

TRABAJO ORIGINAL

Inducción de hiperglucemias moderadas en ratas wistar por inoculación neonatal de estreptozotocina. ¿Inyección subcutánea o intraperitoneal?

Moderate Hyperglycemia Induction in Wistar Rats by Neonatal Streptozotocin Inoculation. Subcutaneous or Intraperitoneal Injection?

Bequer L*, Gómez T*, Molina JL*, López F**, Gómez CL***, Clapés S****

* Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.

** Hospital Gineco-obstétrico "Mariana Grajales". Villa Clara.

*** Centro de Toxicología Experimental. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.

**** Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Habana

RESUMEN

La experimentación en modelos animales es una herramienta importante para comprender los mecanismos fisiopatológicos que caracterizan la diabetes mellitus. Dado que es necesario conocer la implicación de cada variante seleccionada en la concepción del modelo de diabetes a utilizar, en este caso de hiperglucemias moderadas, proponemos evaluar en ratas adultas el efecto de la administración neonatal (subcutánea o intraperitoneal) de estreptozotocina (STZ) sobre su estado metabólico y oxidativo.

Se indujo diabetes en gazapos hembras de dos días de nacidos mediante la inoculación de 100 mg/Kg de peso corporal de STZ. Los grupos, de 10 animales cada uno, se definieron según la vía de inoculación subcutánea (SC) o intraperitoneal (IP). Los neonatos designados como controles recibieron (SC o IP) únicamente vehículo. El fenotipo se manifestó a las 6 semanas de vida en ambos grupos. El grupo STZ SC mostró un promedio semanal de glucemias significativamente mayor y un peor control glucémico durante el experimento, reflejado por los valores de hemoglobina glicosilada. A las 12 semanas se realizó la eutanasia y se estudiaron indicadores del perfil renal, lipídico y estrés oxidativo. En los grupos tratados con STZ, respecto a los tratados solamente con vehículo, no existen diferencias significativas en el lipidograma y uricemia; únicamente la creatinemia y la uremia son significativamente mayores en STZ SC vs. CONTROL SC y STZ IP. El análisis estadístico de los parámetros del estado oxidativo [malonildialdehído (MDA) y productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP)] no muestra diferencias entre los grupos estudiados.

Se concluye que, si bien por ambas vías de inducción se logra instaurar el modelo deseado, desde el punto de vista metabólico los animales en los que se utilizó la vía SC el fenotipo se manifiesta con mayor similitud a lo que ocurre en el síndrome diabético humano, fundamentalmente en lo referido a los parámetros de la función renal. **Rev Argent Endocrinol Metab 51:178-184, 2014**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: diabetes mellitus tipo 2, estreptozotocina, modelos animales, hiperglucemia moderada, inyección subcutánea

ABSTRACTS

Animal experimentation is an important tool for understanding the pathophysiological mechanisms characterizing diabetes mellitus type 2 (DMT2). Based on the fact that it is necessary to know the implication of each variant selected in DMT2 models, in this case of moderate hyperglycemia, we propose to evaluate the metabolic and oxidative stress status in adult rats after neonatal [subcutaneous (SC) or intraperitoneal (IP)] administration of streptozotocin (STZ). Thus, DMT2 was induced by either SC or IP injection of 100 mg/Kg

Recibido: 05-03-2014 Aceptado: 22-09-2014

Correspondencia: MSc. Leticia Bequer Mendoza - Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Carretera al Acueducto. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. leticiabm@ucm.vcl.sld.cu

body weight of streptozotocin (STZ) in 2 day-old rat female offsprings. Neonates designated as controls received only vehicle in a similar schedule. Groups of 10 animals were defined by the route of injection (SC or IP). Hyperglycemia developed at 6 weeks of life in both experimental groups; however, rats from the group receiving STZ SC displayed a significantly higher weekly average of blood glucose levels and a poorer glycemic control during the experiment (indicated by the peripheral glycosylated hemoglobin levels). At 12 weeks of age, euthanasia was performed, and indicators of kidney function, peripheral lipid profile and oxidative stress parameters were studied. In STZ-treated rats, there were no significant differences in circulating concentrations of lipids, uric acid, MDA and PAOP, compared with controls. Interestingly, peripheral creatinine and urea concentrations were significantly higher in STZ SC-treated rats than in both CONTROL SC and STZ IP rats. We conclude that, although the DMT2 phenotype could be obtained by neonatal STZ administration by either route, the phenotype developed by animals inoculated with STZ by the SC route was more similar to that occurring in the human diabetic syndrome, mainly as regards renal function parameters. **Rev Argent Endocrinol Metab 51:178-184, 2014**

No financial conflicts of interest exist.

Key words: diabetes mellitus, streptozotocin, animal models, moderate hyperglycemia, subcutaneous injection

INTRODUCCIÓN

Según la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD), el término diabetes mellitus (DM) define un desorden metabólico de etiología multifactorial, que se caracteriza por hiperglucemia crónica con disturbios del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, como resultante de alteraciones en la secreción y/o acción de la insulina⁽¹⁾.

La forma más común de la enfermedad es la DM tipo 2 (DMT2), presentando una prevalencia promedio mundial de 8,3 % en el año 2011. En esta se presenta una disfunción de las células β pancreáticas que resulta en una progresiva disminución de la secreción de insulina en un escenario de una reducción de la acción de la hormona⁽¹⁾.

El número creciente de casos y la evolución de las complicaciones asociadas a la DMT2 en general, ha llevado a que la experimentación en modelos animales sea una herramienta importante para entender los complejos mecanismos fisiopatológicos asociados a la enfermedad. Habitualmente, los estudios son realizados fundamentalmente en roedores, en los que la diabetes es inducida mediante la acción citotóxica de estreptozotocina (STZ) sobre las células β del páncreas^(2,3).

El uso de la STZ como agente diabetogénico está ampliamente estudiado. En dependencia del tipo de hiperglucemia que se desee inducir será la línea de roedor, su edad, así como la dosis y vía de inoculación del fármaco a emplearse. Aunque existen numerosas variantes, generalmente se utiliza la administración de STZ a edad adulta para lograr una destrucción total del páncreas endocrino y una hiperglucemia severa, mientras

que la inyección de la droga en el período neonatal provoca hiperglucemias moderadas en la adultez debido a la regeneración parcial de células β ^(2,4,5).

Como ocurre en el síndrome diabético humano, en el animal de laboratorio también se modifica el balance del estrés oxidativo (EO) y el estado metabólico general del individuo, situación que es utilizada en la investigación con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que conlleven a una calidad y esperanza de vida adecuada en las personas que padecen esta enfermedad.

Partiendo del hecho de que es necesario conocer la implicación de cada variante seleccionada en la concepción del modelo de diabetes a utilizar, en este caso el de hiperglucemias moderadas, nos proponemos en este trabajo evaluar si existen diferencias entre los fenotipos (en cuanto al estado metabólico y oxidativo) entre los fenotipos obtenidos cuando la administración neonatal de STZ se realiza por la vía subcutánea (SC) o intraperitoneal (IP)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se aparearon ratas Wistar hembra y macho, aptas para la reproducción, obtenidas del CENPALAB (Centro de Producción de Animales de Laboratorio en La Habana, Cuba). Al segundo día del nacimiento de la descendencia se sexaron las crías y en las hembra se indujo hiperglucemia mediante la inoculación de 100 mg/Kg de peso corporal de STZ (Applichem; disuelta en buffer citrato 0,1 M, pH 4,5). Los neonatos designados como controles recibieron únicamente vehículo buffer citrato. Los

grupos de estudio (n = 10 animales cada uno) se definieron según la sustancia (vehículo o STZ) y la vía de inyección (SC o IP).

Durante el período de lactancia (21 días), las crías se mantuvieron con sus madres. Luego del destete se alojaron en cajas de 5 animales. En todo momento se controlaron las condiciones experimentales para la temperatura (20 ± 2 °C), humedad (40 %), ciclo de luz/oscuridad (12 horas) y acceso a libre demanda de agua y comida balanceada.

Desde la semana 6 hasta la 12 de vida se realizaron mediciones, en ayuno de 16 horas, de los niveles de glucosa en sangre (glucosa oxidasa; con Glucómetro y Biosensores SUMA). El sacrificio se llevó a cabo por exsanguineación bajo anestesia (tiopental sódico; 50-60 mg/kg). Por punción de la vena cava inferior se extrajo sangre para la realización de varias determinaciones bioquímicas y de EO.

Para la cuantificación de hemoglobina glicosilada (Hb A1c) se utilizó el método de aglutinación utilizando 20 μ l de sangre total. El resto de la sangre se colectó en tubos con anticoagulante (EDTA 5,6 %), se centrifugó a 3000 rpm por 10 min, y el plasma se almacenó a -40 °C para posteriores análisis.

Tanto los parámetros circulantes de la función renal (creatinina, urea, ácido úrico) como lipídica (colesterol y triglicéridos) se resolvieron por métodos enzimáticos. El daño oxidativo a lípidos se midió mediante la determinación de malondialdehído (MDA), mientras que el daño a proteínas se evaluó mediante la técnica de productos avanzados de la oxidación a proteínas (PAOP).

De acuerdo a la normalidad de las muestras en cada variable se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas para determinar diferencias entre los grupos. La prueba t de Student se empleó únicamente para la glucemia, y para el resto de los indicadores se utilizó la prueba no paramétrica de Mann Whitney. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). El nivel de significación estadística fue considerado cuando $P < 0,05$.

El experimento fue realizado según recomienda la *guía del National Institutes of Health* para el trabajo con animales experimentales. El protocolo fue aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética de la Unidad de Investigaciones Biomédicas en la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara (CUBA).

RESULTADOS

La inducción neonatal de DMT2 en ambos grupos tratados con STZ se confirmó mediante la medición semanal de las glucemias en ayuno. La Figura 1 muestra el promedio de las glucemias tomadas entre las semanas 6 y 12 en cada grupo estudiado. Todas las ratas incluidas en los grupos controles mostraron glucemias por debajo de 6,1 mmol/l. Las hiperglucemias en los grupos inoculados con STZ no fueron constantes en el tiempo. A lo largo de las 7 semanas de monitoreo, en algunas ratas los valores oscilaron incluso por debajo de 6,0 mmol/l, aunque de manera general predominaron cifras superiores. El promedio semanal de glucemias fue significativamente mayor en el grupo STZ SC que en los restantes grupos.

Entre los parámetros bioquímicos estudiados se encuentra la Hb A1c, un fuerte indicador del estado metabólico del individuo. En la Figura 2 se presentan los valores medios por cada grupo cuando medidos al final del experimento. En los grupos diabéticos, la significación estadística refleja un pobre control glucémico respecto a los controles; sin embargo, el grupo STZ SC fue el que mostró una peor regulación metabólica, aunque no alcanzó a ser significativa al compararse con lo ocurrido en el STZ IP.

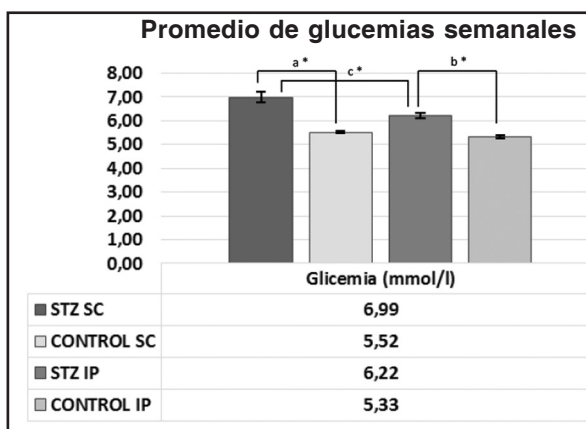


Figura 1. Promedio semanal de glucemias en los grupos de estudio. Los valores están expresados como la media \pm EEM. * $P < 0,05$ (t de Student) (N = 10 ratas por grupo).

^aSignificación estadística de STZ SC respecto a CONTROL SC (* $P = 0,000$)

^bSignificación estadística de STZ IP respecto a CONTROL IP (* $P = 0,000$)

^cSignificación estadística de STZ SC respecto a STZ IP (* $P = 0,031$)

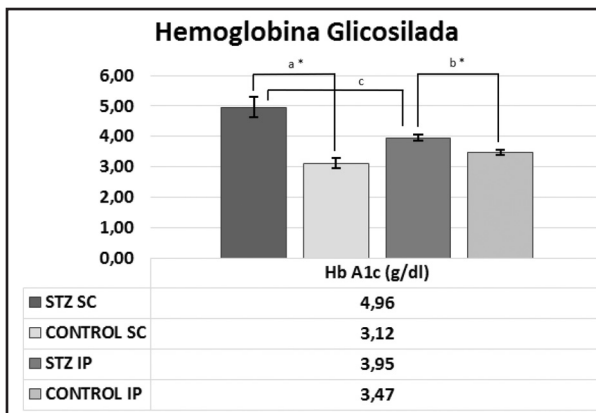


Figura 2. Hemoglobina glicosilada en los grupos de estudio. Los valores están expresados como la media \pm EEM. * $P < 0,05$ (Mann Whitney) (N = 10 ratas por grupo).

^aSignificación estadística de STZ SC respecto a CONTROL SC (* $P = 0,001$)

^bSignificación estadística de STZ IP respecto a CONTROL IP (* $P = 0,006$)

^cSignificación estadística de STZ SC respecto a STZ IP ($P = 0,167$)

Los indicadores periféricos de las funciones renal, lipídica y de EO se exponen en la Tabla 1. En los grupos tratados con STZ, respecto a los tratados solamente con vehículo, no existieron diferencias significativas para los parámetros periféricos del lipidograma y el ácido úrico. Sin embargo, y de importancia, los niveles circulantes de creatinina y urea fueron significativamente mayores en STZ SC comparados con los obtenidos en los grupos CONTROLES (SC e IP) y STZ IP. Finalmente, el análisis estadístico de los valores de MDA y PAOP no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados.

DISCUSIÓN

Durante las últimas décadas, se han desarrollado numerosos modelos experimentales en animales que, aunque ninguno posee todas las características clínicas observadas en diabetes en humanos, han tratado de recrear el patrón de la enfermedad natural lo más aproximadamente posible^(3,5,6). El modelo perfecto debería cumplir con las dos particularidades fundamentales de la DMT2: resistencia a la insulina y disfunción parcial de las células β pancreáticas, que junto a síntomas como hiperglucemia, desbalance metabólico y del EO definen la enfermedad.⁽³⁾

En dependencia de la finalidad de la investigación será el diseño del modelo a utilizar⁽²⁻⁴⁾ por lo que, en el presente trabajo, se induce diabetes con STZ a los dos días del nacimiento de ratas wistar por vía SC e IP con el objetivo de evaluar si en la adultez existen diferencias en el estado metabólico y de estrés oxidativo en función de la ruta de administración del agente diabetogénico.

A partir del análisis de los resultados encontramos que en todos los animales tratados en el período neonatal con STZ, e independientemente de la vía de inoculación, la enfermedad se manifiesta a partir de la sexta semana y se mantiene hasta el final del experimento, aunque el grupo inyectado SC promedió glucemias significativamente superiores al resto de los grupos.

En este tipo de modelos, donde ocurre una disminución en la producción de insulina debido a la destrucción neonatal de las células β secretoras de la insulina, está descrito que en los primeros días de vida las crías muestran hiperglucemias pero luego hasta aproximadamente las semanas 6 u 8 de vida los animales exhiben valores de glucemia normales. A partir de ese momento comienzan a presentar hiperglucemias moderadas, desarrollando en la rata adulta un fenotipo similar al de DMT2^(3,7-10).

Este comportamiento inicial responde a la acción de STZ como agente citotóxico selectivo para las células β contenidas en los islotes pancreáticos. Aunque esto es aún tema de debate, sí es conocido que STZ provoca muerte celular mediante la activación de los mecanismos de reparación celular en los que están involucrados desde la alquilación de bases de ADN nuclear hasta el consumo de mediadores químicos como el NAD^+ ⁽¹¹⁻¹³⁾. Varios trabajos han demostrado que la recuperación de la hiperglucemia transitoria es consecuencia de la rápida capacidad de regeneración celular en los roedores. Sin embargo, como la generación de nuevos islotes y reestructuración de los existentes en el páncreas es parcial, finalmente con el crecimiento esas células son insuficientes para secretar la insulina requerida por el animal en la edad adulta y se producen hiperglucemias moderadas^(2,14).

En este estudio, como consecuencia de la inducción de la enfermedad en ambos grupos inoculados con STZ, los animales desarrollaron un pobre control glucémico respecto a los CONTROLES. Esto se evidencia por la medición de los niveles circulantes de hemoglobina glicosilada a las 12 semanas de vida. Dichos valores reflejan que el grupo que

recibió el fármaco (STZ) por vía subcutánea (SC) ha presentado, aproximadamente en los dos meses anteriores a la determinación, una menos efectiva regulación glucémica (aunque no significativa) que los inyectados por la vía intraperitoneal. Vale acotar que la glicación de la hemoglobina se produce lentamente durante la vida media del eritrocito, alrededor de 7 semanas en la rata. Esta prueba es de gran utilidad para evaluar el control glucémico a largo plazo pues refleja la concentración relativa de glucosa sanguínea en el tiempo^(15,16).

Como ya se mencionó anteriormente, otras de las características más comunes de la diabetes tipo 2 y que, desearían verse manifestadas en un modelo animal de esta enfermedad, son las relacionadas al control metabólico y estado oxidativo. En la presente investigación, los indicadores estudiados reflejan un significativo desbalance metabólico en el perfil de parámetros relacionados a la función renal, así como un daño a lípidos y proteínas ligeramente superior cuando la STZ fue inyectada subcutáneamente.

La nefropatía diabética puede estar presente en el 10-25 % de los pacientes con diabetes tipo 2 al momento del diagnóstico⁽¹⁾, de ahí la importancia del estudio de la función renal en el modelo experimental. Las concentraciones de urea y creatinina en circulación son marcadores de referencia de la función renal, aunque la creatinina es considerada como un índice de función renal más sensible. El incremento en ambos parámetros indica un daño renal progresivo, y ello ha sido descrito tanto en estudios realizados en humanos diabéticos^(17,18) como en modelos animales⁽¹⁹⁻²¹⁾.

La elevación en la urea y creatinina séricas en el grupo STZ SC respecto a sus controles y respecto a STZ IP puede ser atribuida a cambios morfológicos y funcionales que ocurren en estadios tempranos de la enfermedad tanto en humanos como en modelos experimentales⁽¹⁹⁾. De hecho, la STZ ha sido utilizada en investigaciones para inducir nefropatía diabética pues provoca una hiperfiltración glomerular parecida a la que ocurre en la DMT2. En ratas diabéticas se ha descrito esta situación de hiperfiltración glomerular, frecuente a pesar de existir un número de nefronas normal, con vasodilatación preglomerular e incremento del filtrado glomerular y de la fracción de filtración⁽²²⁾.

Por otra parte, además de los trastornos del metabolismo de la glucosa que caracterizan la diabetes mellitus, en los pacientes diabéticos suelen asociarse cambios en el patrón de los lípidos séricos,

lo que constituyen un riesgo importante desde el punto de vista cardiovascular. En este modelo de inducción neonatal, aunque se muestra un ligero aumento de colesterol y triglicéridos en los grupos tratados con STZ respecto a los controles, dichas diferencias no son significativas, coincidiendo con estudios previos y similares⁽²³⁾. En otros reportes algunos autores refieren desarrollo de dislipidemia, fundamentalmente hipertrigliceridemia. En esos trabajos la diabetes es inducida a edad adulta por lo que las hipoinsulinemias e hiperglucemias generadas son severas^(19,24). Evidentemente los valores de las glucemias en este experimento y/o el tiempo de duración del mismo, independientemente de la vía de inducción de la enfermedad, no son suficientes para desencadenar los mecanismos necesarios que conllevan a las alteraciones lipídicas propias de la DMT2.

Estudios realizados evidencian la intervención de alteraciones de la insulina, ya sea por deficiencia o resistencia, como un importante factor fisiopatológico en el desarrollo de la dislipidemia. La insulina participa en la regulación de determinadas enzimas que controlan el metabolismo lipídico. Su incapacidad para funcionar adecuadamente puede ocasionar un aumento en el aporte de sustrato que puede llegar a ser tan intenso que sature la vía de oxidación resultando la aparición de hígado graso e hipertrigliceridemia⁽²⁴⁻²⁶⁾.

La diabetes mellitus es una enfermedad fuertemente relacionada al estrés oxidativo. Las especies reactivas del oxígeno generadas son capaces de reaccionar con numerosas estructuras celulares, específicamente con los ácidos grasos insaturados que forman parte de las membranas fosfolípicas, con proteínas y ácidos nucleicos. Como resultado, ocurren reacciones de peroxidación lipídica y glicosilación de proteínas que finalmente se traducen en daños a moléculas de gran importancia biológica⁽²⁷⁻²⁹⁾. En el presente trabajo, a pesar de no tener significación estadística, ambos grupos inoculados con STZ muestran un mayor daño a lípidos y a proteínas que los grupos no tratados (CONTROLES). Es posible que las hiperglucemias moderadas producidas en las semanas de evolución de la enfermedad (aproximadamente entre la 6 y la 12) no sean suficientes para provocar un desbalance oxidativo, lo que corrobora lo planteado por determinados autores que utilizan este mismo modelo⁽²³⁾. Sin embargo, en otras investigaciones donde es simulada la diabetes tipo 1 con hiperglucemias elevadas sí se han encontrado desórdenes

en el sistema oxidativo, tanto en enzimas antioxidantes como en moléculas^(24, 30).

Luego de analizar el comportamiento de cada parámetro determinado en los grupos de estudio se puede plantear que por ambas vías de inducción se logra instaurar el modelo deseado. No obstante es evidente que desde el punto de vista metabólico en los animales en los que se inoculó la STZ por vía SC la enfermedad se manifiesta con mayor similitud a lo que ocurre en el síndrome diabético humano, fundamentalmente en el daño evidenciado sobre la función renal.

Ningún modelo animal conocido reproduce exactamente todas las características de la DMT2, sin embargo, consideramos que el modelo de inducción de hiperglucemias moderadas en ratas wistar mediante la inoculación subcutánea de STZ, a los dos días de nacimiento, representa determinadas particularidades de la enfermedad y puede ser utilizado como una importante herramienta en la investigación de mecanismos fisiopatológicos, reproductivos e incluso farmacológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en evidencia. Edición 2013. Revista de la ALAD:1-142, 2013.
2. **Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, Netto AO, Dallaqua B, Gallego FQ, Iessi IL, Corvino SB, Serrano RG, Marini G, Piculo F, Calderon IMP, Rudge MVC.** Mild Diabetes Models and Their Maternal-Fetal Repercussions. *J Diabetes Res*:1-9, 2013.
3. **Islam M, Wilson R.** Experimentally Induced Rodent Models of Type 2 Diabetes In: *Animal Models in Diabetes Research, Methods in Molecular Biology*. J. Hans-Georg ed. Springer Science+Business Media, LLC pp 161-174, 2012.
4. **Jawerbaum A, White V.** Animal Models in Diabetes and Pregnancy. *Endocr Rev.* 31:680-701, 2010.
5. **Srinivasan K, Ramarao P.** Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res* 125:451-472, 2007.
6. **Ciobotaru E.** Development of Improved Animal Models for the Study of Diabetes. In: *Diabetes Mellitus – Insights and Perspectives*. O.O. Oguntibeju, ed. In Tech, Croatia. pp 313-336, 2013.
7. **González E.** Diabetes mellitus experimental: etiología de las malformaciones congénitas en descendientes de ratas diabéticas. *Rev Cubana Endocrinol* 13:53-63, 2002.
8. **Areas M, Gregorio S, Reyes F.** Evaluación de la inducción de diabetes neonatal con streptozotocina en ratas Wistar. *Alimentaria* 347:45-49, 2003.
9. **Portha B, Picon L, Rosselin G.** Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17:371-377, 1979.
10. **Arulmozhi DK, Veeranjanyulu A, Bodhankar SL.** Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 diabetes mellitus: A glance. *Indian J Pharmacol* 36:217-221, 2004.
11. **Szkudelski T.** Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med*:1-10, 2012.
12. **Lenzen S.** The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216-226, 2008.
13. **Szkudelski T.** The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 50:536-546, 2001.
14. **Nicholson M, Arany E, Hill D.** Changes in islet microvasculature following streptozotocin-induced b-cell loss and subsequent replacement in the neonatal rat. *Exp Biol Med* 235:189-198, 2010.
15. **Rosales A.** Determinación de Hemoglobina glicada (HbA1c) en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. In: *Unidad de Investigación Experimental. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Izta-palapa, Mexico, DF.* p 31, 1994.
16. **Aguilar M.** ¿Hemoglobina A1c en el diagnóstico de la diabetes mellitus? Pros y contras. *Av Diabetol* 26:4-5, 2010.
17. **Khalaf SJ.** Study of some biochemical markers in diabetic patients. *Tik Med J* 16:84-87, 2010.
18. **Deepa K, Manjunatha goud BK, Oinam D, Devaki RN, Bhavna N, Asha P, Naureen A.** Serum urea, creatinine in relation to fasting plasma glucose levels in type 2 diabetic patients. *Int J Pharm Bio Sci* 1:279-283, 2011.
19. **Mir SH, Baqui A, Bhagat RC, Darzi MM, Shah AW.** Biochemical and Histomorphological Study of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Rabbits. *Pak J Nut* 7:359-364, 2008.
20. **Amin KA, Awad EM, Nagy MA.** Effects of panax quinquefolium on streptozotocin-induced diabetic rats: role of C-peptide, nitric oxide and oxidative stress. *Int J Clin Exp Med* 4:136-147, 2011.
21. **Pradeepa S, Subramanian S, Kaviyarasan V.** Biochemical evaluation of antidiabetic properties of *Pithecellobium dulce* fruits studied in streptozotocin induced experimental diabetic rats. *Int J Herbal Med* 1:21-28, 2013.
22. **Bárceñas L.** Efecto del suero de anguila en un modelo experimental de insuficiencia renal en ratas. In: *Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Colima, Colima.* p 36, 2007.
23. **Sinzato YK, Lima PH, de Campos KE, Kiss AC, Rudge MV, Damasceno DC.** Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Rev Assoc Med Bras* 55:384-388, 2009.
24. **Fernández T, Clapés S, Suárez G, Antiguas A, Uriarte O, Rodríguez V, Soca M, Perera A, Herrera M, Rodríguez M, Cabrera A.** Marcadores de estado metabólico, estrés oxidativo e inflamación en

- ratas diabéticas tratadas con vitamina E. Memorias Convención Internacional de Salud Pública. Cuba Salud 2012. La Habana:1-8, 2012.
25. **Traversa M, Elbert A.** Dislipidemia, Diabetes tipo 2 y enfermedad renal. Aspectos fisiopatológicos y terapéuticos. Separata Línea Montpellier 17:1-36, 2009.
 26. **Sherwin R.** Diabetes Mellitus In: Cecil. Tratado de Medicina Interna. Bennet and Plum, eds. McGraw Hill InterAmericana. p 2585, 1996.
 27. **Rosado J, Mendoza V.** Minirevisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en diabetes mellitus. Bioquímica 32:58-69, 2007.
 28. **Dale I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A.** Biomarkers of oxidative damage in human diseases. Clin Chem 52:601-623., 2006.
 29. **Giacco F, Brownlee M.** Oxidative Stress and Diabetic Complications. Circ Res 107:1058-1070, 2010.
 30. **Mora A, Aragón M, Ospina L.** Caracterización del estrés oxidativo in streptozotocin diabetic wistar rats. Farmacología y Toxicología 16:1-12, 2009.