

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

**ESTUDIO PATOLÓGICO DEL PÁNCREAS, CÓRNEA, CRISTALINO Y
BIOQUÍMICA CLÍNICA EN CANINOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1
INDUCIDA CON ALOXANO®.**

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

**NICOLÁS ANTONIO DELGADILLO STURLA
VALDIVIA – CHILE
2005**

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Victor Cubillos G.

Firma

PROFESOR COLABORADOR

Dra. Claudia López A.

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Marcelo Gómez J.

Firma

Dr. Frédérick Ahumada

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

01 de julio de 2005

Dedicado a mi familia y a la srta. Mariana Navia.

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODO	16
5. RESULTADOS	22
6. DISCUSIÓN	47
7. CONCLUSIONES	53
8. BIBLIOGRAFÍA	55
9. ANEXOS	64
10. AGRADECIMIENTOS	72

1.- RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo durante el año 2003, en 20 caninos machos enteros de 4 a 7 años de edad. Estos animales los cuales fueron sometidos a diversos exámenes con el objetivo de evaluar los tipos y grados de lesiones anatómo e histopatológicas presentes en páncreas y ojo, así como alteraciones en variables de bioquímica sanguínea y concentración de glucosa en humor acuoso durante el desarrollo de *Diabetes Mellitus Tipo 1* (DM-1) inducida con Aloxano[®].

Los animales fueron divididos en 2 grupos, un Grupo Control (n=5) y un Grupo Experimental (n=15) al cual se le indujo DM-1 mediante la administración endovenosa de Aloxano[®]. El Grupo Experimental además, se subdividió en 5 Grupos (n=3) de acuerdo al tiempo post-inducción (p.i.) y momento de sacrificio (2 h, 24 h, 7 d, 14 d y 21 d). A cada Grupo Experimental se le asignó un perro Control. Las muestras de sangre para bioquímica sanguínea se tomaron en ambos grupos (Control y Experimental) a las 0 h. (basal) y a las 2 h, 24 h, 7 d, 14 d y 21 d p.i. con Aloxano[®]. Muestras de tejido pancreático, tejido ocular y humor acuoso se tomaron en el momento del sacrificio correspondiente para cada Grupo (Control y Experimental).

Dentro de los hallazgos histopatológicos más importantes destacan la marcada disminución en el número de islotes de Langerhans del páncreas de los Grupos Experimentales en comparación con los perros Controles, la cual fue significativa ($P < 0.05$) a partir de los 7 d p.i. con Aloxano[®]. Por otra parte, a nivel del globo ocular, el hallazgo más importante fue la marcada disminución en el grosor del epitelio corneal, el cual mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en los Grupos Experimentales III, IV y V en relación con los perros Controles. En esta estructura también se evidenciaron trastornos del crecimiento, degenerativos y necróticos, así como trastornos degenerativos a nivel del cristalino.

Los resultados de bioquímica sanguínea, estuvieron relacionados principalmente con un aumento significativo ($P < 0.05$) de glucosa y fructosamina a partir de los 7 d p.i. con Aloxano[®] (Grupo Experimental III), indicativo de hiperglicemia sostenida, condición característica de DM. Por otra parte, también se presentó un aumento en las concentraciones de glucosa en humor acuoso, el cual mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en los Grupos Experimentales III, IV y V en comparación con los perros Controles.

Estos resultados se analizan y discuten, haciendo especial énfasis sobre los efectos del Aloxano[®] en el páncreas, y la relación que existe entre DM y las alteraciones que se presentan tanto a nivel del páncreas como en el globo ocular (córnea y cristalino).

Palabras claves: Aloxano[®], perros, Diabetes Mellitus, glucosa, catarata.

“Anatomopathologic study of pancreas and genesis of ocular cataract in Alloxan[®] - induced Diabetes Mellitus Type 1 dogs”

2.- SUMMARY

The present study was carried out during 2003, in 20 male adult dogs. These animals were submitted to different exams, with the aim to evaluate the types and degrees of anatomic and histopathological lesions present in pancreas and eyes, blood biochemical altered parameters and glucose concentration in aqueous humor during the development of Alloxan[®] - induced *Diabetes Mellitus Type 1* (DM- 1)

The dogs were divided in 2 groups: Control Group (n=5), and Experimental Group (n=15). This last Group was DM-1 induced by Alloxan[®] intravenously, and was subdivided in 5 Groups (n=3), according to the post- induction (p.i.) time and moment of euthanasia (2h, 24h, 7d, 14d, 21d). For each Experimental Group one Control dog was considered. Blood samples were collected from both groups (Control and Experimental) at different times, according to the moment of euthanasia: 0 h, (baseline), 2 h, 24 h, 7 d, 14 and 21 p.i. days. Samples of pancreatic tissue, eye tissue and aqueous humor were also taken.

The most important histopathologic finding in pancreas tissue was the decrease in the number of Langerhans islets in Experimental Groups ($P<0.05$), compared with the Control ones. On the other hand, in the eyeball tissue, the most important finding was the decrease of the corneal epithelium thickness, which showed significant differences ($P<0.05$) in the Experimental Groups III, IV and V, compared to Controls dogs. The epithelium corneal also showed growth, degenerative and necrotic disorders, as well as degenerative disorders in the lens.

The results of biochemical test, allow to demonstrate a significant increase ($P<0.05$) of blood glucose and fructosamine since 7 p.i. days with Alloxan[®] (Experimental Group III). Results indicate the presence of hyperglycemia through time, a characteristic condition of this disease. Results also showed an increase of aqueous humor glucose concentration over time ($P<0.05$) in Experimental Groups III, IV and V, compared to the Controls dogs.

These results are analyzed and discussed. Special emphasis is made on the effects of the Alloxan[®] in the pancreas, and the relation that exists between DM and the alterations that appear on pancreas as well as on the eyeball (cornea and lens).

Key words: Alloxan[®], dogs, Diabetes Mellitus, Glucose, Cataract.

3. INTRODUCCION

3.1.- Generalidades.

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad que fue reconocida en seres humanos hace miles de años, sin embargo a lo largo de la historia ha sido olvidada y redescubierta en más de una ocasión (Figuerola, 1997). El término *Diabetes* proviene del griego *diabeinen*, que quiere decir “pasar a través”, y *Mellitus* de la raíz griega que significa “miel”. Este concepto en general se entiende como la eliminación de grandes cantidades de orina dulce, ya que la orina de los pacientes afectados por esta enfermedad presentan un olor dulce, “tipo miel” debido a que una de las características más importantes de este cuadro es la presencia de glucosa en la orina que le imprime dicho olor (Figuerola y col., 1997; Jones y col., 1997).

3.1.1.- Definición.

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que afecta el páncreas endocrino y que se caracteriza por una deficiencia absoluta o relativa de insulina (Fleeman y Rand, 2000), cuyo resultado es una intolerancia a los carbohidratos, comprometiendo también al metabolismo de las proteínas y lípidos (Schaer, 1999). Crawford y Cotran (1995) y Jones y col. (1997) definen este cuadro como un síndrome complejo, en el cual el fenómeno más característico es una falla en el metabolismo de la glucosa debido a una deficiencia absoluta o relativa de insulina. Algunos estudios indican que en Medicina Veterinaria esta enfermedad es de presentación común tanto en perros como en gatos (Salgado y col., 2000; Guptill, 2003), siendo de características muy similares a la enfermedad en humanos (Simón, 1997; Fleeman y Rand, 2000)

3.1.2.- Aspectos epidemiológicos.

La DM es una enfermedad de distribución universal. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003), 177 millones de personas sufren de esta condición en el mundo, de las cuales 4 millones mueren cada año debido a complicaciones secundarias. Los países con mayor porcentaje de personas con DM son: India, China, USA, Indonesia, Rusia, Japón, Pakistán, Brasil e Italia. El número de personas que padecen diabetes en América el año 2000 era de 35 millones, de los cuales 19 millones (54,0%) vivían en América Latina y el Caribe. Las proyecciones indican que para el año 2025 esta cifra ascenderá a 64 millones, de los cuales 40 millones (62,0%) corresponderán a América Latina y el Caribe (OPS, 2001).

En Chile, según en Ministerio de Salud (2004), el porcentaje de personas afectadas es de aproximadamente un 6,5% de la población total. Dentro de las personas mayores de 65 años, esta cifra podría ascender al 15,0%. Hoy en día, la mayor parte de la información disponible en relación con la DM en el hombre, proviene de estudios experimentales realizados en animales (Fleitas y col., 2000; Gale, 2001).

En caninos, la incidencia de DM varía entre 1:100 y 1:500 y entre 1:100 a 1:800 (Hoeing, 1995; Davidson, 2000).

Algunos estudios relacionados con la distribución por edad de la DM revelan que los perros más afectados tienen entre 4 y 14 años de edad, con una incidencia máxima entre 7 y 9 años (Marmor y col., 1982; Feldman y Nelson, 2000; Fleeman y Rand, 2000). En los gatos, Kraus y col. (1997) señalan que el rango de edad de presentación de DM fluctúa entre 7,5 y 15 años. En cuanto a la relación existente entre DM y sexo, existen diferentes estudios; en algunos, se hace mención a la ausencia de diferencias entre machos y hembras (Feldman y Nelson, 2000), sin embargo, Plotnick y Greco (1995) y Guptill (2003) señalan que las hembras podrían ser hasta dos veces más susceptibles que los machos, por otra parte, Davidson (2000) afirma que los machos castrados tienen una presentación 1,5 veces superior de DM que los enteros.

En cuanto a la predisposición por raza, diferentes estudios señalan que existen diversas razas con un alto riesgo de padecer DM, entre las cuales las más importantes son: Terrier australiano, Husky siberiano, Schnauzer mediano, Labradores retriever, Alaskan malamute, Pinscher miniatura, entre otras (Marmor y col., 1982; Hess y col., 2000; Guptill, 2003). También se ha observado que existe una mayor presentación de DM Tipo 1 en razas de tamaño pequeño como Dachshund y Caniche (Nelson, 1997). Con respecto a los gatos, según Panciera y col. (1990), la raza, a diferencia del peso y de la edad, no parece ser un factor de riesgo importante.

La mayor cantidad de estudios sobre esta enfermedad, han sido realizados en modelos animales, como roedores y caninos. La droga más utilizada ha sido el Alozano[®], la cual fue descubierta por Wholer y Justin en el año 1828 como un derivado del ácido úrico y utilizada por primera vez en el año 1942 por Shaw Dunn y McLetchie, para inducir DM Tipo 1 en animales de laboratorio (McLetchie, 2002). Actualmente, esta droga se utiliza para tratar tumores de las células β de los islotes de Langerhans o insulinomas.

3.2.- Clasificación de etiología.

En Medicina Veterinaria, la clasificación de la DM sigue los patrones utilizados en Medicina Humana, existiendo los Tipos 1 y 2. La **DM Tipo 1** se caracteriza por la destrucción o pérdida de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, con una insuficiencia progresiva y total de insulina que conduce a que los pacientes que tienen esta enfermedad sean dependientes del aporte de insulina exógena (DM insulino dependiente). También puede presentarse ocasionalmente resistencia insulínica (Schaer, 1999; Feldman y Nelson, 2000). La **DM Tipo 2** se caracteriza por resistencia a la insulina a nivel de receptores y post-receptores o por células β disfuncionales, por lo cual estos pacientes pueden o no ser dependientes de insulina, de acuerdo al grado de estas alteraciones (Leahy, 1990; Simón, 1997). Existe otro tipo, es la denominada **Diabetes Gestacional**, la cual se caracteriza por intolerancia a la

glucosa durante la gestación o durante el estado de diestro debido a resistencia a la insulina, inducida por factores hormonales (Unger y Foster, 1992; Schaer, 1999).

Los principales factores relacionados con la etiología de la **DM Tipo 1** son: genéticos, inmunológicos, ambientales e inflamatorios (Jones y col., 1997). La etiología de la **DM Tipo 2** guarda relación principalmente con el exceso de peso (obesidad), y la administración prolongada de antagonistas de la insulina (hormona del crecimiento, glucocorticoides y adrenalina) (Leahy, 1990). En gatos, la etiología principal de la DM Tipo 1 y especialmente la de Tipo 2, se debe al depósito de una sustancia amiloide (amilina) a nivel de las células β de los islotes de Langerhans (Khan y col., 1999; O'brien, 2002). La acumulación progresiva de esta sustancia origina alteraciones en la secreción de insulina y resistencia a esta hormona por parte de los tejidos (Johnson, 1986; Hoenig, 2000; O'brien 2002).

3.3.- Patogénesis de la Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMID).

3.3.1.- Aspectos generales.

Como se ha mencionado, la causa más importante en la génesis de la DM Tipo 1 es una disminución progresiva en la secreción de insulina por parte de las células β , lo cual lleva a una dependencia absoluta de esta hormona (Feldman y Nelson, 2000; Fleeman y Rand, 2000).

3.3.2.- Insulina.

La insulina es la hormona reguladora más importante del metabolismo orgánico, principalmente a nivel de carbohidratos, lípidos y proteínas (Kahn y col, 2000; Vander y col., 2001, Pirola y col., 2004). Esta hormona está constituida por una proteína de alto peso molecular, formada por dos cadenas de aminoácidos unidas por un puente bisulfuro (Steiner y Middleton, 1991). La insulina es secretada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas endocrino, desde donde es liberada al torrente sanguíneo y posee una vida media en el plasma entre 4 a 6 minutos, de tal modo que la mayor parte desaparece de la circulación entre 10 a 15 minutos (Guyton y Hall, 2002). Alrededor del 50% del excedente de insulina se degrada a nivel hepático mediante la acción de la enzima insulinasa, y la cantidad restante, principalmente en los riñones y músculos, entre otros (Sato y col., 1991). Dentro de las funciones de la insulina destacan principalmente: 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, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y división y diferenciación celular. Sin embargo, la principal función metabólica de esta hormona es el incremento del transporte de glucosa al interior de las células del organismo (Vander y col., 2001; Guyton y Hall, 2002).

La acción de la insulina permite el ingreso de glucosa a la mayoría de las células, con excepción de los glóbulos rojos, cerebro (excepto parte del hipotálamo), hígado, riñón, túbulos renales, mucosa intestinal, células β del páncreas y epitelio germinal de gónadas (Chastain y Ganjman, 1990).

3.3.3.- Mecanismo de acción de la insulina.

La insulina actúa ligándose a un receptor de membrana (proteína receptora) (Pirola y col., 2004), que consiste en cuatro subunidades que se mantienen unidas a través de un enlace bisulfuro: dos subunidades alfa situadas en su totalidad en la porción externa de la membrana y dos subunidades beta que atraviesan la membrana hacia el citoplasma celular. La insulina se liga a las subunidades α , originando una autofosforilación de las subunidades β al interior del citoplasma, transformándolas en enzimas activas (proteínquinasa local) (Haruta y col., 1995; Guyton y Hall, 2002), lo cual trae como resultado la fosforilación y desfosforilación de una gran cantidad de enzimas citosólicas (Pirola y col., 2004). De este modo, la insulina controla la mayor parte de la maquinaria celular y da origen a las siguientes reacciones: 1) aumento de la permeabilidad a la glucosa en la mayoría de las células, especialmente células musculares y grasas, 2) aumento en la permeabilidad de aminoácidos, iones de potasio y fosfato y 3) reacciones metabólicas como resultado de variaciones en la traducción de ARN mensajero y transcripción del ADN en el núcleo celular (Cunningham 2003).

3.3.4.- Control en la secreción de insulina.

El factor más importante en el control de la secreción de insulina es la concentración de glucosa plasmática. Si ésta aumenta alrededor de un 10% sobre su valor normal, como ocurre generalmente después de la ingestión de alimentos, origina una respuesta muy eficiente sobre la secreción de insulina (tanto en rapidez como en cantidad) (Stander y Middleton, 1991). Por otra parte, la disminución de las concentraciones de glucosa a las presentes durante el ayuno origina, dentro de los 3 a 5 minutos siguientes, la interrupción en la secreción de esta hormona (Vander y col., 2001; Guyton y Hall, 2002). Otro mecanismo responsable del control de la insulina está a cargo de la somatostatina, hormona secretada por las células delta de los islotes de Langerhans (Cunningham, 2003).

3.3.5- Factores secundarios asociados al incremento de la glicemia.

El factor más importante en el incremento de las concentraciones plasmáticas de glucosa en la DM Tipo 1, se debe a una falta absoluta o relativa de insulina (Martín y Capen, 1979; Cunningham, 2003), sin embargo, se ha demostrado que el aumento absoluto o relativo del glucagón, constituye un factor responsable del incremento de las concentraciones de glucosa y de algunas complicaciones crónicas de la DM Tipo 1 (Fleeman y Rand, 2000). El glucagón es secretado por las células alfa de los islotes de Langerhans y en menor medida por el intestino (glucagón intestinal) (Cunningham, 2003). Su rol más importante es aumentar las concentraciones de glucosa en la sangre mediante la degradación de glucógeno hepático (glucogenólisis). La síntesis de glucagón es estimulada principalmente por una disminución de la glicemia y en menor medida, por un aumento en la concentración de aminoácidos en la sangre, principalmente alanina. Durante el desarrollo de DM, el catabolismo proteico aumenta y por ende la concentración de aminoácidos en la sangre, estimulando así la secreción de glucagón. Como consecuencia, se produce la glucogenólisis en el hígado, aún en presencia de elevadas concentraciones de glucosa plasmática, lo cual origina una severa hiperglicemia (Fraser, 2001).

Como se ha señalado, el catabolismo proteico induce a un aumento en las concentraciones de aminoácidos en la sangre, algunos de los cuales son empleados por el hígado para procesos de gluconeogénesis. Al igual que el glucagón, la hormona del crecimiento, la adrenalina y el cortisol estimulan la gluconeogénesis y glucogenólisis, lo cual aumenta en presencia de bajos niveles de insulina. Estos cambios metabólicos contribuyen a la hiperglicemia observada en la DM Tipo 1 (Plotnick y Greco, 1995, Cunninham, 2003).

3.4.- Aspectos clínicos.

La concentración plasmática normal de glucosa en los perros es de alrededor de 90 mg/dl. (5 mmol/l). Se considera hiperglicemia leve valores que oscilan entre 130 y 180 mg/dl (7.3 y 10 mmol/l). Sin embargo, cuando los niveles plasmáticos de glucosa sobrepasan los 180 a 220 mg/dl (10 y 12.3 mmol/l), se excede la capacidad de las células de los túbulos renales para reabsorberla, generando glucosuria. Si la eliminación de orina es excesiva, se produce diuresis osmótica y poliuria, lo que conlleva a una marcada pérdida de agua y electrolitos (Na, K, Mg, P) (Crawford y Cotran, 1995). La pérdida excesiva de líquido en la orina origina deshidratación extracelular, lo que conduce a deshidratación intracelular compensatoria por efecto de la hiperosmolaridad derivada de hiperglicemia (Guyton y Hall, 2002). La pérdida de agua estimula los osmorreceptores del centro de la sed en el cerebro, lo que se traduce en polidipsia compensatoria (Crawford y Cotran, 1995; Nelson 1997). Por otra parte, el ingreso de glucosa al centro de la saciedad (ubicado en el hipotálamo) está regulado por la insulina. En pacientes con deficiencia de insulina, la cantidad de glucosa que ingresa a las células de dicho centro es baja, lo cual se traduce en una sensación de hambre incrementada, originándose un aumento patológico en el consumo de alimentos (polifagia), aún en concentraciones incrementadas de glucosa sanguínea (Ganong, 1991). En consecuencia, se presentan los cuatro signos clásicos de la DM: ***poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso*** (Nelson 1997).

3.4.1.- Cetoacidosis diabética.

Diferentes estudios establecen que un déficit de insulina, sumado a la resistencia a esta hormona durante un estado de hiperglicemia prolongada, disminuyen el transporte de glucosa y la síntesis de triglicéridos a partir de ésta, al interior de los adipocitos (Baron y col., 1995). Por otra parte, Baron y col. (1995) establecen que el déficit de insulina origina un incremento en la degradación de triglicéridos a ácidos grasos, esto debido fundamentalmente a 2 procesos: aumento en la actividad de la lipasa sensible a hormona (LSH), la cual es una enzima lipolítica que normalmente es inhibida por las insulina y por aumento de la actividad de compuestos que estimulan a la LSH, principalmente adrenalina, cortisol y hormona del crecimiento (Feldman y Nelson, 2000; Guyton y Hall, 2002). Clínicamente, la disminución en la síntesis de triglicéridos y el incremento en su degradación conducen a una pérdida de peso en los pacientes afectados con DM Tipo 1 (Plotnick y Greco, 1995).

Cuando la liberación de ácidos grasos libres es excesiva, su tasa de captación por el hígado incrementa. En dicho órgano, los ácidos grasos pueden almacenarse nuevamente como triglicéridos, degradarse a H₂O y CO₂ o convertirse en cuerpos cetónicos (principalmente

acetoacetato) (Feldman y Nelson, 2000). Como se ha mencionado, los pacientes con DM Tipo 1 presentan un aumento en la síntesis de glucagón, el cual promueve la transformación de ácidos grasos a cuerpos cetónicos. La alta producción de estos conlleva a una cetosis y posteriormente, debido a la carga positiva que poseen, a una severa acidosis, condición denominada **cetoacidosis diabética**, la cual es frecuente en pacientes que padecen DM Tipo 1 no tratada (Ganong, 1998; Kerl, 2001). Bajo estas condiciones, una gran cantidad de cuerpos cetónicos son excretados por el riñón, y estos, sumados a las altas concentraciones de glucosa a nivel tubular, aumentan la diuresis osmótica, lo cual conlleva a una severa pérdida de electrolitos y agua, disminuyendo drásticamente el volumen plasmático, la presión arterial y la irrigación cerebral. Las alteraciones clínicas que se observan en los pacientes se deben principalmente a la acidosis y la severa diuresis osmótica producida. Los signos más importantes incluyen, deshidratación, anorexia y letargia, así como también, poliuria y pérdida de peso. (Plotnick y Graco, 1995; Kerl, 2001, Vander y col., 2001).

En el perro, además de los aspectos clínicos señalados, también pueden observarse cataratas bilaterales e infecciones recurrentes de las vías urinarias, sistema respiratorio y piel (Nelson, 1997; Fraser, 2001)

3.5.- Patología de la Diabetes Mellitus Tipo 1.

Según Crawford y Cotran (1995) y Jones y col. (1997), a nivel de los islotes de Langerhans las lesiones más significativas se relacionan con: reducción del número y tamaño de los islotes, necrosis de las células β , fibrosis de los islotes y amiloidosis insular, producto de la acumulación de una subestructura fibrilar (amiloide). Esta última alteración es común en gatos.

Lesiones en otros órganos incluyen: **1) afecciones microvasculares**, relacionadas con una cicatrización proliferativa de la retina (retinopatía diabética) y alteraciones renales (nefropatía diabética) (Hanssen, 1997); **2) afecciones macrovasculares**, relacionadas con aumento de lipoproteínas de baja densidad y la presencia de aterosclerosis, responsable de enfermedades cerebrovasculares e infarto al miocardio (Guyton y Hall, 2002) y **3) afecciones neurológicas**, relacionada con alteraciones motoras periféricas y disfunción simpática (Shaw y Boulton, 1997). Las afecciones macrovasculares y neurológicas pueden dar origen a ulceraciones crónicas y gangrena, especialmente en la parte distal de las extremidades (Ganong 1998, Fraser 2001). Estas lesiones han sido observadas tanto en perros como en gatos, sin embargo, según Munana (1995) y Fraser (2001) son de escasa presentación en pequeños animales.

En relación con los trastornos oculares en perros que padecen DM Tipo 1, a diferencia del ser humano donde la retina es la más afectada, las afecciones oculares en pacientes caninos se manifiestan principalmente a nivel del cristalino (Stades y col., 1999).

3.6.- Cristalino.

3.6.1.- Anatomía.

El cristalino o lente (Figura 2) se encuentra dentro del globo ocular y posee un diámetro de 9-12 mm y un espesor de 6-8 mm (caninos y felino) (Stades y col., 1999). Esta estructura se caracteriza por ser biconvexa, avascular, transparente y con la superficie posterior menos curva que la anterior. Los centros de las superficies se denominan polo anterior y polo posterior. El cristalino se ubica entre el iris y el humor vítreo y se encuentra suspendido por las fibras de la zónula. Su ubicación en el interior del globo ocular, está dada por las fibras de la zónula, las cuales se extienden desde el ecuador del cristalino hasta el cuerpo ciliar y por su vecindad con el humor vítreo, el cual se encuentra en la región posterior (Pfeifer y col., 1998; Stades y col., 1999).

3.6.2.- Histología, bioquímica y función.

Desde el punto de vista histológico, el cristalino esta constituido por 3 partes: **cápsula del cristalino**: estructura elástica formada por delgadas láminas de fibras colágenas, posee revestimiento hialino acelular y su estructura es más gruesa en su parte anterior que en la posterior (Basha y Basha, 2001; Junqueira, 2002); el **epitelio del cristalino** (epitelio subcapsular), formado por una capa única de células cuboides que se extienden desde el polo anterior hasta el ecuador del cristalino (superior e inferior) (Slatter, 1991; Barnett y Crispin, 2000; Junqueira, 2002). Las células epiteliales presentes en los ecuadores se elongan hacia el interior y forman las **fibras del cristalino (fibras lenticulares)**: estas están constituidas por células altamente diferenciadas denominadas células lenticulares, las cuales pierden su núcleo a medida que avanzan hacia el interior del cristalino. Cabe señalar que estas células, sufren mitosis durante toda la vida del animal y a medida que se van formando nuevas células, las más antiguas son desplazadas hacia el interior del cristalino, conduciendo finalmente al cuadro conocido como *esclerosis nuclear* (Slatter, 1991; Junqueira 2002).

En los perros, las fibras lenticulares se unen a nivel de los polos y forman una Y en el polo anterior y una Y invertida en el posterior; dichas uniones se conocen como suturas (Riss, 1994; Narfström y col., 1998). Bioquímicamente el cristalino esta compuesto aproximadamente por un 65% de proteínas, 35% de agua y una fracción pequeña de minerales, carbohidratos y lípidos. Su función principal es converger o enfocar la luz, de tal modo, que se pueda formar una imagen clara sobre la retina (Slatter, 1991; Stades y col., 1999).

En una fase temprana del desarrollo ocular, el cristalino es aislado de sus vasos sanguíneos, pasando a depender del humor acuoso y del cuerpo vítreo para su nutrición y eliminación de productos metabólicos de desecho (Riis, 1994; Stades y col., 1999).

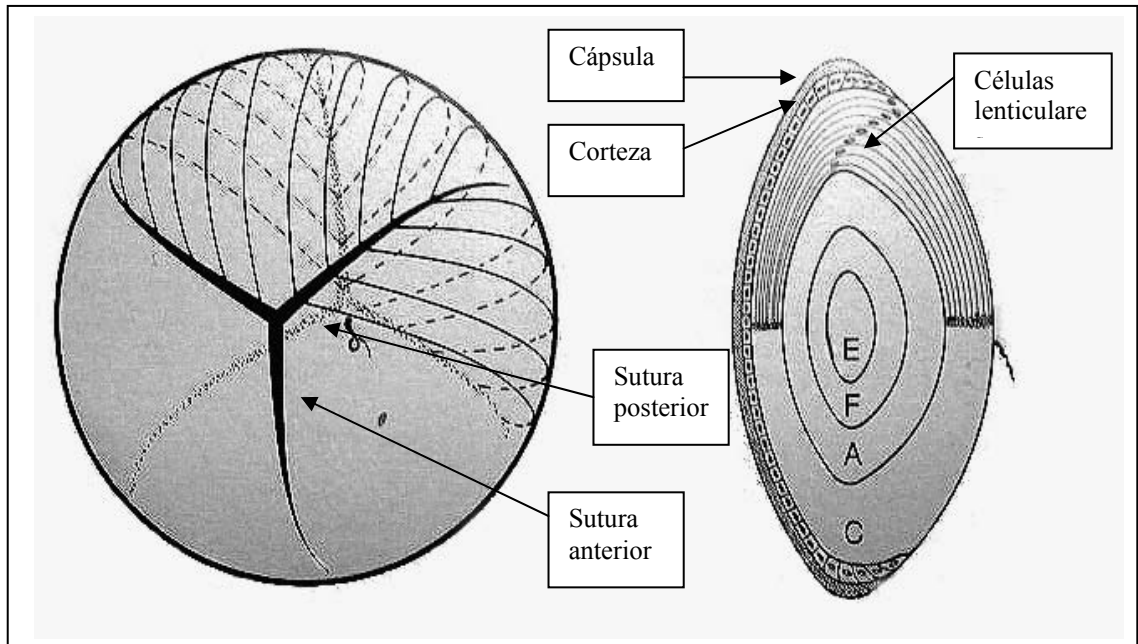


Figura 1: Sección y patrón de fibras de un cristalino adulto. (Núcleos: E embrionario; F. fetal; A. adulto. C. corteza) (Stades y col., 1999).

3.7.- Catarata.

3.7.1.- Definición y epidemiología.

Una de las manifestaciones oculares más comunes en perros que padecen DM no controlada es la catarata (Salgado y col., 2000). En términos generales la catarata se refiere a la opacidad o pérdida de la transparencia del cristalino (Wyman, 1979). Según Jones y col. (1997), catarata se define como “una opacidad del cristalino debido a una destrucción de la estructura laminar de sus fibras, o bien debido a cambios fisiológicos en la composición proteínica de su estructura íntima”. Por otra parte, Stades y col. (1999) la define como “todo emblanquecimiento o turbidez no fisiológica de las fibras lenticulares y/o de la cápsula”. Plotnick y Greco (1995) señalan que cerca del 40% de los perros diabéticos la presentan. Por otra parte, estudios realizados por Bascher y Roberts (1995), indican que la incidencia de esta enfermedad puede llegar a un 68%.

3.7.2.- Clasificación de las cataratas.

En relación con la clasificación de las cataratas, Slatter (1991) señala que esta puede realizarse según su estadio de desarrollo, posición en el cristalino, momento del desarrollo, apariencia, consistencia y/o etiología. Del punto de vista práctico, el momento del desarrollo y la ubicación de la catarata al interior del cristalino son los aspectos más importantes a evaluar.

3.7.2.1.- Clasificación según estadio del desarrollo.

- **Incipiente:** corresponde a una opacidad focal del cristalino, su cápsula o de ambas estructuras, no existiendo alteración a nivel visual.
- **Inmadura:** marcada opacidad del cristalino con aumento de volumen. Al examen de fondo de ojo, el cristalino está parcialmente oscurecido. Si el problema es bilateral, cursa con dificultad visual (Figura 2).
- **Madura:** cristalino totalmente opaco. No es posible realizar el examen de fondo de ojo. La visión está notoriamente deteriorada, e incluso puede haber ceguera si el problema es bilateral (Figura 3).
- **Intumescete:** el cristalino presenta aumento de volumen. No todas las cataratas pasan a este estadio, sin embargo, cuando se produce, el ojo es susceptible a glaucoma secundario.
- **Hipermadura:** en esta etapa el cristalino comienza a licuarse y en ocasiones, la visión puede retornar, cuadro denominado “**resorsión lenticular**”.

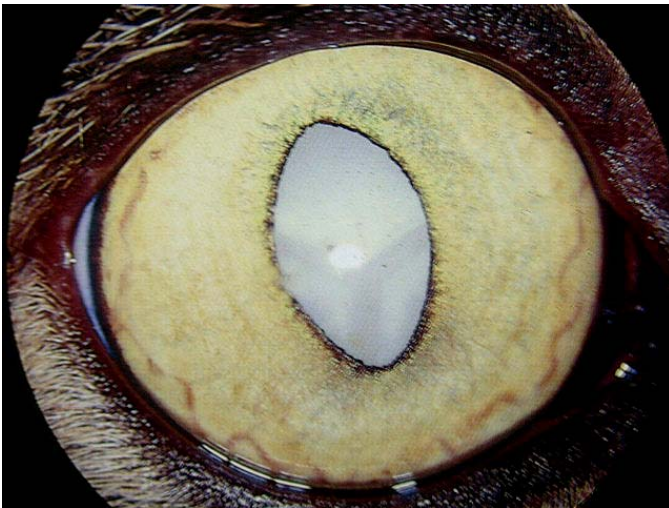


Figura 2. Catarata madura en un gato (Stades y col., 1999)

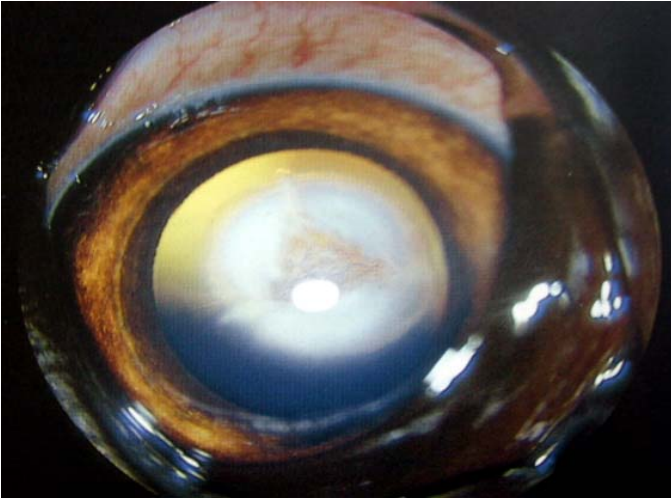


Figura 3. Catarata inmadura de un canino (Stades y col., 1999)

3.7.2.2- Clasificación según momento del desarrollo.

- **Congénita:** presente al nacimiento.
- **Del desarrollo:** ocurre en cualquier momento de la vida del paciente, antes de alcanzar el estado adulto (con anterioridad a los 2 años).
- **Adulto:** término impreciso, referido a cataratas presentes en perros menores de 6 años.
- **Senil:** se presenta en animales viejos y está precedida por esclerosis nuclear, término referido a un deterioro fisiológico de las fibras del cristalino, a medida que transcurre la edad, lo que origina una opacidad visible y progresiva, la cual se considera normal en perros mayores de 6 años.
- **Adquirida:** cualquier tipo de catarata no congénita.

3.7.2.3.- Clasificación según la posición del cristalino

La catarata puede ubicarse en cualquier zona del cristalino, vale decir: cápsula anterior o posterior, corteza anterior o posterior (figura 4), ecuador y/o núcleo.

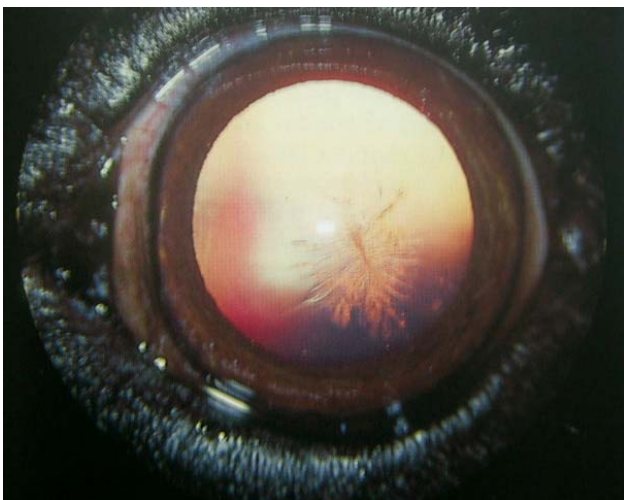


Figura 4.

Catarata cortical en un Cocker Spaniel de 3 años (Stades y col., 1999)

3.7.2.4.- Clasificación según etiología.

Entre las causas más importantes en la génesis de las cataratas se encuentran: hereditarias, inflamatorias, metabólicas, traumáticas, nutricionales, tóxicas, secundarias y congénitas.

3.7.3.- Patogenia de la catarata de origen diabético.

Como se mencionó con anterioridad, la nutrición del cristalino depende principalmente del humor vítreo y humor acuoso. A través de este, la glucosa ingresa al cristalino mediante transporte facilitado. En condiciones normales, la glucosa se convierte en ácido láctico por medio de la vía glicolítica anaeróbica. En condiciones de hiperglicemia (Figura 5), las enzimas glicolíticas se saturan, por lo tanto la glucosa se metaboliza mediante la vía de la aldosa reductasa y el sorbitol hacia fructosa y sorbitol (Wyman, 1979; Slatter, 1991). Estos compuestos no pueden ser excretados mediante transporte facilitado hacia el humor vítreo, lo que produce un aumento de su concentración en el cristalino. De esta forma, la fructosa y el sorbitol actúan como compuestos hidrofílicos generando un flujo anormal de agua hacia el cristalino, lo que se traduce en una tumefacción y ruptura de las fibras lenticulares (Slatter, 1991; Stades y col., 1999). Por otra parte, el sorbitol altera la configuración de la enzima proteica alfa cristalina, con lo cual se detiene la síntesis de proteínas y aminonácidos (Pffeifer y col., 1998). La alta concentración de agua, el bajo nivel de proteínas y la destrucción de las fibras lenticulares, se traduce en una disminución de la transparencia del cristalino y en la presencia de la catarata (Wyman, 1979; Riss, 1994).

La formación de las cataratas es un proceso irreversible y su evolución puede demandar poco tiempo (Nelson, 1997). Dentro del diagnóstico, es importante determinar la causa de la catarata, descartando alteraciones metabólicas mediante el examen físico y clinicopatológico. Asimismo, se debe realizar un diagnóstico diferencial a fin de descartar esclerosis lenticular asociada con la edad, así como otras causas de opacidad ocular media como edema cerebral, tumores intraoculares, desprendimiento de la retina y otras (English, 1999).

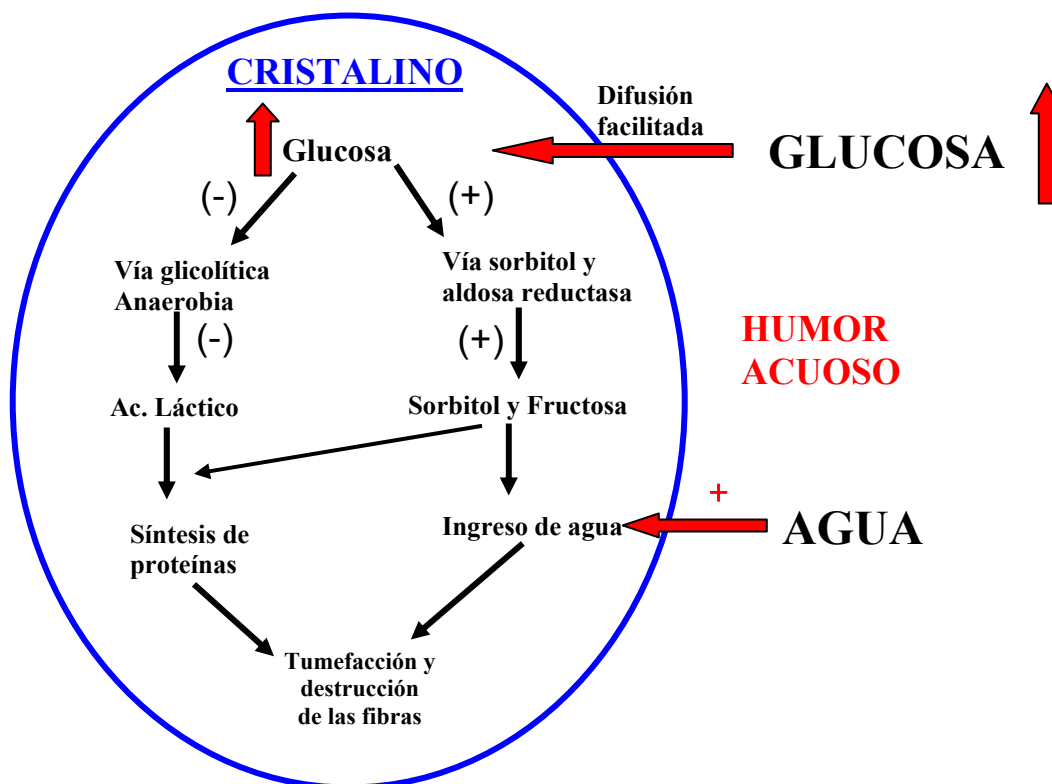


FIGURA 5. Patogenia de la catarata diabética.

Con los antecedentes señalados, se puede concluir que existen muchos estudios que han aportado información acerca de diversos aspectos relacionados con la Diabetes Mellitus. Estos estudios abarcan desde su descubrimiento hasta las alteraciones patológicas que se producen en los individuos afectados. El presente trabajo contribuirá al conocimiento sobre esta enfermedad, enfocándose en las alteraciones pancreáticas, las manifestaciones oculares y la relación que existe entre las concentraciones de glucosa en humor acuoso y la génesis de catarata.

3.8.- Hipótesis

"Existe relación a través del tiempo, entre la severidad de las lesiones anatomopatológicas presentes en páncreas y el desarrollo de cataratas a nivel del globo ocular en perros con DM inducida experimentalmente con Alozano[®]."

3.9.- Objetivos

3.9.1.- Objetivo general.

- Establecer la relación entre la severidad de las lesiones anatomopatológicas y el desarrollo de cataratas a nivel del globo ocular a través del tiempo en perros con DM Tipo 1 inducida experimentalmente con Aloxano®.

3. 9.2.- Objetivos Específicos.

- Evaluar y comparar a través del tiempo, el daño anatómico e histológico del páncreas y ojo en perros con DM Tipo 1 inducida con Aloxano® en comparación con perros clínicamente sanos.
- Relacionar el daño anatómico e histológico del páncreas y ojo, con valores de bioquímica clínica (glicemia, fructosamina sérica y glucosa en humor acuoso) en perros con DM Tipo I inducida con Aloxano®.
- Determinar el grado de afección del cristalino en relación con el tiempo y con la concentración de glucosa y fructosamina plasmática en perros con DM Tipo 1 inducida con Aloxano®.

4. MATERIAL y MÉTODO

4.1.- Material

Se utilizaron 20 caninos machos, mestizos, de 4 a 7 años de edad, con condición corporal 3, de acuerdo a la escala de Hill's Pet Nutrition (Hand y col., 2000). 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.- Inducción de Diabetes Mellitus (DM).

Para la inducción de la DM Tipo 1 se empleó Alozano[®] A-7413 (5,6 Dioxipuracil Monohidratado) (Laboratorio SIGMA, USA), en dosis única e.v. de 75 mg/kg. diluidos en buffer citrato al 5% (Zhao y col., 1999).

4.2.- Método.

Los perros de la presente investigación fueron divididos en 2 grandes grupos: un Grupo Control constituido por perros clínicamente sanos (n=5) y un Grupo Experimental (n=15), al cual se le indujo DM Tipo 1 mediante la administración endovenosa de Alozano[®].

4.2.1.- Etapa pre-experimental.

Como parte del estudio, se llevó a cabo una etapa 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 realizó examen clínico general y topográfico, a fin de evaluar la condición de salud.

Con el propósito de descartar diabetes en los animales en estudio, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa. Con posterioridad a la evaluación sanitaria, los perros fueron desparasitados para lograr un óptimo estado sanitario.

4.2.2. Etapa experimental.

Una vez establecida la condición óptima de salud, en ambos Grupos se tomaron muestras de sangre previo a la inducción de Diabetes (0 horas), de acuerdo a lo establecido en la Figuras 1 y 2. Los perros de ambos Grupos (Control y Experimental), fueron sacrificados a distintos tiempos (2 h, 24 h, 7 d, 14 d y 21 d).

El Grupo Experimental (Exp.) se subdividió en 5 subgrupos de 3 animales cada uno, clasificándose como Grupo Experimental I, II, III, IV y V, de acuerdo al momento de sacrificio posterior a la inducción con Alozano[®] (p.i). El Grupo Experimental I correspondió a

las 2 h p.i., el II a las 24 h p.i., el III a los 7 días p.i., el IV a los 14 días p.i. y finalmente, el Grupo Experimental V a los 21 días p.i. (Figura 2). La inducción de Diabetes se realizó mediante la administración endovenosa del fármaco Alozano[®], en dosis única de 75 mg/kg. En relación con el Grupo Experimental, el análisis de las variaciones de bioquímica sanguínea se realizó considerando los valores basales previo a la inducción con Alozano[®]. Por otra parte, el análisis de glucosa en humor acuoso y las alteraciones anatomopatológicas del páncreas y ojo se realizaron considerando el valor obtenido de los Grupos Control.

Durante el desarrollo de esta investigación los perros fueron mantenidos en caniles individuales en las dependencias de la Clínica de Pequeños Animales, Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, UACH, lo que permitió una evaluación rutinaria. El manejo nutricional se realizó calculando un aporte calórico de 60-70 Kcal/kg/día (Remillard, 1999) y utilizando alimento comercial Champ[®] para cada animal, el cual fue suministrado dos veces por día junto con agua *ad libitum*.

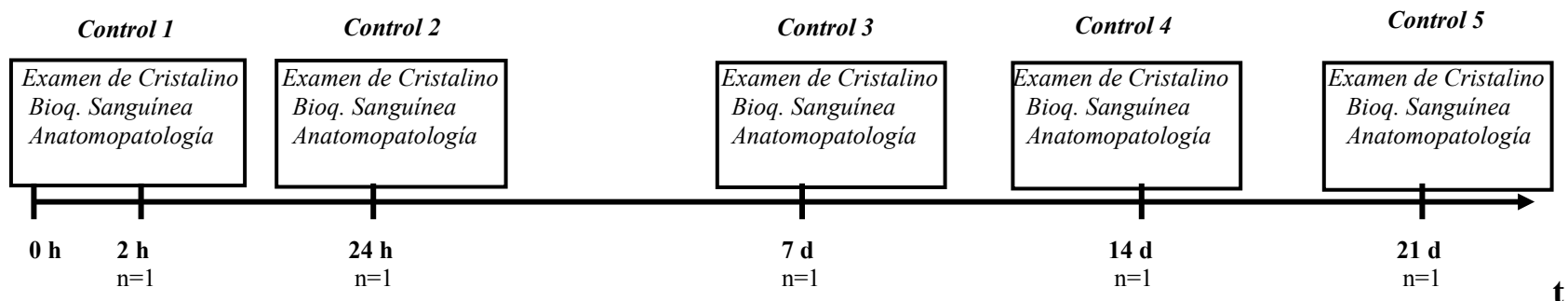


FIGURA 1: Eutanasia Grupo Control y exámenes realizados.

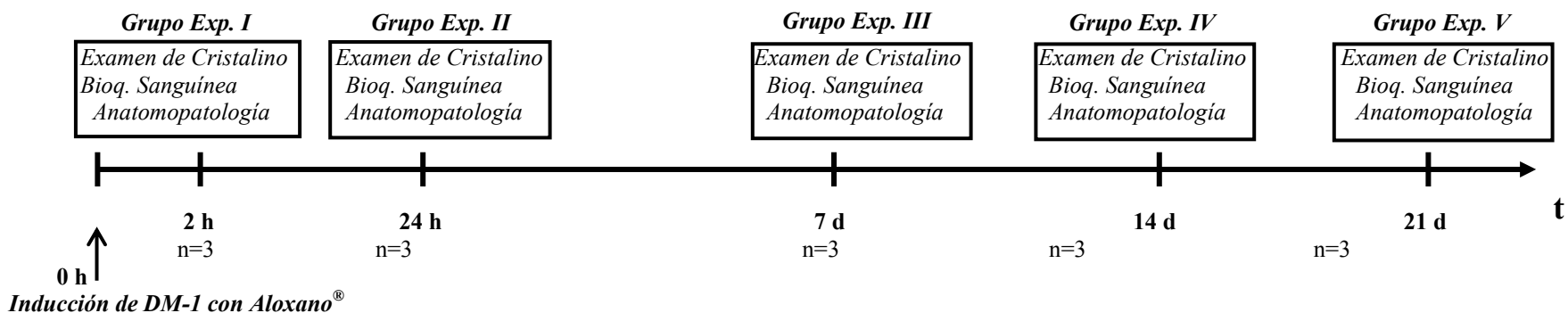


FIGURA 2 Eutanasia Grupo Experimental de acuerdo al tiempo post-inducción de DM-1 con Aloxano® y exámenes realizados.

Para poder realizar la eutanasia se utilizó Tiopental Sódico® (Lab. Chile) en dosis única de 50 mg/kg (Zhao y col., 1999), seguido de sulfato de magnesio en solución sobresaturada, vía endovenosa. Con el fin de evitar cualquier cambio post-mortem, la necropsia se realizó inmediatamente después de la eutanasia, obteniéndose muestras de páncreas y globo ocular.

En la Tabla 1, se presentan los diferentes tipos de exámenes a efectuados en perros Controles e inducidos con Alozano®. Además, en dicha tabla, se especifica la muestra utilizada y la forma en que se evaluó cada uno de los exámenes.

TABLA 1 Exámenes a efectuar en perros controles e inducidos con Alozano®

EXÁMENES	TIPO DE EXÁMEN	MUESTRA	ASPECTOS A EVALUAR
CLÍNICO	Presión ocular	Ojos	Incremento p.o. Presencia de cataratas
ANATOMO - PATOLÓGICO	Macroscópico	Ojos	Presencia de cataratas
		Páncreas	Peso Volumen Consistencia Color
LABORATORIO CLÍNICO	Bioquímica clínica	Cristalino Córnea Páncreas	Trastornos*: Degenerativos Del crecimiento Otros
		Plasma	Glucosa Fructosamina Albúmina
		Humor acuoso	Glucosa

*1: Leve
2: Moderado
3: Severo

** 1: Focal
2: Difusa leve
3: Difusa severa
4: Completa y densa.

4.2.3.- Estudio clínico.

El estudio clínico consideró la medición de la presión intraocular utilizando un tonómetro de Schiotz (Riester®, Alemania), para lo cual se procedió a instilar un anestésico local en ambos ojos (lidocaína al 1%, Recetario Magistral, F. Ahumada), previo a su sacrificio. Se realizaron 3 mediciones por animal y la evaluación de las variaciones de la

presión ocular en los Grupos Experimentales se realizó considerando los valores basales de cada animal, previo a la inducción con Aloxano[®]. Por otra parte, se realizó examen del cristalino con el fin de evaluar la presencia o ausencia de cataratas a través del tiempo. Este examen se llevó a cabo en cuarto oscuro, aplicando un midriático local en ambos ojos (Homatropina 1% gotas oftálmicas, Recetario Magistral, F. Ahumada). Posteriormente, se determinó la presencia de cataratas mediante oftalmoscopia directa (Beta 200, Heine Optotechnik, Cat N° 0230100) utilizando una dioptría entre +8 y +12 (Peiffer y Petersen-Jones, 1998).

4.2.4.- Estudio macroscópico.

La necropsia se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Cubillos y Paredes (1995). El estudio macroscópico consideró el examen del páncreas determinándose peso, volumen, color y consistencia de acuerdo a la Tabla N°1. El peso se estableció utilizando una balanza digital (Soehnle[®], 0-2000 g). Para la determinación del volumen, se utilizó un recipiente graduado con agua, con capacidad de 1000 ml, calculándose el nivel de desplazamiento después de la inmersión de cada órgano.

Además, se realizó examen ocular, determinándose el grado de opacidad del cristalino, de acuerdo al procedimiento descrito por Peiffer y Petersen (1998). Para la adecuada interpretación de las alteraciones presentes, para cada Grupo Experimental se consideró un perro Control.

4.2.5.- Estudio microscópico.

Para la observación histológica del páncreas y del globo ocular, las muestras obtenidas fueron fijadas en formalina tamponada al 10% para procesarlas de acuerdo a las técnicas histológicas de rutina y teñirlas con Hematoxilina Eosina (H/E) (Luna, 1968).

4.2.6.- Laboratorio clínico.

La presente investigación consideró la determinación de glicemia, fructosamina plasmática y glucosa en humor acuoso. Para el estudio de las variables de bioquímica sanguínea, se procedió a tomar 3 ml de sangre a partir de la vena cefálica; dichas muestras fueron almacenados en tubos con heparina para la determinación de fructosamina y los 2 ml restantes en tubos con NaF para la determinación de glucosa. Para la determinación de la variación de los parámetros de bioquímica sanguínea a través del tiempo, se tomaron como valores referenciales los valores basales de los perros previos a la inducción. Por otra parte, para la obtención del humor acuoso, las muestras de ambos ojos fueron tomadas individualmente mediante punción en la zona del limbo ocular, utilizando para ello jeringa de 3 ml con aguja 19G. Para la adecuada interpretación de la concentración de glucosa en humor acuoso, se consideraron como referenciales los valores del Grupo Control.

A continuación, en la Tabla 2 se muestran las variables a determinar.

TABLA 2: Variables de bioquímica clínica y métodos a emplear para su determinación.

VARIABLE	MÉTODO
Glucosa ocular	GOD/PAD Cat.Nº. GL 2623. Lab. Randox.
Glicemia	
Albúmina	Verde de Bromocresol (BCG). Lab. Boehringer Mannheim.
Fructosamina sérica	Test de Reducción con Azul Nitrotetrazolio (NBT). MPR3 Fructosamina 1054686. Lab. Boehringer Mannheim.

4.2.7.- Análisis estadístico.

Los resultados se procesaron en el Programa Stat Graphic Plus v. 2.0, complementado con una planilla Excel 2000. Posteriormente, se analizaron mediante el uso de estadística descriptiva (promedios y error estándar). La distribución de los datos fue determinada mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks.

La comparación de los valores de bioquímica clínico, se efectuaron empleando la prueba de ANDEVA de muestras repetidas. En el caso del recuento de islotes de Langerhans, los datos fueron sometidos a un ANDEVA. En aquellos casos en que se observaron diferencias significativas, se recurrió a la prueba de comparación múltiple de Tukey Kramer, empleando un nivel de significación de 5%.

5. RESULTADOS

5.1.- Estudio clínico.

5.1.1.- Determinación de cataratas.

A continuación, en la tabla 3 se presentan los resultados correspondientes al grado de opacidad del cristalino en los perros en estudio.

TABLA 3: Grado de opacidad del cristalino en perros del Grupo Control e inducidos Experimentalmente con Alozano[®].

GRUPOS	Grado de opacidad del Cristalino *
Control (n=5)	-
Exp. I (n=3)	-
Exp II (n=3)	-
Exp III (n=3)	-
Exp IV (n=3)	-
Exp V (n=3)	-

* ausente (-), leve (+), moderado (++), severo (+++)

En la tabla 1, se muestra que tanto los perros Controles como los inducidos con Alozano[®] no presentaron opacidad en el cristalino.

5.1.2.- Determinación de la presión intraocular.

A continuación, se presentan los resultados en relación con la presión intraocular de los animales en estudio.

TABLA 4: Valores promedio de presión intraocular (PIO) en ojo izquierdo y derecho en Grupos Experimentales.

GRUPOS	VALORES PROMEDIO DE PIO (mmHg)											
	Valor de Referencia (14-30)											
	Basal		2 h (Horas)		24 h		7 d (Días)		14 d		21 d	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Exp I (n=3)	28,0	27,9	27,8	29,8	-	-	-	-	-	-	-	-
Exp II (n=3)	31,4	26,5	30,6	25,6	29,6	27,1	-	-	-	-	-	-
Exp III (n=3)	25,8	28,8	25,9	28,5	25,2	27,9	23,9	29,1	-	-	-	-
Exp IV (n=3)	28,6	25,2	28,4	28,0	27,4	25,3	27,1	25,5	27,2	23,2	-	-
Exp V (n=3)	26,4	28,3	26,5	27,6	25,8	26,4	25,2	27,4	25,2	26,7	24,0	24,8
Promedio	28,0	27,3	27,8	27,9	27,0	26,7	25,4	27,3	26,2	25,0	24,0	24,8

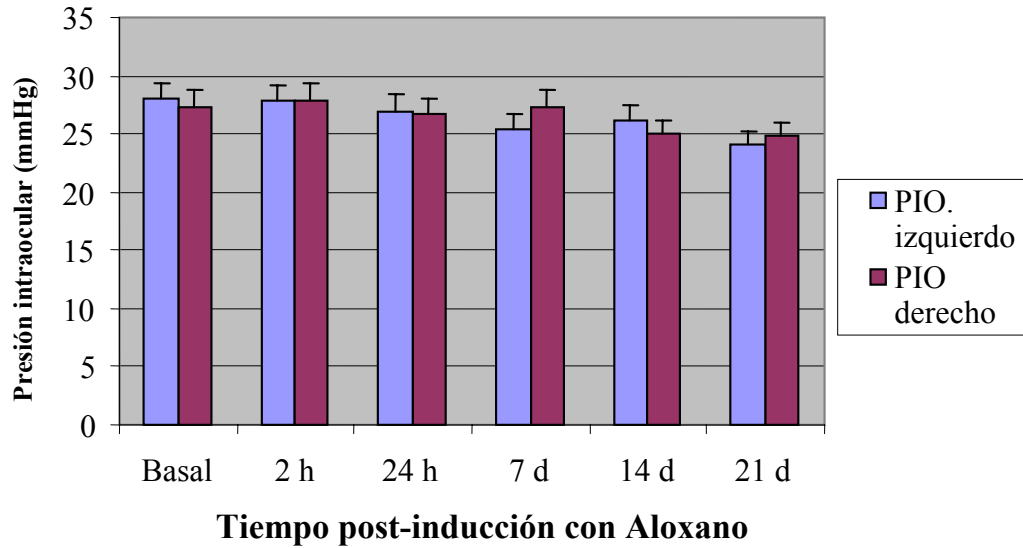


GRÁFICO 1: Valores promedio de PIO \pm EE de ojo izquierdo y derecho, en los Grupos inducidos con Aloxano[®], de acuerdo al tiempo post-inducción

Con respecto a los valores en la presión intraocular, en general no se observaron diferencias entre los Grupos en estudio y el rango de referencia establecido para la especie; el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$).

5.2.- Estudio anatomopatológico

5.2.1.- Estudio macroscópico del páncreas

A continuación, se presentaran los resultado obtenidos en relación al peso y volumen promedio relativo (Tabla 5 y 6) en páncreas de los animales en estudio.

TABLA 5: Peso promedio relativo del páncreas en el Grupo Control e inducidos Experimentalmente con Alozano[®].

GRUPOS	Peso promedio relativo del páncreas *
Control (n=5)	0,0027
Exp I (n=3)	0,0038
Exp II (n=3)	0,0022
Exp III (n=3)	0,0023
Exp IV (n=3)	0,0031
Exp V (n=3)	0,0027

*** Peso órgano (kg) / Peso animal (kg)**

En relación con el peso relativo del páncreas, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el Grupo Control y los Grupos Experimentales.

TABLA 6: Volumen relativo promedio del páncreas en el Grupo Control e inducidos con Alozano[®].

GRUPOS	Volumen relativo del páncreas *
Control (n=5)	0,0026
Exp I (n=3)	0,0046
Exp II (n=3)	0,0024
Exp III (n=3)	0,0023
Exp IV (n=3)	0,0034
Exp V (n=3)	0,0028

Volumen órgano (l) / Peso animal (Kg)

El análisis estadístico efectuado en relación con el volumen relativo del páncreas no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$), entre los Grupos Experimentales y el Grupo Control.

5.3.- Estudio histopatológico

5.3.1.- Estudio microscópico del páncreas.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en páncreas con respecto al número de islotes de Langerhans (Tabla 7) y lesiones histopatológicas (Tabla 8).

TABLA 7: Promedio de islotes de Langerhans por campo (10X), en páncreas del Grupo Control e inducidos con Alozano®.

	GRUPOS					
	Control (n=5)	Exp I (n=3)	Exp II (n=3)	Exp III (n=3)	Exp IV (n=3)	Exp V (n=3)
Promedio de islotes de Langerhans por páncreas*	8,8	8,3	7,6	4,0	2,6	2,4
	8,1	7,9	7,0	3,5	2,6	2,4
	8,1	8,2	7,0	3,3	2,0	2,6
	8,0	-	-	-	-	-
	8,3	-	-	-	-	-
PROMEDIO	8,3	8,1	7,2	3,6	2,4	2,5

* 10 campos 10X

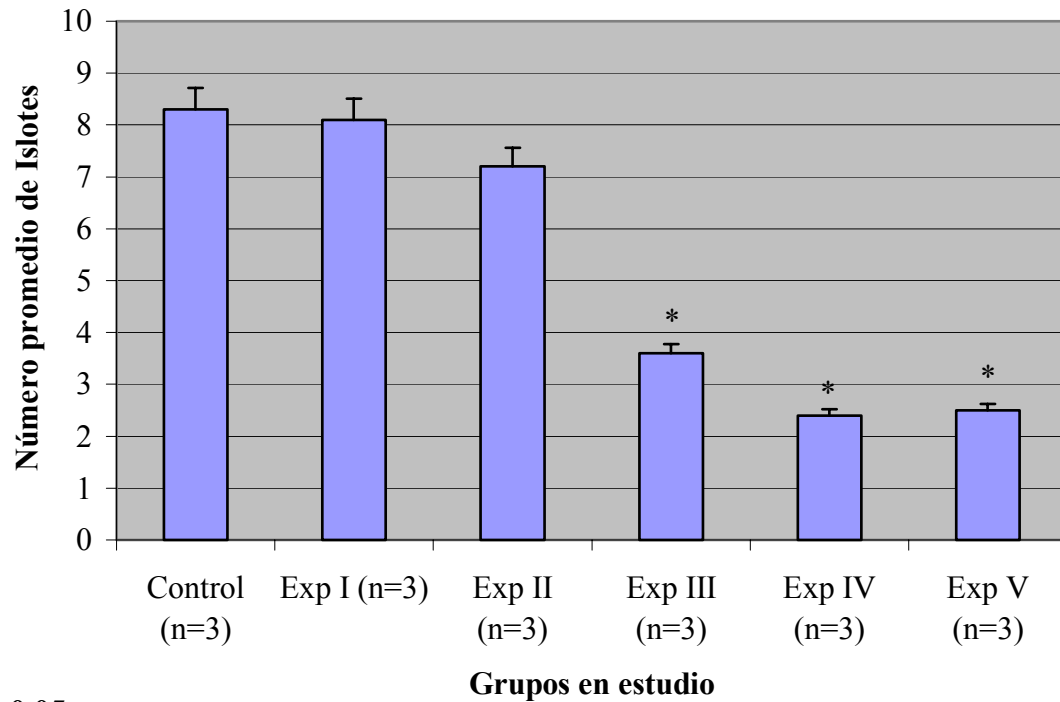


GRÁFICO 2: Número promedio de islotes de Langerhans \pm EE en el Grupo Control y Grupos Experimentales.

En el Grupo Control, a la observación microscópica por campo (10x), se observó un promedio de 8 islotes de Langerhans; en cambio en los páncreas de los Grupos Exp. se apreció una disminución gradual, siendo ésta más severa en aquellos Grupos con mayor tiempo p.i. El análisis estadístico mostró diferencia significativas ($P < 0.05$) entre el Grupo Control y los Exp. II, III, IV, V.

TABLA 8: Trastornos histológicos en páncreas del Grupo Control e inducidos con Alozano[®].

GRUPOS		TRASTORNOS PANCREÁTICOS*						
		ISLOTES DE LANGERHANS			ACINOS			INTERSTICIO
		Picnosis	Vacuolización	Fibrosis	Picnosis	Vacuolización	Proliferación conductos	Infiltrado Linfocitario
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	-	-	++	+	-	++	+

* (-) ausencia, (+) leve, (++) moderada, (+++) intensa

En la Tabla 6, se observó picnosis de las células de los islotes de Langerhans a partir del Grupo Exp. II. En el Exp. III, se apreció una menor intensidad en esta condición, siendo escasa en el Exp. IV y estando ausente en el Exp. V. Por otra parte, se apreció una estrecha relación entre picnosis y vacuolización de las células de los islotes. Finalmente, en los islotes de los Exp. IV y V se observó fibrosis, siendo ésta más evidente en el Grupo Experimental con mayor tiempo p.i.

En relación con los acinos pancreáticos, estos evidenciaron picnosis leve a partir de las 2 hrs. p.i. (Exp. II), incrementándose posteriormente en los Grupos Experimentales con mayor tiempo p.i. Llama la atención que el Exp. III (7 días p.i.) presentó trastornos degenerativos vacuolares en el citoplasma de las células acinares, evidenciándose disminución de esta afección en el Exp. IV (14 días p.i.) y estando ausente en el Exp. V (21 días p.i.). Finalmente, los Grupos Exp. III, IV y V (7, 14, 21 días p.i. respectivamente) presentaron proliferación de conductos intralobulillares.

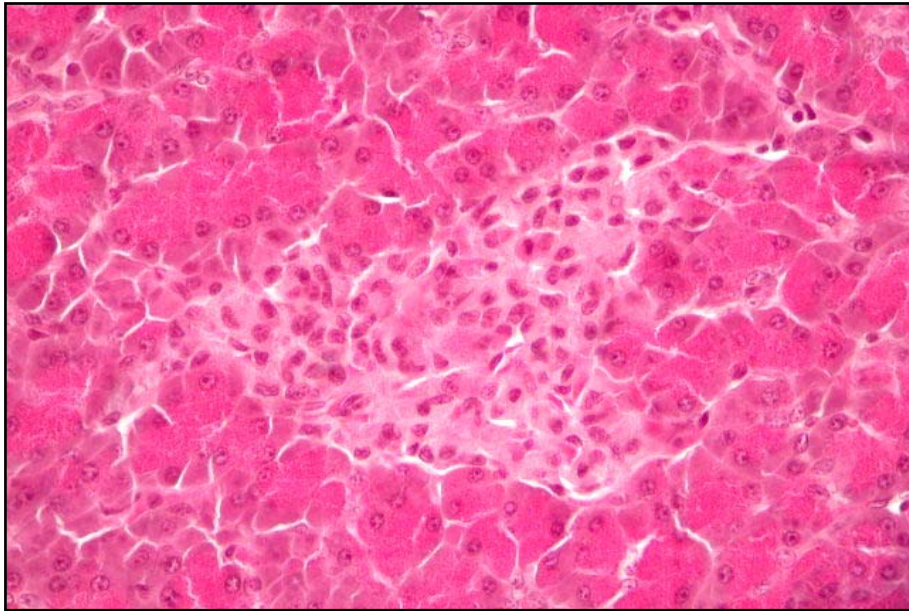


FIGURA 1: Islote de Langerhans en Perro Control. 100 X.

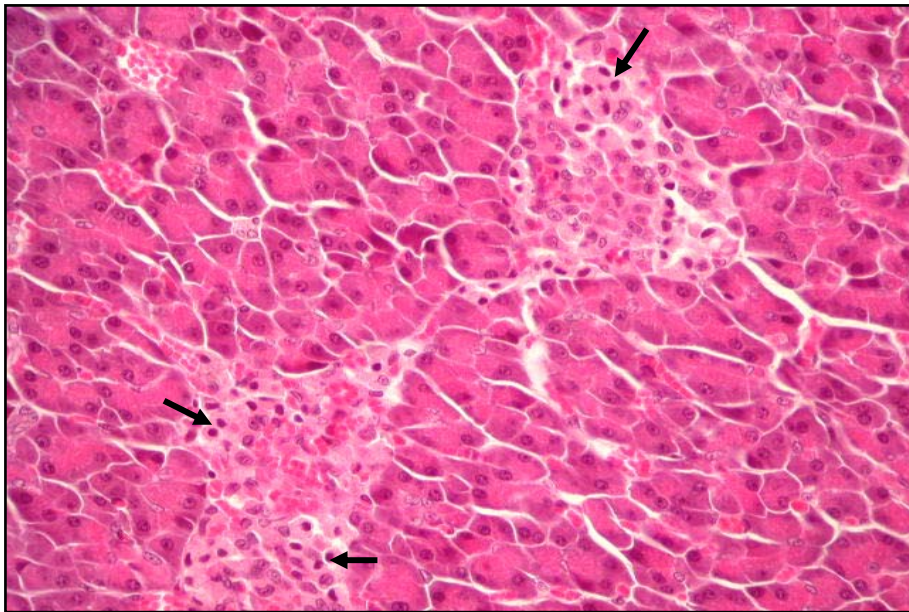


FIGURA 2: Picnosis celular en islote de Langerhans en perro a las 24 horas p.i. con Aloxano®. 100 X.

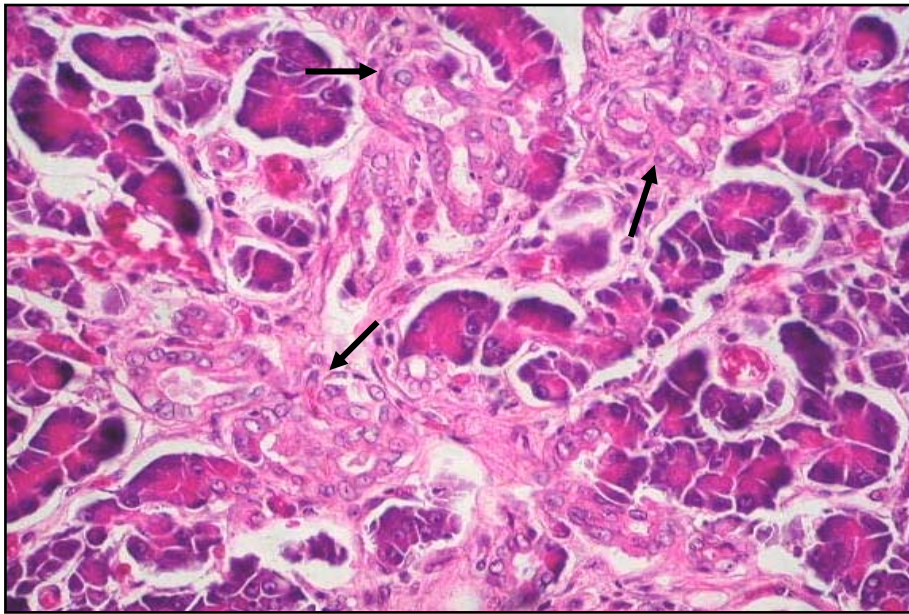


FIGURA 3: Marcada proliferación de conductos intralobulillares (↑) en perro a los 21 días p.i. con Aloxano®. 400 X.

5.3.2.- Estudio microscópico del ojo.

A continuación, en la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos en relación a los hallazgos histopatológicos oculares en los Grupos en estudio.

TABLA 9. Trastornos histológicos de la córnea en ojo izquierdo (I) y derecho (D) en el Grupo Control e inducidos con Aloxano®.

GRUPOS		LESIONES CORNEALES *										
		Epitelio				Estroma		Endotelio				
		Aplanamiento		Vacuolización		Disociación		Hiperplasia		Vacuolización		
		I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	
Control (n=5)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exp I (n=3)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exp II (n=3)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
Exp III (n=3)	1	+	+	-	-	+	-	-	-	++	++	
	2	+	+	+	+	+	+	-	-	++	++	
	3	+	+	+		+	+	-	-	+	+	
Exp IV (n=3)	1	++	++	++	++	-	-	-	-	++	++	
	2	++	++	+	+	+	+	-	-	+++	++	
	3	++	++	++	++	+	+	-	-	+++	++	
Exp V (n=3)	1	-	-	+	+	+++	+++	-	-	+	+	
	2	+++	+++	++	++	+	+	-	-	++	+++	
	3	++	++	+	+	+	+	-	-	+	+	

* ausente (-), leve (+), moderado (++), severo (+++).

En la tabla 9, se puede apreciar un aumento en el grado de aplanamiento del epitelio corneal el cual fue leve en el Grupo Exp. III, moderado en el Exp. IV y severo en el Exp. V. Con respecto a la disociación del estroma, este no presentó grandes alteraciones a excepción del Exp. V, en el cual se apreció una severa disociación. Por otra parte, tanto el epitelio como el endotelio de la córnea mostraron diferentes grados de vacuolización.

Al respecto, cabe señalar que esta fue leve en el endotelio de los Exp. I y II, moderada en el Exp. III y severa en los exp. IV y V. En cambio, en el epitelio fue leve en el Grupo Exp. III y moderada en los Exp. IV y V.

A fin de cuantificar el grado de aplanamiento del epitelio corneal, se procedió a efectuar un estudio morfométrico. Los resultados en relación con el grosor del epitelio de la córnea (μm) de la totalidad de los Grupos en estudio, se presentan en la Tabla 10.

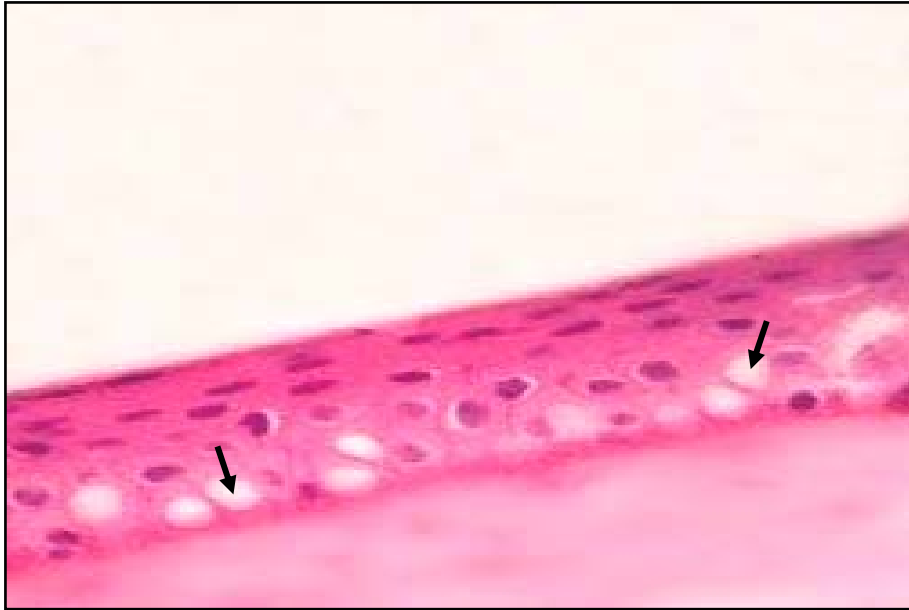


FIGURA 6: Disminución del grosor del epitelio corneal y vacuolización de la capa basal (↑). Perro a los 14 días p.i. con Aloxano® . 400X.



FIGURA 7: Marcada disociación del estroma corneal (↑). Perro - 7 días p.i. con Aloxano® . 400X.

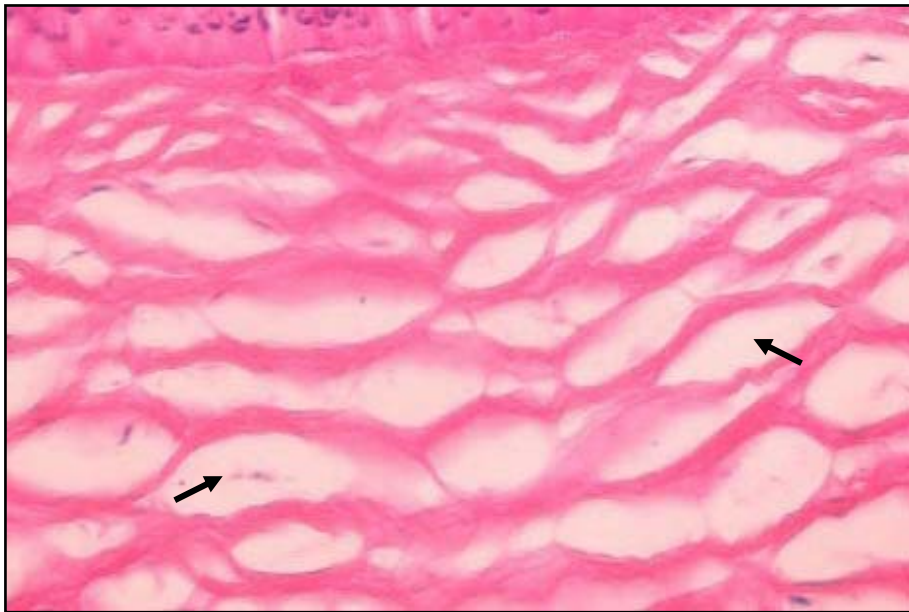


FIGURA 8: Marcada disociación del estroma corneal. Perro - 21 días p.i. con Aloxano[®]. 400X.

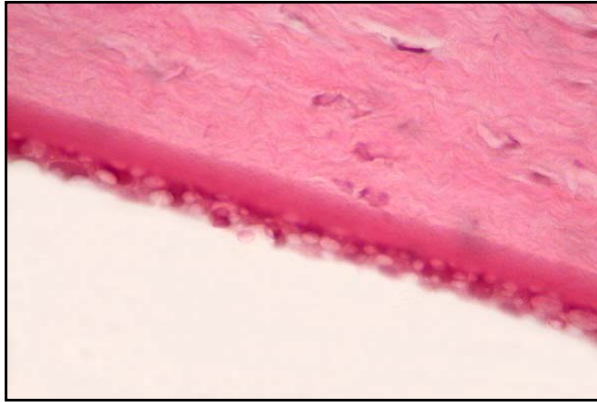


FIGURA 9: Moderada vacuolización del endotelio corneal. Perro - 7 d p.i. con Aloxano®. 400X.

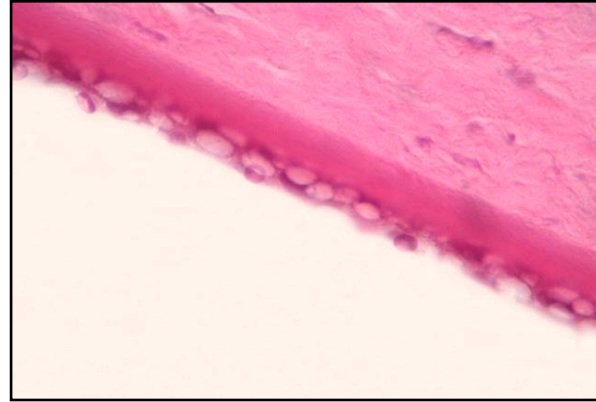


FIGURA 10: Marcada vacuolización del endotelio corneal. Perro - 14 d p.i. con Aloxano®. 40X.

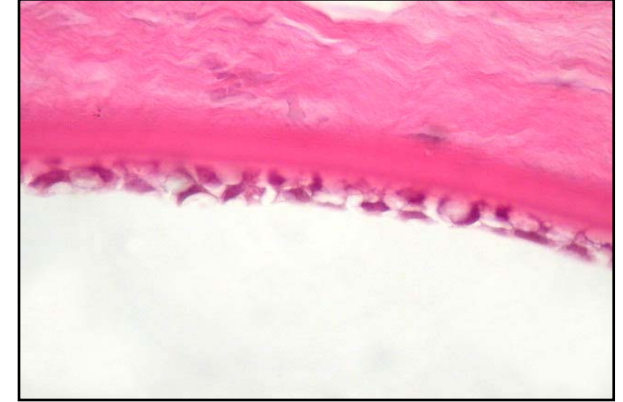


FIGURA 11: Severa vacuolización del endotelio corneal con ruptura celular. 21 d p.i. con Aloxano®. 40X.

TABLA 10: Valores promedio de grosor en epitelio corneal en perros del Grupo Control e inducidos con Aloxano®.

	GRUPOS					
	Control (n=5)	Exp I (n=3)	Exp II (n=3)	Exp III (n=3)	Exp IV (n=3)	Exp V (n=3)
Valores promedio de grosor en epitelio corneal (µm)	35,1	37,5	36,6	26,4	25,0	19,0
	35,7	33,9	34,4	23,2	23,7	21,1
	37,3	34,2	33,7	24,5	22,8	15,3
	35,3	-	-	-	-	-
	34,3	-	-	-	-	-
Promedio	35,5	35,2	34,9	24,7	23,8	18,5

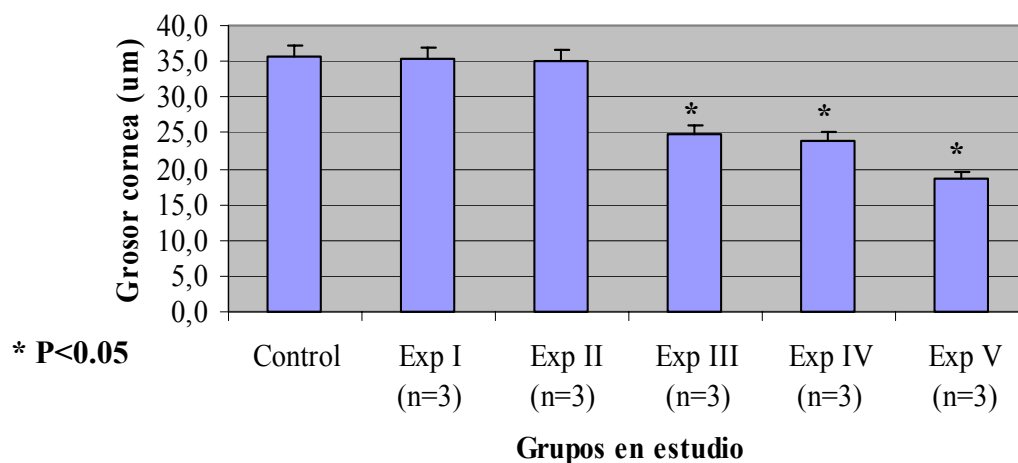


GRAFICO 3: Valores promedio de grosor en epitelio corneal \pm EE en perros del Grupo Control e inducidos con Aloxano®.

En relación con el grosor de epitelio corneal, se presentó una disminución de este a partir del Grupo Exp. III (7 días p.i.). El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los Exp. III, IV y V y los perros Controles.

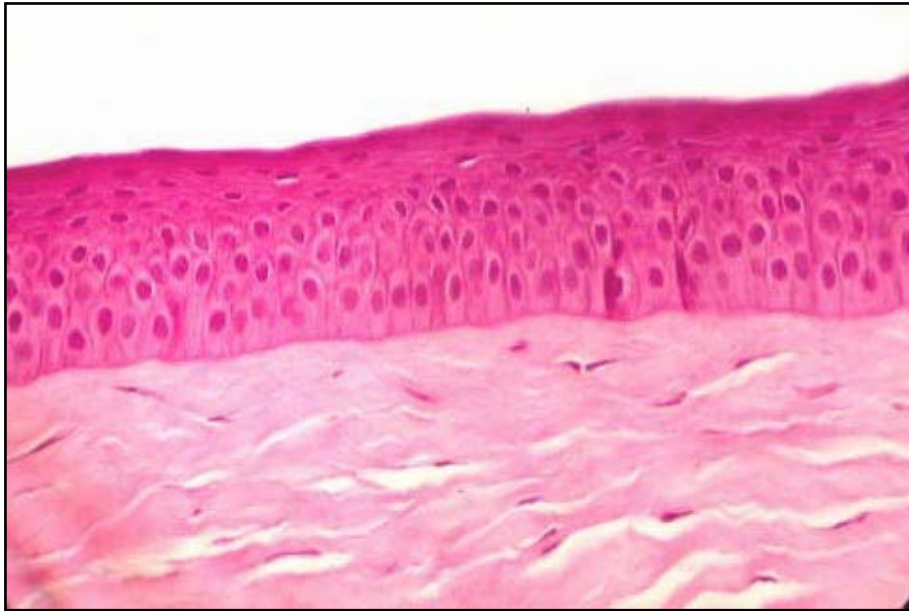


FIGURA 4: Epitelio corneal plano estratificado en perro Control. 400X.

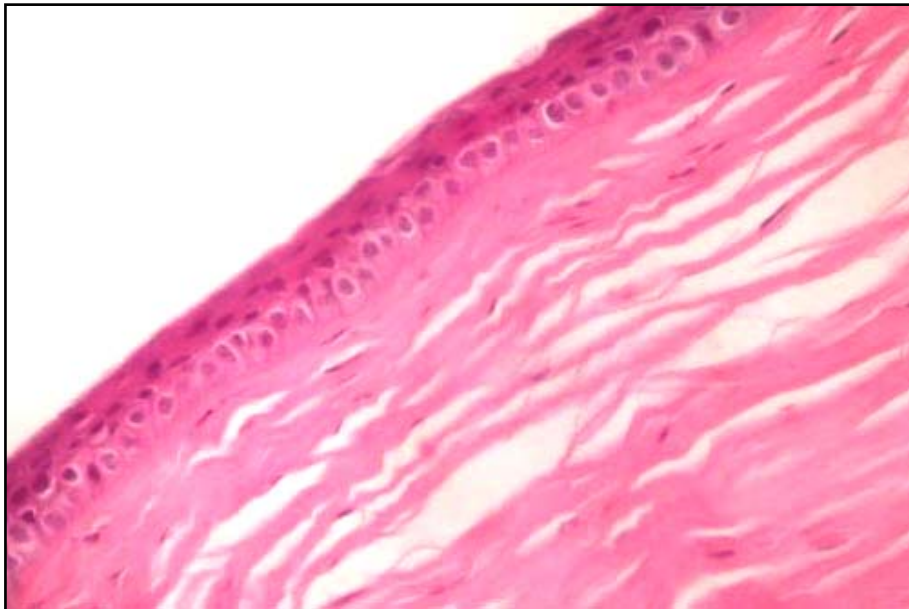


FIGURA 5: Observe la disminución de las capas celulares del epitelio corneal, en comparación con la Figura 4 (perro Control). Perro a los 21 días p.i. con Aloxano[®]. 400X.

TABLA 11. Trastornos histológicos del cristalino en ojo izquierdo (I) y derecho (D) en el Grupo Control e inducidos con Aloxano®.

GRUPOS		LESIONES DEL CRISTALINO *							
		Epitelio de la cápsula				Fibras lenticulares			
		Vacuolización		Hiperplasia		Vacuolización		Persistencia de núcleo**	
		I	D	I	D	I	D	I	D
Control (n=5)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
Exp I (n=3)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	+	-	-	-
Exp II (n=3)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-	-	-
Exp III (n=3)	1	+	+	-	-	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	++	+	-	-
	3	++	++	-	-	++	++	-	-
Exp IV (n=3)	1	+	+	-	-	+	+	-	-
	2	++	+	-	-	++	++	-	-
	3	++	++	-	-	++	++	-	-
Exp V (n=3)	1	++	+	-	-	++	+	-	-
	2	+	+	-	-	+	+	-	-
	3	++	+	-	-	+	++	-	-

*ausente (-), leve (+), moderado(++), severo (+++)

** presente (p); ausente (-)

En la tabla 11, se puede apreciar que tanto el epitelio de la cápsula como las fibras lenticulares presentaron diferentes grados de vacuolización. A nivel epitelial este fue leve en el Grupo Exp. I, incrementando su intensidad (moderada) en los Grupos con mayor tiempo p.i.. Por otra parte, en las fibras lenticulares el grado de vacuolización fue leve a moderado en los Exp. III, IV y V.

En relación con la tinción de Metilamina de Plata, utilizada para verificar el grado de disociación de las fibras lenticulares, en la totalidad de los Grupos en estudio, se observó ausencia de disociación.

5.4.- Estudio de patología clínica

5.4.1. Concentraciones plasmáticas de glucosa, albúmina y fructosamina de los Grupos en estudio.

A continuación, en las tablas 12, 13 y 14 se presentan los resultados obtenidos de los Grupos en estudio, correspondientes a las concentraciones de glucosa, albúmina y fructosamina plasmática, respectivamente.

TABLA 12: Valores promedios de glucosa plasmática en los Grupos inducidos con Alozano[®], de acuerdo al tiempo post-inducción.

GRUPOS	VALORES PROMEDIO DE GLUCOSA PLASMÁTICA (mmol/l) (Valor de Referencia: 4,9-5,6)					
	BASAL	2 h	24 h	7 d	14 d	21 d
Exp I (n=3)	5,14	4,43	-	-	-	-
Exp II (n=3)	5,24	4,35	3,90	-	-	-
Exp III (n=3)	5,16	4,28	3,19	23,28	-	-
Exp IV (n=3)	5,24	4,20	3,34	29,75	38,90	-
Exp V (n=3)	5,71	4,61	3,99	30,18	28,09	24,21
PROMEDIO	5,29	4,37	3,60	27,74	33,50	24,21

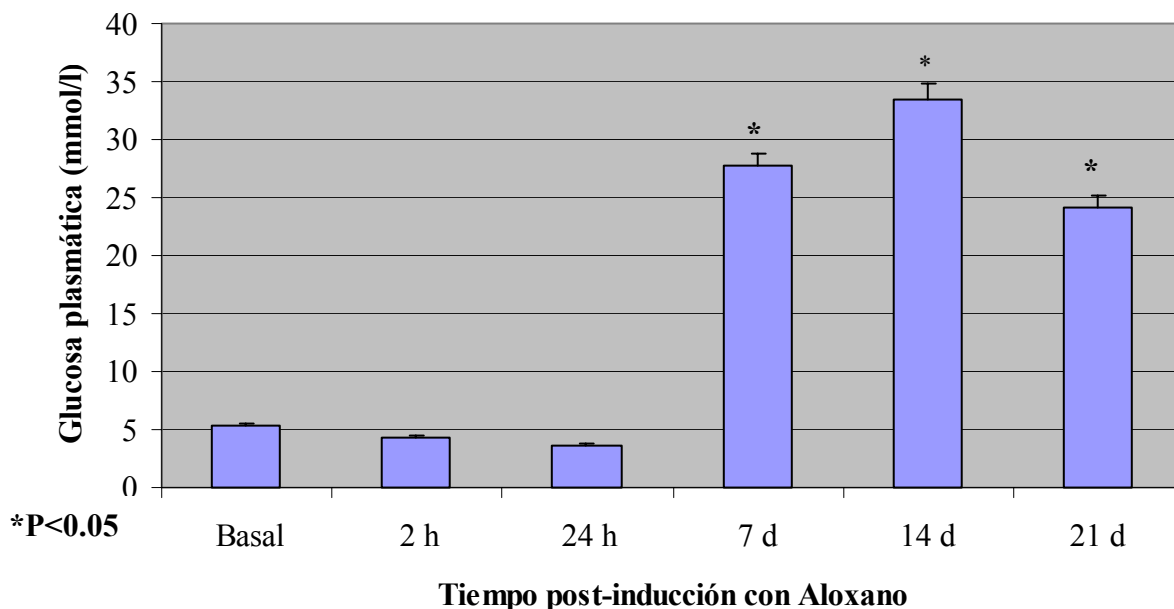


GRÁFICO 4: Valores promedio de glucosa plasmática ± EE en los Grupos inducidos con Aloxano®, de acuerdo al tiempo post-inducción.

En relación con la glucosa plasmática, en la tabla 12 se aprecia que a partir de los 7 días p.i. se presenta un marcado incremento de las concentraciones, por sobre el rango establecido para la especie. El análisis estadístico (Gráfico 4) mostró diferencias significativas ($P<0.05$) entre los valores basales y los obtenidos a los 7, 14 y 21 días.

TABLA 13: Valores promedio de albúmina plasmática en los Grupos inducidos con Aloxano® de acuerdo al tiempo post-inducción.

GRUPOS	VALORES PROMEDIO DE ALBÚMINA PLASMÁTICA (g/l) (Valor de Referencia: 26-28)					
	Basal	2 h	24 h	7 d	14 d	21 d
Exp I (n=3)	27,0	24,7	-	-	-	-
Exp II (n=3)	26,3	26,3	26,7	-	-	-
Exp III (n=3)	27,7	27,3	27,0	30,0	-	-
Exp IV (n=3)	29,7	28,0	26,7	28,3	30,7	-
Exp V (n=3)	28,3	28,3	28,3	30,7	27,3	28,7
PROMEDIO	27,8	26,5	27,2	29,7	29,0	28,7

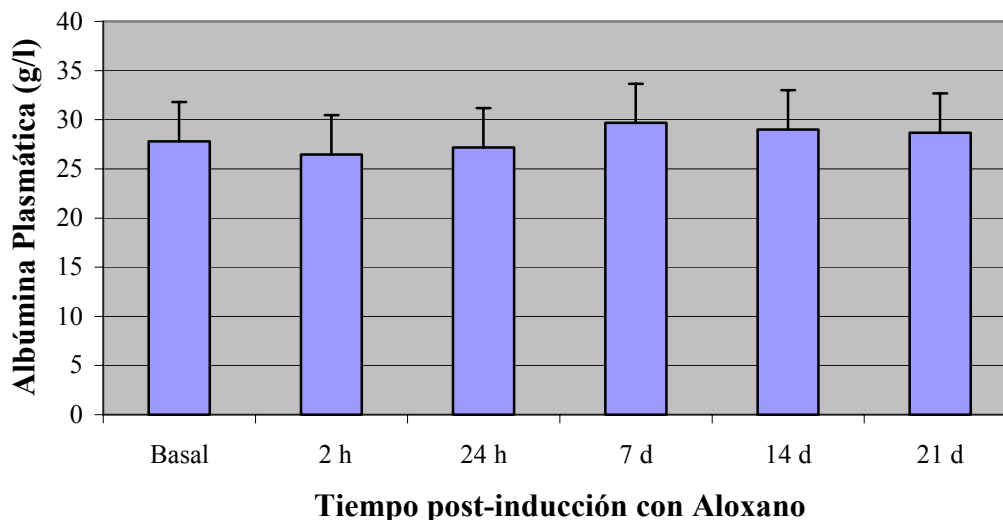
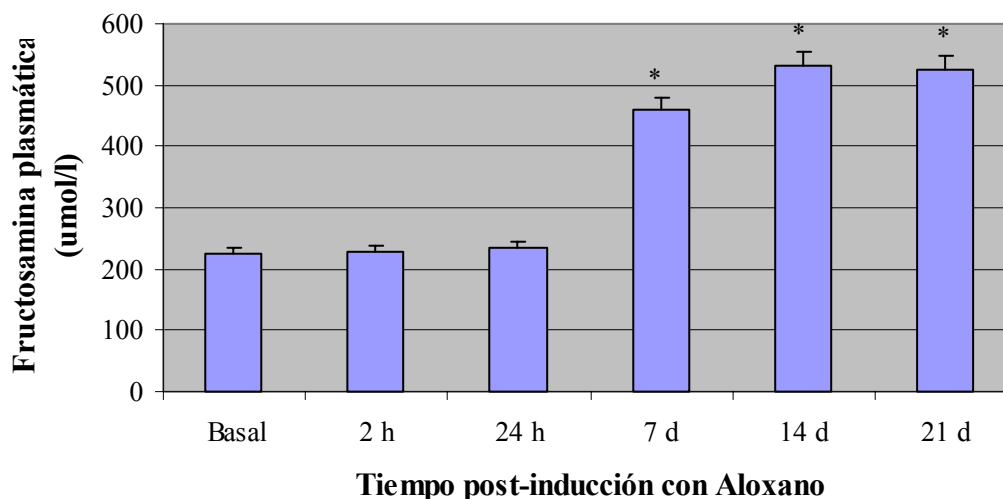


GRÁFICO 5: Valores promedio de albúmina plasmática \pm EE en los Grupos inducidos con Aloxano[®], de acuerdo al tiempo post-inducción.

En relación con los valores de albúmina plasmática (Tabla 13), se observó un incremento por sobre el rango de referencia establecido para la especie a los 7 y 14 días p.i.; sin embargo, el análisis estadístico (Gráfico 5) no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los Grupos en estudio.

TABLA 14: Valores promedio de fructosamina en plasma de Grupos inducidos con Aloxano[®], de acuerdo al tiempo post-inducción.

GRUPOS	VALORES PROMEDIO DE FRUCTOSAMINA ($\mu\text{mol/l}$) (Valor de Referencia: 170-338)					
	BASAL	2 h	24 h	7 d	14 d	21 d
Exp I (n=3)	203,3	207,7	-	-	-	-
Exp II (n=3)	211,7	223,7	216,7	-	-	-
Exp III (n=3)	204,7	194,3	203,7	427,0	-	-
Exp IV (n=3)	280,3	276,7	277,7	498,3	583,3	-
Exp V (n=3)	232,0	234,3	237,3	457,3	480,3	525,7
PROMEDIO	226,4	227,3	233,8	460,9	531,8	525,7



*P<0.05

GRÁFICO 6: Valores promedio de fructosamina plasmática \pm EE en los Grupos inducidos con Aloxano[®], de acuerdo al tiempo post-inducción.

En la tabla 14, se observa que a partir del día 7 p.i. los valores de fructosamina sérica presentaron un aumento por sobre el rango de referencia para la especie, el cual se mantuvo hasta los 21 días p.i. El análisis estadístico (Gráfico 6) mostró diferencias significativas (P<0.05) entre los valores basales y los obtenidos a los 7, 14 y 21 días.

5.4.2. Concentraciones de glucosa en humor acuoso de los Grupos en estudio.

TABLA 15: Valores promedio de glucosa en humor acuoso (mmol/l) obtenidos del Grupo Control e inducidos con Aloxano[®].

GRUPOS	VALORES PROMEDIO DE GLUCOSA EN HUMOR ACUOSO (mmol/l)											
	Control (n=5)		Exp I (n=3)		Exp II (n=3)		Exp III (n=3)		Exp IV (n=3)		Exp V (n=3)	
	-		2 h		24 h		7 d		14 d		21 d	
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Glucosa en humor acuoso	0,00	0,00	0,04	0,10	1,89	1,03	10,47	10,55	16,37	21,41	18,34	19,48
	0,00	0,00	0,17	0,15	0,99	1,22	34,91	34,20	32,71	34,66	25,25	25,50
	0,15	0,14	0,05	0,07	0,20	0,40	31,77	32,13	26,82	31,71	22,03	22,87
	0,18	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Promedio	0,07	0,05	0,09	0,11	1,03	0,88	25,72	25,63	25,30	29,26	21,87	22,62
Promedio I+D	0,06		0,10		0,96		25,68		27,28		22,25	

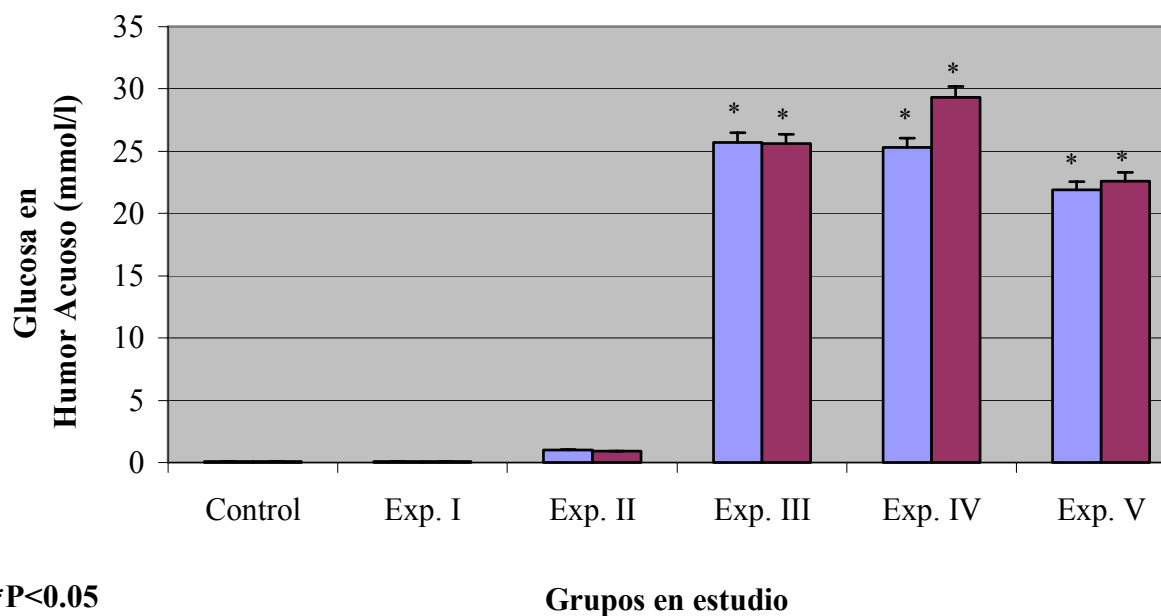
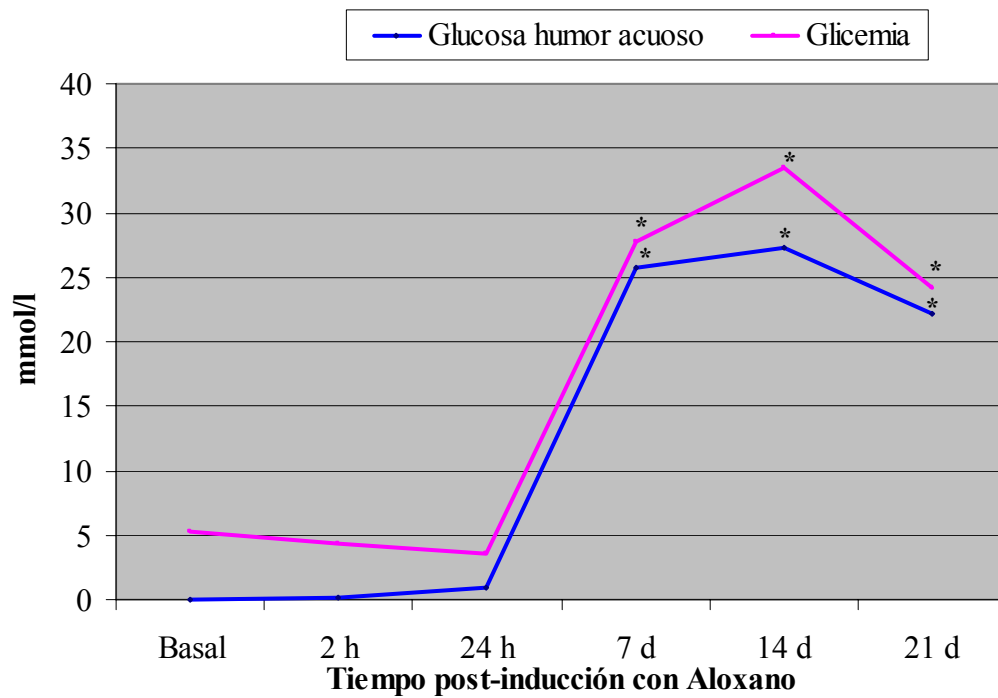


GRÁFICO 7: Valores promedio de glucosa en humor acuoso de ojo izquierdo y derecho \pm EE en el Grupo Control e inducidos con Aloxano[®].

En la tabla 15, se observa que a partir del Grupo Exp. III los valores de glucosa en humor acuoso presentaron un aumento por sobre el rango de referencia para la especie, el cual se mantuvo hasta los Exp. V (21 días p.i.). El análisis estadístico (Gráfico 6) mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los perros Controles y los Exp. III, IV y V (7, 14 y 21 p.i. respectivamente).



P<0.05

GRÁFICO 8: Concentración promedio de glucosa en humor acuoso y sanguínea en el Grupo Control e inducidos con Aloxano[®] a través del tiempo.

En el presente gráfico, se aprecia un aumento significativo ($P < 0,05$) de las concentraciones de glucosa en humor acuoso y en sangre a partir de los 7 días p.i. con Aloxano[®]. Dicho incremento sigue idéntico patrón de comportamiento en sangre y humor acuoso.

6.- DISCUSIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) constituye una de las enfermedades con mayor impacto a nivel mundial (López, 2003). Es así como estudios realizados por WHO (2003) y Gorus y col. (2004) estiman que en el mundo hoy existen más de 150 millones de personas que padecen esta condición, y que en los próximos 20 años esta cifra podría duplicarse. En USA la DM en seres humanos representa la primera causa de muerte por enfermedades y el costo anual para el año 2002 ascendió a los 132 billones de dólares americanos (Hogan y Nikolov, 2003). En América Latina, estudios realizados en el año 2000 por Barceló y col. (2003) indican que las muertes asociadas a DM fueron de aproximadamente 400.000 personas, y el costo anual fue de casi 65.200 millones de dólares.

La mayor parte de los avances científicos y el conocimiento sobre esta enfermedad están relacionados principalmente con el uso de modelos animales y el de compuestos que permiten inducir DM en pacientes clínicamente sanos (Méndez y Ramos, 1994).

El término diabetes aloxánica proviene de la capacidad del Aloxano[®] (droga descubierta en el año 1828 por Wohler and Liebig (McLeitchie, 2002), de inducir DM por medio de necrosis de las células β en el páncreas endocrino, cuyo efecto fue demostrado por Dunn y McLetchie en el año 1942. Al respecto cabe señalar que la dosis necesaria de Aloxano[®] para inducir DM Tipo 1 en modelos animales fluctúa entre 50 a 75 mg/kg (Martín y Capen, 1979; Méndez y Ramos, 1994)

La utilización de modelos animales ha sido considerada desde hace mucho tiempo como una herramienta muy útil para el estudio de la patogénesis de la DM en seres humanos, especialmente la Tipo 1, debido a que la inducción de esta enfermedad mediante el uso de Aloxano[®], es capaz de producir un cuadro muy similar (Jubb y col., 1992; Feldman y Nelson, 2000). Los modelos animales utilizados incluyen principalmente: ratas, ratones, conejos y perros (Fleitas y col. 2000). Estos últimos han adquirido particular importancia debido a una mayor similitud genética con el ser humano, además de permitir una manipulación más cómoda debido a su tamaño y facilidad de manejo (Black y col., 1980; Tan y col., 2002; López, 2003).

Dentro de las complicaciones crónicas que produce la DM se encuentran padecimientos como la cetoacidosis diabética, alteraciones renales, nerviosas, cutáneas y oculares, como retinopatía y cataratas. Aunque los perros pueden presentar retinopatía diabética (Engerman y Kern, 1986; Small y col., 1987; Kern y Engerman, 2001), la catarata es la forma más común de presentación (Jubb y col., 1992).

El presente estudio se realizó a fin de contribuir en el conocimiento del desarrollo de DM Tipo 1 inducida experimentalmente con Aloxano[®], estudiándose la relación con el daño

estructural e histológico del páncreas, ojo y la génesis de catarata ocular en caninos; a su vez, se relacionaron dichas alteraciones con variables de bioquímica sanguínea y glucosa en humor acuoso.

6.1-Estudio clínico y anatomopatológico.

Las alteraciones macroscópicas del páncreas (peso y volumen) no presentaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre el Grupo Control y los Experimentales. Microscópicamente el hallazgo más importante fue la disminución en el número de islotes de Langerhans, debido a necrosis de las células β . Sin embargo, esta disminución no incidió significativamente en el peso y volumen del páncreas, lo cual se debe a que en los perros, los islotes de Langerhans representan sólo el 1 a 2% de la masa total pancreática (Naya y col., 1997). Además, la vacuolización, picnosis (Figura 2) y proliferación (Figura 3) de conductos en los acinos (leve a moderados), no incidieron en las características macroscópicas del órgano.

La disminución en el número y tamaño de los islotes de Langerhans, es una de las características más importantes en pacientes que padecen DM Tipo 1 no inducida experimentalmente. Los resultados de la presente investigación indican que el Aloxano[®] origina alteraciones similares a las señalados; según Jörns y col. (1997) la depleción de células β se debe principalmente a una alteración en el pH celular debido a la producción de radicales libres. En la presente investigación, la disminución en el número y tamaño de los islotes de Langerhans se determinó a las 2 h. p.i., observándose diferencias significativas ($P<0,05$) a partir de los 7, 14 y 21 d. p.i. con Aloxano[®]. Resultados similares obtuvieron Rastogi y col. (1993) mediante la inducción de DM en perros utilizando la misma droga.

Según Klein y col. (1997) y Hennis y col. (2003), la diabetes y la hipertensión son los factores de riesgo más importantes en el aumento de la presión intraocular, aunque según este último autor, los mecanismos involucrados no están totalmente aclarados. Klein y col. (1984), en un estudio en humanos con DM determinaron un aumento en la presión intraocular, sin embargo, ninguno de los pacientes presentó algún grado de cataratas. Otro estudio realizado por Klein y col. (1997) demostraron que el aumento en la presión intraocular tiene una relación directamente proporcional con la duración de la diabetes. De igual modo, Cotran y col. (1995) mencionan que la formación de catarata está en directa relación con la cronicidad del cuadro. Por otra parte, Leasure, Gelatt y Mackay (2001), midieron la presión intraocular en perros durante diferentes estadios de desarrollo de catarata (incipiente, inmadura, madura e hipermadura) encontrando que en ninguno de los estadios la presión intraocular estuvo por sobre los rangos establecidos para la especie. En la presente investigación, clínicamente no se observó opacidad del cristalino en los Grupos Experimentales durante el período en estudio. De igual modo, las mediciones de la presión intraocular (mmHg) no mostraron diferencias significativas ($P>0,05$) entre el Grupo Control y los Experimentales. Debido a la corta duración del estudio (21 días) no se observaron modificaciones en la presión intraocular (PIO) como tampoco formación de cataratas, por lo tanto no es posible afirmar si existe o no relación entre un aumento en la PIO y la presencia de catarata.

En relación con los trastornos histológicos de la córnea en pacientes con DM, estos han sido descritos desde la década de 1980, y aunque los mecanismos no están totalmente clarificados, se sabe que la enzima aldosa reductasa está involucrada en la patogénesis de estas alteraciones (Kinoshita y col. 1979; Fujishima y Tsubota 2002). Estos trastornos involucran al epitelio (epiteliopatía), endotelio (endoteliopatía) o diferentes partes de la estructura corneal (queratopatía) (Hosotani y col., 1995). Según Swann (1999), a nivel del epitelio se produce un adelgazamiento y disminución en el número de células epiteliales. En el presente estudio, las alteraciones más importantes tuvieron relación con un aumento en el grado de aplanamiento celular en el epitelio, a partir del Grupo Exp. III. Dicha alteración celular coincide con una disminución en el grosor del epitelio corneal (Figura 4 y 5), el cual fue significativo ($P < 0.05$), a partir del Grupo Exp. III en relación con el Grupo Control. Investigaciones realizadas con Yamamoto y col. (1998), en ratas con DM Tipo 1 inducida con Estreptozotocina, mostraron que luego de 30 días p.i. el epitelio corneal se observó más delgado y con una disminución en la proliferación celular (reepitelización), comparado con ratas no tratadas. En cuadros de DM la disminución en el grosor corneal es uno de los factores más importantes en la formación de erosiones y posterior presencia de úlceras en pacientes con DM (Kinoshita y col., 1979), alteraciones no observadas en la presente investigación.

A nivel del estroma y endotelio, los hallazgos más importantes fueron la disociación de las fibras estromales a partir del Grupo Exp. III (Figura 7 y 8), y la presencia de vacuolización en el endotelio corneal a partir del Grupo Exp. II (Figura 9,10 y 11). Al respecto, cabe señalar que el endotelio de la cornea es el principal regulador de la hidratación corneal, principalmente mediante la bomba Na-K presente en sus membranas. Alteraciones en la actividad de ésta pueden generar edema en el estroma, con disociación de sus fibras (Schultz y col., 1984; Jubb y col., 1992). Herse (1990) al inducir DM Tipo 1 en conejos utilizando Aloxano[®] demostró que existe fuerte disminución en la actividad de la bomba Na-K endotelial. Si esta alteración en la bomba Na-K se mantiene en el tiempo puede generar lesión celular y la presencia de vacuolas (Cotran y col., 1995). En la presente investigación, se observó marcada vacuolización de la células endoteliales, a partir del 7º día p.i. con Aloxano[®] (Exp. III), siendo más marcada en los Grupos Exp. IV y V. La disfunción de la bomba Na-K, se traduce en degeneración vacuolar, apreciándose un aumento en el flujo de agua hacia el estroma, lo cual se traduce en edema con la consiguiente disociación las fibras estromales.

Como se mencionó con anterioridad, una de las alteraciones oculares frecuentes en cuadros de DM lo constituye la disminución del grosor del epitelio corneal, sin embargo, una de las alteraciones más características de la córnea durante el desarrollo de DM es el aumento en su grosor (Herse, 1990; Rosemberg y col, 2000; Lee y col., 2005). Dicho aumento se relaciona con el aumento en el grosor de la membrana basal de epitelio (producto de una acumulación de los productos de glicosilación avanzada) (Ljubimov y col.,1998; Kaji y col., 2000) y con edema del estroma asociado con la disociación de las fibras debido a falla en la bomba Na-K endotelial.

En relación con los trastornos histológicos del cristalino, éstos se presentan tanto a nivel de epitelio de la cápsula como de las fibras lenticulares. En el epitelio, las alteraciones se relacionan con trastornos degenerativos (vacuolización), proliferativos (hiperplasia) y

metaplasia siendo estas dos últimas condiciones poco frecuentes (Jubb y col., 1992; Phelps, 2001). En el presente trabajo, los Grupos Exp. III, IV y V (7, 14 y 21 días p.i.) presentaron mayor grado de vacuolización hacia la región ecuatorial. Resultados similares han obtenido Fan y col. (1998), al inducir DM utilizando Estreptozotocina en ratas, quienes observaron vacuolas a los 15 días p.i. Richter y col. (2002), incubando cristalinos de perros en un medio con altas concentraciones de glucosa (30 mmol/l), observaron vacuolas en la región ecuatorial del cristalino a los 7 días post-incubación. En la presente investigación, se detectaron idénticas alteraciones a las señaladas por Richter y col. (2002), lo cual es posible que se relacione con las altas concentraciones de glucosa presentes en humor acuoso.

6.2.- Estudio de laboratorio clínico.

Altas y sostenidas concentraciones de glucosa sanguínea a través del tiempo, constituyen el principal hallazgo en perros diabéticos, caracterizándose porque los valores sobrepasan los 10 mmol/L (Shaer, 1999; Behrend, 2002). En el presente estudio, la glucosa sanguínea determinada a los 7, 14 y 21 d p.i. con Aloxano[®] fue superior a los 10 mmol/L, observándose diferencias significativas ($P < 0.05$) en relación con los valores basales (0 h). Estos resultados están en concordancia con investigaciones realizadas por Wang y Lou (2000), quienes demostraron hiperglicemia sostenida en perros a los 7 y 14 días p.i. utilizando una combinación Aloxano-Estreptozotocina en dosis de 50 mg/kg y 30 mg/kg respectivamente.

En 1980 Black y col. demostraron que la asociación de Aloxano-Estreptozotocina en la dosis señaladas anteriormente, induce hiperglicemia sostenida a partir de las 13 h p.i., sin embargo esta diferencia puede deberse a que la asociación de estos 2 fármacos es capaz de inducir con mayor rapidez DM que la sola utilización de Aloxano[®]. Por otra parte, Zhao y col. (1999), demostraron que la utilización de Aloxano[®] en dosis entre 40 a 60 mg/kg, produce una hiperglicemia sostenida por sobre los 10 mmol/L a partir de los 3 días p.i. El presente estudio no permite señalar el momento exacto en que se produjo la hiperglicemia, debido a que no se determinaron concentraciones de glucosa plasmática entre las 24 h. y los 7 días p.i.

Como se mencionó con anterioridad una de las características mas importantes de la DM es la hiperglicemia sostenida, sin embargo, existen otros cuadros en que esta condición puede desarrollarse. Normalmente, el aumento en las concentraciones de glucosa sanguínea se origina con posterioridad al consumo de alimentos con abundante contenido de carbohidratos (Guyton y Hall, 2002), así como en episodios de estrés severos (Rashid y col, 2000).

Uno de los métodos más utilizados para diferenciar hiperglicemia sostenida y pasajera, es la medición de fructosamina sérica. Ésta, se forma por una reacción no enzimática e irreversible entre la glucosa y una proteína sérica (glicosilación no enzimática), la cual en los perros corresponde generalmente a la albúmina (vida media de 1 a 2 semanas) (Gulikers y Monroe, 2003). La fructosamina se encuentra en pacientes con DM y en individuos sanos, sin embargo, la elevada concentración de glucosa que caracteriza la DM permite la formación de grandes cantidades de fructosamina (González y col, 2000). La principal ventaja de este método (determinación de fructosamina) es que permite obtener valores de glucosa sanguínea sostenida alrededor de 1 a 2 semanas antes del muestreo y no es afectada por las fluctuaciones de glucosa asociadas al estrés o a la ingestión de alimentos (Gulikers y Monroe, 2003; López

2003). Cabe señalar que para realizar una medición correcta de fructosamina sérica, las concentraciones de albúmina deben permanecer dentro de los rangos de referencia para la especie (Kawamoto y col, 1992). Al respecto, las concentraciones de albúmina en los perros en estudio permanecieron dentro de los rangos de referencia para la especie (López, 2003).

Los resultados del presente estudio señalan un incremento en las concentraciones de fructosamina sobre el rango de referencia establecido para la especie, a partir de los 7 d p.i. con Aloxano[®]. El análisis estadístico estableció diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los valores basales (0 h) y los obtenidos a los 7, 14 y 21d p.i. con Aloxano[®]. Estos resultados, permiten confirmar que la hiperglicemia de los grupos en estudio fue de carácter sostenido, y que la necrosis inducida en las células β tuvo como consecuencia una disminución en la producción de insulina.

Un aspecto importante a destacar es que estudios realizados en perros diabéticos, señalan que la hiperglicemia sostenida es un factor importante en la disminución de la secreción de insulina (efecto tóxico de la glucosa). En el año 1948, Lukens y Dohan demostraron que la degeneración hidrópica de las células de los islotes de Langerhans se relacionaba con hiperglicemia permanente, constituyendo un importante factor en la patogénesis de la DM. Por otra parte, Yki-Jarvinen (1992) y Maedler y col. (2002) han señalado que concentraciones de glucosa elevadas y sostenidas en el tiempo son responsables de depleción de células β . Por otra parte, en el año 1988 Imamura y col. mediante la pancreatectomía parcial de perros y posterior mantención de elevadas concentraciones de glucosa, demostraron una importante disminución en el número y tamaño de los islotes de Langerhans. Resultados similares obtuvieron Leahy y Weir (1988) al inducir hiperglicemia sostenida utilizando roedores como modelo animal.

En el presente estudio, los animales del Grupo Experimental presentaron una hiperglicemia sostenida a partir de los 7 d p.i. hasta el final del período experimental (21 d), lo cual permite concluir que las alteraciones observadas en los islotes de Langerhans a partir de los 7 d. p.i. con Aloxano[®] tuvo 2 causas. 1) el efecto tóxico de la droga utilizada y 2) el efecto tóxico de la hiperglicemia sostenida.

En relación con las concentraciones de glucosa en humor acuoso, estas fueron elevadas en los animales correspondientes a los Grupos Experimentales III, IV y V (7, 14 y 21 días p.i.), mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) en relación con el Grupo Control. El incremento de las concentraciones de glucosa en humor acuoso de dichos grupos, estuvo relacionado con el aumento significativo ($P < 0.05$) de las concentraciones de glucosa plasmática. Davies y col. (1984), en un estudio realizado en humanos, demostraron que en los pacientes que padecían DM, las concentraciones de glucosa sanguínea y en humor acuoso también estaban elevadas. DiMattio y col. (1981), indujeron DM Tipo 1 en ratas utilizando Estreptozotocina, y comprobaron que el transporte pasivo de glucosa a través de la barrera ocular se encuentra aumentado tanto hacia el humor acuoso como hacia el humor vítreo, en las ratas a las cuales se les indujo diabetes. Además del aumento en la permeabilidad, Cameron y col. (2001), en un estudio realizado en conejos, demostraron que las concentraciones de

glucosa en humor acuoso aumentan rápidamente en relación a un incremento en la glucosa sanguínea.

Con los antecedentes mencionados y los resultados obtenidos podemos concluir que la hiperglicemia sostenida que caracteriza a la DM, provoca un aumento en las concentraciones de glucosa en humor acuoso. Dicho aumento sigue un patrón de comportamiento muy similar a la concentración de glucosa en sangre.

Finalmente, podemos señalar que en aquellos Grupos Experimentales que presentaron una mayor concentración de glucosa en humor acuoso se pudo observar alteraciones de tipo histológicas tanto en córnea como en cristalino, las cuales fueron mas severas en los Grupos Experimentales con mayor tiempo p.i. con Alozano[®].

7.- CONCLUSIONES

Aloxano[®]

- Utilizando la dosis de 75 mg/kg fue posible la inducción de DM Tipo 1 en los animales del Grupo Experimental

Páncreas.

- La utilización de Aloxano[®] en dosis de 75 mg/kg. no produjo alteraciones macroscópicas (peso y volumen) estadísticamente significativas ($P<0.05$), entre los Grupos Experimentales y el Grupo Control.
- La disminución en el número de islotes de Langerhans producto de la necrosis de las células β y las alteraciones observadas a nivel de los acinos pancreáticos (vacuolización, picnosis y proliferación de conductos) no incidieron en las características macroscópicas anteriormente mencionadas.
- Las concentraciones de glucosa sanguínea, en relación con los valores basales, aumentaron significativamente ($P<0.05$) a partir de los 7 d p.i. con Aloxano[®].
- La disminución en la secreción de insulina se debió a la pérdida de islotes de Langerhans producto de la acción tóxica tanto del Aloxano[®] en dosis de 75 mg/kg como de la hiperglicemia sostenida que se produjo en los Grupos Experimentales durante este estudio.

Ojo

- El examen clínico del globo ocular, reveló que el cristalino no presentó alteraciones macroscópicas. Además de esto, los datos obtenidos durante la medición de la presión intraocular demostraron que esta se mantuvo dentro de los rangos establecidos para la especie, durante todo el período de estudio.
- Se observó un aumento de las concentraciones de glucosa en humor acuoso y la glicemia en los Grupos Experimentales durante todo el período de estudio. Por otra parte, ambas concentraciones presentaron una diferencia significativa ($P<0.05$) a partir de los 7 d p.i. (Exp III), en comparación con las concentraciones basales (glicemia) y con los Grupos Control (Humor acuoso).

- Los Grupos Experimentales que estuvieron expuestos durante más tiempo a las altas concentraciones de glucosa en humor acuoso, presentaron alteraciones a nivel histológico tanto en córnea como cristalino, por lo tanto, la glucosa en humor acuoso en elevadas concentraciones tiene un efecto negativo sobre estas estructuras
- Finalmente, sería conveniente realizar un estudio mas prolongado en DM-1 inducida experimentalmente con Aloxano[®], lo cual permitiría poder conocer alteraciones en aspectos como la PIO y momento en que comienza a generarse opacidad en el cristalino.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Barnett C, Crispin S. 2000. *Oftalmología felina*. Pp 160-175. Editorial Inter-Medica. Buenos Aires, Argentina.
- Baron A, Garvey W, Maianu L, Weldon H, Zhu H, Zhu S. 1995. Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. *J Clin Invest* 96, 2792- 2801.
- Barceló A, Aedo C, Rajpathak S, Robles S. 2003. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bulletin of the World Health Organization* 81, 19-27.
- Basha W, Basha L. 2001. *Atlas color de histología veterinaria*. Pp: 231-246. 2ª edición. Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina.
- Basher AWP, Roberts SM. 1995. Manifestaciones oculares de la diabetes mellitus: cataratas diabéticas en el perro. En: Greco DS Peterson ME. 1995. *Diabetes mellitus. Clínica Veterinaria de Norteamérica. Clínica de pequeños animales*. Pp 685-699. Edit. Interamericana, México.
- Behrend E. 2002. Diabetes Mellitus: an update on oral hypoglycemic agents and monitoring options. *Vet Med* 2, 743-751.
- Black H, Roselum I, Capen C. 1980. Chemically induced (Streptozocin-Alloxan) diabetes mellitus in the dog. Biochemical and ultrastructural studies. *Am J Pathol* 98, 295-305.
- Cameron B, Baba J, Cote G. 2001. Measurement of the glucose transport time delay between the blood and aqueous humor of the eye for the eventual development of a non-invasive glucose sensor. *Diabetes Technol Ther* 3, 209-210.
- Chastain CB, Ganjman VK. 1990. *Endocrinología clínica de los animales de compañía*. Inter-Vet. Buenos Aires.
- Cotran R, Kumar V, Robbins S. 1995. El páncreas endocrino. En: Robbins SL. 1995. *Patología estructural y funcional*. Pp 1004-1024. 5º ed, McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Cubillos V, Paredes E. 1995. *Manual de necropsia en animales domésticos*. Pp: 37-45. Fac. de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

- Cunningham J. 2003. *Fisiología veterinaria*. Pp: 479-486. 3° ed, McGraw-Hill Interamericana. México, D F. México.
- Davidson G. 2000. Providing care for diabetic veterinary patients. *Int J Pharm Comp* 4, 386-389.
- Davies P, Duncan, Pynsent P, Arber D, Lucas V. 1984. Aqueous humor glucose concentration in cataract patients and its effect on the lens. *Exp Eye Res* 39, 605-609.
- DiMattio J, Altszuler N, Ellis S, Zadunaisky J. 1981. Glucose transport across ocular barriers of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes* 30, 903-906.
- Duckworth W, Bennett R, Hamel F. 1998. Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine Reviews* 19, 608-624.
- Dunn JS, Sheenan H, Mcleitchie N. 1943. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* 1, 484-487.
- Engerman L, Kern S. 1986. Hyperglycemia as a cause of diabetic retinopathy. *Metabolism*. 35, 20-23.
- English RV. 1999. Malformaciones congénitas del cristalino. En Morgan RV. 1999. *Clinica de pequeños animales*. Pp 463-467. 3ª ed. Harcourt Brace. Madrid. España.
- Fan W, Yan M, Hu Y, Li G. 1998. The role of epithelium in cataract formation in diabetic rats. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 29, 185-188.
- Feldman E, Nelson R. 2000. *Endocrinología y reproducción en perros y gatos*. 2ª ed, McGraw– Hill Interamericana. México DF. México.
- Figuerola D. 1997. *Diabetes*. Pp:200-210. 3ª Ed. Editorial Masson S.A. Barcelona, España.
- Fleitas A., Carballo R, Almeida G, Quintela AM, Alfonso M. 2000. Modelo experimental de diabetes en conejos. *Rev Cubana Angiol y Circ Vasc* 1, 10-14.
- Fleeman L, Rand J. 2000. Long- term managment the diabetic dog. *J of Waltham Focus* 10, 16-23.
- Fraser C. 2001. *El Manual Merck de Veterinaria*. 5ª ed en español. Grupo Océano. Barcelona, España.
- Fujishima H, Tsubota K. 2002. Improvement or corneal fluorescein staining in post cataract surgery of diabetic patienets by an oral aldose reductase inhibitor, ONO-2235. *Br J of Ophthalm* 86, 860-863.

- Gale E. 2001. The discovery of Type I Diabetes. *Diabetes* 50, 217-225.
- Ganong WF. 1991. *Review of medical physiology, editorial Appleton and Lange*. Pp: 630-645. 15° ed, C. V. México.
- Ganong WF. 1998. *Fisiología medica*. Pp: 640- 647. 16ª ed. El Manual Moderno S. A de C. V. México.
- Gonzales F, Castello P, Gagliardino J, Rossi J. 2000. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al día int* 3, 1-13.
- Gorus F, Weets I, Couck P, Pipeleers D. 2004. Epidemiology of type 1 and type 2. The added value of diabetes registries for conducting clinical studies: the Belgian paradigm. *Acta Clin Belg* 59, 1-13.
- Gulikers K, Monroe W. 2003. Fructosamine and glycosylated hemoglobin concentration. *Vet Med* 98, 1034-1037.
- Guptill L, Glickman L, Glickman N. 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records (1970-1999). *Vet J* 165, 240-247.
- Guyton A., Hall JE. 2001. *Tratado de Fisiología Médica*. 978-992 10ª ed, Mc. Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Hand M, Thatcher C, Remillard R, Roudebush P. 2000. *Nutrición clínica en pequeños animales*. 4ª edición. Panamericana – Formas e Impresos. Santa Fe de Bogotá, Colombia.
- Hanssen. 1997. Blood glucose control and microvascular and macrovascular complication in diabetes. *Diabetes* 46, S1001- S103.
- Haruta T, Morris AJ, Rose AW, Nelson JG, Mueckler M, Olefsky JM. 1995. Insulin stimulated glucose transport is mediated by a divergent signalling pathway. *J Biol Chem* 270, 27991-27994.
- Hennis A, Wu S, Nemesure B, Leske M. 2003. Hypertension, diabetes, and longitudinal changes in intraocular pressure. *Ophthalmology* 110, 908-914
- Herse P. 1990. Corneal hydration control in normal and alloxan-induced diabetics rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 2205-2213.

- Hess R, Kass P, Ward C. 2000. Breed distribution of dog with diabetes mellitus admitted to a tertiary care facility. *J Am Vet Med Assoc* 216, 1414-1417.
- Hoening M, Hall G, Ferguson D, Jordan K, Henson M, Johnson K, O'Brien T. 2000. A feline model of experimentally induced islet amyloidosis. *Am J Pathol* 157, 2143-2150.
- Hoening M. 1995. Pathophysiology of canine diabetes. *Vet Clin North Am* 25, 253-256.
- Hogan P, Dall T, Nikolov P. 2003. Economic cost of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care* 26, 917-932.
- Hosotani H, Ohashi Y, Yamada M, Tsubota K. 1995. Reversal of abnormal corneal epithelial cell morphologic characteristics and reduced corneal sensitivity in diabetic patients by aldose reductase inhibitor, CT-112. *Am J Oph* 119: 288-294.
- Imanura T, Koffler M, Hendelmar J, Prince D, Thirdby R, Inman L, Unger R. 1988. Severe diabetes induced in subtotaly depancreatized dogs by sustained hyperglycemia. *Diabetes* 37, 600-609.
- Johnson K, Hayden D, O'Brien T, Westermarck P. 1986. Spontaneous diabetes mellitus-islet amyloid complex in adult cats. *Am J Pathol* 49, 416-419.
- Jones T, Hunt R, King N. 1997. *Veterinary pathology*. 6th ed, Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- Jubb K, Kennedy P, Palmer N. 1992. *Pathology of domestic animals*. Pp: 461-471. 4^o ed Harcourt Brace and Company. California, USA.
- Junqueira L. 2002. *Histología Básica*. Pp: 444-459. 5^a Edición. Masson. Barcelona, España.
- Kahn N, Acharya K, Bhattacharya S, Acharya R, Mazumder S, Bauman A, Sinha A. 2000. Nitric oxide: the "second messenger" of insulin. *Iubmb Life* 49, 441-450.
- Kaji Y, Usui T, Oshika T, Matsubara M, Yamashita H, Araie M, Toshinori M, Ishibashi T, Nagai R, Horiuchi S, Amano S. 2000. Advanced glycation end products in diabetic corneas. *Invest Ophthal Vis Sci* 41, 362-368.
- Kawamoto M, Kaneko J, Heusner A, Feldman E, Koizumi I. 1992. Relation of fructosamine to serum protein, albumin and glucose concentration in healthy and diabetic dog. *Am J Of Vet Res* 53, 851-855.
- Kerl M. 2001. Diabetic ketoacidosis: pathophysiology and clinical and laboratory presentation. *Compendium* 23, 220-228.

- Kern T, Engerman R. 2001. Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy aminoguanidine and aspirin. *Diabetes* 50, 1636-1642.
- Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, Merola LO. 1979. Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism* 28, 462-469.
- Klein B, Klein R, Moss S 1984. Intraocular pressure in diabetic persons.. *Ophthalmology* 91, 1356-1360.
- Klein B, Klein R, Moss S. 1997. Incidence of self reported glaucoma in people with diabetes mellitus. *Br J Ophthalmol* 81, 743-747.
- Klein S. 2000. El uso de animales en la investigación biomédica. *Revista de divulgación científica y tecnología de la asociación Ciencia Hoy*. 10, 100-107. Barcelona. España.
- Kraus M, Calvert C, Jacobs G, Brown J. 1997. Feline diabetes mellitus: a retrospective study of 55 cats (1982- 1994). *J Am Anim Hosp Assoc* 33,107-111.
- Leahy L. 1990. Natural history of β -cell dysfunction in non insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 13, 988-992.
- Leahy L, Weir C. 1988. Evolution of abnormal insulin secretory responses during 48 hrs. *in vivo* hyperglycaemia. *Diabetes* 37, 217-222.
- Lee J, Oum B, Choi H, Lee J, Cho B. 2005. Differences in corneal thickness and corneal endothelium related to duration in diabetes. *Eye* 15, 1038- 1043.
- Leida M, Green A. 1999. Long-term regulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase by insulin and glucose. *Diabetes* 48, 1691-1697.
- Liu S., Wang W, Luo X, Ye B. 2000. Chemically induced (streptozotocin-alloxan) diabetes mellitus in dogs. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 25, 125-128.
- Ljubimov A, Huang Z, Huang G, Burgeson R, Gullberg D, Miner J, Ninomiya Y, Sado Y, Kenney M. 1998. Human corneal epithelial basement membrane and integrin alteration in diabetes and diabetic retinopathy. *J Hist Cyt* 46, 1033-1041.
- Lukens F, Dohan F. 1948. Experimental diabetes produced by the administration of glucose. *Endocrinology* 42, 244-262.
- López C. 2003. Estudio patológico de la Diabetes Mellitus Tipo I, inducida con Aloxano® en caninos. *Memoria de Titulación M. Sc*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

- Luna LG. 1968. *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3rd ed, Mc Graw-Hill Book Company. USA.
- Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka H, Spinass G, Kaiser N, Halban P, Donath M. 2002. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110, 851-860.
- Mansilla M. 1999. Utilización de fructosamina sérica para el diagnóstico y screening de Diabetes Mellitus en perros. *Memoria de Título M. Sc*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Marmor M, Willeberg P, Clickman L, Priester W, Cypess R, Hurvitz A. 1982. Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in dogs. *Am J Vet Res* 43, 465-470.
- Martin S, Capen C. 1979. The endocrine system. In: E. J. CATTICOTT. *Canine medicine*. 4^a ed, American Veterinary Publication Inc. USA.
- McLetchie N. 2002. History: Alloxan diabetes. *J R Coll Physicians Edinb* 32, 134-142.
- Méndez D, Ramos H. 1994. Animal models in diabetes research. *Arch Med Res* 25, 367-375.
- Miller P. 2001. Glaucoma: diagnosis and therapy. *Small Animal Ophthalmology . Waltham/OSU Symposium*,. Madison, pp: 1-14.
- Ministerio de Salud de Chile. 2004. Protocolo plan AUGE: Diabetes Mellitus. Disponible en: http://www.colegiomedico.cl/archivos/prot%20diabetes_mellitus_tipo_1.pdf. Consultado el 26 Mayo de 2004.
- Munana K. 1995. Long-term complications of diabetes mellitus, part I: retinopathy, nephropathy, neuropathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 25,715-30.
- Narfström K, Bjerkas E, Ekestén B. 1998. Deterioro visual, “cataratas”. En: Peiffer R, Petersen-Jones SM. 1998. *Oftalmología de animales pequeños*. Pp: 85-165. 2^a ed, Intermédica. Buenos aires. Argentina.
- Naya F, Huanf Y, Qiu H, Muo F, DeMayo A, Leiter M, Tsai Y. 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis and abnormal enteroendocrine differentiation in beta2/neuroD-deficient-mice. *Genes Dev* 11, 2323-2334.
- Nelson RW. 1997. Diabetes Mellitus. En: Ettinger SJ, Feldman EC. 1997. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. Pp: 1856. 4^a ed, Inter-Médica. Buenos Aires. Argentina.
- O'brien T. 2002. Pathogenesis of diabetes mellitus feline. *Mol Cell Endocrinol* 197, 213-219.

- OPS, Organización Panamericana de la Salud. 2001. La diabetes en América. Disponible en http://www.paho.org/spanish/sha/be_v22nn2-diabetes.htm. Consultado el 26 de Mayo de 2004.
- Pancieria D. 1990. Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: in 333 cases (1980-1986). *J Am Vet Med Assoc* 197, 1504-1509.
- Peiffer R, Petersen-Jones S. 1998. *Oftalmología de animales pequeños*. Pp: 163. 2ª ed, Intermédica. Buenos Aires- Argentina.
- Pirola L, Johnston M, Obberghen V. 2004. Modulation of insulin action. *Diabetología* 47, 170-184.
- Phelps N. 2001. Mechanism of cataract formation. *J Am Optom Assoc.* 6, 27-33.
- Plotnick A, Greco D. 1995. Diagnosis of diabetes mellitus in dogs and cats. Contrasts and comparisons. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 25, 563-70.
- Ptak W, Klimer M, Bryniarski K, Ptak M, Pajcher M. 1998. Macrophage function in alloxan diabetic mice: expression of adhesion molecules, generation of monokines and oxygen and NO radicals. *Clin Exp Immunol* 114, 13-18.
- Ramos EZ. 1994. Animal models in diabetes research. *Arch Med Res* 25, 367-375.
- Rashid S, Shi Z, Niwa M, Mathoo J, Vandelangeryt M, Bilinski D, Lewis G, Vranic M. 2000. β -Blokade, but not normoglycemia or hyperisulinemia, markedly diminishes stress-induced hyperglycemia in diabetic dogs. *Diabetes* 49, 253-262.
- Rastogi, k., Brubaker P, Kawasaki A, Efendic S, Vranic M. 1993. Increase in somatostatin to glucagon ratio in islets of alloxan-diabetic dogs: effect of insulin-induced euglycemia. *Can J Physiol Pharmacol* 71, 512-517.
- Remillard, R.L. 1999. Nutritional management of diabetic dogs. *Compendium* 21, 699-713.
- Riis, R.C. 1994. Enfermedades del cristalino. En: Kirk WR, Bonagura JD. 1994. *Enfermedades oftalmológicas. Terapéutica veterinarias de pequeños animales*. Pp: 1241-1248. Editorial McGraw-Hill interamericana, Madrid.
- Richtr M, Guscetti F, Spiess B. 2002. Aldose reductase activity and glucose-related opacities in incubated lenses from dogs and cats. *Am J Vet Res* 63, 1591-1597.
- Rosenberg M, Tervo T, Immonen I, Muller L, Gronbagen-Riska C, Vaseluoma M. 2000. Corneal structure and sensivity in type 1 Diabetes Mellitus. *Invest Ophthalm Vis Sci* 41, 2915-2921.

- Salgado D, Reusch C, Spiess B. 2000. Diabetic cataracts: different incidence between dogs and cats. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 142: 349-353.
- Sato H, Terasaki T, Mizuguchi H, Okumura K, Tsuji A. 1991. Receptor-recycling model of clearance and distribution of insulin in the perfused mouse liver. *Diabetologia* 34, 613-621.
- Schaer, M. 1999. Enfermedades del páncreas endocrino (células de los islotes). En: Morgan R. *Clínica de pequeños animales*. Pp: 463-467. 3ª edición. Harcourt Brace. Madrid. España,.
- Shaw J, Boulton A. 1997. The pathogenesis of diabetic foot problems. *Diabetes* 46, S59- S61.
- Schultz R, Matsuda M, Yee R, Edelhauser H, Schultz K. 1984. Corneal endothelial changes in type 1 y type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Oph* 98, 401-410.
- Simon, C. 1997. Diabetes Mellitus: manejo del paciente diabético. *Mevepa* 11, 21-29.
- Small W, Stefansson E, Hatchell L. 1987. Retinal blood flow in normal and diabetic dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28, 672-675.
- Slatter, D. 1991. *Fundamentals of veterinary ophthalmology*. 2nd ed. Saunders edit. USA.
- Stades F, Boevé M, Neumann W, Wyman M. 1999. *Oftalmología clínica veterinaria*. Inter.-Médica. Buenos aires. Argentina .
- Steiner A, Middleton S. 1991. *Fisiología humana*. 4ª ed. Editorial Universitaria. Santiago, Chile.
- Swam P. 1999. Non-retinal ocular changes in diabetes. *Clin Exp Optom* 82, 43-46.
- Tan C, Sano H, Iwaasa H, Pan J, Sailer W, Hreniuk D, Feighner S, Palyha O, Pong S, Figueroa D, Austin C, Jian M, Yu H, Ito J, Ito M, Guan X, Macneil D, Kanatani A, Van L Der Ploeg, Howaard A. 2002. Melanin- concentrating hormone receptor hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics* 79, 785-792.
- Triana M. 2001. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía. *Rev Cubana Angiol Cir Vasc* 2, 131-141.
- Unger R, Foster DW. 1992. Diabetes mellitus. In: Wilson JD, Foster DW (eds). *Textbook of endocrinology*. Pp 1225 8th ed. Philadelphia. USA.

- Vander A, Sherman J, Luciano D. 2001. *Human Physiology: the mechanism of body function*. 8° edition. McGraw-Hill Higher Education. New York, USA.
- WHO, World Health Organization. 2003. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health: Diabetes Mellitus on the world. Disponible en. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/diabetes/en>. Consultado el 26 de mayo de 2004.
- Wyman M. 1979. The eye. In: Cattcott EJ. *Canine Medicine*. 4^a ed, American Veterinary Publication Inc. USA.
- Yamamoto N, Katakami C, Yamamoto M. 1998. Proliferation of corneal epithelial cells in diabetic rats. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 102, 475-480.
- Yki-jarvinen H. 1992. Glucose toxicity. *Endocr rev* 13, 415-431.
- Zhao G, Zhang X, Smith C, Xu X, Ochoa M, Greenhouse D, Vogel T, Curran CH, Hintze TH. 1999. Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes. *Am J Physiol* 277, 268-278.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Valores de presión intraocular (PIO) obtenidos en perros Controles e inducidos con Aloxano®.

GRUPOS	PRESIÓN INTRAOCULAR (mmHg)												
	Valor de Referencia (14-30)												
		BASAL		2 h		24 h		7 d		14 d		21 d	
		I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D
Control	1	30.3	26.0										
	2	32.6	31.4										
	3	30.3	30.1										
	4	29.0	32.6										
	5	30.3	31.4										
Exp I	1	29.0	29.0	29.0	31.4								
	2	26.9	31.4	29.2	30.1								
	3	28.0	23.4	25.1	28.0								
Exp II	1	32.6	26.0	31.4	26.0	27.1	29.0						
	2	17.9	26.0	18.7	26.9	17.5	25.1						
	3	31.6	22.1	29.0	20.7	29.0	19.6						
Exp III	1	19.1	31.4	19.6	32.6	19.6	32.6	18.6	34.1				
	2	28.1	29.0	29.0	26.0	28.0	26.0	27.1	25.1				
	3	30.1	26.0	29.0	26.9	28.0	25.1	26.2	28.0				
Exp IV	1	32.6	26.0	31.4	27.1	30.1	28.0	29.0	28.0	30.3	26.2		
	2	27.1	19.6	28.0	20.7	26.0	20.1	25.1	20.7	24.2	18.2		
	3	26.2	30.1	26.0	29.0	26.0	28.0	27.1	28.0	27.1	25.1		
Exp V	1	25.1	28.0	26.0	26.9	24.2	26.0	23.4	26.0	24.2	26.0	23.4	25.1
	2	29.0	29.0	30.1	28.0	28.0	28.0	28.0	30.1	28.0	28.0	26.0	25.1
	3	25.1	28.1	23.4	28.0	25.1	25.1	24.3	26.0	23.4	26.0	22.7	24.3
Promedio		28.1	28.0	27.3	27.4	26.2	26.6	25.4	27.3	26.2	24.9	24.0	24.8
Desv. Est.		3.9	3.4	3.9	3.2	4.1	3.9	3.1	3.7	2.7	3.4	1.7	0.4

ANEXO 2. Peso y volumen relativo de páncreas de perros Controles e inducidos con Aloxano®.

GRUPOS	Peso relativo(kg) páncreas	Volumen relativo(ml) páncreas
Control	0.0012	0.0015
	0.0027	0.002
	0.0017	0.0019
	0.0027	0.0027
	0.0053	0.0048
Exp I	0.0039	0.0046
	0.0031	0.0038
	0.0045	0.0054
Exp II	0.0023	0.0032
	0.0022	0.0017
	0.0021	0.0023
Exp III	0.0029	0.003
	0.0015	0.0013
	0.0025	0.0026
Exp IV	0.0028	0.0035
	0.0036	0.0035
	0.003	0.0033
Exp V	0.0022	0.0023
	0.0025	0.0029
	0.0034	0.0033

ANEXO 3: Valores obtenidos en la medición del grosor del epitelio corneal en perros Controles.

	GRUPOS				
	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 5
	34,88	35,32	38,93	37,07	35,56
	34,75	34,16	39,06	33,23	35,90
	34,48	34,40	36,58	33,88	34,57
	34,60	33,41	37,43	37,06	32,89
	31,95	34,22	35,15	36,10	35,47
	35,39	34,60	36,84	34,83	32,14
	34,20	37,17	39,40	35,79	30,75
	38,42	35,20	37,60	33,90	33,55
	36,46	38,66	35,60	35,48	35,46
	36,17	40,02	36,13	35,15	36,79
Promedio	35,13	35,72	37,27	35,25	34,31

ANEXO 4: Valores obtenidos en la medición del grosor del epitelio corneal en perros del Grupo Experimental I.

	GRUPOS		
	Exp I - 1	Exp I - 2	Exp I - 3
	42,34	31,31	33,73
	41,71	34,35	32,26
	38,76	36,92	31,15
	35,83	34,83	35,49
	34,27	35,87	35,03
	37,21	37,40	33,18
	34,52	32,37	35,97
	38,16	32,28	34,90
	36,43	32,37	34,78
	36,06	30,89	35,79
Promedio	37,53	33,86	34,23

ANEXO 5: Valores obtenidos en la medición del grosor del epitelio corneal en perros del Grupo Experimental II.

	GRUPOS		
	Exp II – 1	Exp II -2	Exp II -3
	38,37	33,81	34,33
	37,65	35,94	35,29
	35,73	35,19	33,09
	33,44	33,77	33,73
	34,44	34,71	36,59
	35,20	29,71	29,72
	36,09	33,02	32,69
	38,80	31,54	31,86
	39,70	36,37	35,53
	37,01	39,64	34,08
Promedio	36,64	34,37	33,69

ANEXO 6: Valores obtenidos en la medición del grosor del epitelio corneal en perros del Grupo Experimental III.

	GRUPOS		
	Exp III- 1	Exp III - 2	Exp III - 3
	28,15	24,97	27,44
	28,29	22,43	24,82
	26,47	23,25	24,06
	26,16	22,55	25,72
	28,74	20,19	23,59
	25,29	21,15	24,02
	25,72	23,32	23,17
	25,44	22,59	22,34
	24,38	22,95	24,04
	25,81	28,38	25,57
Promedio	26,44	23,18	24,48

ANEXO 7: Valores obtenidos en la medición del grosor del epitelio corneal en perros del Grupo Experimental IV.

	GRUPOS		
	Exp IV - 1	Exp IV- 2	Exp IV- 3
	26,07	24,05	24,60
	27,03	25,56	23,96
	25,34	21,92	19,96
	24,53	23,26	24,85
	25,26	22,95	23,30
	26,04	23,17	20,59
	25,00	22,87	21,04
	23,40	23,90	23,30
	23,66	25,09	24,18
	23,32	24,27	22,37
Promedio	24,96	23,70	22,81

ANEXO 8: Valores obtenidos en la medición del grosor del epitelio corneal en perros del Grupo Experimental V.

	GRUPOS		
	Exp V -1	Exp V -2	Exp V - 3
	19,41	20,32	16,23
	18,93	21,15	14,00
	17,58	21,02	15,36
	17,82	21,87	14,60
	18,63	20,62	17,02
	19,11	20,63	15,67
	19,44	24,60	15,34
	19,60	20,85	16,22
	19,37	19,82	14,09
	20,31	20,23	14,31
Promedio	19,02	21,11	15,28

ANEXO 9. Valores de glucosa plasmática de perros Controles e inducidos con Aloxano®.

GRUPOS		VALORES DE GLUCOSA PLASMÁTICA (mmol/l)					
		Valor de Referencia 3.0-5.0					
		0 h	2 h	24 h	7 d	14 d	21 d
Control	1	5.53					
	2	5.1					
	3	5.32					
	4	5.24					
	5	5.08					
Exp I	1	5.12	4.43				
	2	5.39	4.77				
	3	4.9	4.08				
Exp II	1	5.56	4.49	4.63			
	2	5.04	4.05	3.77			
	3	5.12	4.52	3.29			
Exp III	1	5.23	4.68	3.27	10.24		
	2	4.79	4.03	3.22	38.71		
	3	5.47	4.14	3.07	20.88		
Exp IV	1	5.33	4.37	3.41	21.83	34.79	
	2	5.36	4.26	3.06	25.69	40.65	
	3	5.03	3.98	3.55	41.73	41.27	
Exp V	1	5.02	3.79	3.87	30.01	30.65	26.68
	2	6.26	5	3.58	33.21	32.11	25.79
	3	5.84	5.03	4.51	27.33	21.51	20.16
Promedio		5.2	4.3	3.6	27.7	33.4	24.2
Desv. Est.		0.3	0.3	0.5	9.6	7.3	3.5

ANEXO 10. Valores de Albúmina plasmática de perros Controles e inducidos con Aloxano[®].

GRUPOS		VALORES DE ALBÚMINA PLASMÁTICA (g/l)					
		Valor de Referencia 26-28					
		0 H	2 H	24 H	7 D	14 D	21 D
Control	1	25					
	2	27					
	3	25					
	4	25					
	5	28					
Exp I	1	30	28				
	2	26	26				
	3	25	20				
Exp II	1	28	26	26			
	2	26	28	27			
	3	25	25	27			
Exp III	1	29	28	29	30		
	2	31	29	28	30		
	3	23	25	24	30		
Exp IV	1	35	32	28	25	23	
	2	26	27	26	27	32	
	3	28	25	26	33	37	
Exp V	1	26	24	27	25	29	34
	2	28	27	28	36	29	24
	3	31	27	30	31	24	28
Promedio		27.8	26.4	27.1	29.6	29	28.6
Desv. Est.		2.9	2.5	1.5	3.3	4.7	4.1

ANEXO 11. Valores de fructosamina sérica de perros Controles e inducidos con Aloxano®.

GRUPOS		VALORES DE FRUCTOSAMINA SÉRICA (umol/l)					
		Valor de Referencia 170-338					
		0 h	2 h	24 h	7 d	14 d	21 d
Control	1	263	-	-	-	-	-
	2	210	-	-	-	-	-
	3	258	-	-	-	-	-
	4	228	-	-	-	-	-
	5	240	-	-	-	-	-
Exp I	1	210	208	-	-	-	-
	2	215	217	-	-	-	-
	3	185	198	-	-	-	-
Exp II	1	142	154	139	-	-	-
	2	206	219	213	-	-	-
	3	287	298	298	-	-	-
Exp III	1	215	212	219	397	-	-
	2	202	197	207	505	-	-
	3	197	174	185	379	-	-
Exp IV	1	211	220	214	388	515	-
	2	332	341	330	583	547	-
	3	298	269	289	524	688	-
Exp V	1	278	266	286	376	531	566
	2	228	232	225	495	432	518
	3	190	205	201	501	478	493
Promedio		226.4	227.3	233.8	460.8	531.8	525.6
Desv. Est.		48.5	46.5	52.7	72.2	79.3	30.2

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo quiero agradecer a las siguientes personas que hicieron posible su realización.

Dr. Víctor Cubillos G., profesor patrocinante, por proporcionarme su apoyo, comprensión y orientación constante durante este trabajo.

Dra. Claudia López, por su incansable esfuerzo, incondicional apoyo, gran amistad además de su ayuda en la búsqueda de material bibliográfico y constante orientación en la realización de este trabajo.

Dr. Enrique Paredes, Dr., Manuel Moroni, Dr. Daniel Boroschek y Dr. Roberto Wiegand por su apoyo en la búsqueda de material biológico en este estudio y a Dn. H. Genaro Altear, por su ayuda en los cortes histológicos.

A toda mi familia, a quienes agradezco sus palabras, consejos y todo el infinito apoyo que me proporcionaron durante el tiempo que duro este trabajo.

A Mariana Navia S. por su gran amor, amistad y constante apoyo, con quien siempre puedo contar para escuchar palabras de aliento en aquellos momentos en que se necesitan.

A Heinrich y Gisela, por su gran amistad y apoyo que me proporcionaron en momentos difíciles.

Y finalmente a todo el personal y compañeros del Instituto de Patología Animal, por proporcionarme las herramientas y un ambiente agradable en el cual poder trabajar, Sra. Aintzane Alberdi, Sr. Ignacio Malverde, Srta. Sandra Albornoz y Sr. Guillermo Santibáñez.