

La diabetes mellitus tipo 2 modifica la densidad celular en el cerebro de la rata

Type 2 diabetes mellitus affects cell density in the rat brain

Carol-Victoria Mérida-Portilla¹, Karen Paola Ramos-Riera¹, Ángel Alberto Puig-Lagunes², Luis Beltrán-Parrazal³, Consuelo Morgado-Valle³, María-Leonor López-Meraz³

¹Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana. ²Facultad de Medicina Sede Minatitlán, Universidad Veracruzana. ³Instituto de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana

Recibido: 28 de enero de 2022

Aceptado: 17 de marzo de 2022

Puedes encontrar este artículo en: www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2022/31/31.html

Resumen

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico con alta incidencia mundial que puede afectar la función cerebral. El objetivo de este estudio fue generar DM tipo 2 (DM2) en ratas recién nacidas tratadas con estreptozocina (STZ) y caracterizar su efecto en la densidad celular cerebral. Ratas macho de la cepa Wistar de 3 días de edad se inyectaron subcutáneamente con 100 mg/Kg de STZ; las ratas control se inyectaron con una solución amortiguadora de citratos (vehículo). El peso corporal y la glucemia se monitorearon durante los días postnatales 30, 60 y 90. El porcentaje de la hemoglobina glicada y el conteo de células en el hipocampo, la amígdala, el tálamo y la corteza piriforme (utilizando la tinción de hematoxilina y eosina) se evaluaron en el día postnatal 90. Los resultados mostraron que la glucemia de las ratas STZ incrementó paulatinamente y alcanzó valores mayores a los 200 mg/dL en el día postnatal 90, tiempo en el que también se identificó un mayor porcentaje de hemoglobina glicada. Los conteos celulares mostraron un menor número de células en el núcleo talámico dorsomedial de las ratas STZ en comparación con las ratas control; el resto de las regiones cerebrales evaluadas no mostraron cambios. En conclusión, la DM2 generada por la aplicación de STZ en la etapa neonatal promueve pérdida celular en el tálamo.

Palabras clave: Estreptozocina, diabetes mellitus, cerebro, recién nacido, ratas.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder with a high worldwide incidence that affects brain function. This study aimed to induce type 2 DM (DM2) by applying streptozocin (STZ) in newborn rats to evaluate its effects on brain cell density. Three-day-old Wistar male rats were injected subcutaneously with 100 mg/kg of STZ; matched control rats were injected with citrate buffer. Bodyweight and blood glucose were monitored at 30, 60, and 90 days of age; glycated hemoglobin and cell counting in the hippocampus, amygdala, piriform cortex, and thalamus (by using the hematoxylin and eosin staining) were performed at postnatal day 90. The results showed that the blood glucose of STZ rats gradually increased and reached values higher than 200 mg/dL at postnatal day 90; the percentage of glycated hemoglobin also augmented at that time. STZ rats showed fewer cells in the dorsomedial thalamic nucleus when compared to the control group; no additional changes were observed in other brain regions. In conclusion, DM2 produced by neonatal application of STZ promotes cell loss in the rat thalamus.

Keywords: Streptozotocin, diabetes mellitus, brain, newborn, rats.

*Correspondencia: Dra. María Leonor López-Meraz. Instituto de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas, CP. 91190, Xalapa, Veracruz, México. Correo-e: leonorlopez@uv.mx Tel: + 52 228 8418900 Ext. 13054

Este es un artículo de libre acceso distribuido bajo los términos de la licencia de Creative Commons, (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en algún medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.



I. Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico que afecta a una alta cantidad de personas alrededor del mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2014 el 8.5% de la población adulta tenía diabetes y esta enfermedad fue la causa directa de aproximadamente 1.5 millones de defunciones en el mundo en 2019.¹ La DM se caracteriza principalmente por un incremento en los niveles sanguíneos de glucosa, ya sea por insuficiencia en la secreción o acción de la insulina, o bien debido a ambos mecanismos.² La DM tipo 2 (DM2) es la forma más frecuente de la enfermedad representando entre el 85 y el 90% de los casos de DM a nivel mundial.³ Se estima que para el 2030, la DM será la séptima causa de muerte en el mundo, además de que aumenta el riesgo de presentar comorbilidades tales como infarto al miocardio, ceguera y accidente cerebrovascular.¹ De hecho, la DM2 es un factor de riesgo para presentar daño cerebral, debido entre otros aspectos, a la hiperglucemia crónica, y se relaciona con déficit cognitivo.^{4,5} Sin embargo, se sabe menos sobre las alteraciones que la DM2 promueve per se en el cerebro. A pesar de que la DM es una enfermedad ampliamente estudiada, aún existen numerosos mecanismos implicados en su fisiopatología y en el desarrollo de sus comorbilidades que se desconocen. Lo anterior destaca la importancia del desarrollo de modelos experimentales de DM que permitan generar conocimiento sobre la enfermedad.

Actualmente se dispone de diferentes modelos animales que permiten recrear algunos de los síntomas de la DM que se presentan en humanos, para así poder identificar nuevas alternativas para su prevención y tratamiento. Un modelo animal ampliamente utilizado es el que implica el uso de la estreptozocina (STZ), una toxina aislada de

Streptomyces achromogenes, y cuya molécula está conformada por un grupo nitrosourea unido al carbono 2 de la glucosa.⁶ El mecanismo tóxico de la STZ radica en su capacidad para internalizarse en las células β del páncreas mediante el receptor de glucosa GLUT2 y en su potencial alquilante que produce varios puntos de ruptura tanto en el ADN nuclear como en el mitocondrial.⁷ Este último efecto promueve un deterioro en el metabolismo celular e induce la muerte de las células pancreáticas, lo que en consecuencia conlleva a una falta de producción de insulina y a la elevación de la glucemia.⁶ Cuando la STZ se administra de forma sistémica a roedores adultos en dosis entre 50-200 mg/Kg, se produce una alteración metabólica similar a la DM tipo 1 o insulinodependiente, que resulta de la degeneración generalizada del páncreas y de un aumento dramático en los niveles de glucemia una semana después de la aplicación de la toxina.^{6,8-10} Por el contrario, la administración de STZ en ratas recién nacidas, es uno de los principales modelos que se utiliza para inducir DM2, pues la evidencia muestra que existe una recuperación parcial del páncreas en etapas tempranas del desarrollo, y que los niveles sanguíneos de la glucosa se elevan hasta la etapa adulta.^{11,12} Sin embargo, el modelo de DM2 producido por la administración de STZ en ratas recién nacidas, presenta múltiples variaciones, que incluyen desde el día de aplicación de la toxina, la vía de administración, la dosis empleada, la mortalidad que promueve y los niveles de glucemia alcanzados.¹¹⁻¹⁷ (Tabla 1)

El objetivo del presente estudio fue caracterizar las consecuencias de la DM2 en la densidad celular en el cerebro de la rata. Para este fin, se empleó una adecuación del modelo experimental de DM2 inducido con STZ en ratas macho recién nacidas que permite promover hiperglucemia y baja mortalidad.

Tabla 1. Comparación entre diferentes modelos de diabetes tipo 2 inducidos con estreptozocina en ratas neonatas.

Referencia	Cepa y sexo	Condiciones experimentales (dosis, vía de administración, día de aplicación)	Resultados
11, 12	Wistar, hembras	100mg/kg, i.p., s.c., P2 y P5	Glucemia >200 mg/dL a los dos meses de edad. Se observó daño en el páncreas. No se reportan datos de mortalidad.
13	Wistar, macho	150mg/kg, i.p., P5	Glucemia de 175.9 ± 61.8 mg/dL a los tres meses de edad. Mortalidad del 70% los primeros días después de la administración de STZ.
14	Wistar, sexo no especificado	100mg/kg, i.p., P2	Glucemia de 182mg/dL a los tres meses de edad. No se reportan datos de mortalidad.
15	Wistar, ambos sexos	50mg/kg, i.p., P3	Glucemia de 264.8mg/dL y 365.4mg/dL, a las 12 y 16 semanas de edad, respectivamente. Mortalidad de 10 a 15% después de la aplicación de la STZ.
16	Wistar, hembras	135mg/kg, i.p., P2-P3	Glucemia de 140.52 ± 36.2 mg/dL entre los 80 y 105 días de edad.
17	Wistar, ambos sexos	90mg/kg, i.p., P0	La glucemia mostró tendencia a ser mayor en machos (221.6mg/dL) que en hembras (190.97mg/dL) de tres meses de edad. No se reportan datos de mortalidad.
18	Wistar, ambos sexos	100mg/kg, i.p., P0	Glucemia de 230.6mg/dL a los dos meses de edad. No se reportan datos de mortalidad.
19	Wistar, macho	160mg/kg, i.p., P2	Glucemia >180mg/dL a las 10 semanas posteriores la administración de STZ. No se reportan datos de mortalidad.
20	Wistar, hembras	70mg/kg, i.p., P5	A los tres meses de edad, se detectó hiperglucemia en algunas ratas; a los 4 meses el 100% de las ratas presentaron glucemia de 360 mg/dL. No se reportan datos de mortalidad.
21	Sprague Dawley, macho	90mg/kg, i.p., P2	Glucemia de 190mg/dL a los dos meses de edad en el 30% de las ratas; el resto presentó hiperglucemia moderada. No se reportan datos de mortalidad.

STZ, estreptozocina; i.p., intraperitoneal; s.c., subcutánea; P, día postnatal.

2. Materiales y métodos

2.1. Animales

Ratas adultas hembras y machos de la cepa Wistar se emplearon como pie de cría y las cruces se realizaron en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Cerebrales de la Universidad Veracruzana. El día de nacimiento de las ratas se consideró como el día P0 y las crías se mantuvieron con sus madres hasta el día del destete que se realizó en el día P21. En el día P3 se identificó el sexo de las ratas y las camadas se ajustaron a 10 sujetos (en la mayoría de los casos la proporción de machos y hembras fue 1:1). Las ratas se mantuvieron en condiciones ambientales de temperatura (22-25°C) y humedad relativa (65-75%), con ciclos luz-oscuridad de 12 h (luces se encienden a las 08:00) y con agua y alimento estándar para roedor (*Lab diet*) a libre demanda. Todos los experimentos realizados en este proyecto se realizaron siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de México indicadas en la NOM-062-ZOO-1999, así como *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health* y los lineamientos ARRIVE¹⁸ (Aprobación del CICUAL del Instituto de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana 2018-007).

2.2. Administración de estreptozocina

En el día P3, un grupo de ratas macho seleccionado aleatoriamente se inyectó con 100 mg/kg de STZ (s.c.) disuelta en buffer de citratos pH 4.5 (Grupo STZ, n=9), y otro grupo recibió una inyección subcutánea con un volumen equivalente (50 µl) de buffer de citratos (Grupo Control, n=9). La dosis, la vía y el día de administración de STZ se seleccionaron después de realizar una extensa revisión de estudios que reportaron la mayor supervivencia de las ratas después de la administración de la STZ y los niveles de glucemia superiores a 200 mg/Kg en la etapa adulta de la rata (Tabla 1).^{15,17} El peso corporal de las ratas se registró en los días P30, P60 y P90.

2.3. Determinación de los niveles de glucemia

La concentración de glucosa sanguínea se determinó en sangre capilar en los días P30, P60 y P90. La obtención de la muestra de sangre se realizó en la vena lateral de la cola de las ratas, utilizando una lanceta estéril, con previa asepsia de la zona de muestreo con etanol 70%. Una vez realizada la punción, se recolectó una gota de sangre en una tira reactiva y la concentración de glucosa sanguínea se analizó utilizando un glucómetro portátil (OneTouch UltraMini).

2.4. Determinación de hemoglobina glicada

El porcentaje de hemoglobina glicada se evaluó como un indicador de la elevación sostenida de la glucemia y se determinó por medio de quimioluminiscencia. En el día P90, las ratas se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/Kg, i.p.) y mediante punción intracardiaca se extrajo una muestra de 3 ml de sangre, la cual se colectó en tubos con anticoagulante EDTA. La hemoglobina glicada se determinó por quimioluminiscencia.

2.5. Conteos celulares

En el día P90, un subgrupo de ratas control (n=4) o STZ (n=5) a las que se les anestesió y extrajo sangre cardiaca, se perfundieron transcárdialmente (flujo de 20 ml/min, la temperatura de las soluciones fue de 4°C) con NaCl 0.9% y paraformaldehído 4% (preparado en una solución de fosfatos 0.1 M, pH 7.4). Posteriormente, los cerebros se separaron, se deshidrataron en etanol a concentraciones crecientes y xilol y se incluyeron en bloques de parafina. Los cerebros se cortaron en secciones coronales de 10 µm de espesor a nivel del hipocampo dorsal (3.6 mm posterior a bregma¹⁹) y se montaron en portaobjetos gelatinizados. La tinción de hematoxilina-eosina propuesta por Sankar y colaboradores²⁰ se empleó para estimar el número de células presentes en diferentes regiones cerebrales. Esta tinción diferencial permite además identificar neuronas que están irreversiblemente dañadas y que se caracterizan

por colorearse de rosa intenso (eosinofílicas) y presentar cambios en la morfología nuclear (picnosis y cariorexísis),²⁰ sugerentes de muerte celular. Se realizó un análisis semi-automatizado utilizando un microscopio óptico Leica (DM500 acoplado a una cámara digital ICC50 HD) y el programa Fiji ImageJ.²¹ Las regiones cerebrales que se evaluaron fueron el hipocampo, el tálamo y la amígdala. Para el caso de la capa piramidal de CA1, CA2 y CA3 del hipocampo y la capa II de la corteza piriforme, el área analizada fue de 20,000 μm^2 (10,000 μm^2 por hemisferio cerebral), mientras que para los núcleos dorsomedial del tálamo y basolateral de la amígdala fue de 80,000 μm^2 (40,000 μm^2 por hemisferio). El conteo se realizó bilateralmente en 4 secciones coronales consecutivas para cada rata; los datos que se presentan corresponden al promedio obtenido de los 4 cortes para cada región cerebral analizada.

2.6. Análisis estadístico

Se identificó el tipo de variable y la distribución que mostraban los datos para verificar si cumplían los supuestos de normalidad. En función de lo anterior, se seleccionaron las siguientes pruebas estadísticas: Para identificar diferencias entre las ratas tratadas con STZ y las ratas control en el peso corporal y los niveles de glucemia a lo largo del estudio, se empleó una Anova de dos vías para muestras repetidas, considerando los factores tratamiento (STZ y control) y tiempo de análisis (P30, P60 y P90), seguida de ser en caso, de una

prueba post-hoc de Sidak. Para comparar los porcentajes de hemoglobina glicada se empleó la prueba t de Student para datos no pareados. Para identificar diferencias en el conteo de células cerebrales en cada región analizada se realizó una prueba U de Mann Whitney para muestras independientes. Los análisis se realizaron con el programa Prisma Graph Pad version 6.0h (GraphPad Software Inc.) y se consideró una diferencia estadística cuando $p < 0.05$.

3. Resultados

El análisis estadístico mostró que existe diferencia en las mediciones de glucosa sanguínea debida al tratamiento [$F(1, 8) = 14.35$; $p = 0.0053$], pero no se identificaron cambios debido al tiempo de análisis [$F(2, 16) = 2.735$, $p = 0.09$]. Sin embargo, sí existió una interacción entre el tratamiento y el tiempo de análisis [$F(2, 16) = 3.8$; $p < 0.05$]. El grupo tratado con STZ presentó un incremento en los niveles de glucemia en el día P90 ($p < 0.05$) con respecto a las mediciones del mismo grupo en P30 y P60. No obstante, la concentración de glucosa fue mayor en las ratas STZ en comparación con las ratas del grupo control únicamente en el día P90 ($p = 0.0005$) (Figura 1A). Cuando se analizó el porcentaje de la hemoglobina glicada en P90, el grupo STZ presentó un aumento del 18.8% de este parámetro ($t = 21.60$, $p < 0.001$) con respecto al grupo control (Figura 1B).

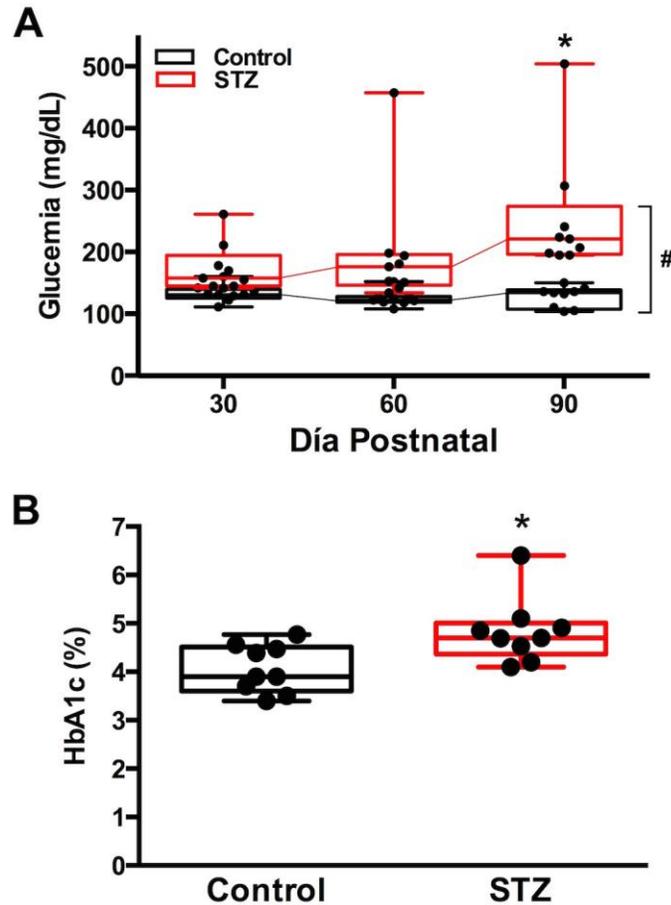


Figura 1. Curso temporal de los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de ratas a las que se les administró estreptozocina (STZ) o vehículo (control) durante el día postnatal (P) 3 (A). La hemoglobina glicada se evaluó en el día P90 para ambos grupos experimentales (B). Los datos de cada grupo experimental se representan como cajas y alambres y los puntos corresponden a los valores individuales. El curso temporal de la glucemia se analizó con una Anova de dos vías para muestras repetidas, seguido de la prueba post-hoc de Sidak. * $p < 0.05$, diferencia en P90 vs P30 y P60 en el grupo STZ; # $p < 0.05$, diferencia entre el grupo STZ y el grupo control en P90. El porcentaje de hemoglobina glicada se analizó mediante la prueba t de Student, * $p < 0.0001$ vs el grupo control.

Por otro lado, el análisis de varianza identificó diferencias en el peso corporal de las ratas debido al tratamiento [$F(1, 8) = 16.8$; $p < 0.0034$] y al tiempo de evaluación [$F(2, 16) = 999.7$; $p < 0.0001$], mismo que se relaciona con la edad de la rata, pero no hubo una interacción entre el tratamiento y el

tiempo de estudio en este parámetro [$F(2, 16) = 1.814$, $p = 0.1949$]. Las ratas diabéticas mostraron menor peso corporal que los respectivos controles (Tabla 2). Es importante destacar que la mortalidad fue nula bajo estas condiciones experimentales.

Tabla 2. Peso corporal de ratas a las que se les administró estreptozocina o vehículo neonatalmente.

Día postnatal	Control	STZ	Promedio por día postnatal
30	97.3±1.5	78.3±1.6	87.9±2.5*
60	299.0±4.8	262.9±5.7	281±5.7*
90	401.1±11.1	369.4±10.5	385.2±8.4*
Promedio por tratamiento	265.8±25.1	236.9±23.9&	

Los datos muestran los valores de peso corporal (g) en ratas tratadas con estreptozocina (STZ, n=9) o vehículo (Control, n=9). Los datos se expresan como la media ± E.E.M. El Anova de dos vías para muestras repetidas mostró diferencias debido al tratamiento (&p<0.0034) y al tiempo de evaluación o edad de las ratas (*p<0.0001 diferencias con respecto a las otras edades), pero no como resultado de la interacción entre ambos factores (p=0.1949).

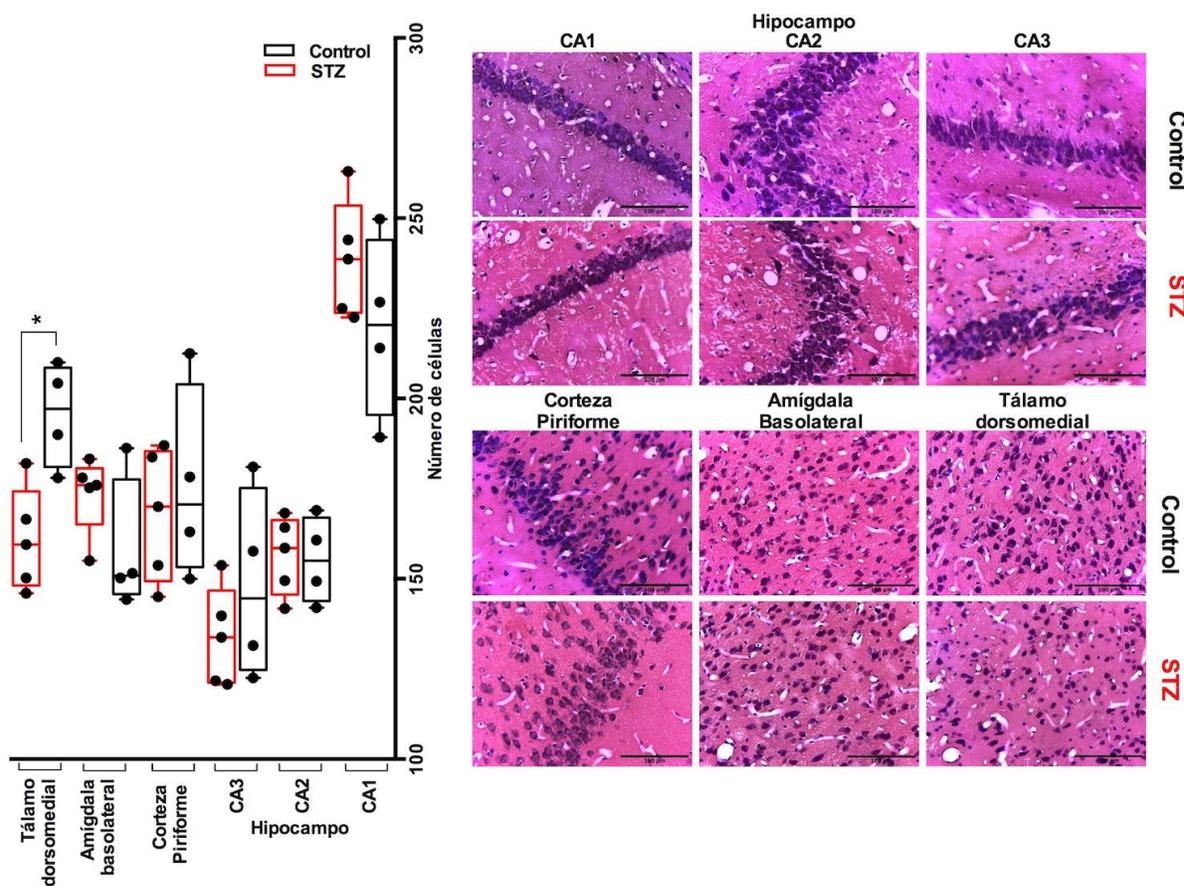


Figura 2. Número de células en el hipocampo dorsal (capas piramidales de CA1, CA2 y CA3), el núcleo amigdalino basolateral, la corteza piriforme y el núcleo talámico dorsomedial de ratas a las que se les administró estreptozocina (STZ) o el vehículo (control) durante el día postnatal (P) 3. Los resultados de cada grupo experimental se representan como cajas y alambres y los puntos corresponden a los valores individuales. Se realizó una prueba U de Mann Whitney para muestras independientes. *p<0.05 vs el grupo control.

En ambos grupos experimentales se identificaron células con somas definidos sin evidencia de hinchazón o picnosis y núcleos con gránulos de cromatina que ocupan la mayor parte del citoplasma. No se observaron células eosinofílicas con núcleos picnóticos o fragmentados sugerentes de daño celular. Los conteos celulares mostraron un número similar de células en las capas CA1 (U=6, p=0.4127), CA2 (U=10, p>0.9999) y CA3 (U=6, p=0.4127) del hipocampo dorsal, así como en la amígdala basolateral (U=5, p=0.2857) y la corteza piriforme (U=9, p=0.9048) de las ratas control y ratas las tratadas con STZ. Sin embargo, se detectó un menor número de células en el núcleo talámico dorsomedial de las ratas STZ en comparación con las ratas control (U=1, p=0.0317) (Figura 2).

4. Discusión

La DM2 es una enfermedad metabólica crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC). Los resultados de nuestro estudio mostraron que las ratas con DM2 presentan un menor número de células en el núcleo talámico dorsomedial. Estos hallazgos sugieren que la DM2 podría promover cambios bioquímicos que conlleven eventualmente a la pérdida neuronal.

Los resultados mostraron que las ratas que fueron tratadas con STZ en el P3 mostraron un incremento paulatino en la concentración de glucosa en sangre a lo largo del tiempo, el cual resultó mayor al observado en las ratas control en P60, pero que alcanzó valores por arriba de los 200 mg/dL hasta el día P90. En el estudio realizado por Arulmozhi y colaboradores²³ se reportó que a pesar de que existe una destrucción de las células β del páncreas después de administrar STZ, cuando la administración se realiza poco después del nacimiento (etapa neonatal) el páncreas muestra una recuperación celular parcial, que al parecer está determinada por la mitosis que realizan las células supervivientes y no por regeneración de novo. Esta recuperación se presenta en 40% de células β en comparación

con el grupo control, lo que significa menor una menor producción de insulina, lo que conduce a una posterior elevación de la glucemia en la rata.^{17,24} Se sabe que la capacidad de regeneración del páncreas en ratas de la cepa Wistar disminuye durante la primera semana de vida,²⁵⁻²⁹ por lo que es importante considerar que mientras más temprano se realice la administración de la STZ existe una mayor posibilidad de regeneración del páncreas. Lo anterior aumenta la probabilidad de supervivencia del recién nacido, pero también la probabilidad de no presentar niveles incrementados de glucosa. Es por esto que en el presente estudio se eligió el día P3 como el día de administración de la STZ.¹⁵ En el trabajo de Bequer y colaboradores¹² se comparó el efecto de la administración de STZ en los días P2 y P5; los resultados mostraron que cuando la toxina se aplicó en el P5 la mortalidad de los animales fue del 95%, mientras que cuando se realizó en P2 era del 0%. Sin embargo, los niveles de glucemia en la etapa adulta de las ratas tratadas en el día P2 fluctuaron y el valor máximo alcanzado a las 12 semanas del estudio fue de 153 mg/dL. Al comparar dichos resultados con los obtenidos en este estudio, identificamos que la aplicación de la STZ en P3 tiene la ventaja de promover el mismo porcentaje de supervivencia que cuando se realiza en el P2, pero con valores mayores de glucemia y de hemoglobina glicada en la etapa adulta.

Estudios previos reconocen que la administración de STZ en las ratas recién nacidas, es un modelo experimental adecuado para la inducción de DM2, debido a que la rata no solamente presenta síntomas como hiperglucemia y valores incrementados de hemoglobina glicada,^{6,12} sino que también modela la resistencia por parte de los receptores de insulina,²⁸ una de las características más relevantes de este tipo de DM, así como desequilibrios metabólicos en lípidos y proteínas consecuencia de la resistencia a la insulina.^{29,30} Por lo tanto, establecer las condiciones experimentales precisas del modelo, tales como el día de

aplicación, la dosis y la vía de administración, así como identificar el momento en el que se presenta la hiperglucemia es de suma importancia para continuar generando conocimiento sobre la fisiopatología de la DM2. Además, apoya la búsqueda de terapias para contrarrestar la enfermedad y sus comorbilidades, tales como el infarto al miocardio, el accidente cerebrovascular, la retinopatía y la neuropatía diabéticas y la insuficiencia renal que afectan a las personas con DM.¹ A nivel experimental repercute positivamente en los aspectos éticos del manejo de animales de laboratorio, pues la reducción del número de sujetos de estudio empleados y la refinación de los procedimientos realizados de los modelos son críticos en la investigación biomédica.³¹

Por otra parte, una de las características de la DM2 es una disminución en el peso corporal de quien la padece, que además puede relacionarse con un mayor riesgo de presentar complicaciones.²² Nuestros resultados revelaron que las ratas tratadas con STZ presentaron un menor peso corporal que las ratas control. Este resultado concuerda con una menor ganancia de peso que se reportó previamente en ratas hembra de 6, 8 y 12 semanas de edad tratadas con STZ en las primeras 48 y 72 h de vida.¹⁶ En nuestro estudio no detectamos diferencias en el peso corporal debido a la interacción entre el tratamiento y el tiempo de análisis, lo que podría deberse a que se realizó un análisis longitudinal que implicó los primeros 3 meses de vida de la rata, periodo durante el cual hay francas diferencias en el peso corporal debido a su desarrollo normal de la rata. Adicionalmente, no debe olvidarse que el deterioro corporal debido a la DM2 se presenta a lo largo del tiempo y nuestras ratas presentaron un aumento de la glucemia a partir del día postnatal 90.

Con la finalidad de identificar si la DM2 producía cambios en la neurobiología cerebral, se realizó un análisis para determinar cambios en el número de células, presumiblemente neuronas, en algunos núcleos y regiones cerebrales de la rata. Se identificó que, de las regiones evaluadas, sólo

el núcleo talámico dorsal mostró una reducción en el conteo celular. En un estudio previo se reportó que la DM tipo I inducida por STZ y aplicada de forma sistémica en ratas macho adultas no promovió diferencias en el número de neuronas hipocámpales de las regiones CA3, CA1, el hilio o el giro dentado.⁶ En contraste, se sabe que la aplicación intracerebroventricular de STZ promueve neurodegeneración en regiones cerebrales como el hipocampo, el hipotálamo y el área septal,³² así como alteraciones bioquímicas y neuropatológicas similares a lo observado en la enfermedad de Alzheimer.³³ Las diferencias entre ambos abordajes experimentales puede deberse al sitio de aplicación de la STZ (directamente o no al cerebro), la edad a la cual se desarrolle el modelo, la capacidad de la STZ para atravesar la barrera hematoencefálica, y por supuesto al proceso fisiopatológico de la aparición de la DM2. Sin embargo, no existe información adicional disponible sobre las consecuencias de estos abordajes cerebrales en el tálamo. Recientemente se reportó que personas con DM2 presentan una reducción en la cantidad de material gris (considerada como daño cerebral) en diferentes regiones del encéfalo incluyendo la corteza prefrontal, el hipocampo, la amígdala, el núcleo caudado, la corteza cerebelar y el tálamo.³⁸ Si bien, en nuestro estudio sólo identificamos un menor conteo en el tálamo, esta región podría tener una mayor susceptibilidad a los cambios fisiopatológicos que se presentan en la DM2. De hecho, en personas con DM2 existe una menor conectividad funcional tálamo-cortical que se relaciona con déficit cognitivo; sin embargo, los autores del estudio describen la ausencia de daño estructural en el tálamo.³⁹ Nuestros resultados sugieren que en la rata, el desarrollo de la DM2 se acompaña de pérdida celular, presumiblemente neuronal, en el tálamo, aunque se desconoce el mecanismo que determina este proceso. Se desconoce por qué el tálamo resultó ser más sensible a los efectos de la DM2, pero este fenómeno puede estar relacionado con los cambios en la bioquímica cerebral promovidos por la DM2, como la producción

de productos de glicación avanzada, neuroinflamación, disfunción mitocondrial y estrés oxidante, así como una alteración en la homeostasis de calcio,⁴⁰⁻⁴² que promuevan un proceso neurodegenerativo y eventualmente la pérdida neuronal. Una limitante de nuestro estudio es su diseño transversal y el tiempo limitado que las ratas vivieron con DM2. Sin embargo, a partir de estos hallazgos se pueden diseñar investigaciones futuras para caracterizar los mecanismos celulares implicados en el efecto descrito.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio muestran que la DM2 promueve pérdida celular en el tálamo cerebral. El empleo de modelos experimentales de esta enfermedad es relevante para conocer los mecanismos a través de los cuales la DM2 puede desencadenar o promover pérdida neuronal.

5. Financiamiento

CVMP recibió una beca para estudios de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (249772).

6. Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

7. Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Diabetes. [Fecha de consulta: 1 de marzo del 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
2. American Diabetes Association. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care. 2019 42: (Supplement 1): S1-S2.
3. Organización Panamericana de Diabetes. Diabetes. [Fecha de consulta: 1 de marzo del 2022]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&id=4475&layout=blog&Itemid=40610&lang=es&limitstart=15#:~:text=La%20diabetes%20tipo%202%20es,cal%C3%B3rico%20de%20bajo%20valor%20nutricional
4. Hamed SA. Brain injury with diabetes mellitus: evidence, mechanisms and treatment implications. Expert Rev Clin Pharmacol 2017 10(4):409-428.
5. Cho SE, Roy B, Freeby M, Mullur R, Woo MA, Kumar R. Prefrontal cortex brain damage and glycemic control in patients with type 2 diabetes. J Diabetes 2020 12(6):465-473.
6. Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. Diabetologia 2008 51(2):216–226.
7. Tjälve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. J Endocrinol 1976 69(3):455-6.
8. Huang CW, Cheng JT, Tsai JJ, Wu SN, Huang CC. Diabetic hyperglycemia aggravates seizures and status epilepticus-induced hippocampal damage. Neurotox Res 2009 15(1):71-81.
9. Merzouk H, Madani S, Sari DC, Prost J, Bouchenak M, Belleville J. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. Clin Sci 2000 98(1):21–30.
10. Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, Netto AO, Dallaqua B, Gallego FQ, et al. Mild Diabetes Models and Their Maternal-Fetal Repercussions. J Diabetes Res 2013 1-9.
11. Bequer L, Gómez T, Molina J. L, López F, Gómez CL, Clapés S. Inducción de hiperglucemias moderadas en ratas wistar por inoculación neonatal de estreptozotocina. ¿inyección subcutánea o intraperitoneal?. Rev. Argent. Endocrinol Met 2014 51(4):178-184.
12. Bequer L, Gómez T, Molina J L, Artiles D, Bermúdez R, Clapés S. Acción de la

- estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomédica* 2016 36:230-238.
13. Takada J, Machado M, Peres S, Brito L C, Borges Silva C, Costa C, et al. Neonatal streptozotocin induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism* 2007 56(7):977-984.
 14. Bolkent S, Akev N, Can A, Yanardag R, Okyar A. Immunohistochemical studies on the effect of Aloe vera on the pancreatic β -cells in neonatal streptozotocin-induced type-II diabetic rats. *Egyptian Journal of Biology* 2005 7:14-19.
 15. Ghule AE, Jadhav SS, Bodhankar S. Trigonelline ameliorates diabetic hypertensive nephropathy by suppression of oxidative stress in kidney and reduction in renal cell apoptosis and fibrosis in streptozotocin induced neonatal diabetic (nSTZ) rats. *Int Immunopharmacology* 2012 14(4):740-748.
 16. Figueroa C, Pérez IH, Mejía R. Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Rev MVZ Córdoba* 2013 18(Supl): 3699-3707.
 17. Bačová Z, Najvirtová M, Križanová O, Hudecová S, Zorad S, Štrbák V, et al. Effect of Neonatal Streptozotocin and Thyrotropin-Releasing Hormone Treatments on Insulin Secretion in Adult Rats. *Gen. Physiol Biophys* 2005 24(2): 181-197.
 18. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLOS Biol* 2010 8(6): e1000412.
 19. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier. China. 2007 pp 106.
 20. Sankar R, Shin DH, Wasterlain CG. Serum neuron-specific enolase is a marker for neuronal damage following status epilepticus in the rat. *Epilepsy Res* 1997 28(2):129-136.
 21. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012 9(7):676-682.
 22. Yang S, Wang S, Yang B, Zheng J, Cai Y, Yang Z. Weight loss before a diagnosis of type 2 diabetes mellitus is a risk factor for diabetes complications. *Medicine (Baltimore)* 2016 95(49):e5618.
 23. Arulmozhi DK, Veeranjanyulu A, Bodhankar SL. Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: A glance. *Indian J Pharmacol* 2004 36:217-21.
 24. Weir GC, Leahy JL, Bonner W. Experimental Reduction of B-Cell Mass: Implications for the Pathogenesis of Diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1986 2(1-2):125-161.
 25. Bonnier-Weir S, Trent DE, Honey RN, Weir GC. Response to neonatal islets to streptozotocin: Limited β cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* 1981 30(1):64-69.
 26. Bonnier-Weir S, Trent D F, Zmachinski C J, Clore E T, Weir G C. Limited β cell regeneration in a β cell deficient rat model: studies with dexamethasone. *Metabolism* 1981 30(9):914-918.
 27. Portha B, Picolon L, Rosselin G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 1979 17(6):371-377.
 28. Blondel O, Bailbe D, Portha B. Insulin Resistance in Rats With Non-Insulin-Dependent Diabetes Induced by Neonatal (5 Days) Streptozotocin: Evidence for Reversal Following Phlorizin Treatment. *Metabolism* 1990 39(8): 787-793.
 29. Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, Chen MJ, Mathers JC, Taylor R. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia* 2011 54(10):2506-2514.

30. McCaffery JM, Jablonski KA, Franks PW, Dagogo J, Wing RR, Knowler WC et al. TCF7L2 polymorphism, weight loss and proinsulin: insulin ratio in the diabetes prevention program. *PLoS One* 2011 6(7): e21518.
31. Tanner R. The 3Rs: What are Medical Scientists Doing about Animal Testing? *Front. Young Minds* 2018 6:44.
32. Santos TO, Mazucanti CH, Xavier GF, Torrão AS. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. *Physiol Behav* 2012 107(3):401-13.
33. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Mol Neurobiol* 2016 53(3):1741-1752.
34. Tourrel C, Bailbe D, Meile M, Kergoat M, Bernard Portha B. Glucagon-Like Peptide-1 and Exendin-4 Stimulate Cell Neogenesis in Streptozotocin-Treated Newborn Rats Resulting in Persistently Improved Glucose Homeostasis at Adult Age. *Diabetes* 2001 50: 1562-70.
35. Sartoretto JL, Melo GA, Carvalho MH, Nigro D, Passaglia RT, Scavone C, Cuman RK, Fortes ZB. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sci* 2005 77(21):2676-89.
36. Sinzato Y, Ortiz PH, De Campos K, Inhasz KAC, Cunha RMV, Damasceno DC. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status In adult rats. *Rev Assoc Med Bras* 2009 55(4): 384-8.
37. Madhoosudan AP, Suryanarayana P, Kumar Putcha U, Srinivas M, Bhanuprakash RG. Evaluation of Neonatal Streptozotocin Induced Diabetic Rat Model for the Development of Cataract. *Oxid Med and Cell Longev* 2014 2014:463264.
38. Roy B, Ehlert L, Mullur R, Freeby MJ, Woo MA, Kumar R, Choi S. Regional Brain Gray Matter Changes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci Rep* 2020 10(1):9925.
39. Chen YC, Xia W, Qian C, Ding J, Ju S, Teng GJ. Thalamic resting-state functional connectivity: disruption in patients with type 2 diabetes. *Metab Brain Dis* 2015 30(5):1227-36.
40. Guerrero-Berroa E, Schmeidler J, Beeri MS. Neuropathology of type 2 diabetes: a short review on insulin-related mechanisms. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014 24(12):1961-6.
41. Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2015 84:22-38.
42. Bathina S, Srinivas N, Das UN. Streptozotocin produces oxidative stress, inflammation and decreases BDNF concentrations to induce apoptosis of RIN5F cells and type 2 diabetes mellitus in Wistar rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2017 486(2):406-413.