

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL**

**DIABETES MELLITUS INDUCIDA CON ALOXANO® EN CANINOS Y SU RELACIÓN  
CON LA TIROIDES**

Memoria de Título presentada como parte  
de los requisitos para optar al TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO.

**HELEN YINETTE CÁRDENAS DANNER**  
**VALDIVIA-CHILE**  
**2003**

**PROFESOR PATROCINANTE**

---

Dr. Víctor Cubillos G.

**PROFESOR COPATROCINANTE**

**PROFESOR COLABORADOR**

---

Dra. Claudia López A.

**PROFESORES CALIFICADORES**

---

Dra. Carolina Gallardo M.

---

Dr. Elías Caballero V.

**FECHA DE APROBACIÓN**

8 de agosto de 2003

*Con cariño a mis padres,  
hermanos y omiita.*

## ÍNDICE

	Página
1. Resumen. ....	1
2. Summary. ....	2
3. Introducción. ....	3
4. Material y Métodos. ....	11
5. Resultados. ....	17
6. Discusión. ....	52
7. Conclusiones. ....	63
8. Bibliografía. ....	64
9. Anexos. ....	71

# DIABETES MELLITUS INDUCIDA CON ALOXANO<sup>®</sup> EN CANINOS Y SU RELACIÓN CON LA TIROIDES

## 1. RESUMEN

Este estudio se realizó en perros con el fin de establecer la relación entre la Diabetes mellitus Tipo 1 y la glándula tiroides. Se utilizaron 20 caninos, machos, mestizos, de los cuales 5 fueron usados como controles y el resto se dividió en 5 subgrupos de 3 perros cada uno (Grupos Experimentales), a los cuales se les administró una dosis única de 75 mg/kg de Aloxano<sup>®</sup>.

Los perros del Grupo Control fueron sacrificados al inicio de la investigación (0 h) y los de los Grupos Experimentales a las 2 y 24 h, así como a los 7, 14 y 21 días. Muestras de sangre para análisis de laboratorio clínico (glicemia, fructosamina, albúmina, T3/T4, calcio y fósforo) se obtuvieron previo a la eutanasia de cada Grupo. Posteriormente, se realizó la necropsia, evaluándose la presencia de alteraciones morfológicas en páncreas y tiroides. Para el análisis histológico de ambos tejidos se tomaron muestras en formalina bufferizada al 10%.

El análisis histológico del páncreas reveló disminución en el número de islotes de Langerhans por campo, a partir de las 24 h, haciéndose más evidente desde los 7 días p.i. en adelante. Además, se observaron lesiones necróticas y degenerativas desde las 2 h post-administración del Aloxano<sup>®</sup> e infiltrado linfocitario intersticial a partir de las 24 h, el cual es característico de cuadros de Diabetes. Las tiroides, evidenciaron disminución de la altura de los epitelios foliculares, incremento de la densidad del coloide, disminución de las gotas coloideas y, mediante la tinción de Desmarais y Laham, se apreció una mayor cantidad de coloide folicular (color amarillo), indicativo de hipofunción tiroidea. Por otra parte, se vió incremento en el número de células parafoliculares productoras de calcitonina a partir de los 7 días p.i., dicho incremento no guardó relación con los valores de calcio sanguíneo observados.

El análisis de los valores plasmáticos de glucosa y fructosamina, evidenció un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), a partir del séptimo día, indicando la presencia de Diabetes mellitus. El análisis de las hormonas tiroideas T3 y T4 en los perros de los Grupos Experimentales, indicó disminución de la actividad de la glándula tiroides desde el séptimo día, hallazgos que están en concordancia con las alteraciones histológicas presentes en dicho órgano. Finalmente, los valores plasmáticos de albúmina, calcio y fósforo no evidenciaron variaciones en los Grupos Experimentales.

Los resultados obtenidos permiten concluir que existe una clara relación entre la Diabetes mellitus inducida experimentalmente con Aloxano<sup>®</sup> en perros y la glándula tiroides, manifestada ésta por una disminución de su funcionalidad.

Palabras clave: Diabetes mellitus, tiroides, perros.

## **DIABETES MELLITUS INDUCED WITH ALLOXAN® IN DOGS AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE THYROID GLAND.**

### **2. SUMMARY**

The current survey was performed with the purpose to establish the relation between Diabetes Mellitus Type 1 and in the thyroid gland in dogs. The experimental study considered 20 crossbred male dogs from which 5 were utilized as Control Group and the rest was divided in 5 subgroups of 3 dogs each one (Experimental Groups) to which a unique dose of 75 mg/kg of Alloxan® was administered.

According to the experimental design, the dogs of the Control Group were sacrificed at the beginning of the investigation (0 h) and those of the Experimental Groups at 2, 24 h and 7, 14 and 21 days respectively. Samples of blood for the clinical laboratory analysis (glycaemia, fructosamine, albumin, T3/T4, calcium and phosphorus) were obtained previous to the euthanasia of each group; afterwards a necropsy was done, evaluating the presence of morphologic changes in the pancreas and thyroid. For the histological analysis, samples of both tissues were taken and were fixed in 10% bufferized formaline.

The histological analysis of the pancreas revealed a decline in the number of Langerhans islets per field, from the 24 h, being more evident from the 7 days p.i. henceforth. In addition, necrotic and degenerative injuries were observed from the 2 h of Alloxan® post- administration and interstitial lymphocyte infiltrated from the 24 h. The lymphocyte infiltrate is typical from the diabetes charts. In the Experimental Groups, the thyroid showed an evident decrease in the height of follicular epitheliums, increase of the colloid density and declining of the colloid drops. By means of the Desmarais and Laham stain, a bigger amount of follicular colloid was appreciated (yellow color), indicatives of thyroid hypofunction. On the other hand, an increase of the number of parafollicular cells (that produce the calcitonina) was observed from the 7 days p.i. on, this increment did not have a relationship with the blood calcium values observed.

The analysis of the fructosamine and glucose plasmatic values, made clear a significant statistic increase, from the 7<sup>th</sup> day on, indicating the presence of Diabetes Mellitus. The analysis of the T3/T4 thyroid hormones in the Experimental Groups, indicated a decrease of the thyroid gland activity, from the 7<sup>th</sup> day on, findings that are in agreement with the histological alterations that are present in that organ. Finally, the albumin, calcium and phosphorus plasmatic values did not show variations in the Experimental Groups.

The obtained results allow to conclude that there is a clear relation between the Diabetes Mellitus induced experimentally with Alloxan® in dogs and the thyroid gland, expressed by a functional decrease.

Key Words: Diabetes mellitus, thyroid, dogs.

### 3. INTRODUCCIÓN

El páncreas conjuntamente con el hígado constituyen las glándulas mixtas más importantes del organismo, con función endo y exocrina. El páncreas es una glándula lobulada, tubuloalveolar de color grisáceo, la cual en gran parte está localizada adyacente al duodeno (Carlton y McGavin, 1995).

La función exocrina del páncreas está dada por los acinos glandulares, responsables de secretar enzimas digestivas hacia el lumen intestinal. La función endocrina, está regulada por los islotes de Langerhans, responsables de la secreción de hormonas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos hacia el torrente sanguíneo (Guyton, 1992; Cunningham, 1999).

#### 3.1. PÁNCREAS EXOCRINO

El páncreas exocrino produce enzimas que contribuyen a la digestión y que actúan sobre los lípidos (lipasa y fosfolipasa), proteínas (tripsina y quimotripsina) y carbohidratos (amilasa). Por otra parte, el jugo pancreático, posee también electrolitos que mantienen el pH del contenido intestinal en un rango óptimo para la actividad enzimática. Su actividad es regulada por factores nerviosos y humorales (Carlton y McGavin, 1995).

#### 3.2. PÁNCREAS ENDOCRINO

El páncreas endocrino consiste en aproximadamente un millón de unidades celulares (los islotes de Langerhans) y de células dispersas en los conductos pancreáticos de menor calibre. Desde el punto de vista embriológico, las células de los islotes son de origen endodérmico y se forman a partir de diversos puntos a lo largo del sistema tubuloductal del páncreas (Cotran y col., 1995). En caninos, el sistema endocrino pancreático se caracteriza por poseer 5 tipos celulares (Cunningham, 1999; Nelson, 2000):

- **Las células  $\alpha$**  secretan glucagón, hormona responsable de la hiperglicemia debido a su actividad glucogenolítica a nivel hepático. Dichas células contienen gránulos insolubles en alcohol y se tiñen de color rojo brillante mediante la tinción de Fucsina Aldehído de Gomori.
- **Las células  $\beta$**  secretan insulina, hormona responsable de la captación y utilización de glucosa por el 80% de los tejidos del organismo. Dichas células representan entre el 60 al

80% de los islotes pancreáticos, poseen gránulos solubles en alcohol y se tiñen de color naranja oscuro con la tinción Tricrómica de Mallory y de color púrpura con Fucsina Aldehído de Gomori.

- **Las células C**, no poseen gránulos y son las precursoras de los otros tipos celulares presentes en los islotes. No presentan positividad ante ningún tipo de tinción, pudiendo ser identificadas mediante microscopía electrónica y técnicas inmunohistoquímicas.
- **Las células  $\delta$**  (raramente descritas en perros) (5%) están localizadas en la periferia de los islotes. Son responsables de la síntesis y producción de somatostatina, hormona encargada de la inhibición de la liberación de insulina y glucagón.
- **Las células F** secretan polipéptido pancreático (PP), el cual posee diversas funciones a nivel gastrointestinal, es así como estimula las enzimas gástricas e intestinales e inhibe la motilidad intestinal. Dichas células están presentes tanto en el páncreas endo como exocrino.

### 3.2.1. Insulina

La insulina es una hormona anabólica, que tiene efectos directos sobre el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas (Jubb y col., 1993). Es necesaria para el transporte de glucosa y aminoácidos a través de la membrana celular; la formación de glucógeno en el hígado y músculo esquelético; la conversión de glucosa en triglicéridos; la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas. Su función metabólica fundamental es incrementar el transporte de glucosa al interior de ciertas células del organismo. Las células del músculo estriado, incluido el miocardio, los fibroblastos y las células adiposas, en su conjunto, representan aproximadamente dos tercios del peso corporal. Además de estos efectos metabólicos, junto a factores del crecimiento similares en su accionar a la insulina, ponen en marcha la síntesis de ADN en ciertas células y estimulan su crecimiento y diferenciación (Cotran y col., 1995).

La insulina interacciona con sus células diana ligándose primero al receptor de insulina, compuesto por dos subunidades glicoproteicas,  $\alpha$  y  $\beta$ . Dado que la cantidad de insulina ligada a las células depende de la disponibilidad de receptores, su número y su actividad son importantes para regular la acción de la insulina. La hormona ligada al receptor desencadena una serie de reacciones intracelulares como la activación o inhibición de enzimas mitocondriales sensibles a la insulina, síntesis de proteínas y síntesis de ADN (Cotran y col., 1995).



### 3.3. DIABETES MELLITUS

La Diabetes mellitus es una enfermedad crónica, hereditaria, frecuente, caracterizada por hiperglicemia y generalmente glucosuria, debida a insuficiencia absoluta o relativa de insulina, que origina trastornos en el metabolismo intermediario de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, y que se caracteriza por múltiples manifestaciones clínicas y anatómicas (Pumarino, 1984).

En el ámbito de la medicina veterinaria esta condición ha sido reportada principalmente en animales con lapso de vida prolongado como perros y gatos (Jubb y col., 1993; Nelson, 2000). Al respecto, esta patología ha sido ampliamente estudiada en perros, tanto en su forma de presentación natural como al ser inducida experimentalmente mediante el uso de drogas citotóxicas (Aloxano y Estreptozotocina) que afectan a las células beta de los islotes de Langerhans (Grodsky y col., 1982; Hermansen y col., 1985; Mendez y Ramos, 1994).

#### 3.3.1. Clasificación de la Diabetes Mellitus

3.3.1.1. Diabetes mellitus Insulino Dependiente (DID, de tipo I): La mayor parte de las células beta del páncreas se destruyen en el momento en que se manifiesta la DID. Este proceso destructivo es de naturaleza autoinmunitaria. Requiere para su presentación susceptibilidad genética a esta enfermedad. En segundo lugar, necesita de un factor ambiental para iniciar el proceso en individuos con susceptibilidad genética. Se piensa que las infecciones virales representan un mecanismo desencadenante común (Foster, 1991). En perros constituye la forma más frecuente de presentación, afectando entre el 50 al 70% de los pacientes diabéticos (Hoening, 1995; Nelson, 2000).

3.3.1.2. Diabetes mellitus No Insulino Dependiente (DNID, de tipo II): Esta enfermedad tiene un mecanismo de herencia desconocido, excepto la variante denominada “Diabetes del Adulto de Inicio en la Juventud” (DAIJ). Se caracteriza por hiperglicemia leve en pacientes jóvenes, resistentes a cetosis.

Los pacientes con DNID muestran dos defectos fisiológicos: anomalías de la secreción de insulina y resistencia a la acción de ésta en los tejidos efectores. Se ha observado también, que la mayoría de los pacientes con diabetes tipo II son obesos, por lo que se ha especulado la posibilidad de que la resistencia insulínica inducida por este estado produzca un agotamiento de las células beta, en otras palabras, el defecto secretor sería secundario (Foster, 1991). Por otra parte, existen condiciones fisiológicas que causan el mismo efecto, como la preñez en las perras, donde las altas concentraciones de estrógenos, cortisol y el antagonismo de la progesterona sobre la acción periférica de las insulinasas placentarias, dan origen a Diabetes Mellitus tipo II (Chastain y Ganjman, 1994).

3.3.1.3. Diabetes mellitus tipo III: La DM tipo III se presenta producto de enfermedades o tratamientos medicamentosos. Entre las enfermedades que pueden originar este cuadro, en perros y gatos, se reportan la Enfermedad de Cushing (hiperadrenocorticismos), el hipertiroidismo, la acromegalia, anormalidades de receptores insulínicos y alteraciones genéticas responsables de múltiples anomalías (Engerman y Kramer, 1982; Chastain y Ganjman, 1994; Hoenig, 1995; Schäer, 1999; Nelson, 2000).

Los glucocorticoides y progestágenos son las drogas más frecuentes en el origen de DM tipo III. La furosemida, las tiazidas, la fenitoína y la clorpromazina se consideran responsables de la tolerancia a la glucosa (Simon, 1997).

En relación con la presentación de los tres tipos de DM antes descritos, en caninos se han reportado pacientes con hiperglicemias e insulinemias extremadamente bajas (homologable a la diabetes humana juvenil tipo I), perros hiperglicémicos con normo e hiperinsulinemia (similar a lo documentado en el hombre en la diabetes tipo II) y perros con diabetes subclínica (similar a la diabetes tipo III en el hombre). Estos diferentes tipos representan estadios de la evolución natural de la Diabetes Mellitus en los perros, comenzando por el tipo III, luego el II y finalmente, manifestándose el tipo I (Simon, 1997).

### 3.3.2. Fisiopatología de la Diabetes Mellitus

La deficiencia absoluta o relativa de insulina origina una menor utilización de la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos por parte de los tejidos periféricos (hígado, músculos y células adiposas). Cuando la hiperglicemia resultante excede los 180 a 220 mg/dl (10,08-12,32 mmol/l) en el perro y llega a valores cercanos a los 300 mg/dl (16,8 mmol/l) en el gato, se presenta glucosuria con diuresis osmótica (poliuria). La glucosuria representa una pérdida calórica y junto con la menor capacidad de utilizar la glucosa ingerida, conduce a pérdida de peso. La polidipsia compensa la poliuria evitando la deshidratación (Ettinger y Feldman, 1997).

La capacidad de la glucosa para penetrar en las células cerebrales hipotalámicas en el “centro de la saciedad” está bajo influencia de la insulinemia; dado que la glucosa no puede ingresar a dichas células, no se inhibe el centro del hambre y se produce polifagia. En consecuencia, los cuatro signos clásicos de la Diabetes Mellitus son: poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso (Ganong, 1992).

Los animales sin tratar finalmente desarrollan cetoacidosis. La deficiencia de insulina promueve el aumento de la lipólisis. Los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo, en ausencia de la insulina, son convertidos en el derivado CoA llamado Acil CoA, que finalmente deriva en la formación de cuerpos cetónicos (Ettinger y Feldman, 1997).

### 3.4. GLÁNDULA TIROIDES

Todos los vertebrados tienen glándula tiroidea y su origen y desarrollo probablemente sea común en todas las especies. Deriva de un primordio del piso faríngeo que surge como evaginación de dicho piso, cerca del primer par de bolsas faríngeas. Esta evaginación adquiere finalmente aspecto bilobulado y se localiza sobre la superficie ventral de la parte superior de la tráquea. Los dos lóbulos se hallan unidos por un istmo situado transversalmente con relación a la superficie ventral de la tráquea en la mayoría de los animales domésticos, a excepción del perro y del gato, en donde desaparece al principio de la vida (McDonald, 1991). Los tabiques fibrosos dividen la glándula en pseudolóbulos que, a su vez, se componen de vesículas, conocidas como folículos o acinos, que se rodean de una red capilar. En general, las paredes del folículo están compuestas por epitelio cuboideo. La luz se rellena de una sustancia coloidal proteinácea que contiene una proteína específica de la tiroidea, la Tiroglobulina; cuya sustancia peptídica permite la síntesis y almacenamiento de Triyodotironina (T3) y Tetrayodotironina o Tiroxina (T4) (Wartosky e Ingbar, 1991).

En diferentes localizaciones del epitelio folicular e intersticio existen células C neuroectodérmicas secretoras de Calcitonina, reconocibles sólo por técnicas inmunocitoquímicas (Cotran y col., 1995) y tinciones especiales de plata (Grimelius, 1968).

La función de la tiroidea es sintetizar, almacenar y secretar hormonas yodadas indispensables para el funcionamiento celular (Pumarino, 1984). La síntesis de hormonas tiroideas depende de la captación de yodo en cantidad adecuada, del metabolismo normal del yodo en el interior de la glándula y de la síntesis paralela de la proteína receptora de yodo, la tiroglobulina.

El yodo ingresa en la tiroidea desde el torrente circulatorio en forma de yoduro inorgánico o iónico, que procede de dos fuentes diferentes: yoduro derivado de la desyodación de las hormonas tiroideas o de los agentes yodados administrados al paciente y del yoduro ingerido con el agua y alimentos (Wartosky e Ingbar, 1991).

La segunda etapa de biosíntesis hormonal comprende la oxidación del yoduro a una forma capaz de yodar los residuos tirosilo de la tiroglobulina (Wartosky e Ingbar, 1991). En esta fase se forman las sustancias precursoras Monoyodotirosina (MIT) y Diyodotirosina (DIT), que quedan unidas a la tiroglobulina (Pumarino, 1984). Más tarde, éstas sufren una condensación oxidativa, permitiendo la presentación de diversas yodotironinas, como la T3 y T4 (Wartosky e Ingbar, 1991). Estas permanecen unidas a la tiroglobulina, que luego se almacena en el lumen folicular hasta que sean necesarias (Pumarino, 1984).

Las hormonas activas se liberan a la sangre a través de la pinocitosis de la sustancia coloidal folicular en el borde apical de las células; durante este proceso se forman las gotas

coloidales, que se unen con los lisosomas tiroideos, formando “fagolisosomas”. La tiroglobulina es hidrolizada por las proteasas y peptidasas dentro de estos fagolisosomas. La etapa final consiste en la liberación de las yodotironinas, T3 y T4, hacia la sangre (Wartosky e Ingbar, 1991).

### **3.5. DIABETES MELLITUS Y SU RELACIÓN CON LA GLÁNDULA TIROIDES**

En la actualidad se ha determinado una relación entre la Diabetes Mellitus tipo I de etiología autoinmune y la glándula tiroides. Los anticuerpos que ocasionan esta enfermedad, al dañar las células pancreáticas, pueden afectar las células de la tiroides, incrementando su función (Adams, 2000). Esto es lo que se denomina Enfermedad de Graves, que se caracteriza por hipertiroidismo, responsable de bocio hiperplásico difuso hiperfuncionante que está acompañado por oftalmopatía infiltrativa y dermopatía infiltrativa (Cotran y col., 1995). Otros estudios han demostrado que la incidencia de hipotiroidismo parece incrementarse tanto en la DM tipo I como en la tipo II (Khan, 2002). Una asociación entre el hipotiroidismo y la DM tipo I se ha encontrado en criaderos de razas Beagle, habiéndose reportado una alta incidencia de anticuerpos antitiroglobulina circulantes en perros con DM tipo I versus perros sanos. Las posibles razones para esta asociación consideran la alteración que origina el hipotiroidismo en la secreción de insulina e igualmente en la resistencia a ésta, por otra parte, la enfermedad autoinmune poliendocrina ya mencionada, la obesidad y la predisposición genética a desarrollar ambos desórdenes. (Ford y col., 1993).

Los problemas de hipotiroidismo influyen en la diabetes, dado que el metabolismo de la glucosa se encuentra alterado debido a la ausencia de hormonas tiroideas para regularlo. De hecho, se conoce empíricamente que en el hipotiroidismo hay riesgo de hipoglicemia y es prudente reducir la dosis de insulina (Brenta y col., 2001). Por otra parte, el inicio de un hipertiroidismo en personas con diabetes implica que los niveles de glucosa pueden aumentar levemente. Si esta situación persiste sin tratar y se vuelve más grave, el control de la diabetes puede ser extremadamente difícil (Khan, 2002). El hipertiroidismo está usualmente asociado con incremento en los requerimientos de insulina, también origina aumento en la gluconeogénesis hepática y una rápida absorción gastrointestinal de glucosa (Wu, 2000). La resistencia a la insulina, por otra parte, puede ser causada por un exceso o deficiencia de hormonas tiroideas, en que una cantidad normal de insulina induce una respuesta biológica subnormal. Esto se puede originar de problemas que se desarrollan antes de la interacción de la insulina con su receptor (prereceptor), o cuando se une al receptor o finalmente, después de la interacción entre el receptor y la insulina (Ford y col., 1993).

Dado que en caninos, la Diabetes Mellitus constituye el trastorno hormonal más común, junto con los problemas tiroideos (hipotiroidismo) (Hess y col., 2000; Nelson, 2000), se diseñó la presente investigación, como parte de un proyecto de mayor envergadura, que tiene como propósito efectuar una evaluación de la Diabetes Mellitus a través del tiempo, observando en forma integral las alteraciones morfológicas presentes en diversos órganos y tejidos, como páncreas, hígado, riñón, ojo y glándula tiroides.

Para llevar a cabo la presente investigación, se indujo Diabetes Mellitus tipo I en perros clínicamente sanos, mediante el uso de Alozano<sup>®</sup>, sustancia estructuralmente parecida a la urea (Mendez y Ramos, 1994; Jones y col., 1997). Este elemento tiene acción necrosante específica y selectiva sobre las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans (McDonald, 1991). Al respecto, se postulan dos teorías, una describe la interacción de los metabolitos del Alozano<sup>®</sup> con el zinc pancreático, responsables de la destrucción de las células beta. Otras observaciones sustentan la teoría de la formación de radicales de oxígeno que desempeñan una función significativa en la acción diabetogénica de esta sustancia (Fleitas y col., 2000). A partir de la primera hora post-administración se observa hipoglicemia como consecuencia de la destrucción de las células de los islotes, con liberación de la insulina almacenada. Con posterioridad se inicia una importante alza de la glucosa sanguínea llegando a valores de 300 o 400 mg/dl (16,8-22,4 mmol/l), siempre que las células hayan sido destruidas completamente. Esta Diabetes Mellitus experimental es muy parecida a la presentación natural de la enfermedad (McDonald, 1991).

### 3.6. OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO

1. Determinar a través del tiempo, el daño histológico del páncreas y su relación con la glándula tiroides (aspectos lesionales y de laboratorio clínico ) en perros con DM Tipo I inducida con Alozano<sup>®</sup>.
2. Relacionar los valores séricos de T3 y T4 a través del tiempo con el daño anatómico e histológico del páncreas y tiroides en perros con DM Tipo I inducida con Alozano<sup>®</sup>.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

El material biológico de la presente investigación estuvo constituido por un grupo de 20 caninos machos, mestizos, de 4 a 7 años de edad, con peso corporal entre 12 a 17 kg. Los perros utilizados fueron obtenidos del Proyecto DID S-2000-58: "Población canina sometida a un programa de eutanasia: caracterización demográfica, motivos de eutanasia, hallazgos anatomopatológicos y parasitológicos e impacto en Salud Pública".

#### 4.1.1. Estudio anatomopatológico

Se utilizaron tiroides y páncreas de perros clínicamente sanos y con DM tipo I inducida con Aloxano<sup>®</sup>. El estudio se realizó en el Instituto de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, entre los meses de Abril y Junio del 2003.

#### 4.1.2. Estudio de laboratorio clínico

Se utilizaron muestras de sangre de perros clínicamente sanos y con DM tipo I inducida con Aloxano<sup>®</sup>. El estudio se efectuó en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Universidad Austral de Chile.

#### 4.1.3 Material inductor de diabetes

Aloxano<sup>®</sup> A-7413 (5,6 Dioxipuracil Monohidrato) Laboratorio SIGMA, en dosis de 75 mg/kg/animal. El Aloxano<sup>®</sup> fue diluido en agua destilada a una concentración del 15%.

### 4.2. MÉTODO

Para la realización de la presente investigación se dispuso de un Grupo Control constituido por perros clínicamente sanos (n=5) y un Grupo Experimental (n=15), al cual se le indujo DM tipo I mediante la administración endovenosa de Aloxano<sup>®</sup>. Este último fue dividido en 5 subgrupos, clasificándose como Grupo Exp. I, II, III, IV y V, de acuerdo al tiempo post inducción (p.i.) con Aloxano<sup>®</sup>. El Grupo Exp. I correspondió a las 2 h, el Grupo Exp. II a las 24 h, el Grupo Exp. III a los 7 días, el Grupo Exp. IV a los 14 días y, por último, el Grupo Exp. V a los 21 días. Ambos grupos (Control y Experimental) fueron mantenidos en el Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

#### **4.2.1. Etapa pre-experimental**

Como parte de la presente investigación, se llevó a cabo una fase pre-experimental, en que los perros de ambos grupos (Control y Experimental) fueron sometidos a un período de adaptación de 7 días, durante el cual se les realizó examen clínico general y especial, a fin de evaluar la condición de salud. El examen clínico especial consideró la obtención de muestras de sangre y orina, para la realización de exámenes hematológicos, de urianálisis (densidad, glucosuria y cetonuria) y perfil bioquímico completo, lo que permitió descartar posibles afecciones pancreáticas, hepáticas y renales, además, los animales fueron desparasitados. Finalmente, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa, para descartar la presencia de diabetes.

#### **4.2.2. Etapa experimental**

Al Grupo Experimental se le indujo DM, mediante la administración endovenosa del fármaco Aloxano<sup>®</sup>, en dosis única de 75 mg/kg. Con posterioridad, los animales fueron mantenidos bajo un mismo régimen nutricional, utilizando para ello alimento comercial (Friskies o Alpo de Nestlé<sup>®</sup>), el cual fue suministrado dos veces al día.

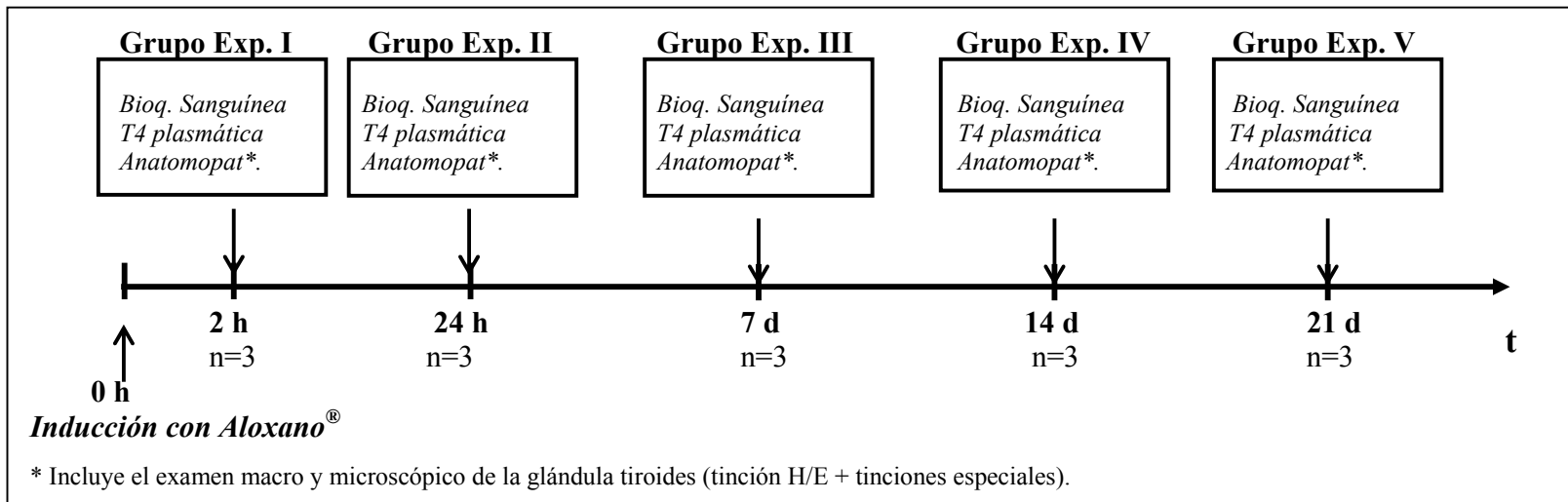
El aporte diario de calorías por perro, se calculó en relación al peso, altura y condición corporal, considerando además los requerimientos de mantención. Las necesidades para cubrir dichos requerimientos fueron de 60-70 kcal/kg/día (Remillard, 1999; Nelson, 2000).

Los perros del Grupo Control se sacrificaron al inicio del período experimental (0 h), utilizando Tiopental sódico y solución sobresaturada de Sulfato de Magnesio vía endovenosa, previa obtención de muestras de sangre para determinación de análisis de bioquímica sanguínea. Posteriormente, se realizó necropsia, tomándose muestras de páncreas y tiroides para análisis histológico (Figura 1). Los perros del Grupo Experimental fueron sacrificados secuencialmente de acuerdo al cronograma establecido en la Figura 2.





**FIGURA 1: EUTANASIA DE GRUPO CONTROL Y EXÁMENES A REALIZAR.**



**FIGURA 2: EUTANASIA DE GRUPOS EXPERIMENTALES, DE ACUERDO AL TIEMPO DE INDUCCIÓN CON ALOXANO<sup>®</sup> Y EXÁMENES A REALIZAR.**

\* Incluye el examen macro y microscópico de la glándula tiroides (tinción H/E + tinciones especiales).

En el Cuadro 1, se presentan los diferentes tipos de exámenes efectuados en perros controles e inducidos con Alozano®; además, se especifica la muestra utilizada y los aspectos evaluados en cada uno de los exámenes.

**CUADRO 1. Exámenes efectuados en perros controles e inducidos con Alozano®**

TIPO DE EXAMEN	ASPECTOS EVALUADOS	MUESTRA	PARÁMETROS
<b>PATOLÓGICO</b>	Macroscópico	Páncreas Tiroides	Peso (g) Volumen (cm <sup>3</sup> ) Consistencia* Color**
	Microscópico	Páncreas (P) Tiroides (T)	<b>P:</b> Número de islotes por campo 10X <b>T:</b> Número de Células parafoliculares por campo 40X.  <b>Trastornos***:</b> Degenerativos Necróticos Inflamatorios Del crecimiento Otros
<b>LABORATORIO CLÍNICO</b>	Bioquímica sanguínea	Plasma	Glicemia Fructosamina Sérica Albúmina T3/T4 Ca/P

\*1: Blando  
2: Normal  
3: Firme

\*\*1: Pálido  
2: Normal  
3: Oscuro

\*\*\*1: Leve  
2: Moderado  
3: Severo

4.2.2.1. Estudio macroscópico: La necropsia se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Cubillos y Paredes (1995). El estudio macroscópico consideró el examen del páncreas y tiroides, determinándose el peso, color y consistencia de dichos órganos. Para la determinación del peso, los órganos fueron extraídos cuidadosamente en forma limpia (libres de tejido conectivo y adiposo) y se pesaron en una balanza digital. Además, se procedió a medir el volumen de los dos órganos, utilizando para ello una probeta graduada de 1000 ml con agua, calculándose el desplazamiento del nivel de agua después de la inmersión de los órganos. Las muestras del páncreas se obtuvieron de la cola, lugar anatómico donde se encuentra la mayor cantidad de islotes de Langerhans en el perro (Chastain y Ganjam, 1994).

4.2.2.2. Estudio microscópico: Para la observación histológica de los tejidos, las muestras obtenidas fueron fijadas en formalina tamponada al 10%. Con posterioridad, se laminaron y procesaron en autotécnico, donde se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente (70°, 80°, 96°, 100°), para luego ser aclaradas en una mezcla de xilol-alcohol en partes iguales y terminar en xilol puro. Con posterioridad, los tejidos fueron impregnados en una solución de xilol-parafina a 51-53°C y las muestras incluidas en parafina a 56-58°C, utilizando para ello moldes metálicos. Finalmente, los tejidos se cortaron con micrótopo de rotación a 5 µm, montándose en portaobjetos y tiñéndose con Hematoxilina Eosina (H/E) (Luna, 1968).

En el caso del páncreas, el estudio microscópico consideró la determinación del número de islotes de Langerhans por campo a un aumento 10X en la totalidad de Grupos en estudio, para lo cual se procedió a observar 10 campos por páncreas. En el caso de la tiroides, se determinó el número de células parafoliculares por campo a un aumento 40X, analizándose de igual forma 10 campos por tiroides. Finalmente, en ambos órganos se determinaron las lesiones histológicas presentes de acuerdo a lo establecido en el Cuadro N°1.

Como técnicas tintoriales especiales, en el caso del páncreas, se recurrió al uso de la Tinción de Gomori, a fin de determinar la presencia de gránulos con insulina en las células β de los islotes de Langerhans (Luna, 1968). En las tiroides, se recurrió a la técnica tintorial de DesMarais y Laham (1962), la cual permitió identificar a través del color del coloide el grado de actividad hormonal (el color azul señala actividad y el amarillo inactividad). Además, se realizó la tinción de Grimelius (1968) para visualizar la presencia de calcitonina en las células parafoliculares y relacionar su presencia con el cuadro de diabetes.

Para el análisis de los resultados histopatológicos se efectuó una evaluación descriptiva en relación a las distintas características morfológicas del páncreas y tiroides.

4.2.2.3. Laboratorio clínico: Se procedió a tomar 4 ml de sangre a partir de la vena cefálica, de los cuales 2 ml fueron almacenados en tubos con heparina para la determinación de fructosamina sérica, albúmina, Ca/P y T3/T4 plasmáticas, además 2ml en tubos con NaF para determinar la presencia de glucosa plasmática. En el Cuadro 2, se muestran las variables en estudio.

**CUADRO 2. Variables de bioquímica sanguínea y métodos empleados para su determinación.**

VARIABLE	MÉTODO
Glucosa	GOD/PAD Cat.Nº. GL 2623. Lab. Randox.
Fructosamina Sérica	Test de Reducción con Azul Nitrotetrazolio (NBT). MPR3 Fructosamina 1054686. Lab. Boehringer Mannheim.
Albúmina	Verde de Bromocresol (BCG). Lab. Boehringer Mannheim.
Ca / P	<b>Ca:</b> Cresolftaleína-complexona. Lab. Human <b>P:</b> Molibdato, U.V. Lab. Human
T3/T4	Electroquimioluminiscencia ROCHE Diagnóstica.

4.2.2.4. Análisis estadístico: Para el estudio de la bioquímica sanguínea, se recurrió al Análisis de Varianza y a una Prueba de Comparación Múltiple mediante el Software GraphPad InStat, utilizando un nivel de significancia de un 95% y error del 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ESTUDIO MACROSCÓPICO DE PÁNCREAS Y TIROIDES.

Como parte del estudio anatomopatológico se compararon las características macroscópicas (peso, color, consistencia y volumen) de las tiroides y de los páncreas de los perros del Grupo Control con los animales de los Grupos Experimentales.

En relación con el color y la consistencia del páncreas y tiroides, al comparar los Grupos Experimentales con el Control, no se observaron diferencias entre ellos.

A continuación, se presentan los pesos relativos de los páncreas y de las tiroides de los perros controles y de aquellos inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

**CUADRO 3. Peso relativo de páncreas y tiroides en perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>.**

GRUPOS	Nº	PESO RELATIVO*		
		Páncreas	Tiroides der.	Tiroides izq.
Control	1	0.00121	0.000030	0.0000303
	2	0.00267	0.00005	0.0000433
	3	0.00174	0.000033	0.0000313
	4	0.00270	0.0000418	0.0000391
	5	0.00526	0.0000359	0.0000341
Exp. I	1	0.00389	0.0000353	0.0000353
	2	0.00313	0.0000348	0.0000343
	3	0.00446	0.0000348	0.0000352
Exp. II	1	0.00223	0.0000452	0.0000429
	2	0.00228	0.0000243	0.0000253
	3	0.00210	0.0000416	0.0000361
Exp. III	1	0.00291	0.0000445	0.0000472
	2	0.00150	0.0000391	0.0000433
	3	0.00250	0.0000527	0.0000486
Exp. IV	1	0.00280	0.0000350	0.0000271
	2	0.00361	0.0000361	0.0000291
	3	0.00302	0.0000317	0.0000375
Exp. V	1	0.00220	0.0000444	0.0000512
	2	0.00254	0.0000210	0.0000244
	3	0.00336	0.0000237	0.0000196

\*Peso órgano (Kg) / Peso animal (Kg)

El análisis estadístico del presente cuadro indicó que no existen diferencias significativas en el peso relativo de páncreas y tiroides entre los distintos grupos en estudio ( $p > 0.05$ ).

A continuación, en el Cuadro 4, se presenta el volumen de los páncreas y de las tiroides de los perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

**CUADRO 4. Volumen de páncreas y tiroides en perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>**

GRUPOS	N°	VOLUMEN ÓRGANOS (ml)		
		Páncreas	Tiroides der.	Tiroides izq.
Control	1	25	0.5	0.5
	2	30	0.8	0.7
	3	43	0.8	0.7
	4	40	0.6	0.5
	5	55	0.4	0.4
Exp. I	1	42	0.4	0.4
	2	50	0.4	0.4
	3	49	0.5	0.5
Exp. II	1	50	0.4	0.5
	2	25	0.6	0.7
	3	50	0.9	0.6
Exp. III	1	55	0.9	1.2
	2	16	0.6	0.6
	3	19	0.4	0.4
Exp. IV	1	40	0.4	0.3
	2	25	0.3	0.2
	3	28	0.3	0.3
Exp. V	1	20	0.4	0.4
	2	30	0.2	0.3
	3	40	0.3	0.3

El análisis estadístico del presente cuadro indicó que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el volumen de los órganos en estudio entre los distintos grupos.

## 5.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE PÁNCREAS Y TIROIDES.

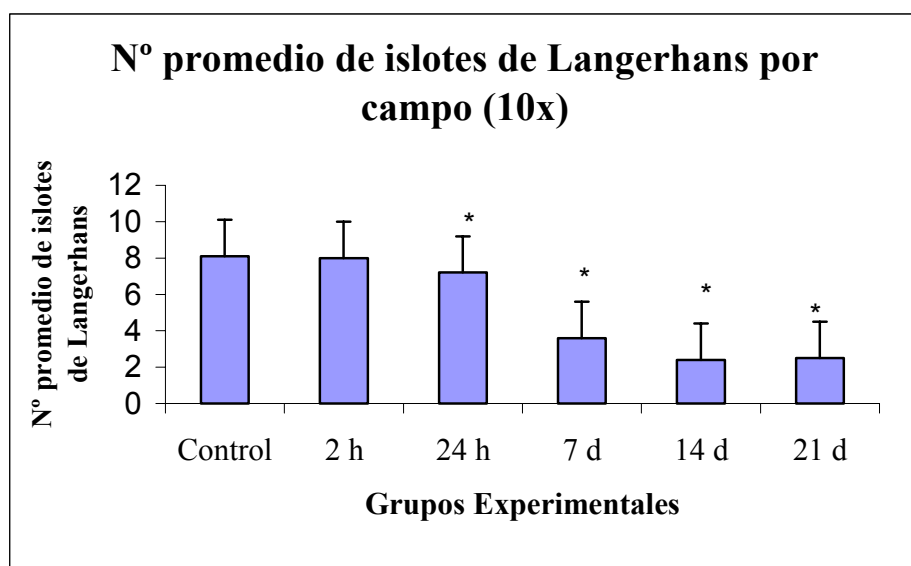
### 5.1.1. Páncreas

A continuación, se presenta el número promedio de islotes de Langerhans por campo en páncreas de perros controles e inducidos con Aloxano<sup>®</sup>.

**CUADRO 5. Número promedio de islotes de Langerhans por campo (10x), en páncreas de perros controles e inducidos con Aloxano<sup>®</sup>.**

GRUPOS	Nº	Número Promedio de Islotes de Langerhans	PROMEDIO TOTAL	DESV. ESTÁNDAR
Control	1	8.8	8.26	0.32
	2	8.1		
	3	8.1		
	4	8		
	5	8.3		
Exp. I	1	8.3	8.13	0.21
	2	7.9		
	3	8.2		
Exp. II	1	7.6	7.2	0.35
	2	7		
	3	7		
Exp. III	1	4	3.6	0.36
	2	3.5		
	3	3.3		
Exp. IV	1	2.6	2.4	0.35
	2	2.6		
	3	2		
Exp. V	1	2.4	2.5	0.11
	2	2.4		
	3	2.6		





\*:  $p < 0.05$

**Gráfico 1:** Número promedio de islotes de Langerhans por campo (10x) en perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

Al comparar los Grupos Experimentales, se aprecia una progresiva disminución en el número promedio de islotes de Langerhans por campo en los grupos con mayor tiempo de inducción. De acuerdo al análisis efectuado, se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los Experimentales, a excepción de los Grupos Control y Exp. I (2 h), en que no hay diferencias entre ellos ( $p > 0.05$ ).

En el Cuadro 6, se presentan los aspectos lesionales microscópicos en páncreas de perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

**CUADRO 6. Aspectos lesionales microscópicos en páncreas de caninos controles e inducidos con Aloxano®.**

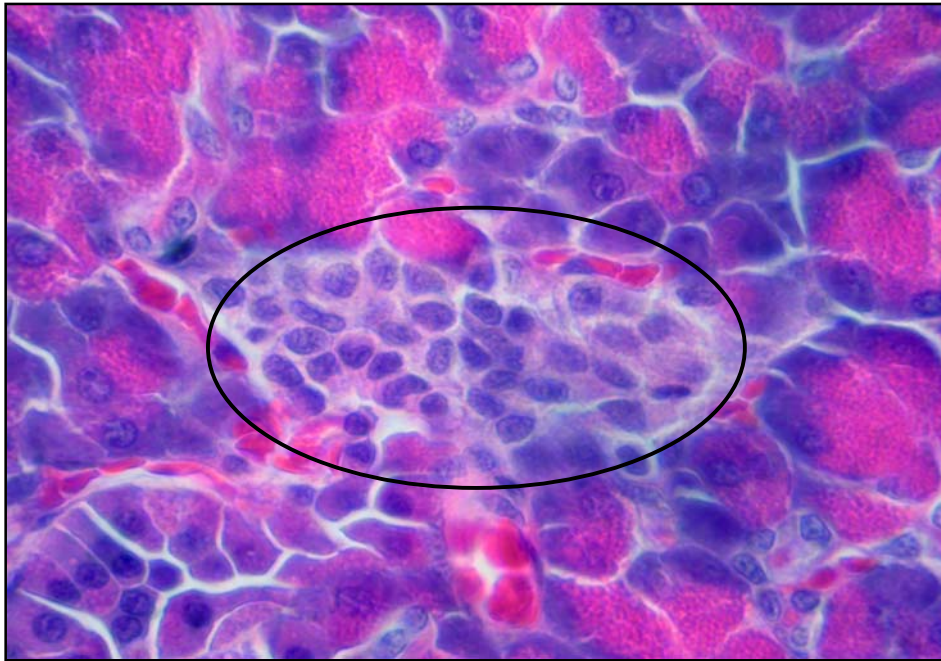
GRUPO	N°	ACINOS			ISLOTES			INTERSTICIO
		Picnosis	Vacuolización	Fibrosis	Picnosis	Vacuolización	Fibrosis	Infilt. Mononuclear
Control	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-
Exp. I	1	+	-	-	+++	+	-	-
	2	+	-	-	+++	++	-	-
	3	+	-	-	+++	++	-	-
Exp. II	1	++	+	-	+++	++	-	-
	2	+++	+	-	+++	-	-	+
	3	++	+	-	+++	++	-	-
Exp. III	1	+++	++	++	++	-	-	+
	2	++	++	+	+	+	-	+
	3	++	++	+	++	+	-	-
Exp. IV	1	++	++	-	+	+	+	+
	2	++	+	-	++	+	-	-
	3	+	+	-	+	-	+	-
Exp. V	1	++	+	-	+	+	++	+
	2	++	-	-	+	-	++	+
	3	++	+	-	+	-	++	+

Ausente = -    Leve =+    Moderado =++    Severo =+++

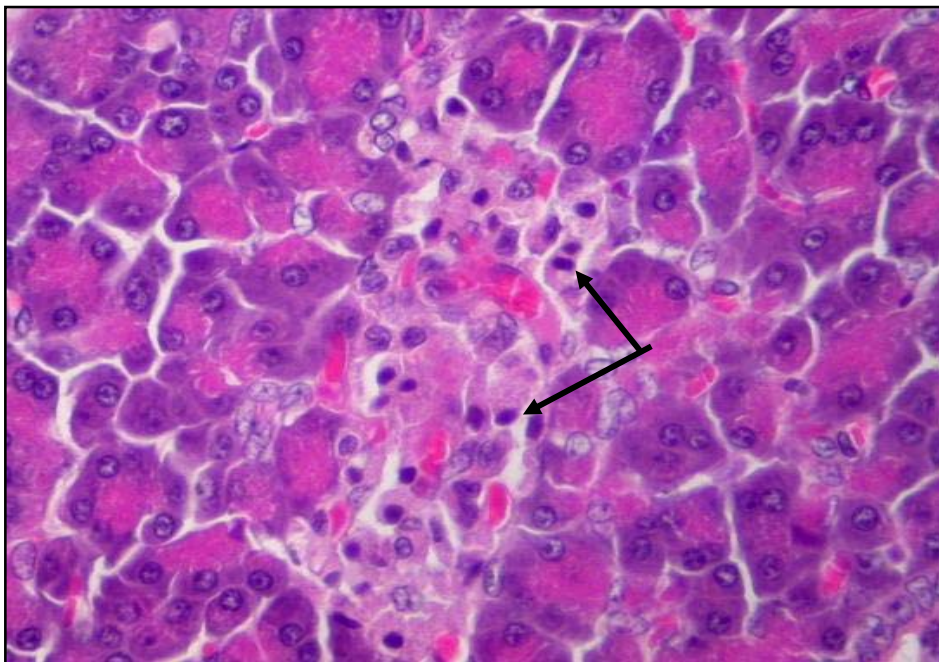
En el presente cuadro, se aprecia que tanto a nivel de los acinos como de los islotes pancreáticos, los cambios más significativos se relacionan con alteraciones necróticas (picnosis), presentes a partir de las 2 h p.i. (Exp. I). Dichas alteraciones están acompañadas de vacuolizaciones citoplasmáticas y fibrosis, las cuales se hacen más evidentes a partir de los Grupos Exp. II y III en los acinos y I-II en los islotes.

### **TINCIÓN DE GOMORI**

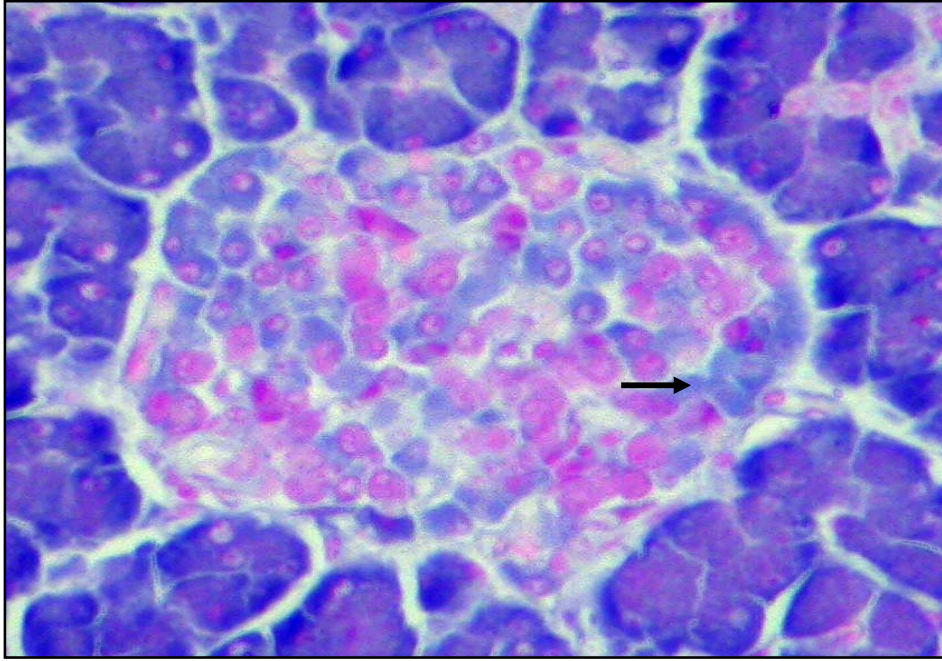
En relación con la tinción de Gomori, se pudo observar que ésta permite visualizar claramente la presencia de gránulos de insulina en el citoplasma de las células beta de los islotes de Langerhans. La insulina se visualiza de color azul, contrastando con la coloración eosinofílica presente en el resto de las células del islote. Al comparar la presencia de insulina en los páncreas de los perros Controles con los Grupos Experimentales I y II (2 y 24 h), no se observaron diferencias. Sin embargo, a partir del séptimo día p.i. en adelante (Grupo III), la insulina no se observó con dicha tinción.



**Foto 1:** Páncreas normal de perro (Grupo Control). Obsérvese el islote de Langerhans (O), rodeado de células correspondientes al tejido acinar exocrino (células con citoplasma rosado). H/E 1400 X.



**Foto 2:** Células beta con picnosis en islote de Langerhans en perro con Diabetes mellitus, a las 24 horas post-inducción con Aloxano® (↑). Grupo Exp. II. H/E 1400 X



**Foto 3:** Células beta en islote de Langerhans en páncreas normal de perro (↑) (Grupo Control). El citoplasma de las células beta se visualiza de coloración azul (gránulos de insulina), contrastando con la coloración rosada de las demás células del islote. Tinción de Gomori 1400 X.

### 5.2.2 Tiroides

En los Cuadros 7 y 8, se presentan las características histológicas del epitelio folicular y coloide, correspondientes a las tiroides de perros controles e inducidos con Aloxano<sup>®</sup>.

**CUADRO °7. Características histológicas del epitelio folicular de tiroides de perros controles e inducidos con Aloxano®.**

GRUPOS	N°	EPITELIO FOLICULAR						Gotas Coloídeas**
		Altura*	Núcleo			Afinidad Tintorial		
			Apical	Central	Basal	Eosinof.	Basof.	
Control	1	+		+			+	+
	2	+		+			+	+
	3	+		+			+	+
	4	+		+			+	+
	5	+		+			+	+
Exp. I	1	+		+			+	+
	2	+		+			+	+
	3	+		+			+	+
Exp. II	1	+		+			+	+
	2	+		+			+	+
	3	+		+			+	+
Exp. III	1	++		+			+	+
	2	++		+			+	+
	3	+++			+		+	+
Exp. IV	1	+++			+		+	+
	2	+++			+		+	-
	3	++		+			+	-
Exp. V	1	+++			+		+	+
	2	++		+			+	+
	3	++			+		+	-

\*Cúbico=+ Plano-cúbico=++ Plano=+++

\*\*Presencia=+ Ausencia=-

Llama la atención que en el análisis del presente cuadro, se aprecia una reducción progresiva de la altura de los epitelios foliculares a partir del Grupo Exp. III (7 días p.i), lo cual se relaciona con un incremento de las células con núcleo en posición basal. Además, hay disminución de la presencia de gotas coloideas en aquellos perros con mayor tiempo de inducción con Alozano<sup>®</sup>.

En el Cuadro 8, se presentan las características histológicas del coloide de las tiroides de perros controles e inducidos con alozano<sup>®</sup>.



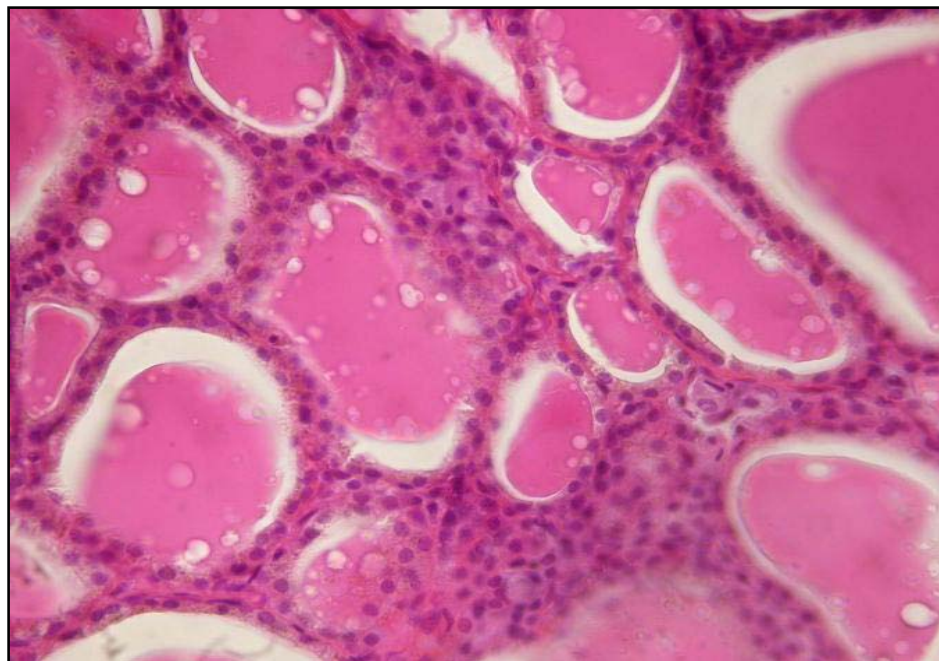
**CUADRO 8. Características histológicas del coloide de tiroides de perros controles e inducidos con Alozano®.**

GRUPOS	Nº	COLOIDE						
		Carácter Tintorial		Distribución		Densidad*	Vacuolas**	Células Descamadas**
		Eosinof.	Basof.	Uniforme	Desuniforme			
Control	1	+		+		++	+	+
	2	+		+		++	+	+
	3	+		+		++	+	-
	4	+		+		++	+	-
	5	+		+		+	+	+
Exp. I	1	+		+		++	+	+
	2	+		+		++	+	+
	3	+		+		++	+	-
Exp. II	1	+		+		++	+	+
	2	+		+		++	+	+
	3	+		+		++	+	+
Exp. III	1	+		+		++	+	+
	2	+		+		+	+	+
	3	+		+		++	+	+
Exp. IV	1	+		+		+++	+	+
	2	+		+		+++	+	+
	3	+			+	+++	+	+
Exp. V	1	+		+		+++	+	+
	2	+		+		+++	+	-
	3	+		+		++	+	+

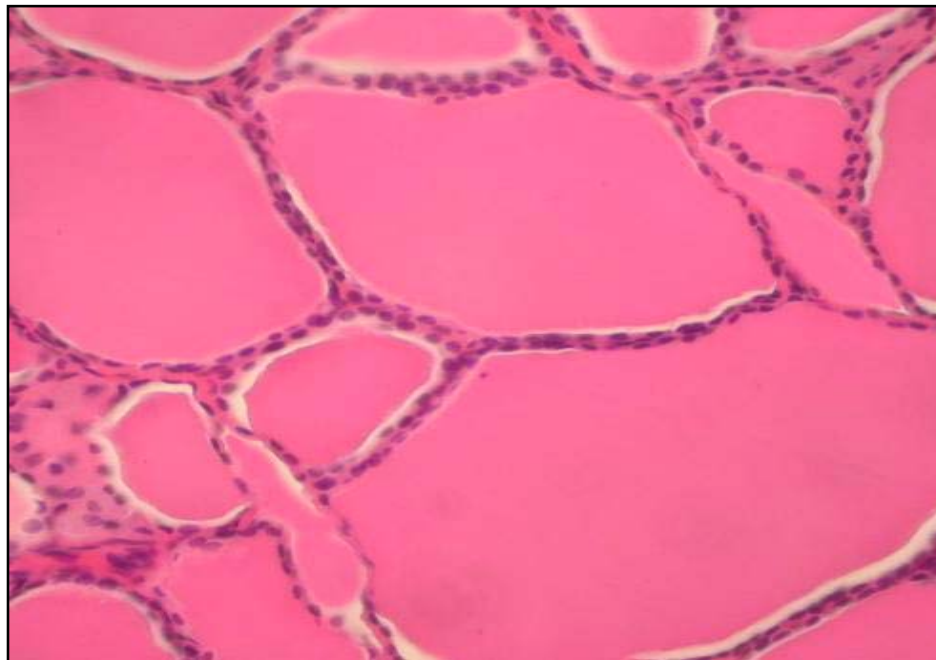
\*Delgado=+ Intermedio=++ Grueso=+++

\*\*Presencia=+ Ausencia=-

Del análisis del Cuadro 8, se aprecia que el carácter tintorial del coloide en los folículos no se modifica, de igual modo, la presencia de las vacuolas coloideas, células descamadas y distribución del coloide, el cual es uniforme en todos los grupos. El cambio más significativo, se relaciona con un incremento en la densidad del coloide en los perros con mayor tiempo de inducción.



**Foto 4:** Epitelio cúbico en folículos y presencia de gotas coloideas en cavidades foliculares de tiroides normales de perro (Grupo Control). H/E 1400 X.



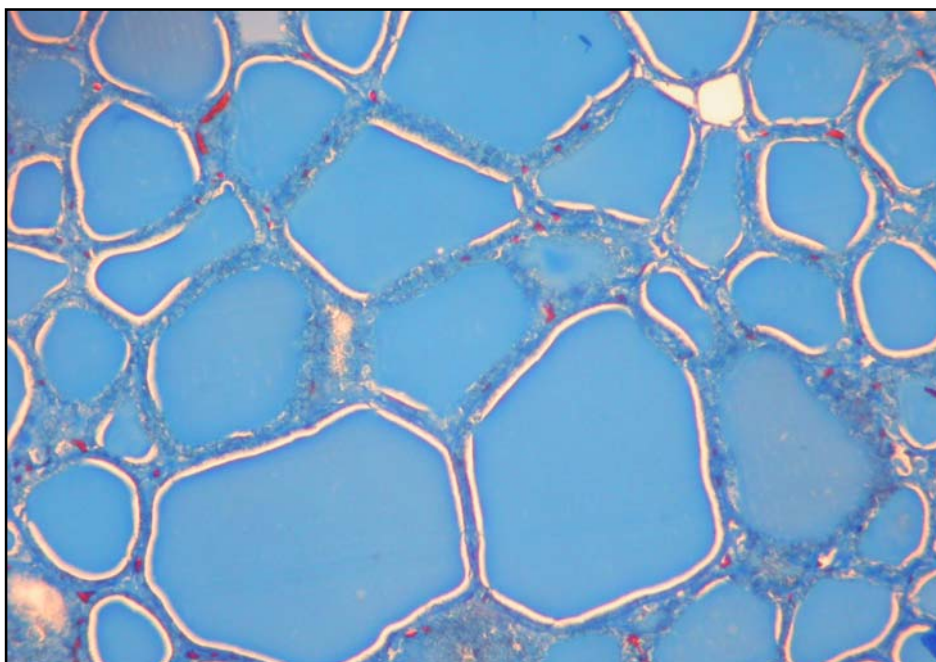
**Foto 5:** Epitelio plano en folículos tiroideos, debido a menor actividad. Tiroidea en perro con Diabetes mellitus a los 7 días post-inducción con Aloxano® (Grupo Exp. III). H/E 1200 X.

En el Cuadro 9, se aprecia la actividad tiroidea en perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>, utilizándose para ello la tinción de Desmarais y Laham (1962).

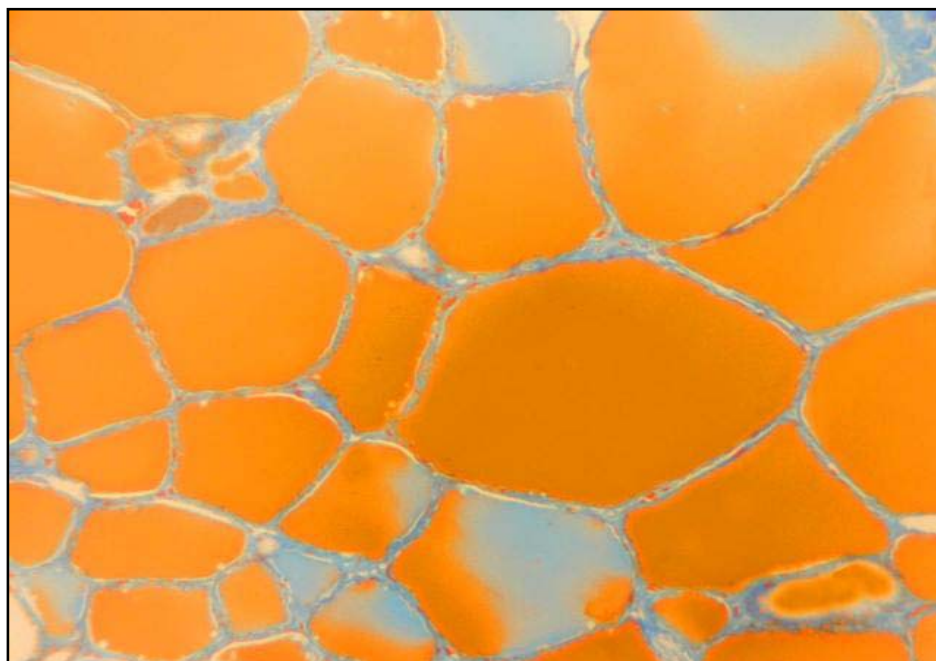
**CUADRO 9. Actividad de la glándula tiroides en perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup> (Desmarais y Laham, 1962).**

GRUPOS	Nº	GRADO DE ACTIVIDAD TIROÍDEO				
		100%	100-75%	75-50%	50-25%	0%
Control	1	+				
	2	+				
	3	+				
	4	+				
	5	+				
Exp. I	1	+				
	2	+				
	3	+				
Exp. II	1	+				
	2	+				
	3	+				
Exp. III	1	+				
	2			+		
	3		+			
Exp. IV	1		+			
	2	+				
	3			+		
Exp. V	1		+			
	2	+				
	3	+				

Obsérvese la disminución en el grado de actividad de la glándula tiroides a partir del Grupo Exp. III. Las características tintoriales coloideas se evaluaron de acuerdo al color, siendo azul activo y amarillo, sin actividad.



**Foto 6:** Coloración azul de coloide en tiroides activa de perro sano (Grupo Control). Tinción de Desmarais y Laham. 700 X.

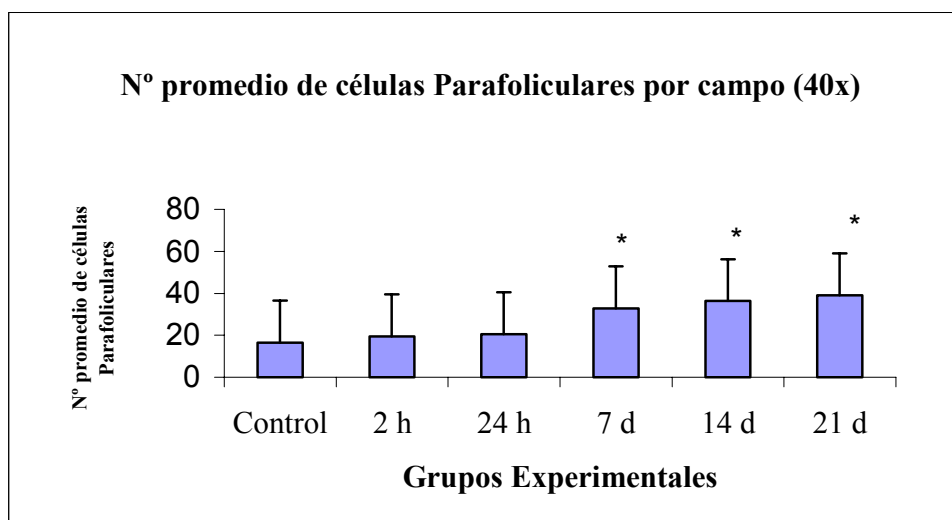


**Foto 7:** Observe la coloración amarilla del coloide (indicador de inactividad) en tiroides de perro con Diabetes mellitus a los 7 días post-inducción con Aloxano<sup>®</sup> (Grupo Exp. III). La coloración azul es indicativa de actividad tiroidea. Tinción de Desmarais y Laham. 700 X.

En el Cuadro 10, se presenta el número promedio de células parafoliculares por campo en tiroides de perros controles e inducidos con Aloxano<sup>®</sup>.

**CUADRO 10. Número promedio de células parafoliculares por campo (40x), en tiroides de perros controles e inducidos con Aloxano<sup>®</sup>, (Grimelius, 1968).**

<b>GRUPOS</b>	<b>Nº</b>	<b>Nº <math>\bar{X}</math> DE CÉLULAS PARAFOLICULARES</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>DESV. ESTÁNDAR</b>
<b>Control</b>	<b>1</b>	14.1	<b>16.52</b>	<b>2.51</b>
	<b>2</b>	15.1		
	<b>3</b>	15.8		
	<b>4</b>	20.6		
	<b>5</b>	17.0		
<b>Exp. I</b>	<b>1</b>	19,3	<b>19,5</b>	<b>1.41</b>
	<b>2</b>	21		
	<b>3</b>	18,2		
<b>Exp. II</b>	<b>1</b>	19.3	<b>20.5</b>	<b>1.16</b>
	<b>2</b>	20.8		
	<b>3</b>	21.6		
<b>Exp. III</b>	<b>1</b>	28.0	<b>32.8</b>	<b>5.75</b>
	<b>2</b>	31.3		
	<b>3</b>	39.2		
<b>Exp. IV</b>	<b>1</b>	37.7	<b>36.3</b>	<b>1.19</b>
	<b>2</b>	35.5		
	<b>3</b>	35.8		
<b>Exp. V</b>	<b>1</b>	35.2	<b>39.03</b>	<b>3.42</b>
	<b>2</b>	41.8		
	<b>3</b>	40.1		

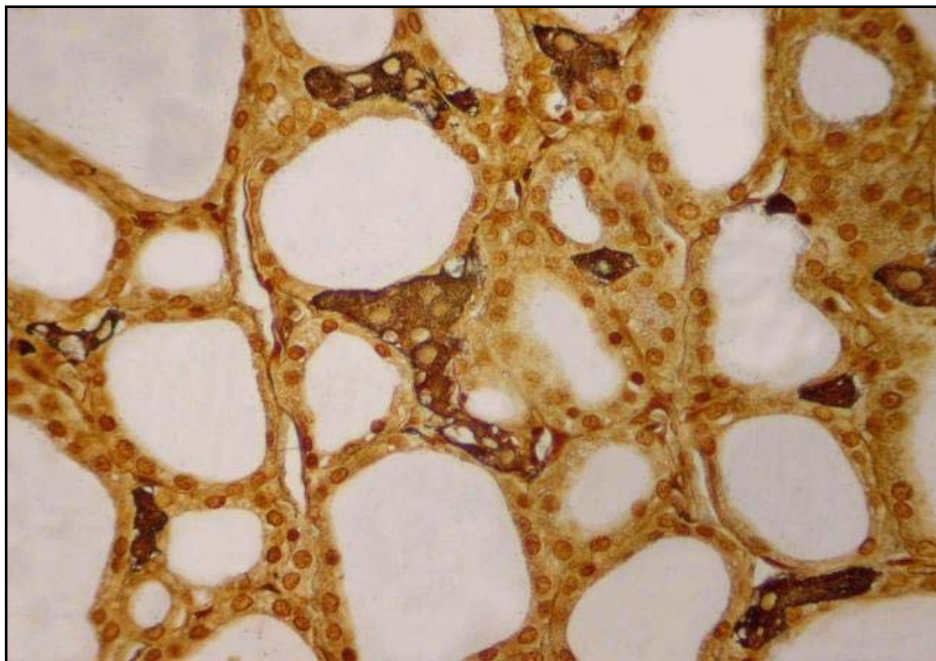


\*:  $p < 0.05$

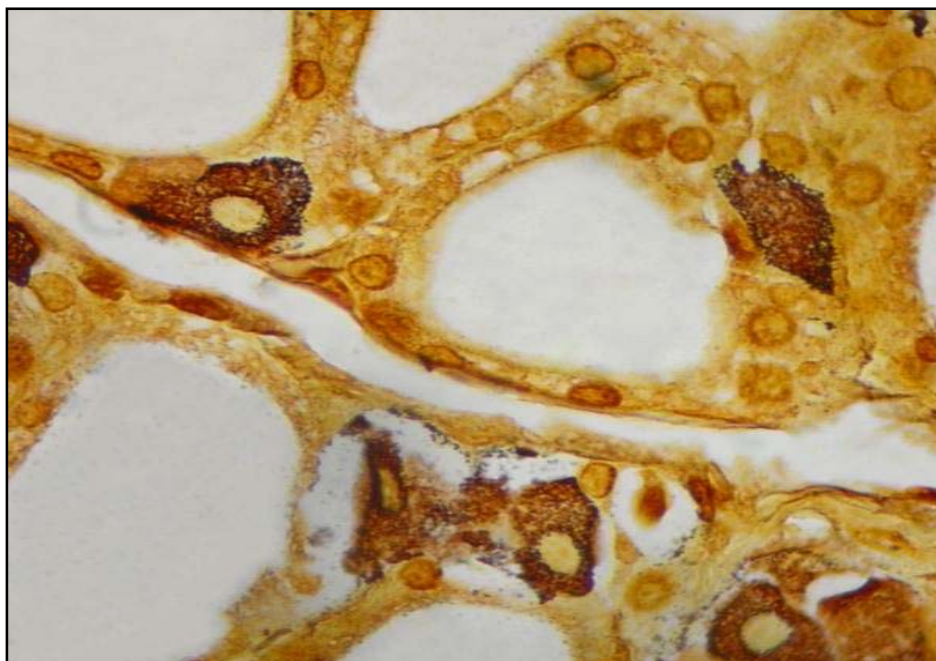
**Gráfico 2: Número promedio de células parafoliculares en tiroides de perros controles e inducidos con Alozano®.**

Al comparar el Grupo Control con los Experimentales, se aprecia un aumento progresivo en el número promedio de células parafoliculares por campo, a medida que transcurre el tiempo post inducción.

El análisis estadístico señaló diferencias altamente significativas entre los Grupos Control y Exp. I-II, al relacionarlos con los últimos Grupos Experimentales (Exp. III, IV y V) ( $p < 0.05$ ).



**Foto 8:** Células parafoliculares en tiroides de perro (color café oscuro) (Grupo Control). Dichas células no están en contacto con la cavidad folicular. Tinción de Grimelius. 1400 X.



**Foto 9:** Observe la presencia de calcitonina en el citoplasma de las células parafoliculares en tiroides de perro (granulación café oscura) (Grupo Control). Tinción de Grimelius. 4000 X.



### **5.3. VALORES DE BIOQUÍMICA SANGUÍNEA EN PLASMA**

Para determinar los valores de bioquímica sanguínea en plasma, se realizó un seguimiento de los distintos grupos en estudio a través del tiempo. Inicialmente se efectuó un muestreo basal (0 h), en el que se incluyó al Grupo Control. Posteriormente, los Grupos Experimentales I y II fueron muestreados a las 2 y 24 h y los restantes, de acuerdo al diseño experimental.

El Grupo Control no fue considerado en el análisis realizado en los valores de bioquímica sanguínea, dado que de acuerdo a lo establecido en el modelo experimental, dichos perros fueron eliminados a las 0 horas, por tal razón, no se obtuvieron muestras seriadas de sangre con posterioridad.

En el Cuadro 11, se presentan los valores de glucosa plasmática observados en perros inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

CUADRO 11. Valores de glucosa plasmática en perros inducidos con Alozano®.

GRUPOS	N°	VALORES DE GLUCOSA PLASMÁTICA VR 3.0-5.0 mmol/l					
		0 h	2 h	24 h	7 días	14 días	21 días
Exp. I	1	5.12	4.43	-	-	-	-
	2	5.39	4.77	-	-	-	-
	3	4.9	4.08	-	-	-	-
Exp. II	1	5.56	-	4.63	-	-	-
	2	5.04	-	3.77	-	-	-
	3	5.12	-	3.29	-	-	-
Exp. III	1	5.23	-	-	10.24	-	-
	2	4.79	-	-	38.71	-	-
	3	5.47	-	-	20.88	-	-
Exp. IV	1	5.33	-	-	21.83	34.79	-
	2	5.36	-	-	25.69	40.65	-
	3	5.03	-	-	41.73	41.27	-
Exp. V	1	5.02	-	-	30.01	30.65	26.68
	2	6.26	-	-	33.21	32.11	25.79
	3	5.84	-	-	27.33	21.51	20.16
<b>Promedio</b>		<b>5.33</b>	<b>4.43</b>	<b>3.90</b>	<b>27.74</b>	<b>33.50</b>	<b>24.21</b>
<b>Desv. Est.</b>		<b>0.48</b>	<b>0.35</b>	<b>0.68</b>	<b>9.64</b>	<b>7.31</b>	<b>3.54</b>

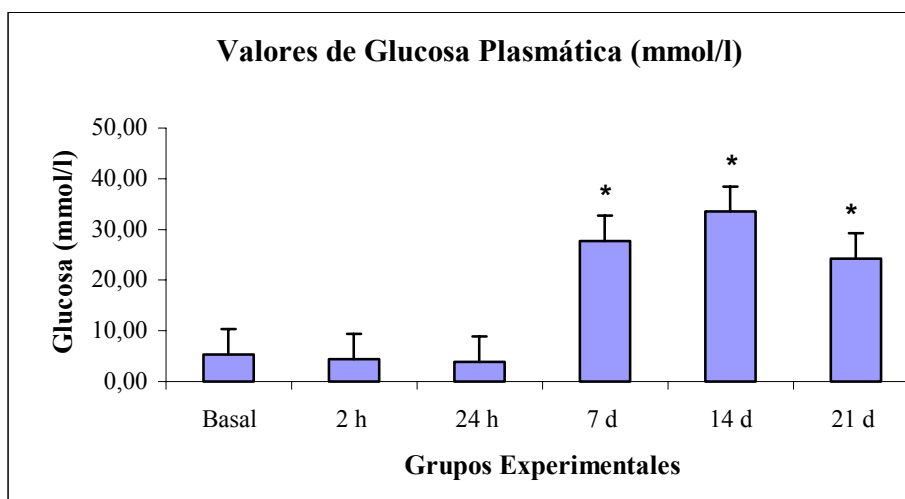
\*: $p < 0.05$ 

Gráfico 3: Valores de glucosa plasmática a distintos tiempos en caninos inducidos con Alozano®.

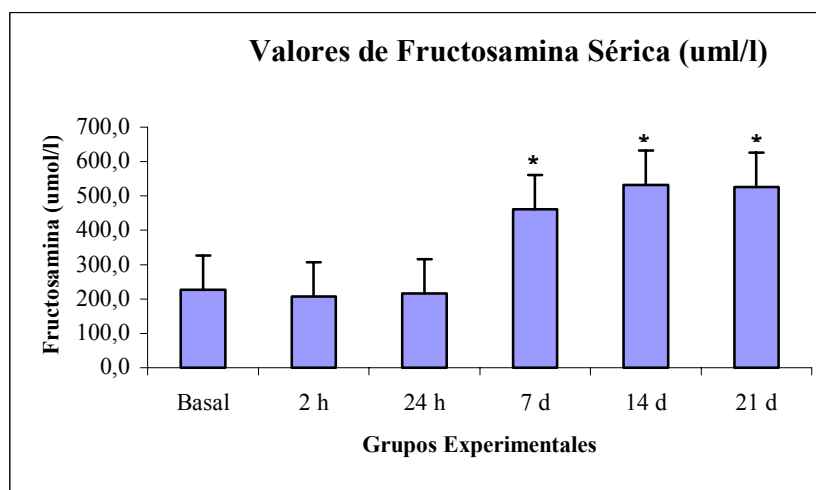
En los Grupos Exp. I y II, se observa una leve disminución de los valores de glucosa plasmática, en relación al nivel basal (0 h) presente en cada uno de ellos. Con posterioridad, se aprecia un marcado incremento a partir del Grupo Exp. III. Cabe señalar que en el Grupo Exp. V, si bien es cierto los valores de glucosa plasmática están muy aumentados (4 a 5 veces más que el valor basal), se observa una leve disminución en relación al Grupo Exp. IV.

Cabe destacar que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los Grupos Experimentales I y II, en cambio, sí entre éstos con el resto ( $p < 0.05$ ).

En el Cuadro 12, se presentan los valores de fructosamina sérica obtenidos en perros inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

CUADRO 12. Valores de fructosamina sérica en perros inducidos con Alozano®.

GRUPOS	N°	VALORES DE FRUCTOSAMINA SÉRICA VR 170-338 umol/l					
		0 h	2 h	24 h	7 días	14 días	21 días
Exp. I	1	210	208	-	-	-	-
	2	215	217	-	-	-	-
	3	185	198	-	-	-	-
Exp. II	1	142	-	139	-	-	-
	2	206	-	213	-	-	-
	3	287	-	298	-	-	-
Exp. III	1	215	-	-	397	-	-
	2	202	-	-	505	-	-
	3	197	-	-	379	-	-
Exp. IV	1	211	-	-	388	515	-
	2	332	-	-	583	547	-
	3	298	-	-	524	688	-
Exp. V	1	278	-	-	376	531	566
	2	228	-	-	495	432	518
	3	190	-	-	501	478	493
<b>Promedio</b>		<b>226.4</b>	<b>207.7</b>	<b>216.7</b>	<b>460.9</b>	<b>531.8</b>	<b>525.7</b>
<b>Desv. Est.</b>		<b>50.3</b>	<b>9.5</b>	<b>79.6</b>	<b>76.6</b>	<b>86.9</b>	<b>37.1</b>



\*: p&lt;0.05

Gráfico 4: Valores de fructosamina sérica a distintos tiempos en perros inducidos con Alozano®.

En los Grupos Exp. I y II no se observan diferencias en los valores de fructosamina sérica en relación a los valores basales. Sin embargo, puede apreciarse un marcado incremento en los Grupos Exp. III, IV y V, al compararlos con sus respectivos valores basales.

El análisis estadístico arrojó diferencias altamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el Grupo Experimental I y II, en comparación con los otros grupos.

En el Cuadro 13, se observan los valores de albúmina plasmática en perros inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

CUADRO 13. Valores de albúmina plasmática en perros inducidos con Aloxano®.

GRUPOS	N°	VALORES DE ALBÚMINA PLASMÁTICA (VR 26-28 g/l)					
		0 h	2 h	24 h	7 días	14 días	21 días
Exp. 1	1	30	28	-	-	-	-
	2	26	26	-	-	-	-
	3	25	20	-	-	-	-
Exp. 2	1	28	-	26	-	-	-
	2	26	-	27	-	-	-
	3	25	-	27	-	-	-
Exp. 3	1	29	-	-	30	-	-
	2	31	-	-	30	-	-
	3	23	-	-	30	-	-
Exp. 4	1	35	-	-	25	23	-
	2	26	-	-	27	32	-
	3	28	-	-	33	37	-
Exp. 4	1	26	-	-	25	29	24
	2	28	-	-	36	29	24
	3	31	-	-	31	24	28
<b>Promedio</b>		<b>27,8</b>	<b>24,7</b>	<b>26,7</b>	<b>29,6</b>	<b>29,0</b>	<b>25,3</b>
<b>Desv. Est.</b>		<b>3,1</b>	<b>4,2</b>	<b>0,6</b>	<b>3,9</b>	<b>5,2</b>	<b>2,3</b>

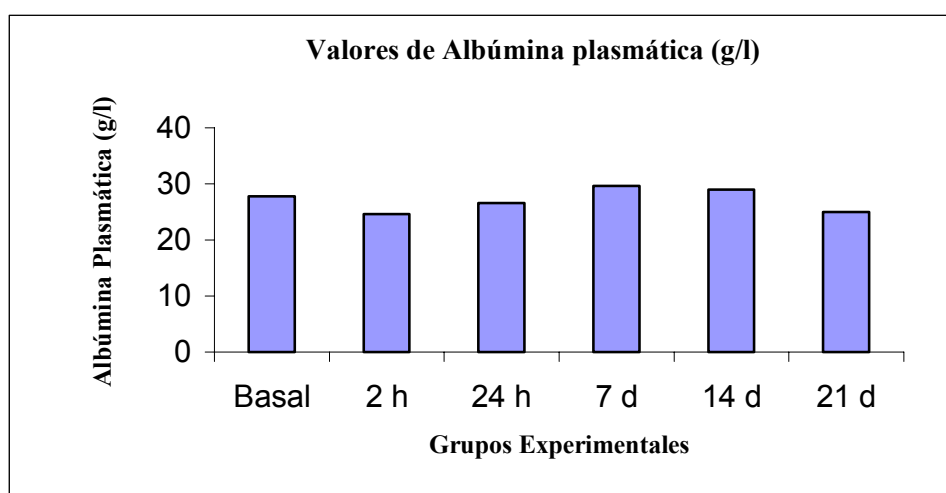


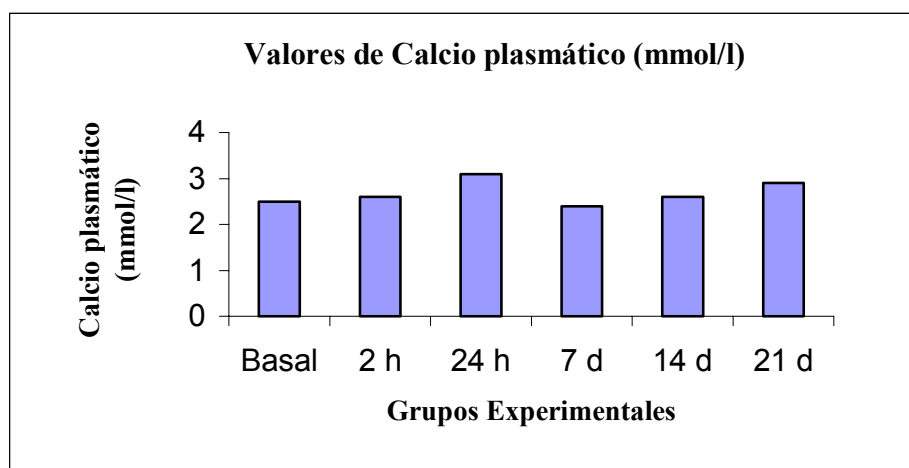
Gráfico 5: Valores de albúmina plasmática a distintos tiempos en perros inducidos con Aloxano®.

Puede apreciarse que no hay diferencias estadísticamente significativas en los valores de albúmina plasmática entre los grupos en estudio ( $p>0.05$ ).

En el Cuadro 14, se presentan los valores de calcio plasmático observados en perros inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

**CUADRO 14. Valores de calcio plasmático en perros inducidos con Alozano®.**

GRUPOS	N°	VALORES DE CALCIO PLASMÁTICO (VR 2.2-2.8 mmol/l)					
		0 h	2 h	24 h	7 días	14 días	21 días
Exp. I	1	2,08	2,81	-	-	-	-
	2	2,03	2,05	-	-	-	-
	3	2,74	2,95	-	-	-	-
Exp. II	1	2.73	-	2.97	-	-	-
	2	2.8	-	2.95	-	-	-
	3	2.65	-	3.67	-	-	-
Exp. III	1	2.77	-	-	3.1	-	-
	2	2.6	-	-	2.9	-	-
	3	2.5	-	-	3.03	-	-
Exp. IV	1	2.7	-	-	2.53	2.49	-
	2	2.5	-	-	1.65	2.88	-
	3	2.5	-	-	2.64	2.75	-
Exp. V	1	2.32	-	-	2.27	2.39	2.58
	2	2.31	-	-	2.03	2.66	2.94
	3	2.39	-	-	1.76	2.59	3.28
<b>Promedio</b>		<b>2.28</b>	<b>2.60</b>	<b>2.98</b>	<b>2.43</b>	<b>2.62</b>	<b>2.93</b>
<b>Desv. Est.</b>		<b>0.4</b>	<b>0.48</b>	<b>0.03</b>	<b>0.53</b>	<b>0.17</b>	<b>0.35</b>

**Gráfico 6: Valores de calcio plasmático a distintos tiempos en perros inducidos con Alozano®.**

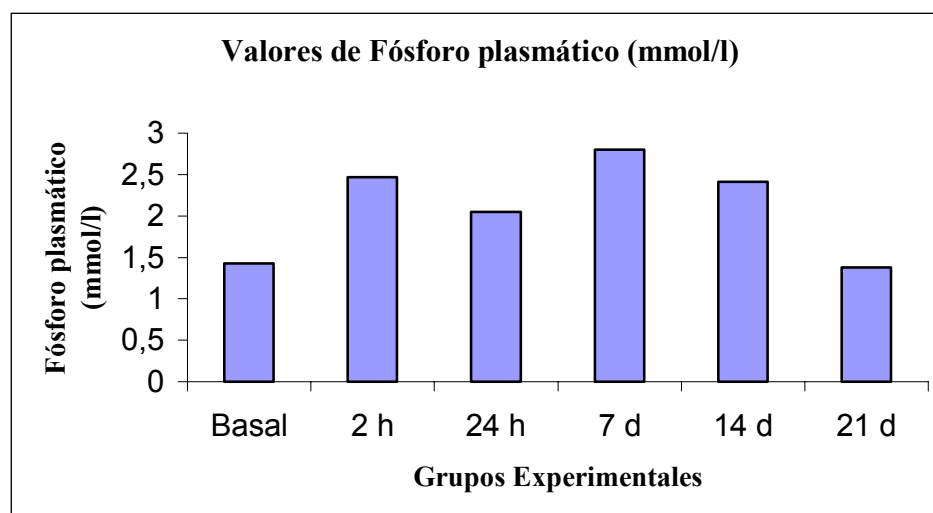
No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos Grupos Experimentales ( $p > 0.05$ ), en relación con los valores plasmáticos de calcio.



En el Cuadro 15, se presentan los valores de fósforo plasmático obtenidos en perros inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

**CUADRO 15. Valores de fósforo plasmático en perros inducidos con Alozano®.**

GRUPOS	N°	VALORES DE FÓSFORO PLASMÁTICO (VR 0.9-1.6 mmol/l)					
		0 h	2 h	24 h	7 días	14 días	21 días
Exp. I	1	1,5	2,31	-	-	-	-
	2	1,52	2,34	-	-	-	-
	3	1,56	2,76	-	-	-	-
Exp. II	1	1.6	-	2.31	-	-	-
	2	1.58	-	1.98	-	-	-
	3	1.1	-	1.86	-	-	-
Exp. III	1	1.48	-	-	1.58	-	-
	2	1.26	-	-	3.49	-	-
	3	0.98	-	-	1.39	-	-
Exp. Iv	1	1.71	-	-	1.31	1.73	-
	2	1.36	-	-	8.54	1.65	-
	3	1.52	-	-	5.09	6.74	-
Exp. V	1	1.2	-	-	1.36	1.49	1.22
	2	1.56	-	-	1.33	1.48	1.68
	3	1.52	-	-	1.52	1.39	1.25
<b>Promedio</b>		<b>1.53</b>	<b>2.47</b>	<b>1.9</b>	<b>2.84</b>	<b>2.41</b>	<b>1.38</b>
<b>Desv. Est.</b>		<b>0.03</b>	<b>0.25</b>	<b>0.45</b>	<b>2.5</b>	<b>2.12</b>	<b>0.25</b>

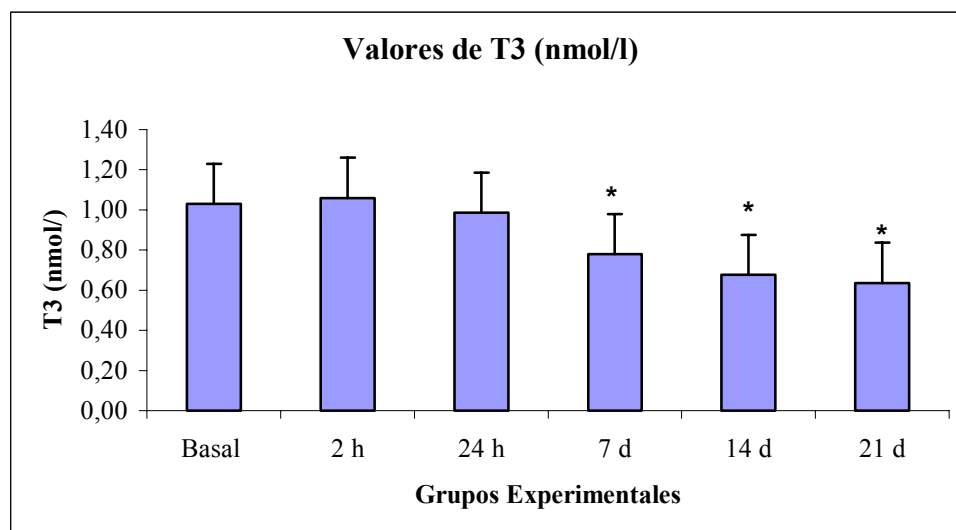
**Gráfico 7: Valores de fósforo plasmático a distintos tiempos en perros inducidos con Alozano®.**

En el presente cuadro, se aprecia que no hay diferencias en los valores de fósforo plasmático entre los grupos en estudio ( $p > 0.05$ ).

En los Cuadros 16 y 17, se presentan los valores de T3 y T4 plasmáticos, obtenidos en perros inducidos con Aloxano<sup>®</sup>.

**CUADRO 16. Valores de T3 plasmática en perros inducidos con Alozano®.**

GRUPOS	N°	VALORES DE T3 PLASMÁTICA 0.6-2.4 nmol/l					
		0 h	2 h	24 h	7 Días	14 Días	21 Días
Exp. I	1	1.16	1.19	-	-	-	-
	2	1.23	1.09	-	-	-	-
	3	1.04	0.93	-	-	-	-
Exp. II	1	1.05	-	0.98	-	-	-
	2	0.89	-	0.75	-	-	-
	3	1.08	-	0.81	-	-	-
Exp. III	1	0.62	-	-	0.62	-	-
	2	1.29	-	-	0.98	-	-
	3	0.89	-	-	0.42	-	-
Exp. IV	1	1.77	-	-	1.01	0.84	-
	2	1.12	-	-	0.42	0.8	-
	3	1.08	-	-	0.79	0.58	-
Exp. V	1	1.05	-	-	0.85	0.74	0.69
	2	1.21	-	-	0.46	0.58	0.68
	3	0.92	-	-	0.48	0.52	0.54
<b>Promedio</b>		<b>1.03</b>	<b>1.06</b>	<b>0.99</b>	<b>0.78</b>	<b>0.68</b>	<b>0.64</b>
<b>Desv. Est.</b>		<b>0.33</b>	<b>0.15</b>	<b>0.24</b>	<b>0.20</b>	<b>0.13</b>	<b>0.08</b>



\*: p &lt; 0.05

**Gráfico 8: Valores de Triyodotironina plasmática (T3) a distintos tiempos en perros inducidos con Alozano®.**

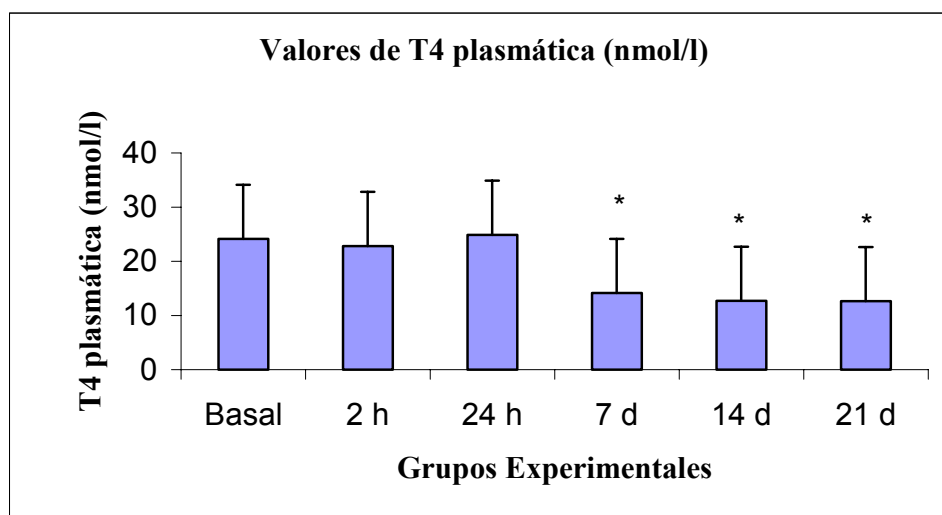
En el Cuadro 16, se aprecia una disminución de los valores plasmáticos de T3 en los grupos en estudio, sin embargo, la casi totalidad de los valores se mantienen dentro de los rangos

establecidos para la especie (0.6-2.4 nmol/l). El análisis estadístico presenta diferencias significativas entre los Exp. I y II al relacionarlos con los demás Grupos Exp. ( $p < 0.05$ ).

En el Cuadro 17 se presentan los valores de T4 plasmática obtenidos en perros inducidos con Alozano<sup>®</sup>.

CUADRO 17. Valores de T4 plasmática en perros inducidos con Alozano®.

GRUPOS	N°	VALORES DE T4 PLASMÁTICA 16-52 nmol/l					
		0 h	2 h	24 h	7 Días	14 Días	21 Días
Exp. I	1	18.4	19.3	-	-	-	-
	2	26.08	24.07	-	-	-	-
	3	26.07	25.06	-	-	-	-
Exp. II	1	23.85	-	24.03	-	-	-
	2	22.36	-	21.86	-	-	-
	3	30.02	-	28.77	-	-	-
Exp. III	1	21.75	-	-	13.96	-	-
	2	28.89	-	-	12.86	-	-
	3	31.05	-	-	12.12	-	-
Exp. IV	1	20.25	-	-	17.98	14.14	-
	2	22.04	-	-	17.84	10.97	-
	3	22.79	-	-	12.25	10.62	-
Exp. V	1	21.06	-	-	12.46	12.03	11.18
	2	20.76	-	-	15.39	15.52	14.83
	3	26.68	-	-	12.45	12.8	11.92
<b>Promedio</b>		<b>24.13</b>	<b>22.81</b>	<b>24.88</b>	<b>14.14</b>	<b>12.68</b>	<b>12.64</b>
<b>Desv. Est.</b>		<b>3.81</b>	<b>3.08</b>	<b>3.53</b>	<b>2.37</b>	<b>1.88</b>	<b>1.93</b>



\*: p&lt;0.05

Gráfico 9: Valores de Tiroxina plasmática (T4) a distintos tiempos en perros inducidos con Alozano®.

En el presente Cuadro, se puede apreciar disminución en los valores plasmáticos de T4, a medida que aumenta el tiempo p.i. en los Grupos Experimentales. El análisis estadístico indicó

diferencias altamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los Exp. I y II, al ser comparados con los otros grupos experimentales.

## 6. DISCUSIÓN

La Diabetes mellitus es un síndrome complejo, que afecta tanto a humanos como a animales; en ambos casos la característica principal es el inapropiado o anormal metabolismo de la glucosa, debido a una deficiencia absoluta o relativa de insulina (Jones y col., 1997). Su incidencia es de 1:200 en perros, constituyendo en la actualidad una endocrinopatía muy frecuente (Carlton y McGavin, 1995).

Aunque las causas de disfunción tiroidea en la Diabetes mellitus siguen siendo desconocidas, se ha demostrado que las diversas alteraciones metabólicas que provoca esta enfermedad, o la deficiencia de insulina por sí sola, pueden afectar directamente algunos aspectos de la función de la glándula tiroidea (Nascimento-Saba y col., 1997).

En relación con el peso y volumen relativo de los páncreas y tiroides de los perros en estudio (Cuadro 3 y 4), el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los distintos grupos, lo que lleva a concluir que no existe una marcada variación en el peso relativo de ambos órganos en perros sanos en comparación con perros diabéticos a distintos tiempos. Cabe señalar que en el presente estudio, no fue posible realizar un seguimiento de las variaciones de los pesos de los órganos en relación con el peso corporal, sin embargo, considerando que a medida que transcurrió el tiempo de desarrollo de la enfermedad, los animales inducidos mostraron una marcada pérdida de la condición corporal y por ende pérdida de peso, los resultados obtenidos llevan a concluir que es posible que las diferencias en los pesos y volúmenes de páncreas y tiroides, fuesen muy pequeñas en relación con la pérdida de peso de los animales a medida que transcurrió el tiempo post-inducción con Aloxano<sup>®</sup>, y por lo tanto éstas no se reflejasen estadísticamente, debido principalmente a la proporcionabilidad entre los órganos y el peso de los animales.

En el presente trabajo, se relacionaron los hallazgos histopatológicos presentes en el páncreas y tiroides con valores de bioquímica sanguínea obtenidos de perros diabéticos inducidos experimentalmente mediante la administración de Aloxano<sup>®</sup>, en dosis única de 75 mg/kg. Según los estudios de Goldner y Gomori (1943), luego de probar la administración endovenosa de este producto en varias concentraciones y en distintas especies animales, especialmente en el perro, se verificó que el Aloxano<sup>®</sup>, en dosis única de 50 a 75 mg/kg de peso corporal, es responsable de diabetes en ausencia de lesiones renales. El Aloxano<sup>®</sup>, se caracteriza en el páncreas por originar necrosis de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans, mediante la producción de radicales libres, lo cual conduce a una deficiencia absoluta de insulina, originando de esa forma el cuadro de Diabetes (Elsner y col., 2002).



Los resultados obtenidos en el presente estudio, señalan en el páncreas una progresiva disminución en el número promedio de islotes de Langerhans por campo, en relación con el tiempo de administración de Alozano<sup>®</sup> (Cuadro 5). La razón de la disminución se debe a la acción de este fármaco, el cual origina necrosis específica en las células beta (McDonald, 1991). Una disminución de estas células, no sólo altera el metabolismo de la glucosa, sino que origina reducción del tamaño de los islotes, haciéndose más evidente a medida que transcurre el tiempo. Estos hallazgos son concordantes con las alteraciones pancreáticas presentes en cuadros de Diabetes mellitus Tipo 1 no Experimental, donde la reducción del número y tamaño de los islotes constituye el hallazgo más frecuente, especialmente en cuadros agudos (Taniyama y col., 1999; Zárate, 2003). Por otra parte, cabe señalar que en bovinos con esta condición, también se ha observado atrofia y reducción en el número de islotes de Langerhans (Taniyama y col., 1993).

En relación con la tinción de Gomori, se pudo observar que ésta constituye una buena técnica tintorial para identificar la presencia de insulina en el citoplasma de las células beta de los islotes de Langerhans en perros, ya que dicha coloración contrasta con el color rosado presente en las otras células del islote. Sin embargo, un aspecto limitante lo constituye la coloración que adquieren las células del páncreas exocrino, ya que también se tiñen de color azul (Figura 5).

En cuanto a la identificación de la insulina en las células beta de los páncreas de los perros correspondientes a los Grupos Experimentales I y II (2 y 24 h), cabe señalar que no se observaron diferencias con los perros del Grupo Control. Con posterioridad, a partir del Grupo III en adelante no fue posible visualizar la insulina en los islotes existentes, ya que tal como se ha señalado, a partir del séptimo día p.i. con Alozano<sup>®</sup> se apreció una significativa reducción en el número de ellos (Cuadro 5). La causa de su disminución, como igualmente la no producción de insulina a partir del séptimo día p.i. se debe a que el Alozano<sup>®</sup> es altamente selectivo y origina necrosis (picnosis) de las células beta a partir de las 2 h p.i. (Grodski y col, 1982).

Al analizar el número de islotes de Langerhans en los Grupos Experimentales (Cuadro 5), se puede observar que la disminución se aprecia en forma importante a partir del séptimo día (Grupo III), disminuyendo levemente con posterioridad a los 14 y 21 días (Grupos IV y V). Este hecho lleva a concluir que si bien es cierto el daño histológico presente en los islotes (picnosis), se observa a partir de las 2 horas (Cuadro 6), el número de islotes sólo se ve afectado en forma considerable a partir del día 7 días p.i. Al respecto, se podría señalar que si bien es cierto, los cambios necróticos en las células beta producto de la acción del Alozano<sup>®</sup> se presentan precozmente (2 h), es posible que la disminución en el número de los islotes de Langerhans se presente con anterioridad a los 7 días, sin embargo, dado que el diseño experimental no consideró mediciones entre las 24 h (Exp. II) y los 7 días (Exp. III), no es posible establecer fehacientemente que la disminución en el número de los islotes se presentó a partir del día 7. Estos hallazgos están en concordancia con lo señalado por diversos autores (Grodski y col, 1982), quienes hacen mención a que una vez aplicado el Alozano<sup>®</sup>, se origina un incremento transitorio de insulina debido a la necrosis celular y liberación de esta hormona al torrente circulatorio. Con posterioridad, una vez que la insulina es metabolizada y producto de la necrosis que comprometió en una alta proporción a las células beta, no se produce la suficiente insulina

de acuerdo a las concentraciones normales, lo cual origina un incremento de la glucosa sanguínea, visualizándose estos hallazgos en el Cuadro 11. Al respecto, cabe señalar que los valores plasmáticos de glucosa aumentaron considerablemente a partir de los 7 días p.i., manteniéndose sobre el rango de referencia para la especie (3.0-5.0 mmol/l). Este hecho confirma la hipótesis de que la disminución del número de islotes de Langerhans, probablemente se origine con anterioridad a los 7 días.

Chastain y Ganjam (1994), mencionan que los valores de glucosa sanguínea que exceden en forma constante los 7.8 mmol/l (140 mg/dl) se consideran hiperglicemia, constituyendo un signo patognomónico de la Diabetes mellitus. Esto permite confirmar la presencia de esta condición en los Grupos Experimentales III, IV y V, lo cual está en concordancia con los parámetros de laboratorio observados en los perros de estos grupos, que presentaron cuadro de diabetes. En el Cuadro 11, se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales (0 h) y aquellas mediciones realizadas con posterioridad a la administración del Aloxano<sup>®</sup> (7,14 y 21 días) ( $p < 0.05$ ). El aumento de los valores de glucosa, como se ha mencionado, es el resultado de la deficiencia de insulina, debido a la destrucción de las células beta.

Al analizar las lesiones microscópicas en los acinos e islotes pancreáticos (Cuadro 6), se aprecian alteraciones necróticas (picnosis), a partir de las 2 h p.i., en asociación con cambios degenerativos (vacuolizaciones citoplasmáticas), los cuales se incrementan a medida que transcurre el tiempo. Estos hallazgos histológicos guardan relación con lo descrito por Martin y Capen (1979), quienes mencionan estas alteraciones a partir de las 2 h, posterior a la administración de una mezcla de Estreptoizotocina y Aloxano<sup>®</sup> en perros. Por otra parte, describen procesos degenerativos de mayor severidad con posterioridad a las 24 h (Figura 4). En el presente estudio, la picnosis y las vacuolizaciones citoplasmáticas están acompañadas de fibrosis, tanto en acinos como en islotes. Además, a nivel del intersticio pancreático se apreció infiltrado mononuclear leve a partir del Grupo Exp. II. Dicho infiltrado inflamatorio es poco frecuente en la DM Tipo 1 de presentación espontánea en humanos y en modelos experimentales animales. Sin embargo, constituye una manifestación histopatológica patognomónica de este tipo de diabetes (Taniyama y col., 1999). Esta condición ha sido denominada “insulitis” por von Meyenburg (1940). Estos hallazgos permiten reforzar los resultados observados en laboratorio clínico, en los Grupos III, IV y V, que señalan altas concentraciones de glucosa sobre lo normal (hiperglicemia), presentes en cuadros de diabetes.

Con el propósito de diferenciar claramente hiperglicemia debida a diabetes, de aquella originada por factores estresantes, se analizó la presencia de fructosamina sérica en el plasma sanguíneo de los perros en estudio.

La fructosamina es una proteína sérica que se forma permanentemente en el cuerpo producto de una reacción no enzimática entre la glucosa y los grupos aminos de las proteínas. Debido a que esta reacción es irreversible, se cree que su concentración depende principalmente de la glucosa plasmática y de la vida media de las proteínas. En el perro, la proteína a la cual se

una la glucosa es la albúmina, la cual tiene una vida media de 1 a 2 semanas. Por esta razón, en gatos y perros la fructosamina se correlaciona con la glucosa presente entre 1 a 2 semanas antes del muestreo (Reusch y Liehs, 1991; Jensen y col., 1992; Kaneko y col., 1992; Kawamoto y col., 1992; Reusch y col., 1993) y en humanos entre 1 a 3 semanas (Reusch y Haberer, 2001). Otra particularidad de esta proteína, es que su concentración no se incrementa en cuadros de hiperglicemia de corta duración (Reusch y Liehs, 1991; Reusch y col., 1993; Link y Rand, 1995; Lutz y col., 1995; Crenshaw y col., 1996).

Un aspecto necesario de resaltar, dada la relación existente entre la glucosa y la albúmina, son los resultados observados en el Cuadro 13, en que se presentan los valores de albúmina plasmática en los diferentes Grupos en estudio. Al respecto, cabe señalar que no se observaron diferencias en los valores de albúmina plasmática entre los Grupos Experimentales. Este aspecto es aparentemente contradictorio, ya que es sabido el rol hepatotóxico del Aloxano<sup>®</sup>, como igualmente la síntesis de proteínas plasmáticas que realiza normalmente el hígado. Una razón que en parte explica los resultados observados, se relaciona con la larga vida media de la albúmina y con el hecho de que está influenciada por el estado nutricional del paciente, de tal modo que no constituye un adecuado parámetro para evaluar la normalidad del hígado. Por otra parte, el estudio anatomopatológico del hígado, el cual se realizó como parte de un proyecto de investigación DID, evidenció severos trastornos de tipo graso a partir del Grupo Experimental III, lo cual se debe al síndrome de movilización grasa debido al cuadro de diabetes. Cabe señalar que los trastornos grasos observados en los hígados en estudio se presentaron en la zona III y la síntesis de albúmina se lleva a cabo en la zona I, esto explica el hecho de que, a pesar de haber un severo daño hepático, este no afectó la síntesis de albúmina, ya que ésta se lleva a cabo, tal como se señaló, en una zona distinta del parénquima a la alterada.

Cabe señalar la existencia de estudios, que plantean la posibilidad que los valores de fructosamina sérica no sean confiables, debido a la presencia de otras enfermedades que actúen concomitantemente, afectando el metabolismo de las proteínas (Kawamoto y col., 1992; Reusch y Tomsa, 1999). Según Reusch y Haberer (2001), esta es la razón por la cual el uso del test de fructosamina en humanos ha sido un tema controversial por muchos años; en el caso particular de la Medicina Veterinaria, no se consideraba en la interpretación clínica de los resultados. Sin embargo, en la actualidad se evalúa, con el propósito de evitar resultados que no correspondan con cuadros de diabetes. En el presente estudio este aspecto fue abordado, realizándose la corrección de la fructosamina, en aquellos casos en que se observó severa hipoalbuminemia.

En humanos, un paciente puede considerarse diabético cuando presenta valores de fructosamina superiores a 224  $\mu\text{mol/l}$  (Muñoz y col., 1997), en perros dichos valores deben ser sobre 400  $\mu\text{mol/l}$ . Por otra parte, valores superiores a los 500  $\mu\text{mol/l}$  se observan en perros diabéticos mal controlados o con diagnóstico reciente (Ettinger y Feldman, 1997). En el presente estudio, se observa un significativo incremento de la fructosamina sérica a partir de los 7 días, incrementándose moderadamente a los 14 y 21 días (Cuadro 12). Los valores de fructosamina sérica observados a los 7 días señalan que los perros con posterioridad a las 24 h evidenciaban valores de glucosa correspondientes a un cuadro de diabetes. Sin embargo, no fue posible establecer esta relación ya que el diseño de la investigación, no consideró análisis de bioquímica sanguínea con posterioridad a las 24 h hasta los 7 días, sin embargo, si se analiza la relación

entre los 14 y 21 días, sí es posible observar una relación directa entre los valores de fructosamina sérica y glucosa, lo cual lleva a suponer que de haber medido los valores de glucosa con posterioridad a las 24 h, se habría encontrado la misma correlación que se observó en los Grupos Experimentales IV y V. Cabe señalar que hay diferencias estadísticamente significativas entre los Grupos Exp. I y II con el resto de los Grupos ( $p < 0.05$ ).

Un segundo aspecto que se abordó en la presente investigación, junto al páncreas, fueron las posibles modificaciones presentes en las tiroides producto de la diabetes experimental inducida con Alozano<sup>®</sup> en los perros en estudio.

La glándula tiroides está constituida por numerosos folículos y tejido conectivo interfolicular que contiene abundantes vasos sanguíneos. Cada folículo se compone de células foliculares epiteliales que circundan al lumen folicular (Kurosomi y Fujita, 1974). Frecuentemente, los folículos se encuentran llenos de coloide. En caninos, las células foliculares varían en altura de acuerdo al grado de actividad glandular, siendo planas o cúbicas bajas en etapas de reposo y cúbicas o cilíndricas cuando la glándula es activa (Bacha y Bacha, 2001).

Las características histológicas del epitelio folicular de las tiroides de los perros en estudio (Cuadro 7), muestran una progresiva reducción en la altura, la cual se hace más evidente a partir del séptimo día (Grupo III). Al respecto, no existen referencias en la literatura nacional y extranjera, que relacionen las características histológicas de la glándula tiroides con Diabetes mellitus en desarrollo. Sin embargo, cabe señalar que diversos estudios mencionan la influencia que puede tener esta enfermedad sobre el normal funcionamiento de la tiroides, en base principalmente a parámetros de bioquímica sanguínea (Kohayagawa y col., 1980; Nascimiento-Saba y col., 1997; Hess y col., 2000). Al respecto, se puede señalar que la disminución de la altura del epitelio folicular se relaciona con una menor actividad tiroidea, la cual puede tener su origen en el desarrollo de DM Tipo 1 Experimental. Esta relación se puede comprobar al observar la disminución de gotas coloideas en las tiroides de los Grupos Experimentales en estudio (Cuadro 7).

Las gotas coloideas son pequeñas vesículas, que transportan la Tiroglobulina desde el coloide a las células foliculares mediante pinocitosis, atravesando la membrana basal de dichas células para unirse a los lisosomas, formando finalmente los fagolisosomas. Las gotas coloideas son altamente dependientes de la TSH liberada desde la adenohipófisis, es así como distintos estudios revelan que después de una inyección de esta hormona, se produce un incremento en el número de gotas coloideas en el citoplasma de las células foliculares (Kurosomi y Fujita, 1974). Con posterioridad, las exopeptidasas lisosomales son las encargadas de separar la T4 de la Tiroglobulina, permitiendo la liberación de esta hormona al torrente sanguíneo (Chastain y Ganjam, 1994). Por ende, una disminución en la presencia de estas gotas implicaría un detrimento en la actividad de la glándula tiroides.

Al analizar las características histológicas del coloide en las tiroides, tanto de los perros controles como inducidos con Aloxano<sup>®</sup> (Cuadro 8), se puede observar que el único cambio de importancia se relacionó con la densidad del coloide folicular, apreciándose un incremento en los Grupos IV y V. El coloide contiene a la Tiroglobulina, glicoproteína de alto peso molecular sintetizada por las células foliculares, que normalmente se almacena en el lumen folicular. El coloide, posee una densidad media que se visualiza de color rosado frente a tinciones rutinarias como la Hematoxilina Eosina (Figura 6) (Cotran y col., 1995). Cuando la glándula presenta inactividad, se produce acumulación del coloide y aumenta su densidad visualizándose de color rosado intenso. Según Vásquez (1974), el incremento en la cantidad y densidad del coloide es característico de estados regresivos (hipofunción) de la glándula, mientras que el coloide escaso y menos denso es propio de una tiroides activa (hiperfunción). Al respecto, en virtud del incremento de la densidad del coloide en los grupos con mayor tiempo post-inducción, se podría concluir que existen evidencias histológicas que avalan una disminución de la actividad tiroidea en los perros con Diabetes mellitus experimental.

Dado que la glándula tiroides modifica permanentemente su actividad producto de múltiples estímulos, lo cual se refleja tanto en su estructura como en la composición química del coloide (Cotran y col., 1995), en el presente estudio se analizó la relación entre la Diabetes mellitus y la actividad tiroidea, utilizando para ello la tinción de Desmarais y Laham (1962). Estos autores establecieron relación entre la coloración del coloide y el grado de actividad de la glándula, a través de isótopos radioactivos, de tal modo que demostraron que la coloración azul se relaciona con actividad glandular; por el contrario el color amarillo con inactividad. En este sentido, Cubillos (1984) señala que habiendo utilizado la técnica de Desmarais y Laham en el análisis de la actividad tiroidea en cerdos con Músculo Pálido, Blando y Exudativo y habiendo comparado esta técnica con Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido, es un método altamente confiable e ideal como procedimiento rutinario y rápido para evaluar el grado de actividad de las tiroides.

Del análisis del Cuadro 9, se desprende que a partir del séptimo día (Grupo III), el coloide evidenció una menor actividad, reflejado en un incremento en el coloide de color amarillo, manteniéndose sin grandes variaciones en los Grupos IV y V (Figura 9). Por otra parte, cabe señalar que en el Grupo Control como igualmente en los Grupos Experimentales I y II, la coloración del coloide fue azul en un 100% (Figura 8). Estos hallazgos permiten concluir, que habiéndose evaluado la actividad tiroidea en base a la tinción de Desmarais y Laham, se observó hipofunción tiroidea tal como se señaló, a partir del séptimo día post-inducción con Aloxano<sup>®</sup>. Este hallazgo está en concordancia con lo observado en los mismos Grupos Experimentales, en los que se apreció una disminución de la altura del epitelio folicular (Cuadro 7); de igual forma, con el incremento de la densidad del coloide folicular (Cuadro 8). La coloración amarilla del coloide, como igualmente la disminución de la altura de los epitelios foliculares y la mayor densidad del coloide observada en los mismos Grupos Experimentales (IV y V), señalan una menor actividad tiroidea producto de la Diabetes mellitus inducida experimentalmente con Aloxano<sup>®</sup>.

Las hormonas tiroideas tienen un amplio rango de efectos vitales. Normalmente mantienen en óptima función todos los órganos, incluyendo los endocrinos (Chastain y Ganjam, 1994). En otras palabras, juegan un rol indispensable en una amplia variedad de reacciones bioquímicas a nivel de tejidos periféricos como el esqueleto y el músculo cardíaco, así como también en hígado y riñón, quienes controlan colectivamente la actividad basal metabólica del organismo (Matamoros y col., 2003). Las principales hormonas secretadas por la glándula tiroidea son: Tiroxina (T4), Triyodotironina (T3), triyodotironina inversa (rT3) y calcitonina (Kaneko y col., 1997; Feldman y Nelson, 2000). Según diversos estudios (Chastain y Ganjam, 1994; Panciera, 1997; Feldman y Nelson, 2000) la medición de la Tiroxina sérica total (T4) y de la Triyodotironina total (T3) han sido las principales técnicas utilizadas para evaluar la función tiroidea. A pesar del reciente desarrollo de ensayos destinados a la medición de T4 libre (fT4) y de la estimulación de la TSH, los elevados costos de ambos ensayos y la limitada validación del segundo test han impedido su masificación en la clínica veterinaria, aún cuando son exámenes de elección en humanos (Panciera, 1997). Por las razones anteriormente expuestas, en el presente estudio se realizaron únicamente mediciones de las hormonas T3 y T4, mediante Electroquimioluminiscencia, con el propósito de evaluar el grado de actividad tiroidea y relacionarlo con las modificaciones histológicas presentes tanto en tiroides como en páncreas

Al observar los valores de T3 en los perros en estudio (Cuadro 16), se puede apreciar que existe una disminución con posterioridad a las 24 h p.i. con Aloxano<sup>®</sup>. Sin embargo, aún cuando la casi totalidad de dichos valores están dentro de los rangos establecidos como normales para la especie (0.6-2.4 nmol/l), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales (0 h) y aquellos observados a la primera semana, después de haber inducido el cuadro de diabetes experimentalmente. Estos resultados guardan relación con lo señalado por Mitsuma y Nogimori (1982), quienes al inducir diabetes en ratas mediante el uso de Estreptozotocina, obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los valores de T3. Algo distintos son los resultados obtenidos por Kohayagawa y col. (1980), quienes describen una disminución de los valores séricos de T3 en caninos machos y hembras, a los cuales se les había inducido Diabetes mellitus mediante el uso de Aloxano<sup>®</sup>, no observándose diferencias al comparar los perros controles con los diabéticos.

Las diferencias observadas, en relación con la T3, entre la presente investigación y diversos estudios que no muestran variaciones, pueden explicarse por factores que influyen directamente en su comportamiento, como el balance energético, el stress y la acción de algunos fármacos (Matamoros y col., 2003). Es posible concluir que en virtud de los aspectos señalados, la determinación de la T3 no constituye un método confiable para medir la actividad tiroidea. En este sentido, cabe señalar que además de los aspectos mencionados, diversos investigadores (Chastain y Ganjam, 1994; Nelson, 2000) señalan, que no existen mayores diferencias en la media o en el rango de concentración de la T3 al compararla entre grupos de perros saludables, hipotiroideos y eutiroideos con enfermedad concurrente. Resumiendo, se puede afirmar que los valores de T3 disminuyen en severos cuadros de hipotiroidismo, sin embargo, es más frecuente que sus valores disminuyan en presencia de enfermedades no tiroideas.

En cuanto a la T4, esta se considera como la hormona más idónea para evaluar la función tiroidea. En la actualidad se han estructurado diversos test en base a esta hormona, los cuales permiten evaluar la actividad tiroidea en animales de compañía (Chastain y Ganjam, 1994; Feldman y Nelson, 2000). Si se considera que más del 99% de esta hormona está unida a proteínas plasmáticas, y que el porcentaje restante (menos del 1%) es el que actúa sobre las células blanco, se hace necesario saber que se pueden alterar los resultados producto de los niveles de las proteínas plasmáticas existentes, como igualmente por su afinidad con la T4. Al igual que la T3, la T4 puede verse afectada por enfermedades no tiroideas como aquellas que involucran al hígado, riñones y ciertas enfermedades infecciosas (Chastain y Ganjam, 1994; Panciera, 1997; Matamoros y col., 2003).

Los valores de T4 obtenidos en la presente investigación, tienden a disminuir a partir de los 7 días (Grupo III), estableciéndose diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales (0 h) y aquellos observados con posterioridad a los 7 días post- administración del Alozano<sup>®</sup> (Cuadro 17). Diversos estudios, en los cuales se ha inducido diabetes experimentalmente, han obtenido idénticos resultados, los que reflejan que se afecta o modifica en diversos sitios el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Kohayagawa y col., 1980; Mitsuma y Nogimori, 1982; Nascimento-Saba y col., 1997). Por otra parte, Ettinger y Feldman (1997) mencionan que la Diabetes mellitus de generación espontánea puede tener un impacto variable sobre la función tiroidea, mencionando la posibilidad de una importante depresión de los niveles séricos de T3 y T4 debido a cetoacidosis diabética. Estos autores señalan que la T3 sérica puede disminuir o aumentar, en cambio, la T4 se mantiene en rangos normales o bien se reduce, señalando que la disminución se debe a factores no relacionados con una menor afinidad proteica, sin embargo, no especifican cuáles serían éstos. Hoy en día, en perros, se atribuye gran importancia al reconocimiento de pacientes que cursan con hipotiroidismo conjuntamente con Diabetes mellitus, debido a la posibilidad de que aumente la resistencia a la insulina cuando ambas condiciones están juntas (Ford y col., 1993). Igualmente se describe que una restauración del eutiroidismo disminuiría los valores de glucosa sanguínea, razón por la cual se recomienda chequear regularmente la funcionalidad tiroidea en todo paciente diabético, esto permitiría el tratamiento precoz de alguna disfunciones tiroideas en estado subclínico (Wu, 2000).

En el perro, las células parafoliculares (C cells o Light cells), fueron descritas por primera vez por Baber (1876), sin embargo, estas fueron visualizadas por Nonidez (1932) utilizando técnicas argentafílicas. Dichas células se encuentran aisladas o en grupos, en la base de las células del epitelio folicular y en el tejido conectivo interfolicular, en la mayoría de los mamíferos y aves, siendo particularmente abundantes en perros y murciélagos (Kurosomi y Fujita, 1974; Bacha y Bacha, 2001). Estas células no están en contacto con el lumen folicular, su polo secretor está orientado hacia los capilares interfoliculares, en los cuales vierte su contenido (Carlton y McGavin, 1995). Las células parafoliculares son las encargadas de la secreción de calcitonina (tirocalcitonina), hormona polipéptida cuya función principal es disminuir el calcio y el fosfato séricos inhibiendo la resorción osteoclástica del hueso y disminuyendo la activación renal de la vitamina D. Su vida media en el plasma es de 5 a 15 minutos, cabe señalar que la célula mantiene una cierta cantidad como reserva a nivel citoplasmático (Chastain y Ganjam, 1994). Estas células constituyen el 0,1% de la masa glandular y su identificación con

Hematoxilina-Eosina no es adecuada, razón por la cual los métodos ideales para su visualización son las técnicas inmunohistoquímicas y argirofílicas (Perinetti, 2000).

En el Cuadro 10, se estableció el número promedio de células parafoliculares por campo, observadas mediante la tinción de Grimelius (1968) (Figuras 10 y 11). Al comparar el Grupo Control con los Experimentales, se apreció un importante incremento en el número de estas células en el Grupo Experimental III, el cual con posterioridad se hizo más manifiesto en los Grupos IV y V. Al analizar estadísticamente los resultados, se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre el Grupo Control y los Grupos Experimentales I y II, sí entre estos y el resto (III, IV y V) ( $p < 0.05$ ).

De acuerdo a lo descrito por Constantinides (1974) y por Copp y Ma (1980), el incremento en el número de células parafoliculares puede deberse a hipercalcemia sostenida en el tiempo. Chastain y Ganjam (1994) también describen a la hipermagnesemia como responsable de la secreción de calcitonina, por encima del índice de secreción basal normal. Por otra parte, Basáez y col (2000) mencionan a ciertas hormonas gastrointestinales como estimulantes de la calcitonina, en especial la gastrina. Esta hormona tiene por función aumentar la secreción de ácido clorhídrico y pepsina, razón por la cual es secretada con posterioridad a la ingesta de alimentos (Cotran y col., 1995; Ettinger y Feldman, 1997).

Cabe destacar que Kovacs y col. (1989), establecieron que la gastrina constituye el mediador más importante de la secreción de ácidos en la fase gástrica de la digestión, en la especie canina. Al respecto, si se considera que uno de los signos más importantes de la Diabetes mellitus (espontánea y experimental) es la polifagia, cabría esperar un significativo incremento en la secreción de gastrina y por ende, incremento en la producción de calcitonina la cual sería responsable del aumento de células parafoliculares en los Grupos Experimentales III, IV y V. Estos hallazgos son coincidentes con lo descrito por Chastain y Ganjam (1994), quienes mencionan la capacidad de la gastrina para estimular la secreción de calcitonina. Por otra parte, cabe señalar que aproximadamente un 40% de la gastrina se metaboliza en el riñón y la parte restante en el hígado (Chastain y Ganjam, 1994; Ettinger y Feldman, 1997). Dado que la Diabetes mellitus experimentalmente inducida con Aloxano<sup>®</sup> produce daño en las células renales y hepáticas (Grodski y col., 1982; Salis y col., 2001; Elsner y col., 2002), se metaboliza menos gastrina, observándose elevadas concentraciones sanguíneas de esta hormona, y una mayor secreción de calcitonina. Tal como se mencionó, este mecanismo sería el responsable del aumento del número de células parafoliculares en la glándula tiroides de los perros con mayor tiempo de Diabetes mellitus inducida experimentalmente con Aloxano<sup>®</sup>. De igual forma, es sabido que en cuadros de Diabetes mellitus espontánea, la gran cantidad de glucosa circulante provoca daños en el hígado y riñón (Martin y Capen, 1979; Garcia Nieto y col., 2001), con una menor metabolización de la gastrina y las consecuencias ya señaladas.

El calcio es el quinto elemento más abundante en el cuerpo, hallándose casi el 99% de él en el esqueleto, en donde sirve de depósito para satisfacer las deficiencias que se puedan originar en el suero. El calcio extraesquelético es necesario para la vida, y esencial para la contracción



normal del músculo cardíaco y esquelético, la función nerviosa y la coagulación de la sangre (Ettinger y Feldman, 1997). La fisiología del metabolismo del calcio y del fósforo se encuentra estrechamente relacionada, siendo ambas reguladas por dos hormonas: la parathormona (u hormona paratiroidea) y la calcitonina (Guyton, 1992).

Al observar los valores de calcio plasmáticos en los diferentes Grupos en estudio (Cuadro 14), llama la atención el hecho que no se observaron diferencias en condiciones que las células parafoliculares si mostraron variaciones estadísticamente significativas, a partir del Grupo Experimental de los 7 días. Este hecho es contradictorio, ya que es sabida la existencia de una relación directa entre las células parafoliculares y las variaciones plasmáticas de calcio. El estado de normocalcemia observado, puede deberse a una sobreproducción de parathormona, la cual supere casi por completo a la calcitonina, logrando así regular el calcio sanguíneo. Al respecto, cabe señalar que en el hombre (adulto) la calcitonina tiene un efecto muy débil sobre la concentración plasmática de calcio ya que, si bien es cierto actúa con mayor rapidez que la parathormona, su accionar es a corto plazo, dado que la paratiroides la supera de modo más energético, siendo esto más evidente en periodos prolongados de tiempo (Guyton, 1992), como en la presente investigación.

En cuanto al fósforo, este es un importante componente de los ácidos nucleicos, membranas celulares, metabolismo aeróbico y anaeróbico; además forma parte de la estructura mineral del hueso al combinarse con el calcio (Chastain y Ganjam, 1994). El fósforo se absorbe del tracto digestivo y se excreta vía renal. Tal como ya se ha mencionado, la parathormona cumple un papel fundamental en la regulación de la concentración del fósforo, por una parte aumentando la resorción ósea y por otra, incrementando la proporción de fosfato eliminado a través de la orina (Guyton, 1992; Ettinger y Feldman, 1997).

Los valores de fósforo observados en los Grupos Experimentales (Cuadro 15), no reflejaron variaciones significativas en relación con el tiempo de administración del Aloxano<sup>®</sup>. Sin embargo, se apreció un leve incremento a partir de Grupo III, el cual puede atribuirse a la acción de la parathormona en los perros con falla renal. Como se ha mencionado con anterioridad, tanto la Diabetes experimental como la espontánea, pueden cursar con nefropatía, la que se manifiesta en distintos grados de severidad (Martin y Capen, 1979; Grodski y col., 1982; Garcia Nieto y col., 2001; Salis y col., 2001; Elsner y col., 2002). Según Nagode y Chew (1992) el incremento de la hormona paratiroidea en los perros con falla renal crónica se relaciona principalmente con el grado de hiperfosfatemia presente. Sin embargo, durante los estados iniciales de la falla renal, la fosfatemia se mantiene dentro del rango normal debido al aumento compensatorio en la excreción de fosfato por el riñón (Ettinger y Feldman, 1997). Este hecho explicaría que, si bien es cierto los valores de fosfato están aumentados, no hay variaciones estadísticamente significativas entre los Grupos, ya que la insuficiencia renal no es severa en la totalidad de los perros estudiados.

Finalmente, de la presente investigación se puede concluir que la administración de Aloxano<sup>®</sup> en perros es responsable del cuadro de Diabetes mellitus Tipo 1. El páncreas, tal como

se ha señalado con anterioridad, presentó severa necrosis de las células beta de los islotes de Langerhans e infiltrado inflamatorio, considerado éste último patognomónico de esta condición. Al relacionar las alteraciones morfológicas del páncreas con los cambios de bioquímica sanguínea, se puede apreciar que los perros inducidos presentaron destrucción de los islotes acompañada de hiperglicemia, existiendo una total concordancia entre los Grupos afectados por las alteraciones morfológicas con aquellos que presentaron altas concentraciones de glucosa sanguínea (sobre los rangos normales).

Por otra parte, morfológicamente los estudios realizados a nivel de las tiroides, se relacionaron con una disminución de la actividad de esta glándula. Cabe señalar que se observaron importantes modificaciones en el número de células parafoliculares, las cuales se incrementaron en forma muy significativa a partir del séptimo día p.i. Por otra parte, los cambios morfológicos visualizados en las tiroides, indicativos de hipofunción, también estuvieron en concordancia con la disminución de los valores de T3 y T4, de tal modo, se puede señalar, que sí existe una relación entre las alteraciones pancreáticas y la tiroides, caracterizada esta última por una disminución de su función .

## CONCLUSIONES

De la presente investigación es posible concluir que:

- La administración de Alozano<sup>®</sup> en dosis única de 75 mg/kg de peso corporal en perros adultos, fue responsable de la inducción de Diabetes mellitus Tipo I. En páncreas se observó destrucción de las células beta de los islotes de Langerhans y clínicamente hiperglicemia. Por otra parte, en tiroides se apreció hipofunción y un significativo incremento de las células parafoliculares, sin variaciones en los valores sanguíneos de calcio.
- El páncreas presentó una disminución estadísticamente significativa del número de islotes de Langerhans a partir del Grupo Experimental II, haciéndose ésta más manifiesta a partir del Grupo Experimental III.
- Histológicamente, el páncreas evidenció en los acinos picnosis y vacuolizaciones citoplasmáticas a partir de las 2 h p.i. (Grupo Exp. I). Además, presentó fibrosis desde los 7 días p.i. en los acinos y de los 14 días en los islotes.
- La tiroides presentó disminución del epitelio folicular, aumento de la densidad del coloide, menor número de gotas coloides y un incremento de células parafoliculares, a partir de los 7 días post-administración del Alozano<sup>®</sup>, todas características morfológicas indicativas de hipofunción.
- Los valores plasmáticos de glucosa y fructosamina, presentaron incremento estadísticamente significativo, a partir de los 7 días p.i., indicativo de diabetes.
- Los valores plasmáticos de T3 y T4 presentaron significativa disminución en los perros de los Grupos Experimentales a partir de los 7 días post-administración del Alozano<sup>®</sup>, lo cual se relaciona con una disminución de la actividad tiroidea.
- Las concentraciones plasmáticas de albúmina, calcio y fósforo no presentaron variaciones en el transcurso del periodo experimental.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, A. 2000. Autoimmune Disease Risk in Families With Type 1 Diabetes. California. USA. (Obtenido de [http://diabetes.about.com/gi/dynamic/offsite.htm?site=http%3A%2F%2Fwww.genetichhealth.com%2FDBTS\\_Other\\_Diseases\\_in\\_Type\\_1\\_Diabetes.shtml](http://diabetes.about.com/gi/dynamic/offsite.htm?site=http%3A%2F%2Fwww.genetichhealth.com%2FDBTS_Other_Diseases_in_Type_1_Diabetes.shtml). Consultado el 29.05.02)
- BABER, E. C. 1876. Contribution to the minute anatomy of the thyroid gland of the dog. *Proc. Roy. Soc.*, 24:240-241.
- BACHA, W., L. BACHA. 2001. Atlas color de Histología Veterinaria. 2ª ed. Inter.-Médica. Buenos Aires. Argentina.
- BASÁEZ, E., P. RODRÍGUEZ, J. MARTÍNEZ. 2000. Hipercalcemia. *Revista médica de Santiago*. 3(11).
- BRENTA, G., I. SINAY, M. PISAREV, Z. GUZMAN, M. SCHNITMAN. 2001. Sensibilidad a la insulina en pacientes atieróticas: Efectos del tratamiento supresor con L-tiroxina y de la suspensión del mismo. Centro de Endocrinología y Metabolismo, Hospital Francés de Buenos Aires. (Obtenido de [http://www.saem.or.ar/numeros/r1\\_01.doc](http://www.saem.or.ar/numeros/r1_01.doc) Consultado el 24.06.03).
- CARLTON, W., D. MCGAVIN. 1995. Special veterinary pathology. 2<sup>nd</sup> ed., Mosby-Year Book. St. Louis. USA.
- CHASTAIN, C.B., V.K. GANJMAN. 1994. Endocrinología clínica de los animales de compañía. Inter-Vet. Buenos Aires, Argentina.
- COTRAN, R., V. KUMAR, S. ROBBINS. 1995. Patología estructural y funcional. 5ª ed., Interamericana. McGraw-Hill, Madrid. España.
- CONSTANTINIDES, P. 1974. Functional Electronic Histology. Amsterdam, El servier Scientific Publishing Co.

- COPP, D.H., S.W.Y. MA. 1980. Comparative Endocrinology of Calcitonin. En: Calcitonin 1980, Int. Symp. held in Milan, Ed. A. Pecile. Amsterdam.
- CRENSHAW, K., M. PETERSON, L. HEEB. 1996. Serum fructosamine concentration as an index of glycemia in cats with Diabetes mellitus and stress hyperglycemia. *J. Vet. Intern. Med.* 10:360-364
- CUBILLOS, V. 1984. Thyroid glands of pigs and pale, soft, exudative meat-light microscopic and ultrastructural studies. Tesis, PhD. University of Queensland. Departament of Veterinary Pathology and Public Health. Queensland, Australia.
- CUBILLOS, V., E. PAREDES. 1995. Manual de Necropsia en animales domésticos. Fac. de Ciencias Vet. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- CUNNINGHAM, J. 1999. Fisiología Veterinaria. 2ª ed., Mc-Graw-Hill Interamericana, México D.F. México.
- DESMARAIS, A., Q.N. LAHAM. 1962. The relation between the staining properties of the thyroidal colloid and its iodine content. *Can. J.Biochem.Physiol.* 40: 227-236.
- ELSNER, M., M. TIEDGE, B. GULDBAKKE, R. MUNDAY, S. LENZEN. 2002. Importance of the GLUT2 Glucose Transporter for Pancreatic Beta cell Toxicity of Alloxan. *Diabetología.* 45:1542-1549.
- ENGERMAN, R.L., J.W. KRAMER. 1982. Dogs with induced or spontaneous diabetes as models for the study of human diabetes mellitus. *Diabetes.* 31:26-29.
- ETTINGER, S., E. FELDMAN. 1997. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del perro y del Gato. Vol. 2, 4ª ed. Inter-Médica. Buenos Aires. Argentina
- FELDMAN, E., R. NELSON. 2000. Endocrinología y Reproducción en perros y gatos. Vol. 1, 2ª ed Interamericana. McGraw-Hill. México.
- FLEITAS, A., R. SIMON, G. ALMEIDA, A. QUINTELA, M. A. ALFONSO. 2000. modelo experimental de diabetes en conejos. *Rev. Cubana angirol. Y Cir. Vasc.* 1:10-15.

- FORD, S., R. NELSON, E. FELDMAN, D. NIWA. 1993. Insuline Resistance in Three Dogs with Hypothyroidism and Diabetes Mellitus. *JAVMA*. 202:1478-1480.
- FOSTER, W.D. 1991. Diabetes. En: Wilson, J.D., E. Braunwald, K.J. Isselbacher, R.J. Petersdorf, J.B. Martín, A.S. Fauci, R.K. Root. Harrison. Principios de Medicina Interna. 2ª ed Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, España.
- GANONG, W. F. 1992. Fisiología médica. Manual moderno. 20ª ed. México.
- GARCIA NIETO, V., L. YANES, A. CALLEJÓN. 2001. Disfunción Tubular Proximal Renal en la Diabetes mellitus Insulino-Dependiente. *Nefrología*. 21:32-38.
- GOLDNER, M.G., G. GOMORI. 1943. Alloxan diabetes in the dog. *Endocrinology*. 33:297-308.
- GRIMELIUS, L. 1968. A silver nitrate stain for  $\alpha_2$  cells in human pancreatic islets. *Acta Soc.Med.Upsal*. 73: 243-270.
- GRODSKY, G., C. ANDERSON, D. COLEMAN, J. CRAIGHEAD, G. GERRITSEN, C. HANSEN, L. HERBERG, CH. HOWARD, A. LERNMARK, F. MATSCHINSKY, E. RAYFIELD, W. RILEY, A. ROSSINI. 1982. Metabolic and underlying causes of diabetes mellitus. *Diabetes* 31:45-53.
- GUYTON, A. 1992. Tratado de fisiología médica. 8ªed., Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, España.
- HERMANSEN, K., O. SCHMITZ, H. ORSKOV. 1985. Reversal of D- and A-Cell insensitivity to glucose in alloxan-diabetic dogs by treatment with the artificial beta cell (Biostator). *Diabetes* 34: 260-266.
- HESS, R., M. SAUNDERS, T. VAN WINKLE, C. WARD. 2000. Concurrent disorders in dogs with Diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). *JAVMA*. 217:1166-1173.
- HOENIG, M. 1995. Pathophysiology of canine diabetes. En: Greco, D., M. Peterson. Diabetes mellitus. *Vet. Clin. North. Am.* 25: 253-256.

- JENSEN, A., H. HOUE, C. NIELSEN. 1992. Critical differences of clinical-chemical parameters in blood from Red Danish dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 52:86-89
- JONES, T., R. HUNT, N. KING. 1997. *Veterinary Pathology*. 6<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA.
- JUBB, K., P. KENNEDY, N. PALMER. 1993. *Pathology of domestic animals*. 4<sup>th</sup> ed., Academic Press. San Diego. USA.
- KANEKO, J. J. 1997. Thyroid function. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Ed. J. J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss. (edss.). 5<sup>th</sup> ed. Academic Press. San Diego. USA.
- KANEKO, J., M. KAWAMOTO, A. HEUSNER, E. FELDMAN. 1992. Evaluation of serum fructosamine concentration as an index of blood glucose control in cats with Diabetes mellitus. *Am. J. Vet. Res.* 53:1797-1801.
- KAWAMOTO, M., J. KANEKO, A. HEUSNER, E. FELDMAN, I. KOIZUMI. 1992. Relation of fructosamine to serum protein, albumin, and glucose concentrations in healthy and diabetic dogs *Am. J. Vet. Res.* 53:851-855.
- KHAN, S. 2002. *Complications: The Thyroid Gland*. Ottawa. Canada. (Obtenido de [http://diabetes.about.com/gi/dynamic/offsite.htm?site=http%3A%2F%2Fwww.diabetes.ca%2Fabout\\_diabetes%2Fthyroid.html](http://diabetes.about.com/gi/dynamic/offsite.htm?site=http%3A%2F%2Fwww.diabetes.ca%2Fabout_diabetes%2Fthyroid.html). Consultado el 29.05.02).
- KOHAYAGAWA, A., L. M. RIBEIRO, J. M. FERREIRA, R. MATEUS. 1980. Efeito do Aloxano nos niveis sericos de triiodotironina, tiroxina e colesterolos em caes. *Arq. Esc. Vet. UFGM*. 32:193-196.
- KOVACS, T., J. WALSH, V. MAXWELL, H. WONG, T. AZUMA, E. KATT. 1989. Gastrin is a major mediator of the gastric phase of acid secretion in dogs: proof by monoclonal antibody neutralization. *Gastroenterology*. 97: 1406-1413.
- KUROSOMI, K., H. FUJITA. 1974. *An Atlas of Electron Micrographs. Functional Morphology of Endocrine glands*. Tokyo: Igaku Shoin Ltd.
- LINK, K., J. RAND. 1995. Changes in fructosamine concentration in cats with induction and resolution of chronic hyperglycemia. *J. Vet. Intern. Med.* 9:180.

- LUNA, L. G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill. New York. USA.
- LUTZ, T., J. RAND, E. RYAN. 1995. Fructosamine concentrations in hyperglycemic cats. *Can. Vet. J.* 36:155-159.
- MARTIN, S., C. CAPEN. 1979. The endocrine system in Catcott, E. J.; Canine Medicin. Vol. 2, 4<sup>th</sup> ed. Am. Vet. Pub. Inc. Santa Barbara, California. USA
- MATAMOROS, R., P. CONTRERAS, F. WITWER, M. I. MAYORGA. 2003. Hipotiroidismo en Rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 35:1-11.
- MCDONALD, L. E. 1991. Endocrinología veterinaria y reproducción. 4<sup>a</sup> ed., Interamericana McGraw-Hill. México.
- MENDEZ, D. J., H. G. RAMOS. 1994. Animal models in diabetes research. *Arch. Med. Res.* 25:367-375.
- MITSUMA, T., T. NOGIMORI. 1982. Effects of Streptozotocin-induced Diabetes mellitus on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid axis in rats. *Endocrinol. Jpn.* 29:695-700.
- MUÑOZ, E., O. BONNE, M. ABREU, C. VALDEZ. 1997. Utilidad de la fructosamina sérica en pacientes diabéticos. *Rev. Cubana Med. Milit.* 26:75-79.
- NAGODE, L., D. CHEW. 1992. Nephrocalcinosis caused by hyperparathyroidism in progression of renal failure: Treatment with calcitriol. *Semin. Vet. Med. Surg.* 7:202.
- NASCIMIENTO-SABA, C. C. A., BREITENBACH, M. M. D., ROSENTHAL, D. 1997. Pituitary-thyroid axis in short- and long-term experimental Diabetes mellitus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30:269-274.
- NELSON, R. 2000. Diabetes mellitus. In: Ettinger, S., E. Feldman. Textbook of veterinary internal medicine. 5<sup>th</sup> ed., Saunders. Philadelphia. USA.
- NONIDEZ, J. F. 1932. The origin of the "parafollicular" cell, a second epithelial component of the thyroid gland of the dog. *Amer. J. Anat.*, 49:479-505.



- PANCIERA, D. 1997. Symposium on Canine Hypothyroidism. *Vet. Med.* 92:44-67.
- PERINETTI, H. 2000. Compendio de Patología Tiroidea. Universidad Nacional de Cuyo. (Obtenido de [http://fmed2.uncu.edu.ar/biblioteca/ebooks/\\_patologia\\_tiroidea/portada.htm](http://fmed2.uncu.edu.ar/biblioteca/ebooks/_patologia_tiroidea/portada.htm). Consultado el 10.07.03)
- PUMARINO, H. 1984. Endocrinología y Metabolismo. Andrés Bello. Santiago. Chile.
- REMILLARD, R. L. 1999. Nutritional management of diabetic dogs. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 21:699-713.
- REUSH, C., M. LIEHS. 1991. Evaluation of fructosamine as a new marker for long-term metabolic control in diabetic dogs and cats. Proceedings of the 9<sup>th</sup> Annual Veterinary Medical Forum, American College of Veterinary Internal Medicine. New Orleans, USA.
- REUSH, C., M. LIESH, M. HOYER, R. VOCHEZER. 1993. Fructosamine- a new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 7:177-182.
- REUSH, C., K. TOMSA. 1999. Serum fructosamine concentration in cats with overt hyperthyroidism. *JAVMA.* 215:1297-1300.
- REUSH, C., B. HABERER. 2001. Evaluation of fructosamine in dogs and cats with hypo- or hyperproteinemia, azotaemia, hyperlipidaemia and hyperbilirubinaemia. *Vet. Rec.* 148:370-376.
- SALIS, A., R. PETERSON, M. STECKER, N. PATEL, L. WILLIS, P. GALLEY, A. ECLAVEA, G. DREESSEN. 2001. Suprarenal intraarterial infusion of Alloxan and Streptozotocin during balloon occlusion of the juxtarenal abdominal aorta. *Acad. Radiol.* 8:473-477.
- SCHÄER, M. 1999. Enfermedades del páncreas endocrino (células de los islotes). En: Morgan, R. Clínica de pequeños animales. 3<sup>a</sup> ed., Harcourt Brace, S.A. Madrid. España.
- SIMON, C. 1997. Diabetes Mellitus. Manejo del paciente diabético. *MEVEPA.* 63:21-29.

- TANIYAMA, H., K. HIRAYAMA, Y. KAGAWA, T. KUROSAWA, M. TAJIMA, T. YOSHINO, H. FURUOKA. 1999. Histopathological and Immunohistochemical analysis of the endocrine and exocrine pancreas in twelve cattle with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM). *J. Vet. Med. Sci.* 61: 803-810.
- TANIYAMA, H., T. SHIRAKAWA, H. FURUOKA, S. OSAME, N. KITAMURA, K. MIYAZAWA. 1993. Spontaneous Diabetes mellitus in young cattle: histologic, immunohistochemical, and electron microscopic studies of the islets of Langerhans. *Vet. Pathol.* 30:46-54.
- VASQUEZ, R. 1974. The thyroid gland morphology of cats subjected to hunger and thirst. *Acta Anat.* 89: 70-79.
- VON MEYENBURG, H. 1940. Uber "Insulitis" bei Diabetes. *Schweiz Med. Wochenschr.* 21:554-557.
- WARTOSKY, L., S. INGBAR. 1991. Tiroides. En: Wilson, J.D., E. Braunwald, K.J. Isselbacher, R.J. Petersdorf, J.B. Martín, A.S. Fauci, R.K. Root. Harrison. Principios de Medicina Interna. 2ª ed Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, España.
- WU, P. 2000. Thyroid disease and Diabetes. San Diego. USA. (Obtenido de <http://journal.diabetes.org/FullText/ClinicalDiabetes/V18N100/Pg38.htm>. Consultado el 29.05.02).
- ZARATE, E. 2003. Diabetes Mellitus en Veterinaria. Universidad Alas Peruanas. Perú. (Obtenido de <http://visionveterinaria.com> Consultado el 10.07.03).

## 8. ANEXOS

**ANEXO 1: Peso de perros controles y experimentales (inducidos con Aloxano<sup>®</sup>) previo al sacrificio.**

<b>GRUPO</b>	<b>Nº</b>	<b>PESO ANIMAL (Kg)</b>
<b>Control</b>	<b>1</b>	16.5
	<b>2</b>	15
	<b>3</b>	23
	<b>4</b>	14.8
	<b>5</b>	11.4
<b>Exp. I</b>	<b>1</b>	10.8
	<b>2</b>	16
	<b>3</b>	21.4
<b>Exp. II</b>	<b>1</b>	14.8
	<b>2</b>	15.8
	<b>3</b>	14.4
<b>Exp. III</b>	<b>1</b>	18.2
	<b>2</b>	12
	<b>3</b>	7.2
<b>Exp. IV</b>	<b>1</b>	11.4
	<b>2</b>	7.2
	<b>3</b>	8.6
<b>Exp. V</b>	<b>1</b>	8.6
	<b>2</b>	10.2
	<b>3</b>	12.2

**ANEXO 2: Peso absoluto de tiroides izquierda, derecha y de páncreas en perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>.**

<b>GRUPO</b>	<b>Nº</b>	<b>PESO TIROIDES IZQ.(g)</b>	<b>PESO TIROIDES DER.(g)</b>	<b>PÁNCREAS (g)</b>
<b>Control</b>	<b>1</b>	0.5	0.5	20
	<b>2</b>	0.65	0.75	40
	<b>3</b>	0.72	0.78	40
	<b>4</b>	0.58	0.62	40
	<b>5</b>	0.38	0.41	60
<b>Exp. I</b>	<b>1</b>	0.38	0.38	42
	<b>2</b>	0.55	0.55	50
	<b>3</b>	0.39	0.39	50
<b>Exp. II</b>	<b>1</b>	0.63	0.67	36
	<b>2</b>	0.4	0.38	33
	<b>3</b>	0.63	0.6	45
<b>Exp. III</b>	<b>1</b>	0.86	0.81	53
	<b>2</b>	0.52	0.47	18
	<b>3</b>	0.35	0.38	18
<b>Exp. IV</b>	<b>1</b>	0.31	0.4	32
	<b>2</b>	0.21	0.26	26
	<b>3</b>	0.32	0.27	26
<b>Exp. V</b>	<b>1</b>	0.44	0.38	19
	<b>2</b>	0.24	0.21	26
	<b>3</b>	0.24	0.29	41

**ANEXO 3: Número de islotes de Langerhans por campo (10X) en páncreas de perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>**

GRUPOS	Nº	NÚMERO DE ISLOTES DE LANGERHANS POR CAMPO (10X)									
		1 <sup>a</sup> med.*	2 <sup>a</sup> med.*	3 <sup>a</sup> med.*	4 <sup>a</sup> med.*	5 <sup>a</sup> med.*	6 <sup>a</sup> med.	7 <sup>a</sup> med.*	8 <sup>a</sup> med.*	9 <sup>a</sup> med.*	10 <sup>a</sup> med.*
Control	1	9	9	9	9	9	9	8	9	8	9
	2	9	7	8	8	8	8	8	8	9	8
	3	9	9	8	8	7	7	8	8	8	9
	4	8	8	9	9	7	7	8	8	8	8
	5	9	9	8	8	8	8	8	7	9	9
Exp. I	1	8	8	9	9	9	7	8	9	8	8
	2	7	8	8	9	8	7	8	8	8	8
	3	8	9	9	8	8	8	8	7	8	9
Exp. II	1	9	7	7	7	8	7	8	8	8	7
	2	8	8	8	7	7	7	6	7	6	6
	3	7	7	7	8	8	8	7	6	6	6
Exp. III	1	5	4	3	3	5	4	4	4	5	3
	2	4	4	3	4	4	3	3	3	4	3
	3	4	4	3	3	3	3	3	4	3	3
Exp. IV	1	3	2	2	2	3	3	4	2	2	3
	2	4	3	2	2	2	3	3	3	2	2
	3	1	2	3	2	1	2	2	2	2	3
Exp. V	1	3	3	2	3	2	1	3	3	2	2
	2	1	3	3	2	3	2	3	3	2	2
	3	3	2	2	2	3	3	4	2	2	3

\* Medición

**ANEXO 4: Número de células parafoliculares por campo (40X) en tiroides de perros controles e inducidos con Alozano<sup>®</sup>**

GRUPOS	Nº	NÚMERO DE CÉLULAS PARAFOLICULARES POR CAMPO (40X)									
		1 <sup>a</sup> med.*	2 <sup>a</sup> med.*	3 <sup>a</sup> med.*	4 <sup>a</sup> med.*	5 <sup>a</sup> med.*	6 <sup>a</sup> med.	7 <sup>a</sup> med.*	8 <sup>a</sup> med.*	9 <sup>a</sup> med.*	10 <sup>a</sup> med.*
Control	1	22	9	17	16	21	13	9	8	18	8
	2	14	15	24	20	13	7	14	17	16	11
	3	11	12	20	9	39	16	10	8	18	15
	4	28	20	13	18	15	26	21	19	26	20
	5	19	18	24	12	14	21	15	11	15	21
Exp. I	1	16	28	31	15	16	12	18	17	22	18
	2	17	28	33	19	18	14	22	19	26	14
	3	19	31	22	14	16	12	15	18	16	19
Exp. II	1	20	28	32	16	13	15	21	18	15	15
	2	20	25	12	18	19	32	21	24	18	19
	3	18	25	31	16	17	24	19	31	17	18
Exp. III	1	14	18	27	18	47	37	21	23	32	43
	2	36	45	28	42	33	28	30	36	32	39
	3	51	38	24	33	40	58	36	35	44	33
Exp. IV	1	36	34	45	28	35	42	41	48	31	37
	2	38	35	38	29	34	33	32	41	36	39
	3	43	29	48	38	31	49	29	28	38	25
Exp. V	1	38	36	35	48	30	34	28	48	26	29
	2	54	46	27	35	48	36	39	37	44	32
	3	38	56	42	46	52	32	23	34	33	45

\* Medición