

Inducción de diabetes experimental en la rana *

M. J. Castiñeiras, A. Boronat, E. Itarte, J. J. Guinovart
y M. Rosell-Pérez **

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona
Barcelona-28 (Spain)

(Recibido el 30 de julio de 1977)

M. J. CASTIÑEIRAS, A. BORONAT, E. ITARTE, J. J. GUINOVART and M. ROSELL-PÉREZ. *Induction of Experimental Diabetes in Frog*. Rev. esp. Fisiol., 34, 385-388. 1978.

The effect of diabetogenic agents, alloxan and streptozotocin, in frogs has been studied. These drugs were administered to the animals by injection into the dorsal lymph sac. Alloxan did not exert any effect at non-lethal doses. At 300 mg/kg alloxan caused death of most of the animals in an hyperglycemic state in less than 72 hours. Streptozotocin at doses lower than 1 g/kg was ineffective. At 1.5 g/kg, a non-lethal dose, about half of the animals became diabetic.

Son varios los métodos utilizados para producir diabetes experimental. La pancreatectomía es el método clásico; sin embargo, presenta dificultades técnicas y el inconveniente de que al extirpar el páncreas se suprimen sus funciones exocrinas y endocrinas. Actualmente los métodos más utilizados son los basados en la administración a los animales de fármacos que actúan selectivamente destruyendo la capacidad de las células β de los islotes de Langerhans para producir insulina.

Hasta hace poco tiempo la droga más utilizada era la aloxana (2,4,5,6-tetraoxi-

pirimidina). Sin embargo, desde el descubrimiento de la acción diabetogénica del antibiótico estreptozotocina (N-metil-nitrosocarbamilglucosamina) (5) se le ha considerado como el fármaco de elección para inducir diabetes experimental. Además, presenta ventajas sobre la aloxana por ser más específica y menos tóxica (1, 4). La administración de estos fármacos a los animales les produce diabetes que se manifiesta por un incremento del nivel de glucosa en sangre y orina, normalmente observable a las 48 horas, siendo éstos los principales parámetros utilizados para determinar el estado diabético del animal.

Material y métodos

Animales. Se utilizaron hembras de la especie *Rana ridibunda*, recibidas de

* Realizado con una subvención de la «Comisión Asesora a la Investigación Científica y Técnica de la Presidencia del Gobierno» de España.

** Fallecido el 3 de enero de 1977.

15 a 20 horas después de su captura. Se disponían inmediatamente en recipientes adecuados y no se les suministraba ningún tipo de alimento. Para evitar errores debidos a la hiperglucemia alimentaria no se utilizaron hasta, por lo menos, 3 ó 4 días después de su captura (7).

Métodos. Las soluciones de aloxana se prepararon con HCl 0,001 N y las de estreptozotocina con tampón de citrato 10 mM, pH 4,5, en solución salina. Debido a la inestabilidad de dichas drogas en solución se administraron siempre dentro de los 5 minutos posteriores a su preparación.

Las soluciones se administraron por inyección en el saco linfático dorsal a través de la masa muscular de las extremidades posteriores. La relación volumen inyectado/peso del animal se mantuvo siempre constante (0,25 ml/10 g peso), variando la concentración de las soluciones según las dosis a administrar. Los animales control fueron inyectados, en cada caso, con la solución vehículo de administración de las drogas.

Los animales tratados se dispusieron en recipientes adecuados manteniéndolos en ayunas. A distintos tiempos se procedió a su desmedulación y, tras una rápida discción, a la obtención de la muestra de sangre (0,3-0,5 ml) por punción cardíaca con un capilar. La glucosa sanguínea se determinó en suero por el método de la hexoquinasa-glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (2).

Las curvas de glucemia se efectuaron inyectando glucosa (2,5 g/kg) en el saco linfático dorsal. A distintos tiempos se procedió al sacrificio de los animales y a la obtención de las muestras sanguíneas.

Productos y reactivos. ATP y aloxana procedían de la firma Sigma. NADP⁺, hexoquinasa y glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa de Boehringer Mannheim. Glucosa de Carlo Erba. Estreptozotocina grado A de Calbiochem.

Resultados

Acción de la aloxana. A dosis comprendidas entre 65 y 250 mg/kg la aloxana no producía ningún efecto sobre los niveles sanguíneos de glucosa. A 300 mg/kg provocaba la muerte de la mayoría de las ranas dentro de las 72 horas siguientes a su administración. De algunas de las ranas que murieron entre las 36 y las 72 horas, se pudieron obtener muestras de sangre en el momento de la agónía, observando que tenían niveles de glucemia elevados, mientras que las ranas que sobrevivían presentaban, a las 72 horas, niveles de glucosa en sangre normales (tabla I). Dosis de aloxana superiores

Tabla I. Niveles de glucemia alcanzados tras la administración de aloxana o de estreptozotocina en el saco linfático dorsal de las ranas.

Entre paréntesis se indica el número de animales de cada grupo. Los tiempos indican el período comprendido desde la administración de la droga hasta el momento del sacrificio de los animales, excepto en el primer grupo de ranas tratadas con aloxana, en el que se indica el tiempo de supervivencia. Valores de p calculados según el test de Student. N.S. = no significativo.

Tratamiento	Tiempo (h)	Niveles de glucemia (mg/100 ml) M ± D.S.
Aloxana	36-72	52,8 ± 14,4 (5) p < 0,001
300 mg/kg	72	23,5 ± 5,4 (3) N.S.
Control	72	25,5 ± 4,5 (8)
Estrepto-		
zotocina	48	50,0 ± 7,9 (7) p < 0,001
1,5 g/kg	48	25,1 ± 5,1 (8) N.S.
Control	48	26,9 ± 5,9 (8)

(400 y 500 mg/kg) provocaban la muerte de todos los animales dentro de las 24 horas siguientes a su administración.

Acción de la estreptozotocina. La administración de estreptozotocina a dosis

inferiores a 1 g/kg no producía ningún efecto significativo sobre los niveles de glucosa sanguínea. Con 1 g/kg los niveles de glucemia a las 48 horas eran ligeramente elevados, si bien los valores variaban considerablemente de un animal a otro.

A las 48 horas de la administración de una dosis de estreptozotocina de 1,5 g/kg, aproximadamente el 50 % de los animales presentaban niveles sanguíneos de glucosa superiores a los observados en los animales control (tabla I). Sin embargo, el resto de los animales inyectados presentaban niveles de glucemia normales.

Asimismo se estudió el efecto de una sobrecarga de glucosa (2,5 g/kg) en animales previamente tratados con estreptozotocina (1,5 g/kg), comparando su curva de glucemia con la que se obtenía con animales no tratados con el agente diabético.

Como puede apreciarse en la figura 1, las ranas control presentaban, a las tres horas, una elevación en los niveles de glucemia que se mantenía más o menos

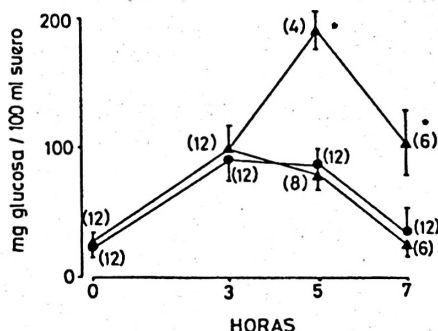


Fig. 1. Niveles de glucemia alcanzados tras la administración de una dosis de 2,5 g/kg de glucosa por inyección en el saco linfático dorsal a animales tratados previamente con estreptozotocina (1,5 g/kg) (▲) y a animales controles (●).

Los números entre paréntesis indican el número de animales en cada punto. Los segmentos verticales representan la desviación estándar. * $p < 0,001$ comparados con los controles.

constante hasta las cinco horas de la administración de glucosa.

A las siete horas ya se habían recuperado prácticamente los valores basales. De las ranas que previamente habían sido tratadas con estreptozotocina se podían diferenciar perfectamente dos grupos de animales. Uno, que constituía aproximadamente el 50 % de los animales, presentaba una curva de glucemia muy similar a la observada en los animales control. En el otro grupo de animales, por el contrario, los niveles de glucemia después de las tres horas seguían elevándose hasta alcanzar, a las cinco horas, valores unas dos veces superiores a los que alcanzaban los animales control. A las siete horas dichos valores habían descendido pero no habían alcanzado todavía los valores basales.

Discusión

La aloxana y la estreptozotocina son los fármacos más ampliamente utilizados para la inducción de diabetes experimental. Las dosis utilizadas normalmente por kilogramo de peso corporal varían según la especie animal y la vía de administración, oscilando entre 60 y 150 mg para la aloxana y de 65 a 200 mg para la estreptozotocina (3, 6). Los efectos diabéticos generalmente son evidentes a las 48 horas de su inyección.

Los datos obtenidos indican que dosis de aloxana o estreptozotocina, que son diabéticas para otros animales de experimentación, administradas a la rana por inyección en el saco linfático dorsal (vía típica para la administración de fármacos a este animal), resultan totalmente ineficaces.

La dosis de aloxana que produce un efecto hiperglucemiante en las ranas (300 mg/kg) provoca al mismo tiempo la muerte de la mayoría de los animales en menos de 72 horas. En consecuencia, la aloxana en las ranas presenta la dosis diabética y la dosis letal muy próxi-

mas. Por ello la aloxana ha resultado ser una droga poco útil para la inducción de diabetes experimental en esta especie.

La estreptozotocina permite obtener ranas con las características propias de la diabetes, si bien se requiere la administración de dosis de siete a veinte veces superiores a las utilizadas en otros animales de experimentación, las cuales, sin embargo, no resultan letales. Por medición de los niveles de glucemia se puede apreciar que sólo en aproximadamente un 50 % de las ranas tratadas con 1,5 g/kg, la droga ha sido efectiva. La realización de una curva de tolerancia a la glucosa exógena confirma este punto, ya que sólo la mitad de los animales tratados con el fármaco presentan curvas de glucemia anormales.

Estos resultados parecen indicar que las ranas presentan una resistencia a los agentes diabetogénicos mayor que la de otras especies animales anteriormente estudiadas, si bien no se puede descartar la posibilidad de que ello sea debido a la peculiaridad de la vía de administración utilizada.

Resumen

Se ha estudiado el efecto de los agentes diabetogénicos, aloxana y estreptozotocina, administrados a la rana a través del saco linfático

dorsal. La aloxana no parece ejercer ningún efecto diabetogénico a dosis no letales. Dosis de 300 mg/kg provocan la muerte de la mayoría de los animales antes de las 72 horas, en un estado de hiperglucemia. La estreptozotocina a dosis inferiores a 1 g/kg tampoco parece ser efectiva. A dosis de 1,5 g/kg, que no resultan letales, la eficiencia es del 50 %, aproximadamente.

Bibliografía

1. ARISON, R. N., CHIACCIO, E. I., GLITZER, M. S., CASSARO, J. A. y PRUSS, M. P.: *Diabetes*, 16, 51-55, 1967.
2. BERGMAYER, H. U., BERNT, E., SCHMIDT, F. y STORK, G.: En «Methods of Enzymatic Analysis» (Bergmayer, H. U., ed.), vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim y Academic Press, Inc., Londres, 1974, pp. 1196-1201.
3. FRERICH, H. y CREUTZFELDT, W.: En «Handbuch der Experimentellen Pharmakologie», vol. XXXII/1, Springer-Verlag, Berlín, 1971, pp. 159-202.
4. HOFTIEZER, V. y CARPENTER, A. M.: *Diabetologia*, 9, 178-184, 1973.
5. JUNOD, A., LAMBERT, A. E., ORCI, L., PICTET, R., GONET, A. E. y RENOLD, A. E.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 126, 201-205, 1967.
6. RUDAS, B.: *Arzneim. Forsch.*, 22, 830-861, 1972.
7. SMITH, C. L.: *J. Exp. Biol.*, 26, 412-429, 1950.