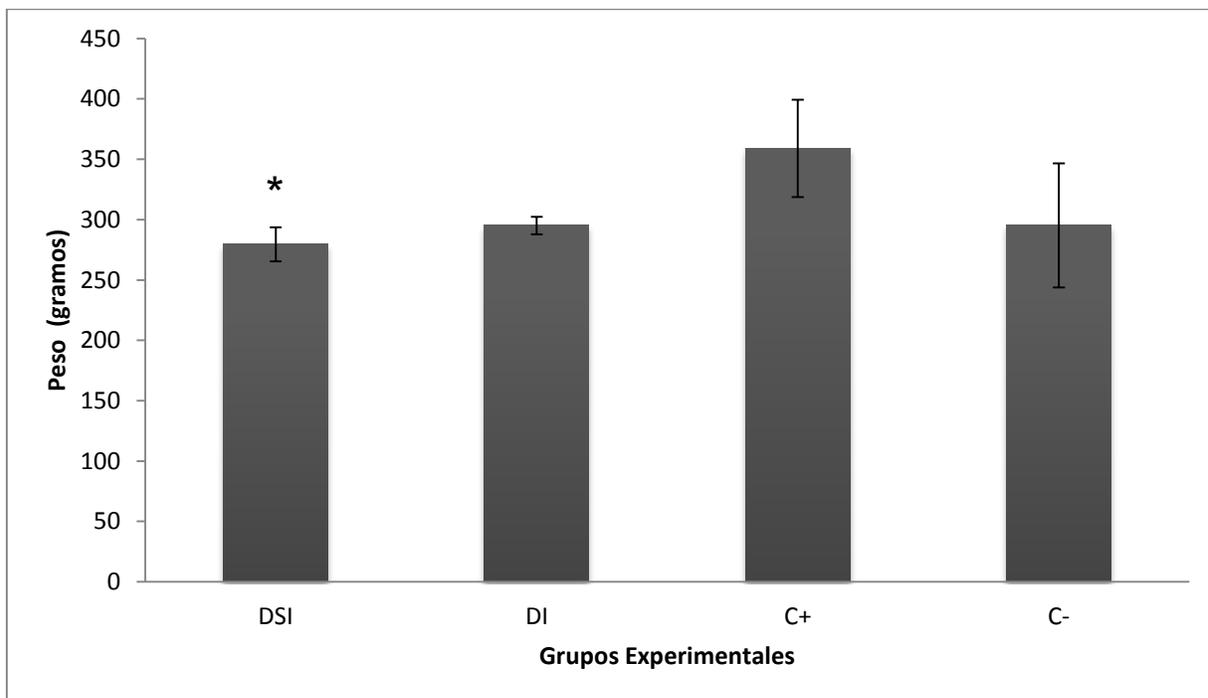
En los niveles de glucosa sérica se puede observar que el valor más alto corresponde al grupo DSI con un promedio de 650.35 mg/dL seguido del grupo DI con 461.95 mg/dL, resultados que contrastan con los de los grupos control donde los promedios son de C+ 111.2 mg/dL y C- 109.7 mg/dL, que son valores que están dentro de los niveles normales de glucosa para dicha especie.



*Figura 2. Niveles de glucosa sérica en ratas gestantes control y diabéticas, con y sin implante de placenta. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (ANOVA de dos factores).*

## 7.2 Peso corporal

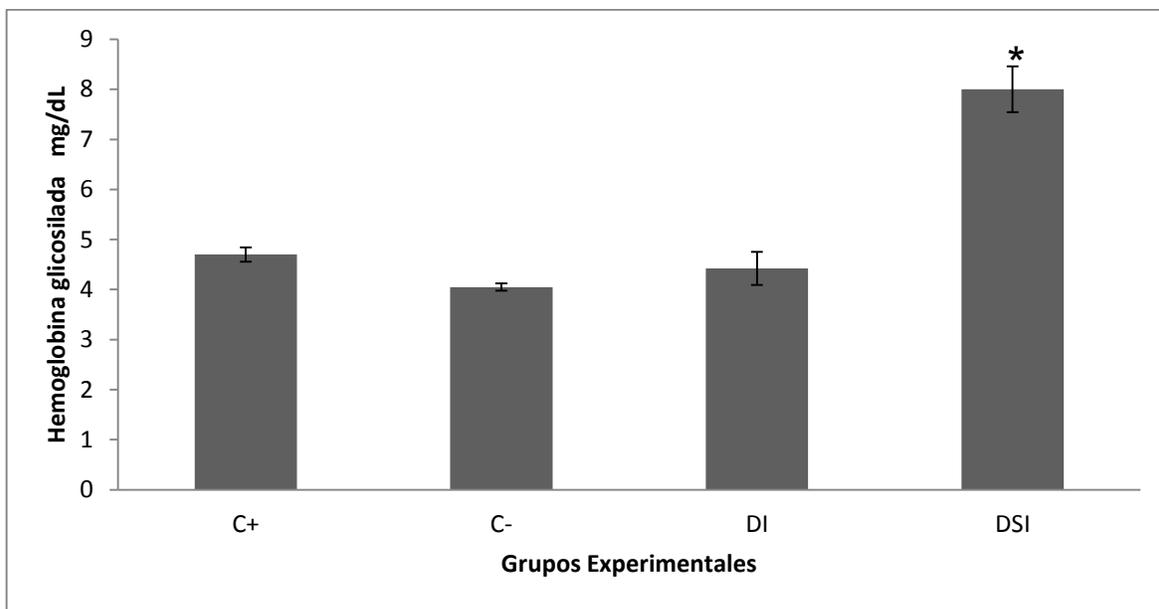
En estos resultados se puede observar que los promedios de tres de los grupos son similares, con valores de 279.5 y 295.1 g para los grupos DSI y DI respectivamente, y son parecidos al grupo C- con 295.2 g; pero se puede ver que el grupo control con implante (C+) presenta un valor de 359.05 g, lo que significa una tendencia ligeramente elevada con respecto al resto de los grupos (Figura 3).



*Figura 3. Peso corporal en gramos de ratas gestantes control y diabéticas, con y sin implante de placenta. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a los grupos control positivo (ANOVA de dos factores).*

## 7.3 Hemoglobina glicosilada

Para los niveles de Hb glicosilada, los resultados se muestran en la figura 4, en la que se presentan los promedios de los valores en los grupos control, C+ con un valor de 4.7 mg/dL, y C- con 4.05 mg/dL así como en los grupos de ratas diabéticas, DI con un valor de 4.42 mg/dL y DSI con 8 mg/dL.



*Figura 4. Niveles de Hb glicosilada en ratas diabéticas gestantes control y preñadas con y sin implante de placenta. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (ANOVA de dos factores).*

#### **7.4 Tamaño de camada**

Con respecto al tamaño de camada de los distintos grupos, éstos se observan en la Figura 5; se puede observar que este parámetro no se afecta por el estado diabético o la colocación del implante. Aquí se presentaron desviaciones estándar muy grandes debido a que el número de fetos en cada rata fue variado dentro de cada grupo experimental, lo cual es normal para esta especie, y para esta cepa.

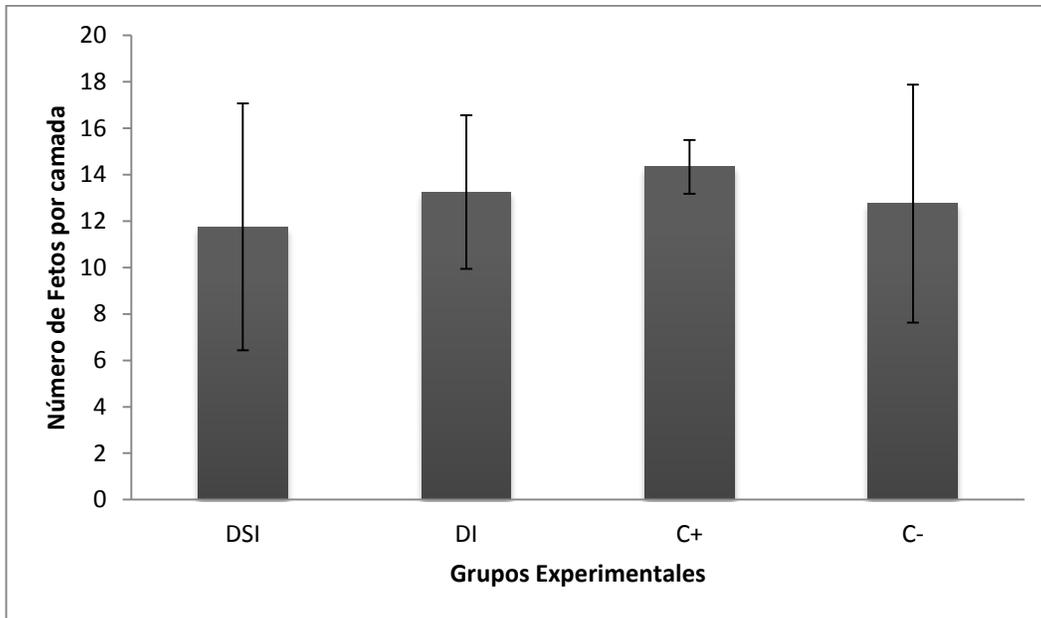


Figura 5. Tamaño de camada de ratas diabéticas con y sin implante liofilizado y ratas control. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. No hay diferencias significativas entre grupos (ANOVA de dos factores).

## 7.5 Parámetros Bioquímicos

Los resultados de las pruebas de laboratorio para los parámetros bioquímicos (creatinina, ácido úrico, urea, colesterol y triglicéridos) se muestran en las siguientes figuras (6 a 10), en ellas se puede observar la comparación entre cada uno de los grupos y se nota el contraste entre las ratas control y las ratas diabéticas.

Los valores en los parámetros de creatinina se muestran en la figura 6, en la cual se observa que ésta presentó valores de 0.8 y 0.82 mg/dL para los grupos control, 0.92 mg/dL en el grupo DI y 0.77 mg/dL para el grupo DSI.

Por otro lado los valores de ácido úrico fueron de 1.6 y 2.3 mg/dL para los grupos control (C+ y C-), 3.5 mg/dL en el grupo DI y 7.1 mg/dL para el grupo DSI (Figura 7).

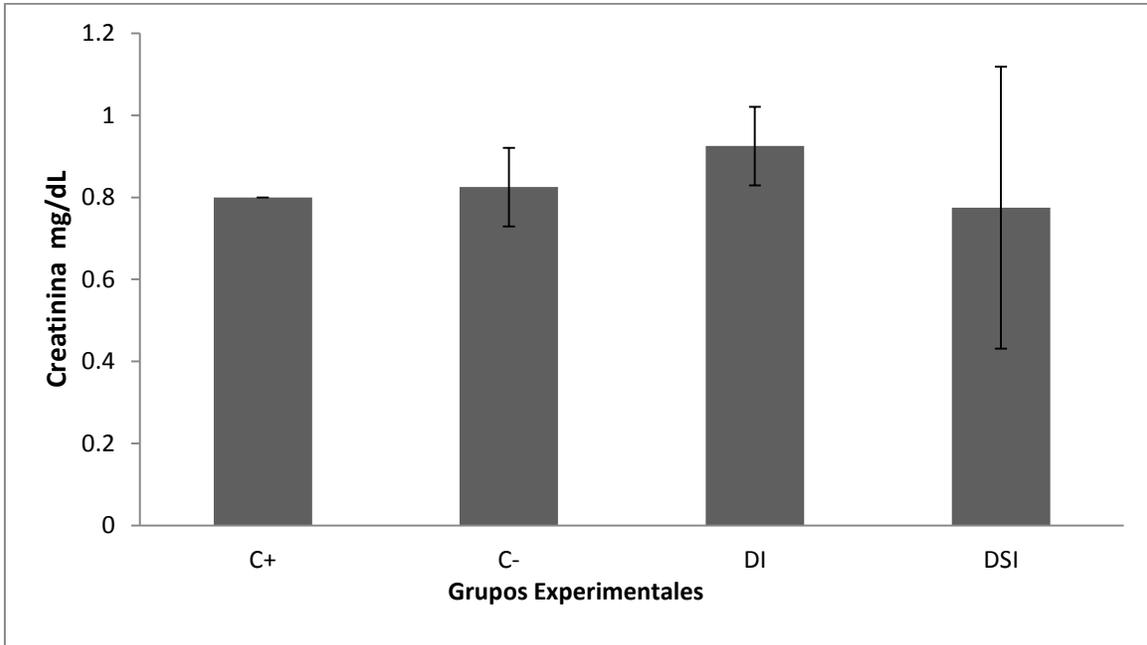


Figura 6. Niveles de creatinina en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. No hay diferencias significativas entre grupos.

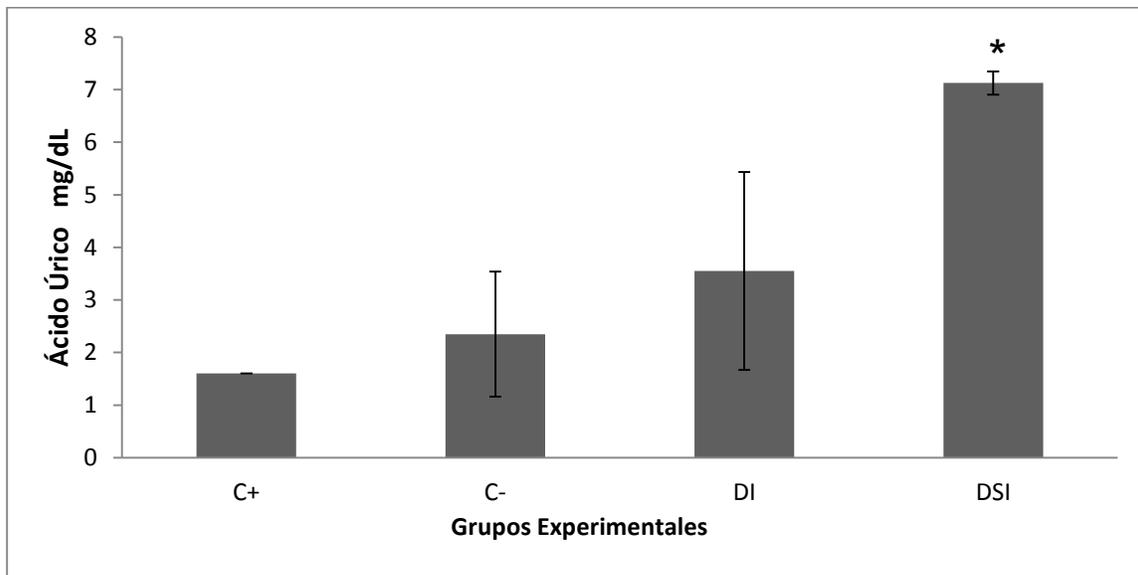
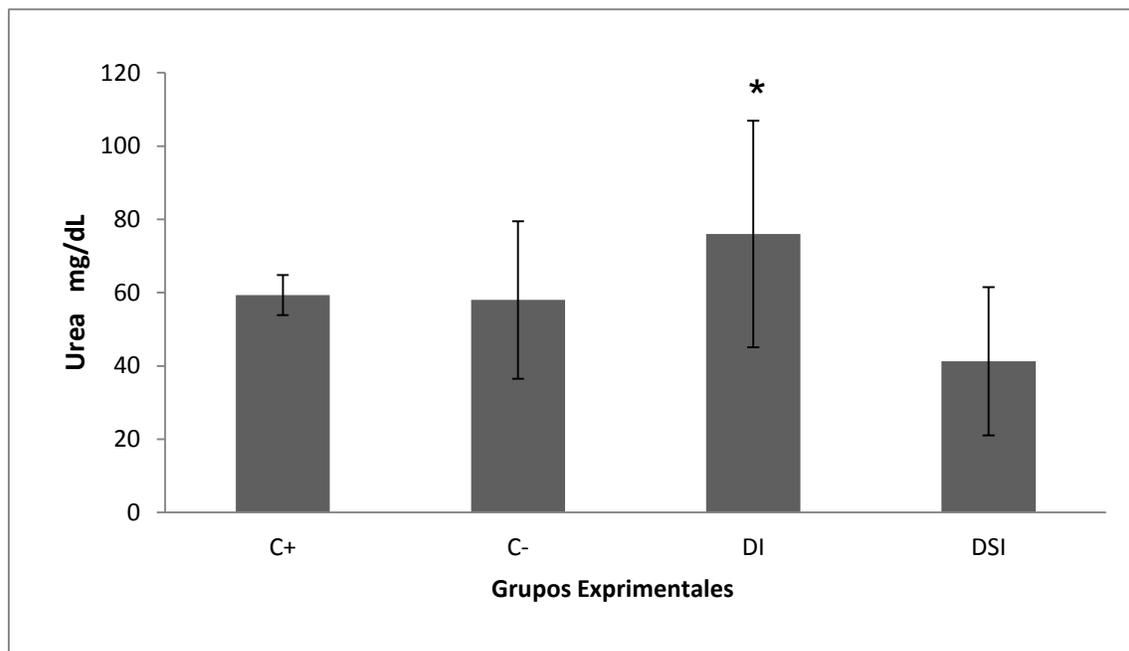


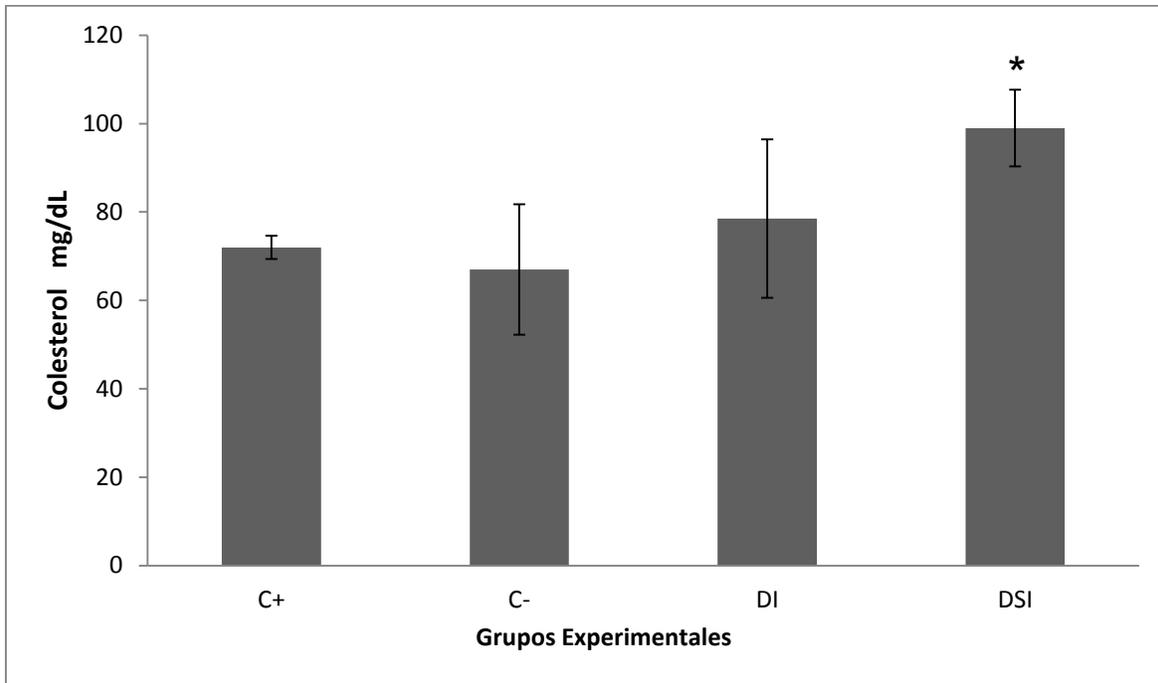
Figura 7. Niveles de ácido úrico en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con implante de placenta. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (ANOVA de dos factores).

En cuanto a los resultados de urea se muestra un valor de 59.3 y 58 mg/dL para los grupos control positivo y negativo respectivamente, mientras que en el grupo DI el valor es de 76 mg/dL y para el grupo DSI el valor fue de 41.2 mg/dL (Figura 8).



*Figura 8. Niveles de urea en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (ANOVA de dos factores).*

Los resultados de colesterol se muestran en la figura 9 y en ella se observa un valor de 78 y 67 mg/dL para los grupos control C+ y C- respectivamente, en el grupo DI se tiene un valor de 78.5 mg/dL y para el grupo DSI el valor es de 98.3 mg/dL, presentando una tendencia elevada en comparación con los otros grupos.



*Figura 9. Niveles de colesterol en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (ANOVA de dos factores).*

Para los triglicéridos se obtuvo un valor de 114 y 147.25 mg/dL en los grupos C+ y C- respectivamente, mientras que en el grupo DI el valor obtenido fue de 189 mg/dL y el grupo DSI mostró un valor de 360.7 mg/dL; observándose que éste valor estuvo muy elevado en comparación con los otros grupos incluido el grupo DI.

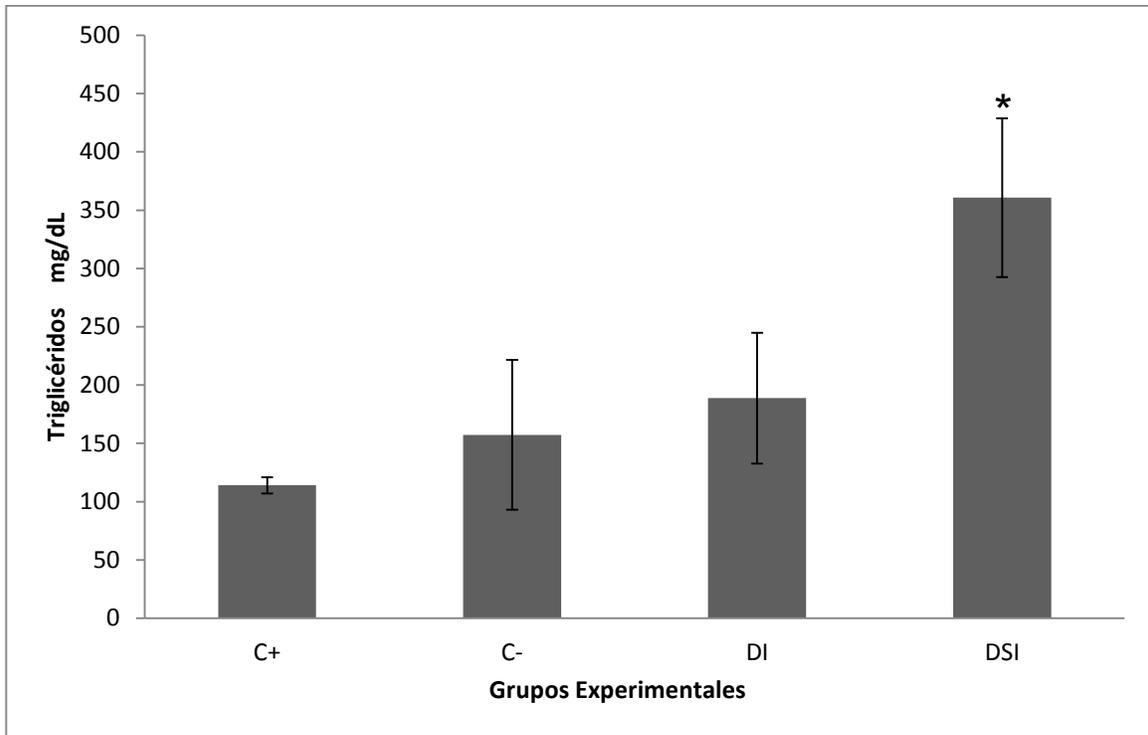


Figura 10. Niveles de triglicéridos en sangre de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (ANOVA de dos factores).

## 7.6 Tallas y Pesos de fetos

Por otra parte, para determinar el efecto de la hiperglucemia en los fetos, éstos se pesaron y midieron y se obtuvo el promedio por grupos. Se puede observar que el grupo que presentó los pesos más bajos es el grupo de diabéticas sin implante, pues presenta mayor diferencia con respecto al grupo control sin implante, mientras que las tallas fueron más homogéneas, pero se observa que nuevamente el grupo de diabéticas sin implante presenta una mayor diferencia con respecto a los otros grupos (Figura 11 y 12).

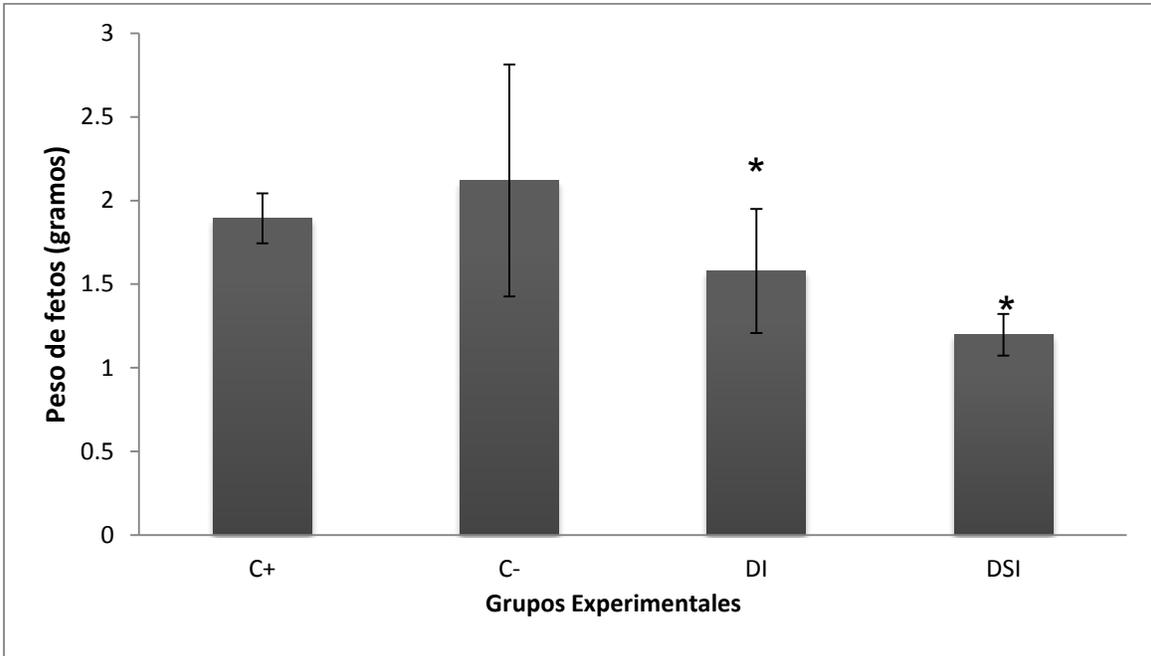


Figura 11. Pesos de fetos por camada de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta; promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (ANOVA de dos factores).

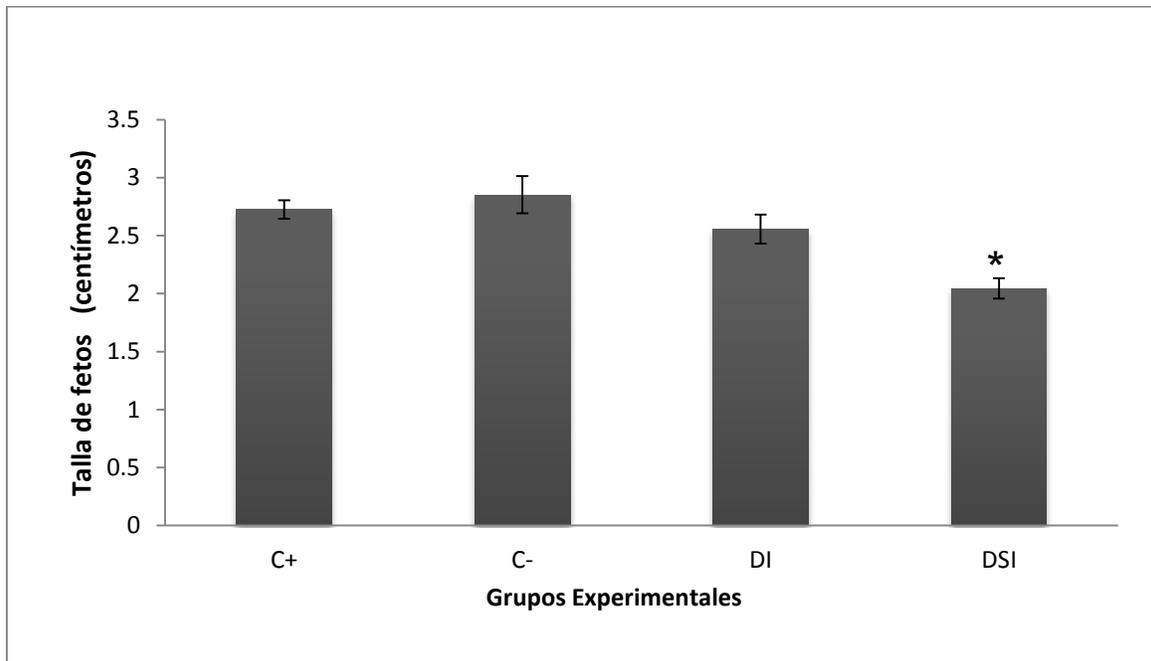


Figura 12. Tallas de fetos por camada de ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta; promedio  $\pm$  desviación estándar de 4 determinaciones independientes. \* $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (ANOVA de dos factores).

En cuanto a las reabsorciones, estas se dieron mayormente dentro del grupo de las ratas diabéticas sin implante (DSI), en comparación con el grupo de diabéticas con implante, mientras que en los grupos control el porcentaje es muy bajo, y cae dentro del porcentaje de reabsorciones normal para esta especie (Figura 13).

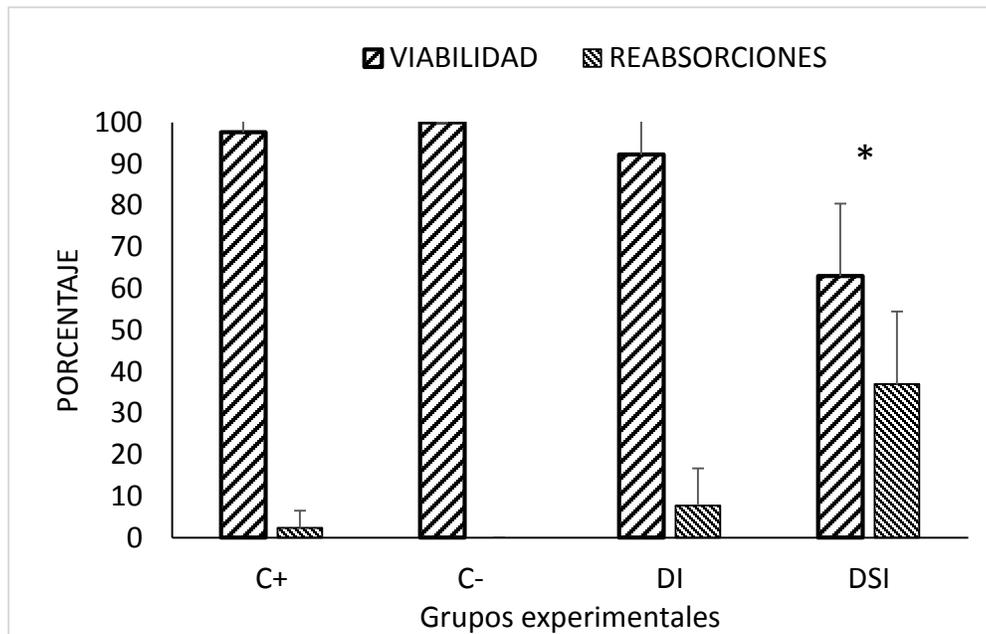
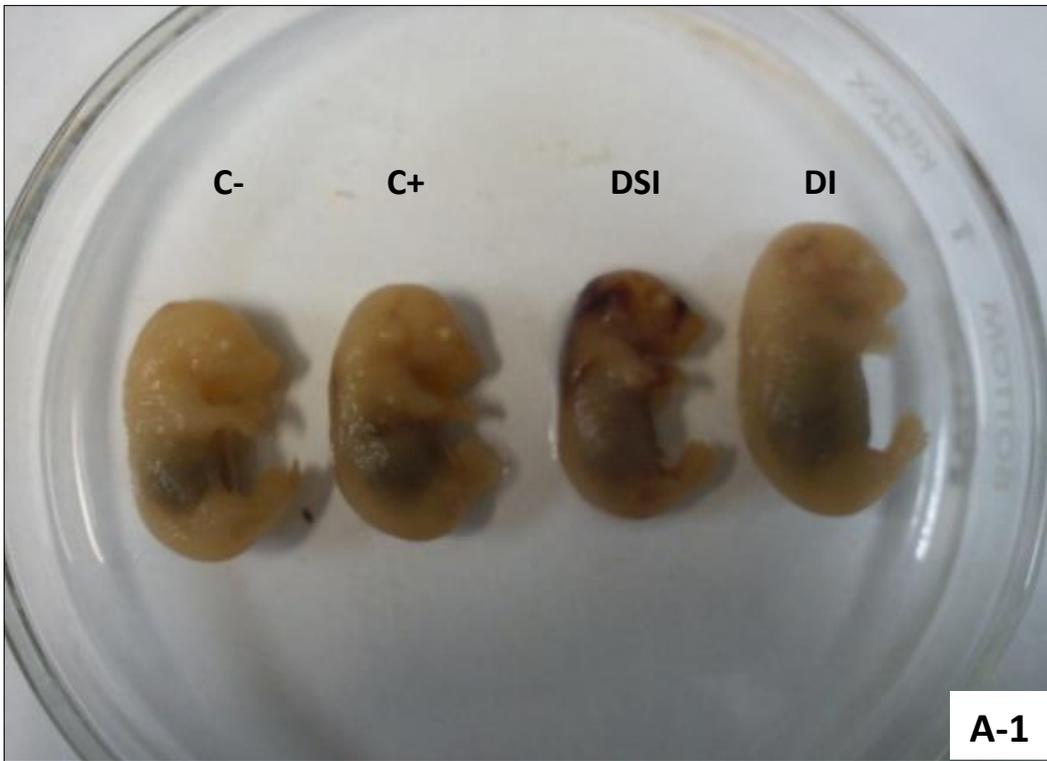


Figura 13. Porcentaje de viabilidad en ratas gestantes control y diabéticas con y sin implante de placenta.  $P < 0.05$  con respecto a ambos controles (chi-cuadrada).

### 7.7 Malformaciones fetales

Durante la observación macroscópica de los fetos se pudieron determinar dos tipos de malformaciones fetales: hipoplasia de extremidades en algunas de las crías del grupo diabéticas sin implante y mayormente hematomas dorsales; los cuales se observaron en tres de los grupos pero su mayoría en el grupo diabéticas sin implante (Figuras 14 y 15).





*Figura 14. Fetos de ratas control y diabéticas con y sin implante de placenta. A-1, diferencias entre fetos de cada uno de los grupos. A-2, diferencias de fetos entre los grupos diabéticos. A-3, feto de rata diabética sin implante comprada con un feto de rata no diabética (A-4).*

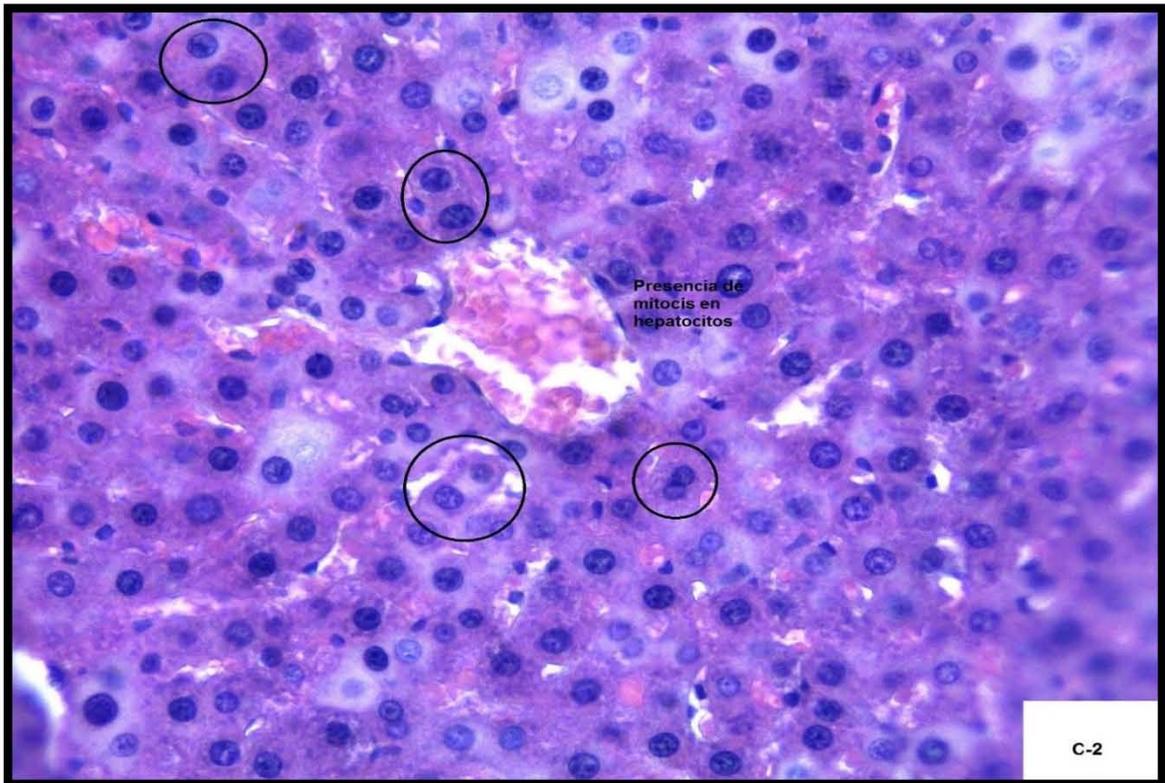
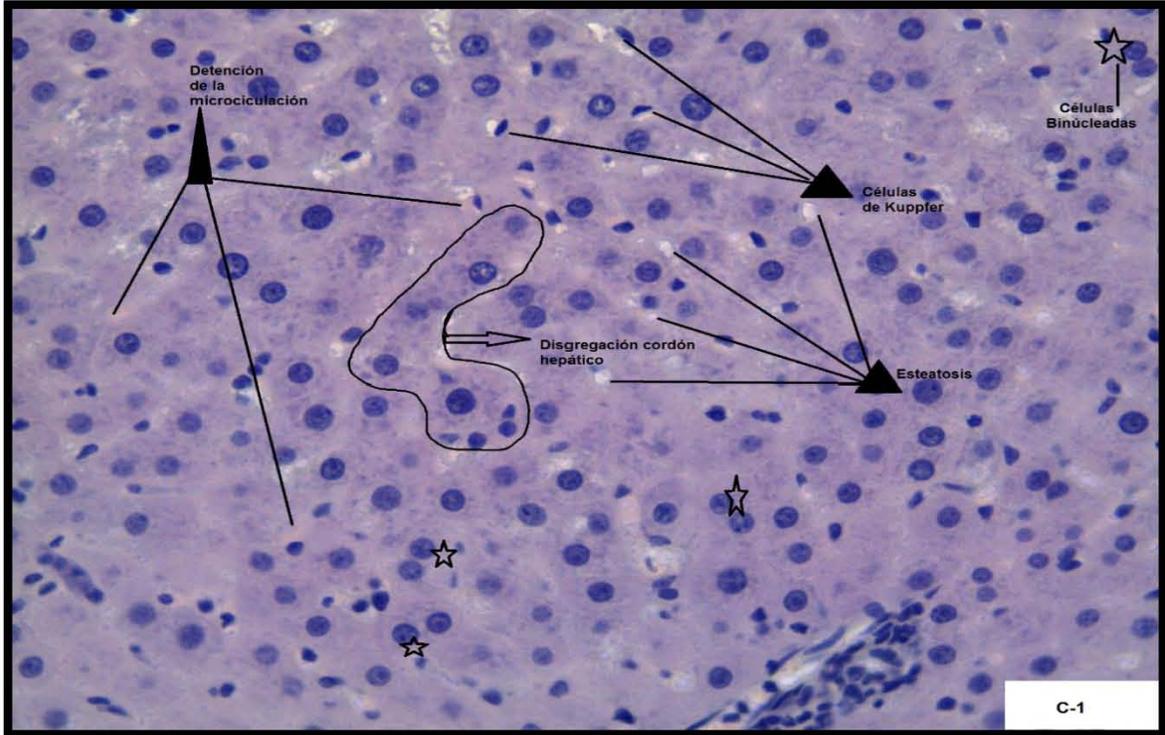


*Figura 15. Fetos de ratas diabéticas con y sin implante. B-1, hipoplasia de extremidad (círculo rojo) en un feto de rata diabética sin implante. B-2, comparación entre fetos de rata diabética con y sin implante, apreciación de hematoma dorsal.*

## 7.8 Histología

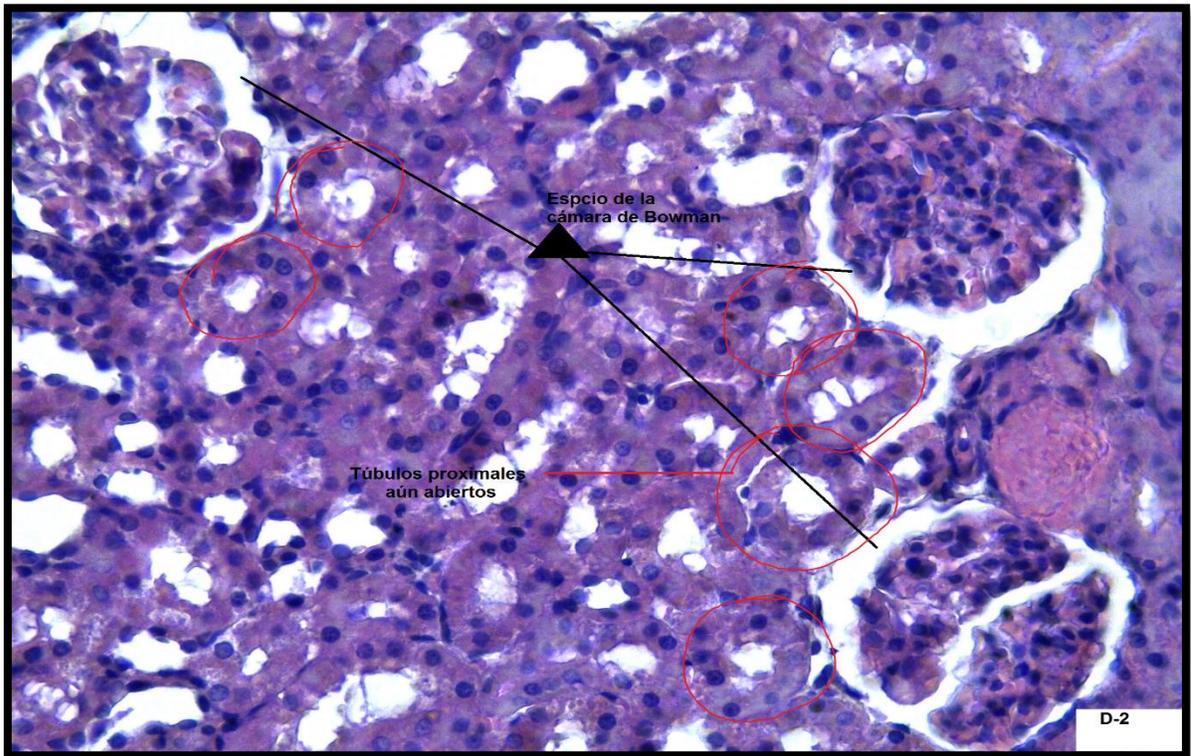
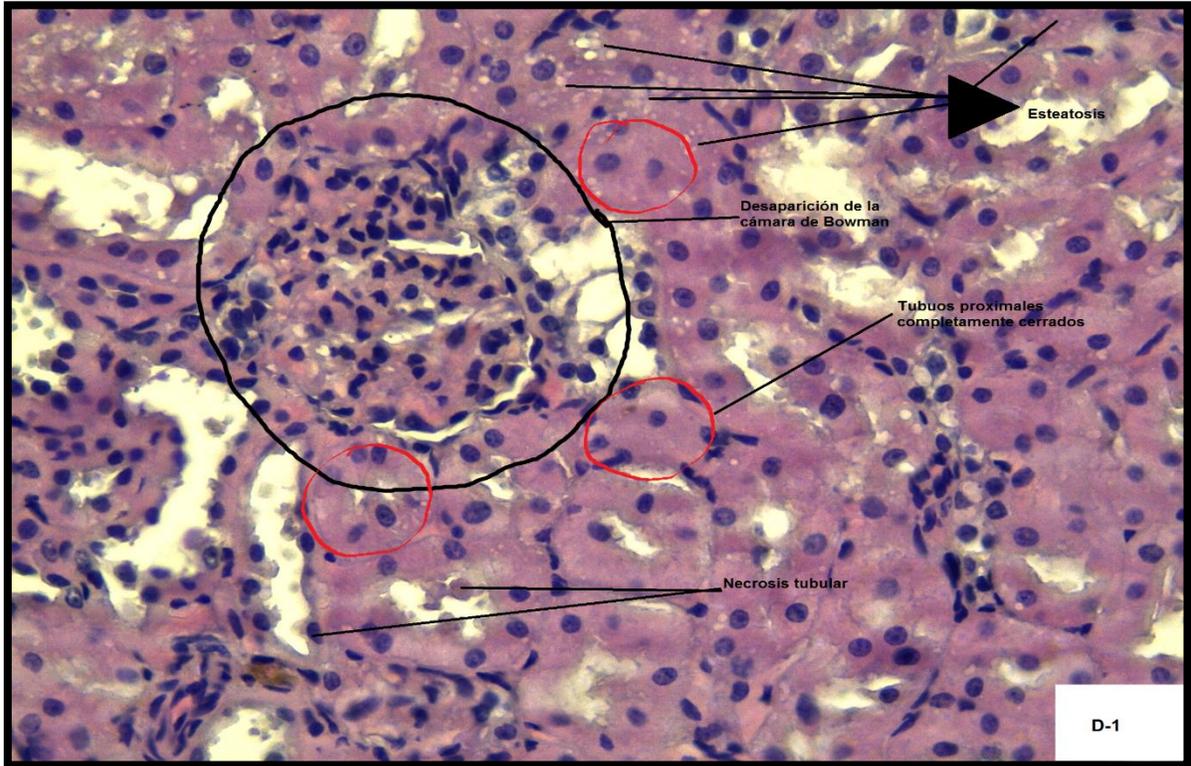
Para el estudio histológico se obtuvieron imágenes al microscopio de los cortes realizados en cada uno de los órganos. En casi todos los órganos se pudieron observar algunas diferencias entre los grupos diabéticos y los grupos con implante, aunque en algunos la diferencia fue más evidente. En cuanto al hígado las diferencias son notables; pues el hígado de las ratas diabéticas sin implante presenta ya signos marcados de esteatosis o inclusión de grasa intracitoplasmática, así como de necrosis temprana, se inicia la desaparición de la membrana citoplasmática y pérdida de cromofilia, todos signos de daño hepático severo, y también se observa disminución en el número de mitosis, congestión en vasos sanguíneos, aumento en células de Kupper que indica inflamación y presencia de células binucleadas así como degradación del cordón hepático, se puede observar que en el grupo diabético con implante (DI) hay un mayor número de mitosis en comparación con el grupo diabético sin implante (DSI) y la histología del órgano se ve normal sin cambios aparentes de daño hepático. (Figura 16).

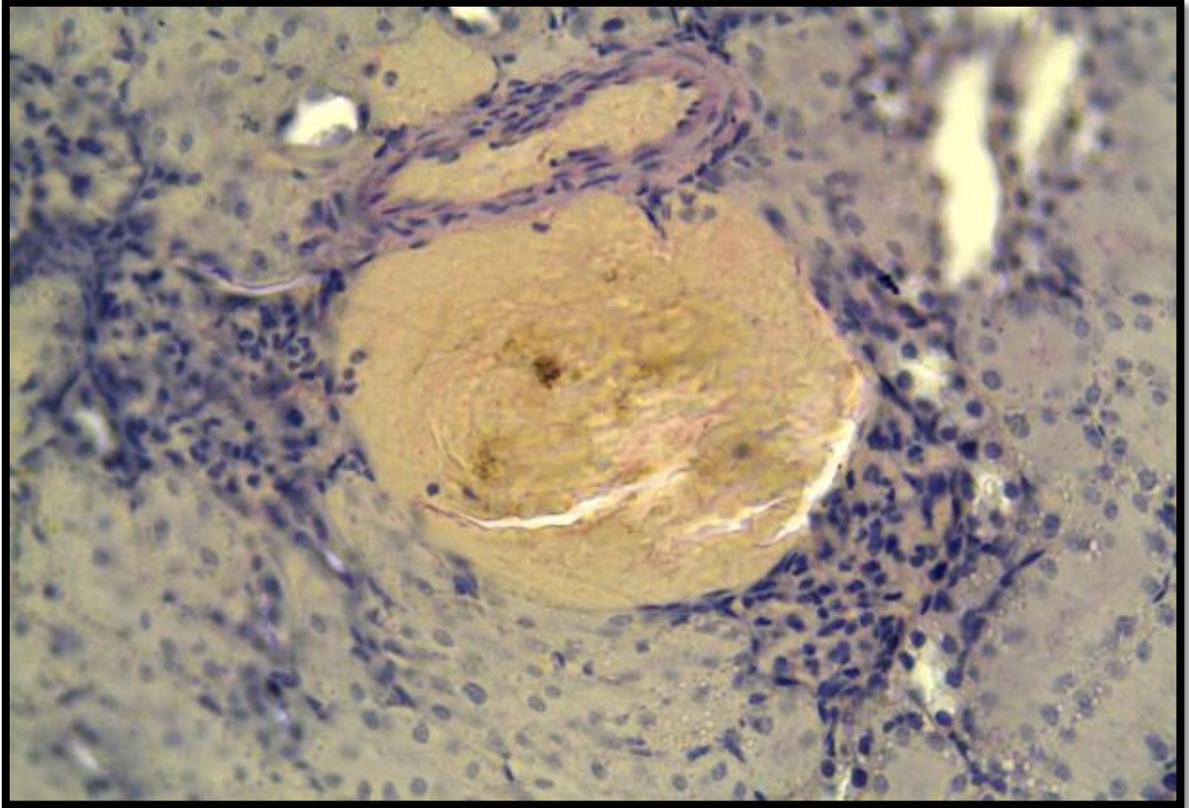
*Figura 16 (página siguiente). Hepatocitos a 40x. En la imagen C-1 se observa un hígado del grupo DSI donde se marcan en los círculos rojos hepatocitos en división, y se puede ver que el número de mitosis es menor que en la imagen C-2, donde se observa un hígado del grupo DI y se puede ver que el número de mitosis es mayor, además se observan las diferencias entre los tejidos.*



En el riñón se puede observar que el número de glomérulos es similar entre los grupos, pero se observa que en los grupos diabéticos estos llegan a ser más pequeños y presentar daños como la desaparición de la cámara de Bowman, esto por la proliferación de células del mesangio; esto es más notorio en el grupo DSI a comparación de los grupos control y DI. También se observa que los túbulos proximales son más pequeños y cerrados en el grupo DSI en cuanto al grupo DI (Figura 17). El daño en el grupo DSI fue más evidente pues incluso en las muestras llegó a ser difícil diferenciar los glomérulos (Figura 18).

*Figura 17 (página siguiente). Riñón a 40x. En la imagen D-1 se ve un riñón DSI y se puede notar que el número de glomérulos es menos que el que se observa en la imagen D-2, donde se ve un riñón del grupo DI, también se nota que los túbulos proximales se encuentran más dañados en el grupo DSI.*

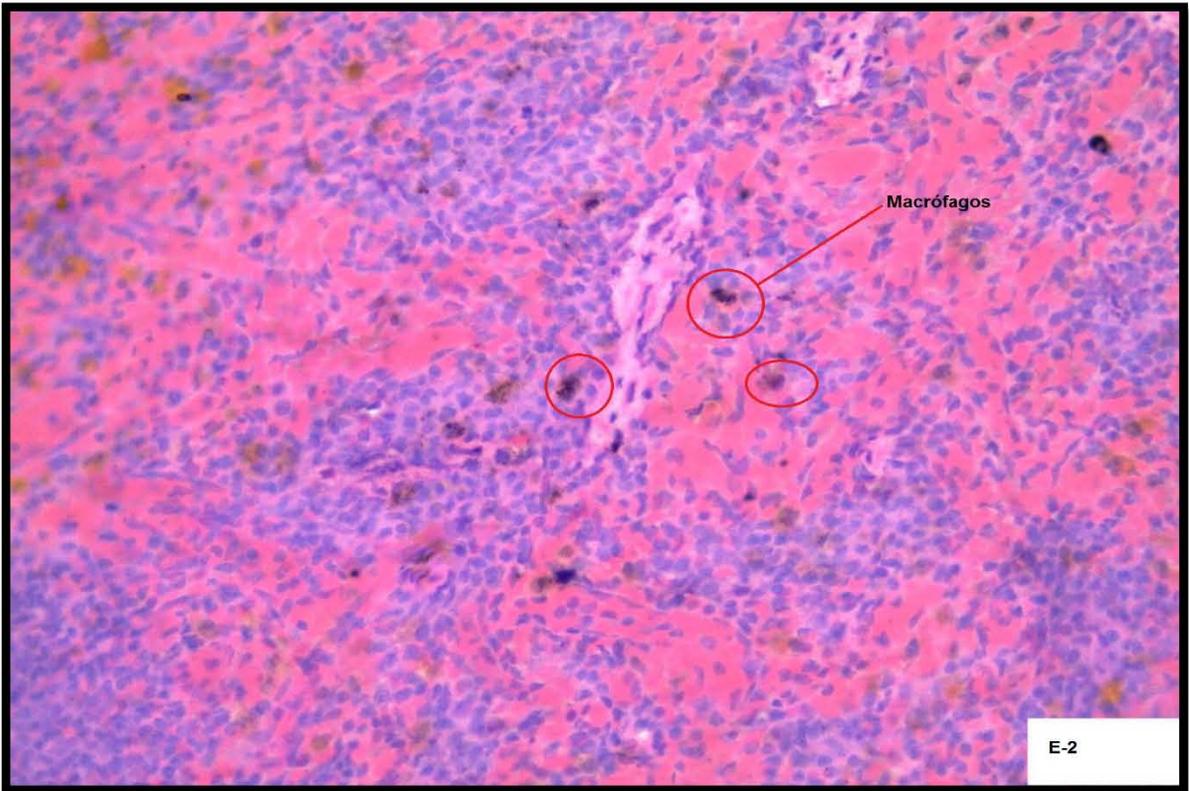
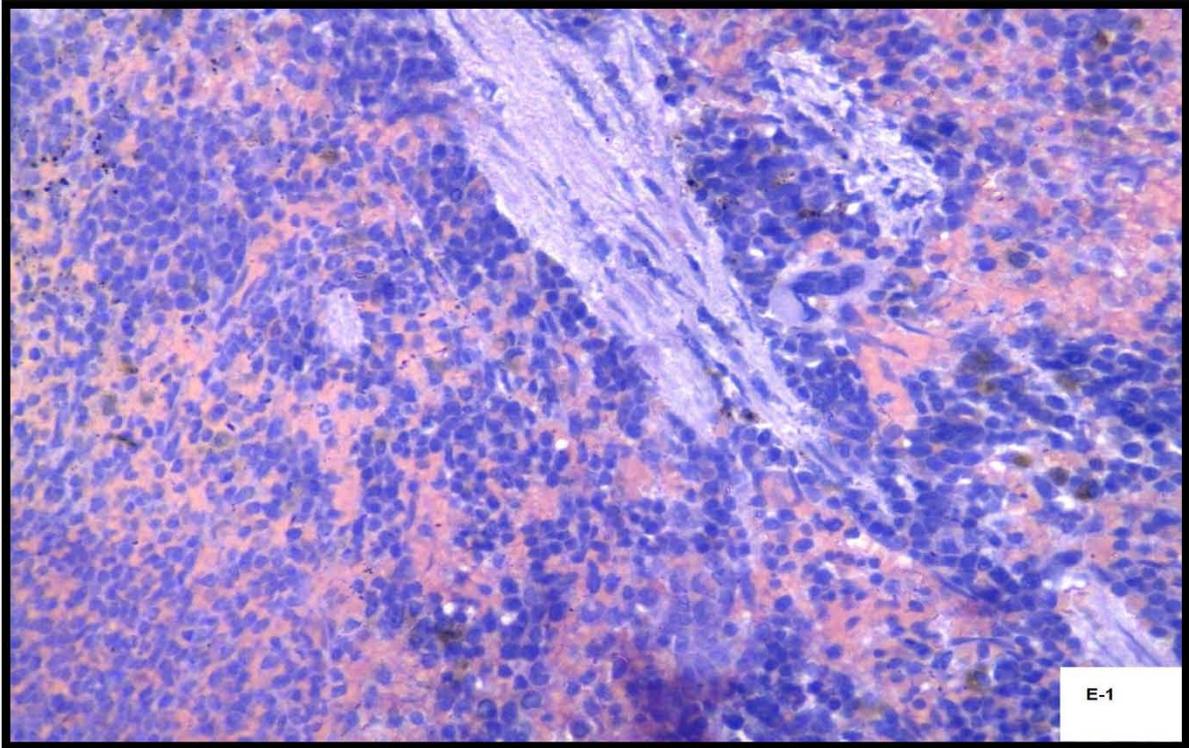


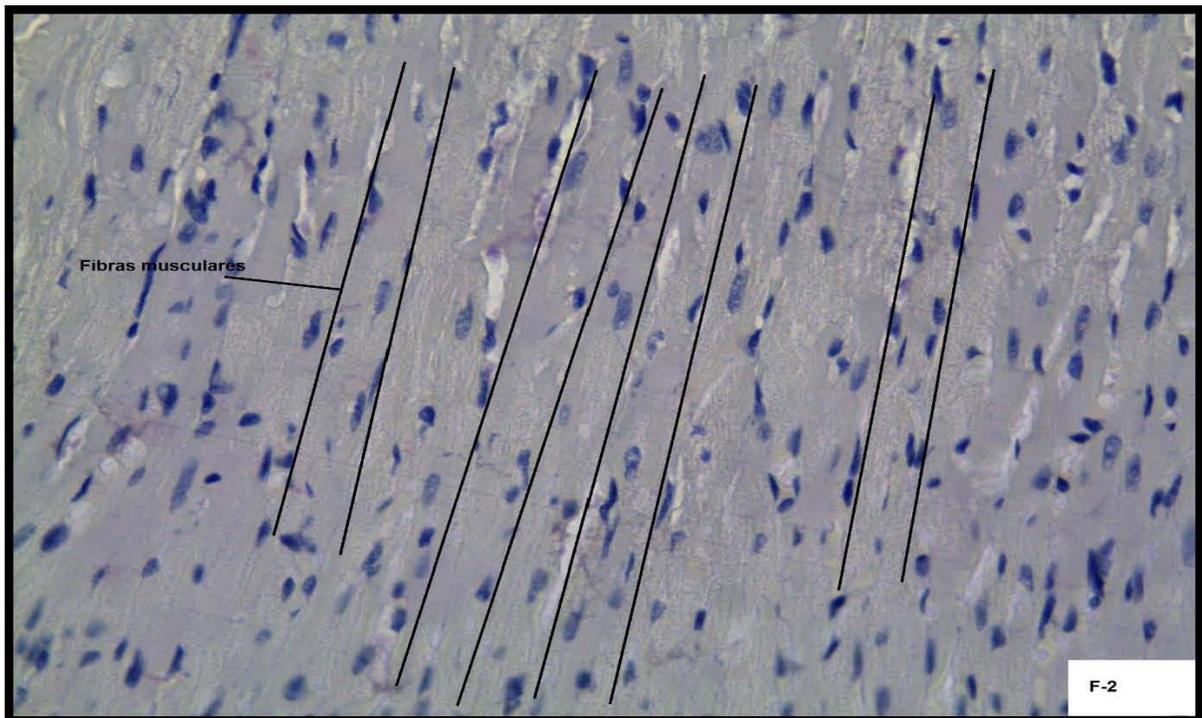
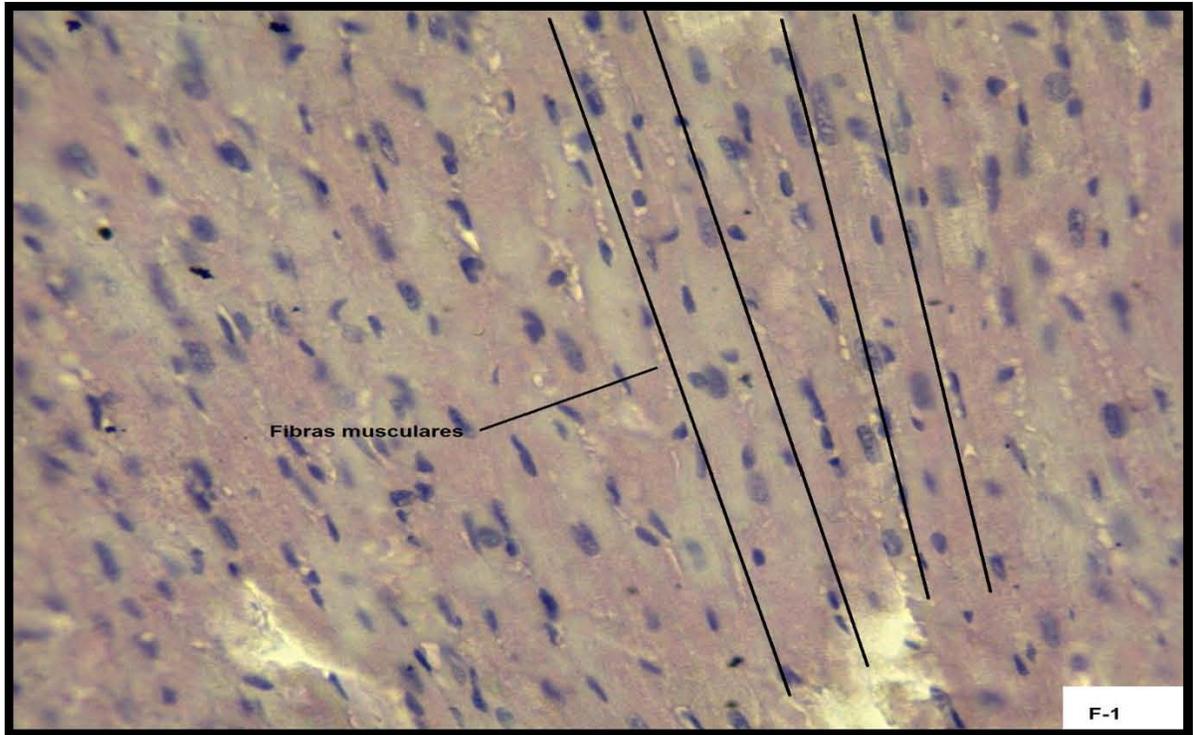


*Figura 18. Imagen a 40x, Riñón del grupo DSI, se observa el gran daño que presenta el tejido*

En el bazo las diferencias entre los grupos control y los diabéticos con y sin implante no es muy evidente, ya que la proporción de ambas pulpas es similar entre los grupos, pero se identificó infiltrado inflamatorio por neutrófilos, y presencia de macrófagos cargados de hemosiderina que puede llegar a indicar una hemorragia (Figura 19). Lo mismo que en el corazón en el cual se encontró que por ejemplo el grosor de las fibras musculares es similar entre los grupos tanto diabéticos como en los control (Figura 20).

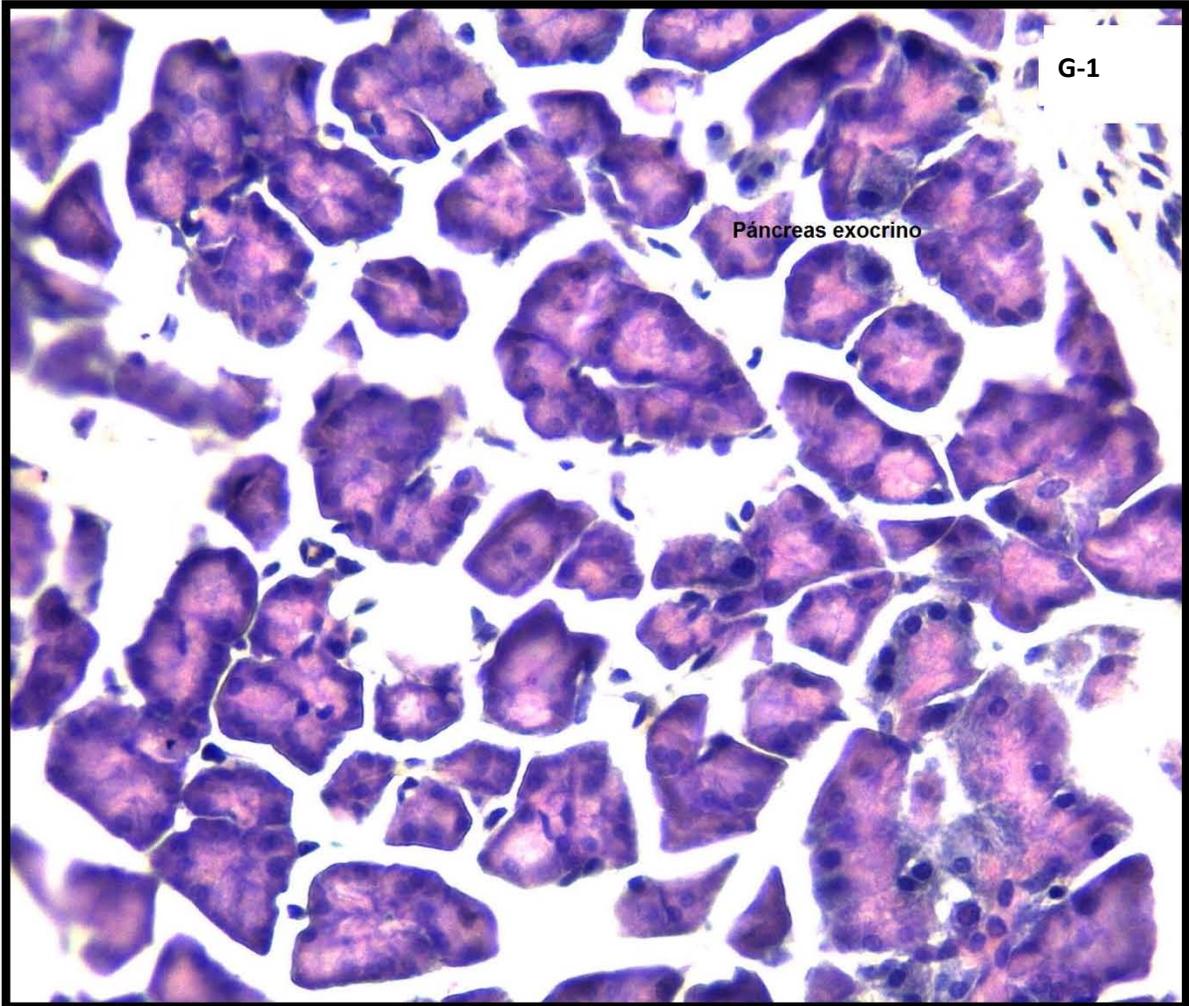
*Figura 19 (página siguiente). Bazo en 40x; en la imagen E-1 se observa un bazo del grupo DI donde se ve que no presenta daños visibles, mientras que en la imagen E-2 se observa un bazo del grupo DSI y se puede ver que tampoco presenta daños evidentes.*

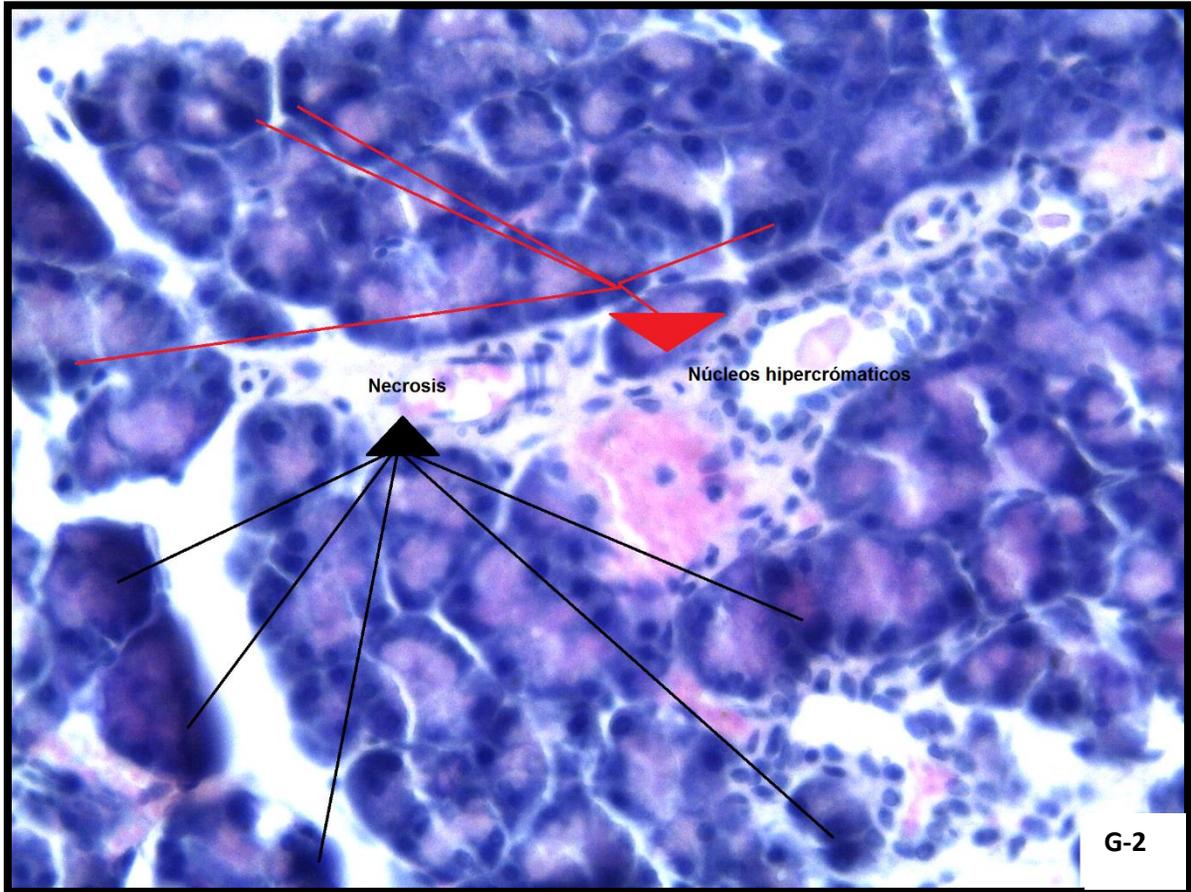




*Figura 20. Corazón en 40x, en la imagen F-1 se observa un corazón del grupo DI mientras que en la imagen F-2 se observa uno del grupo DSI; en ambos grupos se ve que el grosor de las fibras musculares es similar.*

Para el páncreas se observó daños tales como necrosis y núcleos hipercrómicos así como restos celulares de acinos. Además se notó que este era más abundante en los grupos control que en los grupos diabéticos, aunque el grupo DI fue un poco más abundante con respecto al grupo DSI (Figura 21).

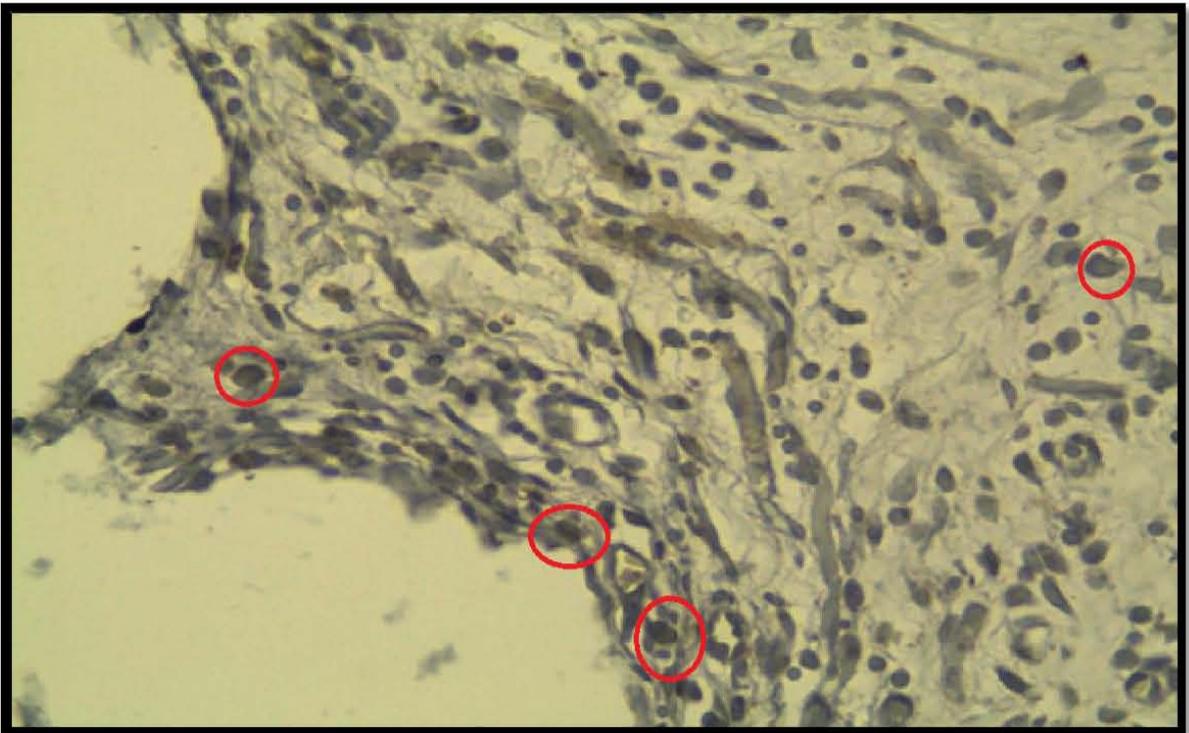
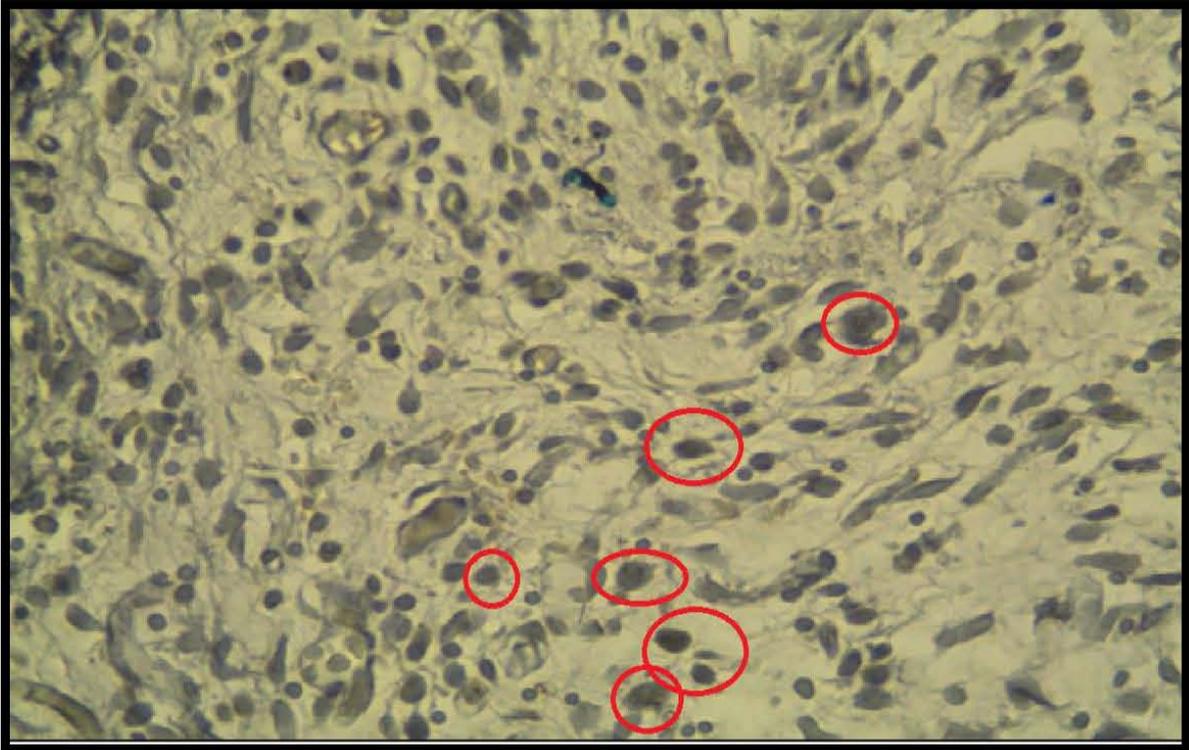




*Figura 21. Páncreas en 40x, en la imagen G-1 (página anterior) se observa un páncreas del grupo DI, mientras que en la imagen G-2 se observa uno del grupo DSI; en ambos grupos se ve que el páncreas no presenta cambios evidentes.*

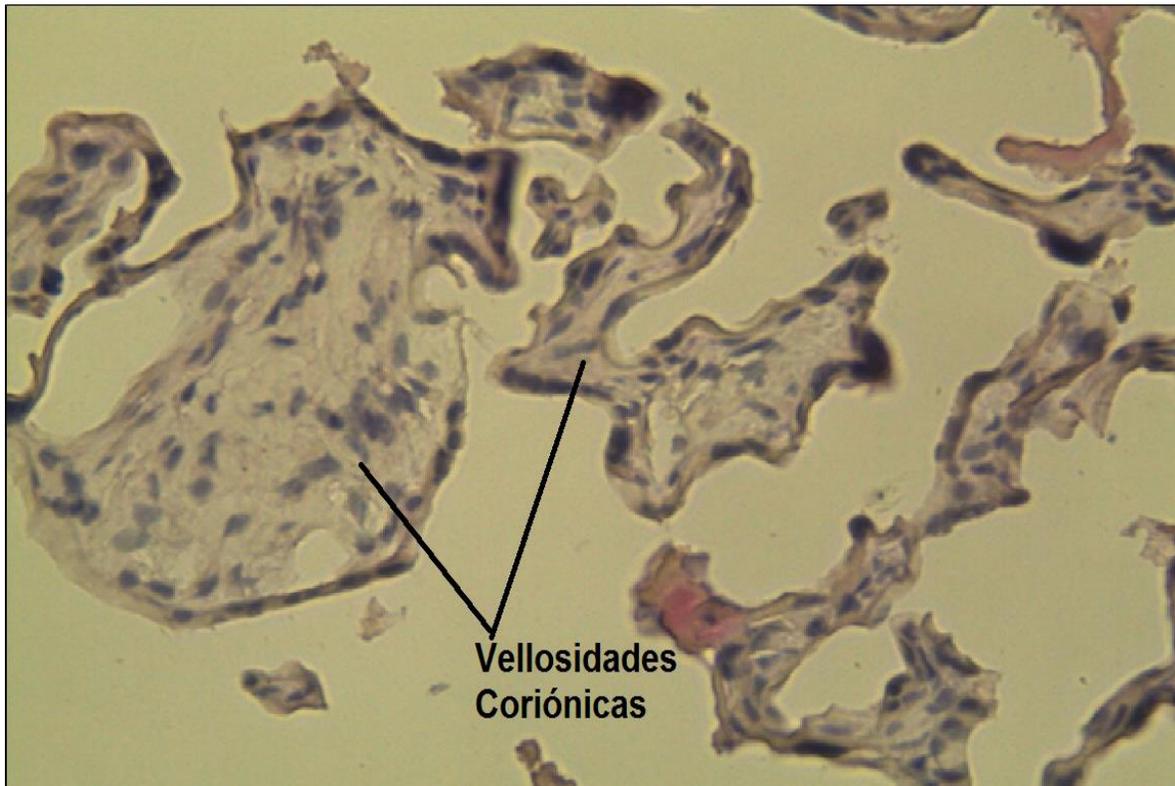
## 7.9 Inmunohistoquímica

Por otra parte, en la prueba de detección inmunohistoquímica realizada en los implantes liofilizados de placenta que fueron recuperados de los organismos del grupo DI, no se pudieron apreciar los marcadores utilizados para dicha prueba, pero se llegaron a observar en las muestras contrastes que pudieran ser considerados como positivos para la prueba. Por lo que no se pudo detectar con precisión la presencia de células madre en ellos y se recomienda la realización de otras técnicas más específicas para poder tener resultados concluyentes (Figura 22).



*Figura 22. Dilución 1:800 imágenes en 40x, se observa la inmunohistoquímica de los implantes recuperados y en los círculos se marcan los contrastes que se podrían considerar como positivos para la prueba.*

Por último el análisis del liofilizado de placenta sin implantar nos mostró que este presenta tejido típico de una placenta humana a término como lo son las vellosidades coriónicas (Figura 23).



*Figura 23. Imagen a 40x, se observa un corte de un liofilizado de placenta humana sin implantar y se puede distinguir una vellosidad coriónica típica del tejido de placenta humana.*

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la concentración de glucosa séricas observadas nos muestran que en el grupo de ratas diabéticas con el implante se observa una disminución significativa con respecto al grupo que no tenía el implante, estos resultados indican que el implante contribuye a un mejor control de los niveles de glucosa sérica en ratas diabéticas, resultados que coinciden con los de Pineda et al., (2011), quienes indican que en ratas con el liofilizado de placenta los niveles de glucosa sérica disminuyen. Así mismo se sabe que las células madre embrionarias (HESCs) tienen potencial como un recurso renovable como fuente de tejido para la diferenciación de las células beta y se sabe que el saco vitelino, la placenta y el páncreas de humano y ratón son los únicos tejidos que producen insulina (Kadam et al., 2010). Es por esto que el presente trabajo sugiere que es muy probable que las células del implante actúen ayudando en mantener una insulinemia normal por su papel secretor de insulina y de esta manera se podría explicar la disminución moderada de los niveles de glucosa sérica, ya que en los grupos controles el grupo al que se le puso el implante presenta niveles sutilmente más bajos ( 109.7 mg/dL) que el grupo que no presentaba el implante (111.2 mg/dL), aunque la diferencia no fue significativa se observa una tendencia a la baja.

En cuanto a los resultados del peso corporal se puede observar que los grupos de ratas diabéticas tienen valores similares, pero los individuos a los que se les colocó el implante presentan un valor ligeramente mayor al del grupo sin implante; en comparación con los grupos control los valores son muy similares, estos resultados son afines a los encontrados por Pineda et al., (2011), quienes reportan que en su estudio no hubo cambios en cuanto al peso corporal de las ratas diabéticas con el liofilizado de placenta. Este dato es importante debido a que en pacientes con diabetes gestacional

La prueba de Hb glicosilada es de suma importancia pues es un indicador indirecto de la glicemia a lo largo del tiempo. El valor normal está entre 4 a 6% en personas no diabéticas, y para los individuos diabéticos se aconseja que el valor

se mantenga por debajo del 7%, sin embargo hasta 7.5% es considerado como un riesgo aceptable (Lino, 2009). En este estudio los grupos de DI y DSI presentan valores de 4.4 y 8.0% respectivamente, lo que se considera una diferencia significativa, por lo que se puede decir que los organismos que fueron tratados con el implante liofilizado de placenta presentan un valor dentro del rango normal para organismos no diabéticos y podemos concluir que este resultado es un buen indicador del estado metabólico general pudiendo hipotetizar que dicho implante ayuda a controlar los valores de Hb glicosilada.

En general los valores son parecidos a excepción del grupo control con implante en el que el peso de las ratas es un poco más elevado que el del resto de los grupos. Esto puede relacionarse con el número de crías que se tuvo por camada en cada grupo ya que dicho grupo es el que presenta un mayor número de fetos. Además se sabe que algunos de los efectos negativos de la diabetes experimental sobre la función reproductiva son: el retardo en el crecimiento fetal, las reabsorciones y una alta incidencia de malformaciones (Clapés, 2000), con base en esto se atribuye a dichos efectos el mayor número de fetos en dicho grupo control.

Los resultados que se obtuvieron de los parámetros bioquímicos realizados en los sueros muestran que los niveles séricos de la creatinina, la urea y el colesterol son similares entre los cuatro grupos. La creatinina en todos los grupos se encuentra dentro de los rangos normales para esta especie, que es de 0.4-1.4 mg/dL (Bolant, 2001) y no se presenta una gran variación entre los grupos.

Los valores de ácido úrico en los grupos control y el grupo de diabéticas con implante se encuentran dentro de los rangos normales para esta especie (1.4-8.0 mg/dL), al contrario del grupo diabéticas sin implante que se encuentra ligeramente por arriba de lo normal. En el caso del colesterol todos los grupos se encuentran dentro del rango normal, aunque se observa que el grupo DSI es el que presenta una mayor cifra de este. Se sabe que en los individuos diabéticos es de suma importancia mantener los niveles de colesterol bajos ya que un aumento en dicho valor eleva el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Por último

el caso de los triglicéridos es el caso en el que más se nota la diferencia entre los grupos ya que los grupos control y DI se encuentran dentro del rango normal (43-95 mg/dL) (Canadian Council on Animal Care, 1998) mientras que en el grupo de DSI se observa que los valores están sobre los niveles normales por mucho, esto es normal ya que se sabe que una de las consecuencias de la diabetes es el aumento tanto de triglicéridos como de colesterol. Todos estos resultados apuntan a que el implante contribuye a un mejor control principalmente en los niveles de colesterol y triglicéridos en ratas diabéticas, además estos resultados coinciden con los de Pineda et al. (2011), quienes indican que en ratas con el liofilizado de placenta los niveles de los parámetros de la bioquímica sanguínea no presentan grandes cambios y en el caso de ratas diabéticas si ayuda a mantenerlos dentro del rango normal.

En cuanto a peso y talla de las crías, en general los valores son similares en todos los grupos, pero se observa que en el grupo de ratas diabéticas sin implante (DSI) el peso y la talla son ligeramente menores a los de los otros grupos. Además de que dicho grupo fue el único que presentó reabsorciones y es el que presenta menor número de crías por camada, así como que fue el grupo donde se pudieron observar algunas malformaciones en los fetos tales como hematomas en el tubo neural. Esto puede deberse a que se sabe que algunos de los efectos negativos de la diabetes experimental son: el retardo en el crecimiento fetal, las reabsorciones y la alta incidencia de malformaciones (Clapés, 2000), con base en esto se atribuye a dichos efectos la aparición de reabsorciones así como las tallas y pesos menores en las crías.

Por otra parte con respecto a la ultra estructura de la histología se nota que en riñón e hígado el daño en ratas DSI es bastante evidente en comparación con los grupos control. Se sabe que la STZ induce neoplasia renal en ratas que han recibido una dosis, otras alteraciones que presentan son a nivel de metabolismo del glucógeno en riñón (Flores et al., 2006; Ramos y Méndez, 1994). Se puede observar que el daño renal y hepático es evidente a los 20 días de haber sido diabetizadas las ratas, y se podría considerar que el daño es grave.

Como cabe esperar uno de los órganos que presentó mayores diferencias fue el hígado, ya que en éste se pudo ver que las mitosis en los hepatocitos de los grupos diabéticos son más evidentes en el grupo DI, lo que nos indica que en este grupo existe una buena respuesta ante el implante ya que se puede inferir que la regeneración de dicho órgano es buena y ayuda a conservar el tejido con un menor daño que el que se puede dar ante la hiperglucemia crónica, esto ayuda ante los problemas que conlleva la diabetes, pues se sabe que esta puede causar daños hepáticos como el hígado graso.

Otro de los órganos que presentó mayor diferencia fue el riñón en el que se pudo observar que el grupo DSI presentó el mayor daño pues en este tejido el número de glomérulos normales observados por muestra fue menor al número que se encontró con respecto al grupo DI; otra diferencia entre estos grupos fue el daño a la estructura de los túbulos renales proximales ya que en el grupo DSI se observa necrosis elevada que no fue observada en el grupo DI. Se sabe que uno de los principales daños, y uno de los más comunes que provoca la diabetes es el daño renal llegando a causar incluso nefropatía diabética, esto dado primordialmente por el estrés oxidativo que se da ante la hiperglucemia crónica, el cual afecta principalmente la estructura y función de proteínas y genera un daño tisular (Díaz et al., 2004; Bosco et al., 2005) es por esto que el hecho de que el grupo DI presentara un menor daño es importante ya que nos indica que el implante contribuye a tener un menor daño y se puede hipotetizar a que contribuye en la protección del riñón.

Para el bazo y corazón, estos órganos no presentaron diferencias evidentes en cuanto a los daños entre cada uno de los grupos. En el bazo se pudo observar que las pulpas (blanca y roja) son similares entre los cuatro grupos y los grupos diabéticos son similares a los grupos control. Para el corazón, este es uno de los órganos que presenta un mayor daño ante la hiperglucemia crónica llegando a causar enfermedades cardiovasculares, pero en los resultados observamos que el corazón no presentó un daño evidente y parece ser similar entre ambos grupos con diabetes, esto se atribuye principalmente al tiempo de exposición ante la

enfermedad ya que fue un lapso relativamente corto y estos daños suelen presentarse después de un periodo largo de tiempo.

En el páncreas, el órgano más importante en individuos diabéticos, se observó que en los grupos inducidos con STZ el tamaño de este órgano era menor comparada con los grupos controles, pero a su vez se observó que el grupo DI presenta una mayor cantidad de dicho órgano en comparación con el grupo DSI, además también parecía ser mayor el número de islotes en el grupo DI que en el grupo DSI. Este representa otro resultado importante ya que nos sugiere que de alguna manera el rendimiento del páncreas es mejor y puede tener un rendimiento más efectivo que en el grupo sin implante.

Con respecto a la detección de marcadores mediante inmunohistoquímica, se llegó a observar un contraste que pudiera implicar la presencia de células troncales en los implantes recuperados, y aunque ésta no se puede tomar como un resultado positivo para los marcadores utilizados, nos puede indicar que el implante puede llegar a actuar como una protección ante los daños que se provocan por la hiperglucemia crónica, sobre todo por los resultados vistos en la histología de los órganos ya que al parecer el efecto fue positivo pues se llegaron a notar mejoría. Otro dato que apoya los resultados es la histología del liofilizado de placenta sin implantar, ya que corrobora que este se constituye de tejido placentario y se sabe que las células madre embrionarias (HESCs) tienen potencial como un recurso renovable como fuente de tejido para la diferenciación de las células beta y se sabe que el saco vitelino, placenta y el páncreas de humano y ratón son los únicos tejidos que producen insulina (Kadam et al., 2010).

A pesar de que no se sabe si las células troncales puedan llegar a sobrevivir al proceso de liofilizados es probable que este conserve propiedades tales de las células troncales, es por esto que el presente trabajo sugiere que es muy probable que las células del implante actúen ayudando en la secreción de insulina y así ayuden a controlar los daños a órganos protegiéndolos de la hiperglucemia crónica.

## 9. CONCLUSIONES

- Se sugiere que el implante liofilizado de placenta en ratas gestantes con diabetes inducida por STZ, ayuda a controlar moderadamente los niveles de glucosa sérica, mientras que el peso corporal no se ve afectado y el número de fetos por camada muestra una tendencia a la baja en ratas gestantes con diabetes.
- Se propone que el implante liofilizado de placenta en ratas gestantes con diabetes inducida por STZ, ayuda a controlar los niveles de colesterol y triglicéridos.
- Las ratas gestantes con diabetes inducida por STZ y con implante liofilizado de placenta presentan un porcentaje no significativo de reabsorciones y malformaciones macroscópicas en las crías, contrario a lo observado en ratas diabéticas sin implantes; por lo que se puede considerar que el implante liofilizado de placenta humana si tiene efecto protector ante la teratogénesis inducida por la diabetes.
- Se observó que el riñón es uno de los órganos que presenta una mayor efecto positivo del implante ante la diabetes inducida por STZ, ya que fue uno de los órganos en los que es más clara la diferencia entre el grupo DI con el grupo DSI. Mientras que el bazo y corazón no presentaron diferencias significativas entre los grupos control y los grupos DI y DSI.
- La técnica utilizada para la detección de células madre en los implantes liofilizados recuperados de las ratas, no mostró resultados concluyentes por lo que se sugiere la utilización de técnicas más específicas.
- Se sugieren estudios más a fondo sobre el mecanismo de acción del implante y como actúa ante la diabetes.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, L.C.; López, A.F.; Sepúlveda, B.S.; Espinosa, F.V. 2007. Actividad de la glutatión reductasa en el embarazo diabético. *Rev Chil Obstet Ginecol*; 72(2):82-88.
- American Diabetes Association. 2011. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 34 (Suppl 1): 564-569.
- Bermúdez, V.; Cano, C.; Medina, M.; Ambard, M.; Souki, A.; Leal, E.; Lemus, M.; Espinoza, S.; Seyfi, H.; Andrade, J.; Bermúdez, A.F. 2002. Nuevas Opciones en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 1: Células Madre y Diabetes. *Arch. Ven. Farmacol. Terap*. 21 (2): 171-176.
- Bancroft, D.J.; Gamble, M. 1996. Theory and practice of histological techniques. Churchill-Livingstone/Elsevier, Philadelphia, USA. 4 ed. 256 pp.
- Bieg, S.; Lernmark, A.1999. Animal models for insulin-dependent diabetes mellitus. En: Volpé R. (editor). Autoimmune endocrinopathies (Contemporary endocrinology 15). Human Press, New Jersey, USA: 113-139.
- Bolant, H.B.; Calvo, B.M.A.; Cejalvo, L.D.; Gimeno, F.O.; Gimeno, F.L.; Lloris, C.J.M. 1990. Hematología y bioquímica clínica de la rata. Parte 2. *Research In Surgery*. Supl4: 12-20.
- Bosco, A.; Lerário, A.C.; Soriano, D.; Ferreira dos Santos, R.; Massote, P.; Galvão D.; Franco A.C.H.M.; Purisch S.; Rodriguez F.A. 2005. Retinopatía Diabética. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 49(2): 217-227.

- Caja Costarricense de Seguro Social Organización Panamericana de la Salud. 2007. Guía para la atención de las personas diabéticas Tipo 2. Segunda edición. San José, Costa Rica. 129 pp.
- Canadian Council on Animal Care. 1998. Manual sobre el cuidado y uso de animales de experimentación. Volumen 1. Segunda edición. Canada. 299 pp.
- Carpenter, M. 2007. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. *Diabetes Care*. 30: 246-250.
- Chiou, S. H.; Chen, S.J.; Chang, Y.L.; Chen, Y.C.; Li, H.L.; Chen, D.T.; Wang, H.H.; Chang C.M.; Chen, Y.J; Ku, H.H.2009. MafA promotes the reprogramming of placenta-derived multipotent stem cells into pancreatic islets-like and insulin cells. *J. Cell. Mol. Med.* 15(3): 612-624.
- Clapés H. S. 2000. Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo. *Rev. Cub. Inv. Biol.* 19(3):191-195.
- Davidson, J.K. 2000. Clinical Diabetes Mellitus: a problem-oriented approach. 3ª. Thieme. New York. 41-44 pp.
- De Anda-Turati, M.; Granados-Arriola, J.; Quiroz-Mercado H. 2000. Marcadores genéticos en retinopatía diabética proliferativa en mexicanos portadores de diabetes mellitus no insulino dependiente. *An. Med. Assoc. Hosp. ABC*; 45(2):61-64.
- Díaz-Flores, M.; Baiza-Gutman, L.A.; Ibáñez-Hernández, M.; Pascoe-Lira, D.; Guzmán-Greenfel A.; Kumate J. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica., *Gac. Med. Méx.* 140(4): 437-449.

- Espinoza, R.M. 2013. Análisis clínico de pacientes con cetoacidosis diabética como debut de diabetes mellitus tipo 1 en el hospital pediátrico Coyoacán en el periodo Febrero 2008 a Junio 2012. Tesis para obtener el diploma de especialidad en pediatría. UNAM, Facultad de Medicina. 65pp.
- 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, G.D.; García, D.R. 2009. Avances en la patogénesis de la embriopatía diabética. *Rev. Méd. Chile.* 137: 1627-1635.
- González, E. 2005. Hiperglucemia y Embriogénesis. Simposio: Prediabetes y diabetes aspectos básicos, clínicos y endocrinológicos. XIV Congreso de SAEM. RAEM. 42: 24-28.
- Guzmán-Juárez, N.; Madrigal-Bujaidar, E. 2003. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 28(2): 12-23.
- Greenspan, F. 1998. Hormonas pancreáticas y diabetes sacarina. *Endocrinología básica.*, Ed. Manual Moderno., México DF., 231-389pp.
- Hugues, H.B.; Rodríguez, G.J.; Rodríguez, G.C. 2001 Animales de laboratorio en la endocrinología: Biomodelos de la Diabetes Mellitus tipo 1. *Rev. Cub. Endo.* 12(3): 168-177.
- Ingle, D.J. 1948. The production of experimental glycosuria in the rat. *Recent Prog. Horm. Res.* 2: 229-253.

- Islas, A.S.; Revilla, M.M.C. 2004. Diabetes Mellitus. 3<sup>a</sup>. Mc Graw Hill. México. 524pp.
- Junod, A.; Lambert, A.; Stauffacher, W.; Renold, A.1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48: 2129-2139.
- Kadam, S.; Muthyala, S.; Nair, P.; Bhonde R. 2010. 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.
- Loeken, M.R. 2006. Advances in Understanding the Molecular Causes of Diabetes- Induced Birth Defects. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 13(1):1-10.
- Malacara, 1990. Fundamentos de endocrinología clínica. JCH Editores. México, D. F. pp. 521-522.
- Mora, H.C.A.; Aragón, N.D.M.; Ospina, F.L.G. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae.* 16:311-319.
- 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 el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Veracruzana. 68pp.
- Paniagua, C.G.L. 2001. Manual de Análisis Clínicos. Hematología, Bioquímica e Inmunología Clínicas. Ed. UNAM. FESI. México.

- Pineda-Carranza, A.; Verdín-Terán, S.L.; Reyes-Campos, M.; Díaz-Toral, L.G.; Nieto-Yáñez, O.; Canales-Martínez, M.M.; Rodríguez-Moctezuma, J.R.; Rodríguez-Monroy, M.A.; Palomar-Morales, M. 2011. Efecto del implante liofilizado de placenta en el control de diabetes inducida con estreptozotocina en ratas Wistar. XVI Foro Interinstitucional de Investigación en Salud.
- Ramos, R.H.G.; Méndez, J.D. 1994. Diabetes Mellitus Experimental. *Cien. Vet.* 6: 347-377.
- Restrepo, O.O. 2000. Diabetes y embarazo. *Rev. Col. Obstet. Ginecol.* 51(2):1-32.
- Salazar, G.M. 2010. Evaluación del efecto teratogénico de la diabetes inducida en rata sobre el desarrollo facial y de las extremidades. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
- Samar, M.E.; Ávila, R.E. 2000. Técnicas Histológicas Fundamentos y Aplicaciones. Universidad de Córdoba. Argentina.
- Scucces, M. 2011. Diabetes y embarazo. *Rev. Obstet. Ginecol.* 71(2):3-12.
- 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. Panamericana. España. Pp. 3.
- 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 (7): 1183-1197.

- Tomlinson, K.C.; Gardiner, S.M.; Hebden, R.A.; Bennet, T. 1992. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol. Rev.* 44:103-150.
- 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 citocina pro inflamatorias en ratas diabéticas. XXXI Coloquio de Investigación FES IZTACALA UNAM. 22 y 23 de agosto.

## 11. ANEXOS

### 11.1 Anexo1. Parámetros Bioquímicos

#### Glucosa Basal (Método de Trinder)

##### Fundamento

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

0.1mol/L de amortiguador de fosfatos  
0.1mol/L de amortiguador de Tris-HCL, pH 8.0

GOD 6 kU/L

POD 3.8 kU/L

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  $+2 \pm + 8^\circ\text{C}$

❖ Solución patrón

Contiene 100 mg/dL 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 546 nm, ajustando a cero de absorbancia con agua destilada.

Cálculo utilizando Ley de Lambert-Beer

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

## 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 (HaA1a+b)<sup>1</sup>. La estimación del porcentaje de la HbA1c se realiza por la lectura de la absorbancia a 415nm.

### 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

<b>Sangre</b>	50 µL
<b>Reactivo</b>	200 µL

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

<b>Hemolizado</b>	50 µL	Desechar el eluido
<b>Reactivo (2)</b>	200 µL	Desechar el eluido
<b>Reactivo (2)</b>	2,0 mL	Desechar el eluido
<b>Reactivo (3)</b>	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  $F = \text{Conc. St.} / \text{D.O. St.}$

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

## Triglicéridos (Método de Soloni)

### Fundamento

Los triglicéridos extraídos se saponifican con etilato de sodio (etóxido de sodio), lo que libera el 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. Solución 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 un tubo de ensaye de 0.5 mL del suero problema mas 4.0 mL de la solución extractora. Agitar vigorosamente durante 10 segundos. Dejar en reposo hasta que se forme 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 superior	-----	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 el 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

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

## 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

1. Reactivo de colesterol (Anhídrido acético 6.33 M en ácido acético 99-100%)
2. Ácido sulfúrico concentrado (95-97%)
3. Solución patrón de colesterol (300 mg/dL)

### Método

Adición	Problema	Patrón
Suero	50 µL	-----
Solución patrón de 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

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

## 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. Diacetilmonoximina
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

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

## Creatinina (Método 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

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

## Método

	<b>Problema</b>	<b>Patrón</b>
<b>Suero</b>	0.5 mL	-----
<b>Solución patrón</b>	-----	0.5 mL
<b>Ácido pícrico</b>	1.0 mL	1.0 mL

Mezclar y dejar reposar durante 5 minutos

<b>Solución amortiguadora</b>	1.0 mL	1.0 mL
-------------------------------	--------	--------

Mezclar, pasar inmediatamente a la cubeta y medir  $DO_1$  a 429 nm antes de que transcurra 1 minuto. Medir la  $DO_2$  a 429 nm 5 minutos después de la primera medición. Obtener la  $\Delta DO$  por restar  $DO_2 - DO_1$ .

## Cálculo

Creatinina mg/100 ml =  $\Delta DO$  problema /  $\Delta DO$  estándar)

## Ácido Úrico

### Fundamento

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

### Reactivos

1. Reactivo desproteinizante: Ácido túngstico estabilizado
2. Carbonato de sodio
3. Reactivo de color

#### 4. Patrón de ácido úrico

Método (para suero)

<b>Agua destilada</b>	4.0 mL
<b>Reactivo desproteinizante</b>	0.5 mL
<b>Muestra</b>	0.5 mL

Centrifugar durante 5 minutos a 2500-3000 rpm

	<b>Muestra</b>	<b>Patrón</b>
<b>Sobrenadante (paso1)</b>	2.5 mL	-----
<b>Agua Destilada</b>	-----	2.5 mL
<b>Patrón</b>	-----	0.025 mL
<b>Carbonato de sodio</b>	0.5 mL	0.5 mL

Mezclar y esperar 10 minutos después agregar:

<b>Reactivo de color</b>	0.5 mL	0.5 mL
--------------------------	--------	--------

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

Cálculo

Ácido úrico mg/100 mL= (D. O. muestra / D. O. patrón) x 10

## 11.2 Anexo 2. Técnica Histológica Convencional

### 1. Paraformaldehído al 4%

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

Procedimiento

Paraformaldehído (Sigma )	4 gm
PBS o H2O	80 mL ( Después de ajustar pH llevar a 100 ml)

Calentar a 60° C con agitación, al alcanzar la temperatura adicionar unas gotas de Hidróxido de amonio (NaOH) 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 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 micrótopo 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 inmuno reactividad.

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
Parafina II *	60 min
Inclusión en bloque (fundida a 60° C)	*TIEMPOS MÍNIMOS

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.

NO dejar más de 1 hr 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 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.

### **11.3 Anexo 3 Tinción de 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. Incubar 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 c.	3 min
Hematoxilina de Harris	5 min
Agua c.	2 min
Alcohol ácido	Lavado
Agua c.	2 min
Agua amoniacal	Lavado
Agua c.	1 min
Eosina alcohólica	10 min
Agua c	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).

#### 11.4 Anexo 4. Técnica para inmunohistoquímica con Peroxidasa en tejidos fijados con zinc.

Usar laminillas silanizadas o poli-L-lisinadas. Los cortes deben ser entre 3-5 micras de grosor, pegar con Ruyter y después meter 30 min al 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 1 min
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 o toda la noche a 4° C
PBS-tritón	3 lavados
PBS 1X	1 min
Segundo anticuerpo conjugado con HRP	1 hr a temperatura ambiente
PBS-tritón	3 lavados de 3 min c/u
Solución de DAB***	Tiempo según coloración observada (1-10min)
Lavado PBS	(con pizeta)
Lavado PBS	1 min
Contra-tinción con Hematoxilina de Harris	
Montaje con Entellan	

\* para inactivación de peroxidasa endógena, preparar al momento

\*\* bloqueo de proteínas

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

Metanol =>9 ml +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 ml puro

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

Solución de DAB => PBS 10 ml + DAB 0.006 gr + 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% = 967 µl de agua destilada + 33 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Esta técnica esta estandarizada para intestinos de ratón fijados con paraformaldehído por 2 hr.

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-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dejando remojar el material usado con hipoclorito de sodio, antes de lavar o desechar.