

Posgrado en Ciencias Biológicas

Universidad Autónoma de Tlaxcala

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



Evolución de signos conductuales y
neurofisiológicos de disfunciones urinarias y
sexuales en ratas macho con diabetes mellitus
tipo 2 inducido por estreptozotocina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Diego Arturo Zacapa López

Directora de tesis

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Co-directora de tesis

Dra. Margarita Juárez Romero

Tlaxcala, Tlax.

Octubre, 2018

Posgrado en Ciencias Biológicas

Universidad Autónoma de Tlaxcala

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



Evolución de signos conductuales y neurofisiológicos de disfunciones urinarias y sexuales en ratas macho con diabetes mellitus tipo 2 inducido por estreptozotocina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Diego Arturo Zacapa López

Comité Tutorial

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Dra. Margarita Juárez Romero

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Tlaxcala, Tlax.

Octubre, 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Diego Arturo Zacapa López** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Evolución de signos conductuales y neurofisiológicos de disfunciones urinarias y sexuales en ratas macho con diabetes mellitus tipo 2 inducidos por estreptozotocina”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 16 DE 2018

DRA. YOLADA CRUZ GÓMEZ

DRA. MARGARITA JUÁREZ ROMERO

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

DR. JOSÉ RAMÓN EGUIBAR CUENCA

DR. ALVARO MUÑOZ TOSCANO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



La presente tesis se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), en el laboratorio de Neurofisiología bajo la dirección de la Dra. Yolanda Cruz Gómez, en co-dirección con la Dra. Margarita Juárez Romero.

El proyecto se desarrolló dentro del programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, el cual está incorporado al Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional de Calidad. Padrón Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC).

El proyecto contó con el financiamiento del CONACyT (Proyecto: YCG-183446; Beca: DAZL-780079) y de la Universidad Autónoma de Tlaxcala con el Cuerpo Académico de Fisiología del Área Pélvica.

Resumen

La Diabetes mellitus es un desorden metabólico considerado como un problema de salud pública a nivel mundial. Se caracteriza por inducir síntomas tales como poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. La hiperglicemia crónica lesiona múltiples órganos y sistemas, entre ellos el aparato genitourinario. El objetivo de la presente tesis fue caracterizar la evolución de los signos conductuales de disfunciones urinarias y sexuales en rata macho diabéticas y la actividad electromiográfica de los músculos periuretrales. Para ello se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, a quienes se les registró la conducta de micción (12 horas, 6 en luz y 6 en oscuridad), la conducta sexual (dos series) y la actividad electromiográfica (EMG) refleja de los músculos periuretrales previo y posterior a la inducción de diabetes con estreptozotocina (60 mg/Kg, Grupo Diabético), o de tratamiento testigo (buffer de citratos, Grupo Vehículo). La confirmación de la diabetes se realizó mediante una prueba de glicemia realizada 72 horas después de la aplicación de estreptozotocina. Los animales con concentraciones de glucosa ≥ 200 mg/dL fueron considerados como diabéticos.

Los resultados mostraron que las alteraciones en la micción de los animales diabéticos se inician desde el día 4 postratamiento. Las alteraciones se caracterizaron por un incremento en los valores de los parámetros de volumen de orina por micción (pretratamiento 0.54 mL en la fase oscura vs 1.22 mL postratamiento; pretratamiento en la de luz 1.34 mL vs 1.76 mL postratamiento); ingesta de agua (postratamiento aumentó 97% en la fase oscura y 360% en fase de luz); duración de la micción (en la fase oscura 2.5 s pretratamiento vs 4 s postratamiento y en la fase de luz 3.8 pretratamiento vs > 6 s postratamiento) y el flujo de orina (aumentó con el tratamiento de 0.19 mL/s a >0.4 mL/s en la fase oscura y de 0.28 mL/s a > 0.4 mL/s en la fase de luz). El incremento en los valores de los parámetros urinarios se mantuvo hasta el día 90.

La diabetes alteró la conducta de micción; pretratamiento los animales presentaron conducta estereotipada de micción y postratamiento hubo micciones pausadas, o emisión de orina en ausencia de la conducta de micción. El porcentaje de animales afectados aumentó progresivamente a lo largo del estudio.

Con respecto a la conducta sexual, el porcentaje de animales copuladores disminuyó progresivamente a partir del día 16, de tal forma que al día 91 sólo el 25% de los animales

copularon, sin embargo, los animales que mostraron conducta sexual no tuvieron alterados los valores de los parámetros copulatorios.

La diabetes también afectó la actividad refleja de la musculatura periuretral. Tanto la amplitud como la frecuencia de la actividad EMG de los músculos esfínter externo de la uretra y bulboesponjoso disminuyeron.

En conclusión, las alteraciones urinarias secundarias a la diabetes mellitus anteceden a las alteraciones sexuales. De éstas últimas, la más notoria es la abolición de la conducta sexual. Conforme evoluciona la enfermedad aparecen disfunciones de la actividad de la musculatura estriada periuretral. Sin embargo, aún se requieren más estudios para determinar si hay disminución en el número de fibras musculares y/o de las unidades motoras, así como discernir si la alteración es propiamente nerviosa.

Índice

1	Introducción	1
2	Antecedentes	3
	2.1 Anatomía del aparato urogenital de la rata macho	3
	2.2 Fisiología del aparato urogenital de la rata macho.....	4
	2.3 Tipos y modelos de inducción de DM en animales	6
3	Justificación	8
4	Preguntas de investigación	8
5	Hipótesis	8
6	Objetivo general	9
7	Objetivos específicos	9
8	Material y métodos	9
	8.1 Diseño experimental	9
	8.2 Animales.....	10
	8.3 Inducción de DM	11
	8.4 Entrenamiento y evaluación de la conducta sexual.....	12
	8.5 Evaluación de la conducta de micción	14
	8.6 Evaluación de la actividad electromiográfica refleja de los músculos EEU y BE.....	16
	8.7 Análisis estadístico	18
9	Resultados	19
	9.1 Función urinaria	19
	9.1.1 Conducta de micción.....	20
	9.1.2 Frecuencia de micción.....	22
	9.1.3 Intervalo intermicción	25
	9.1.4 Volumen de micción	27
	9.1.5 Volumen total de orina	29
	9.1.6 Ingesta de agua.....	31
	9.1.7 Duración de micción	33
	9.1.8 Flujo de orina	35
	9.2 Función sexual.....	37
	9.2.1 Conducta sexual	37

9.2.1 Latencia de monta.....	38
9.2.2 Número de montas	40
9.2.3 Latencia de intromisión.....	42
9.2.4 Número de intromisiones	44
9.2.5 Latencia de eyaculación	46
9.3 Peso corporal.....	48
9.4 Electromiografía	50
10. Discusión.....	59
11. Conclusiones y perspectivas	64
12. Referencias	65
13. Anexo	I
13.1 Prevalencia de la Diabetes mellitus	I
13.2 Clasificación.....	I
13.2.1Prediabetes	II
13.2.2Diabetes tipo 1	III
13.2.3 Diabetes idiopática.....	IV
13.2.4 Diabetes tipo 2	IV
13.2.5 Diabetes Gestacional.....	VI
13.2.6 Diabetes debida a Síndromes monogénicos (DMSM).....	VI
13.2.7 Diabetes neonatal	VII
13.2.8 Diabetes del adulto de inicio en la juventud (MODY).....	VII
13.2.9 Fibrosis quística relacionada con diabetes.....	VII
13.3 Criterios diagnósticos	VIII
13.4 Estandarización de la dosis para la inducción de la DM.....	IX

1 Introducción

La Diabetes mellitus (DM) es una pandemia que afecta a cerca de 422 millones de personas en el mundo. Su prevalencia ha ido incrementado desde hace 30 años como reflejo del aumento progresivo de la obesidad y sobrepeso en la población (Zimmet, 2003). La prevalencia crece más rápidamente en países de bajo y mediano ingreso económico, como México (International Diabetes Federation, 2017; World Health Organization, 2016).

La DM se caracteriza por un incremento crónico de la glucosa plasmática, así como del catabolismo de lípidos y proteínas (Guyton & Hall, 2009). Este desorden metabólico aparece como consecuencia de una disfunción en la secreción o en el uso de la insulina (American Diabetes Association, 2018; International Diabetes Federation, 2017; World Health Organization, 2016), o bien por la excesiva secreción de glucagón (Blair, 2003), lo que conlleva a la disminución de captación de la insulina por las células del organismo (Guyton & Hall, 2009).

Los altos niveles de glucemia en la DM, aunado a otros factores de riesgo como la hipertensión arterial y la dislipidemia, producen un daño gradual y progresivo de los vasos sanguíneos y nervios periféricos, e incluso del sistema nervioso central (Biessels, 2013; Biessels, Staekenborg, Brunner, Brayne, & Scheltens, 2006). Por ello, la DM se ha asociado con el desarrollo de lesiones microvasculares tales como la nefropatía, retinopatía y neuropatía, así como de problemas macrovasculares como la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares y las enfermedades vasculares periféricas (Fedele, 2005; Instituto Nacional de Salud Pública, 2012; International Diabetes Federation, 2017; Secretaría de Salud, 2013; Zimmet, 2003) tales como disminución de la sensibilidad de los miembros y problemas urinarios y sexuales (Secretaría de Salud, 2013).

Los pacientes diabéticos presentan neuropatías, periférica y autonómica. La neuropatía periférica conjunta alteraciones del sensorio y procesos de isquemia, los cuales ocurren en las extremidades de forma bilateral y en sentido distal a proximal que puede evolucionar a la pérdida total de sensibilidad (Meuleman, 2011). La neuropatía autonómica incluye desordenes

como gastroparesias, retención urinaria y disfunción sexual, entre otros (American Diabetes Association, 2018; Blair, 2003).

Cerca del 80% de pacientes diabéticos sufren de algún tipo de complicación del tracto genitourinario (Daneshgari, Liu, Birder, Hanna-Mitchell, & Chacko, 2009; Daneshgari & Moore, 2006). La incidencia de problemas vesicales en la DM es de alrededor del 33%, mientras que casi el 50% de los varones presenta disfunción eréctil (Bacon et al., 2002; Kolondy, Kahn, Gldstein, & Barnett, 1979). En el caso de la función urinaria, el problema de mayor incidencia es la disfunción vesical diabética, la cual se presenta en dos fases, la primera de hiperactividad, seguida por una de hipoactividad vesical (Melman et al., 2009; Nirmal et al., 2014). Respecto a la disfunción sexual, éstas han sido relacionadas con desórdenes de la eyaculación (Pontes et al., 2011) e infertilidad (Yonezawa et al., 2009).

Las complicaciones sexuales y reproductivas mencionadas tienen un efecto importante en la calidad de vida de los pacientes diabéticos y los tratamientos actuales con inhibidores de la 5-fosfodiesterasa no han sido satisfactorios (Oger-Roussel et al., 2014).

Si bien existen estudios que describen los síntomas de las enfermedades urogenitales masculinas asociadas a la DM (Elabbady, Hassouna, & Elhilali, 1995; Hassan, Hassouna, Taketo, Gagnon, & Elhilali, 1993; Guiming Liu & Daneshgari, 2005; Melman et al., 2009; Nirmal et al., 2014; Pontes et al., 2011; Saito et al., 2004; Yonezawa et al., 2009), poco se sabe sobre la evolución natural de los signos conductuales urinarios y sexuales, y su correlación con los mecanismos fisiopatológicos que generan dichas disfunciones. Por ejemplo, no se conoce si la aparición de los signos clínicos de disfunciones del aparato urogenital es precedida por la disfunción del sistema nervioso periférico que inerva al tracto urogenital o de la musculatura estriada uretral asociada con cada función. Esta información sería de gran valor para acrecentar el conocimiento básico de la enfermedad y explorar tratamientos específicos para cada alteración, así como aplicarlos de manera temprana, esto último, en aras de limitar la progresión degenerativa con el tiempo.

2 Antecedentes

Las funciones urinarias y sexuales masculinas tienen lugar en el tracto urogenital, el cual está constituido por los riñones, los uréteres, la vejiga urinaria, la uretra, las glándulas sexuales accesorias, los conductos deferentes y el pene (Tortora & Derrickson, 2009).

2.1 Anatomía del aparato urogenital de la rata macho

La vejiga urinaria es un órgano muscular hueco que se localiza craneal al borde del hueso púbico y sirve de receptáculo y almacén de la orina. Cuando está vacía tiene forma de pera y mide 10 mm de diámetro en su parte más ancha y 5 mm en la más estrecha. Cuando se encuentra llena adquiere forma esférica, midiendo aproximadamente 25 mm de longitud por 15 mm de diámetro en su parte más ancha (Hebel & Stromberg, 1986).

La orina que la vejiga acumula es expulsada periódicamente por la uretra. Ésta, es una estructura tubular formada por musculatura lisa y estriada. Su porción rostral se conecta a la vejiga urinaria y la caudal termina en el meato urinario. Tiene una longitud promedio de 45 mm y se ha dividido en 4 porciones: prostática, membranosa, divertículo uretral y peneana (Martínez, 2003). Existe una flexión en forma de U que se localiza entre la uretra membranosa y la peneana. Esta flexión está relacionada anatómicamente con una porción sacular de la uretra, el divertículo uretral (Martínez, 2003).

Con excepción de la región peneana, la uretra está cubierta por musculatura estriada. El esfínter externo de la uretra (EEU) rodea a la porción prostática y membranosa y los músculos bulboesponjoso (BE) e isquiocavernoso (IC) se encuentran unidos a la base del pene (Holmes, Chapple, Leipheimer, & Sachs, Benjamin, 1991). Los BE son pareados (izquierdo y derecho), cada uno está formado por tres lóbulos: dorsales, laterales y ventrales. Sus fibras se originan en la superficie dorsal del divertículo y se insertan en la pared ventral del pene (Hart & Melese-

D'Hospital, 1983). Los IC también son bilaterales. Cada uno se origina en el arco isquiático del hueso pélvico y se inserta en la crura del pene (Mckenna & Nadelhaft, 1986).

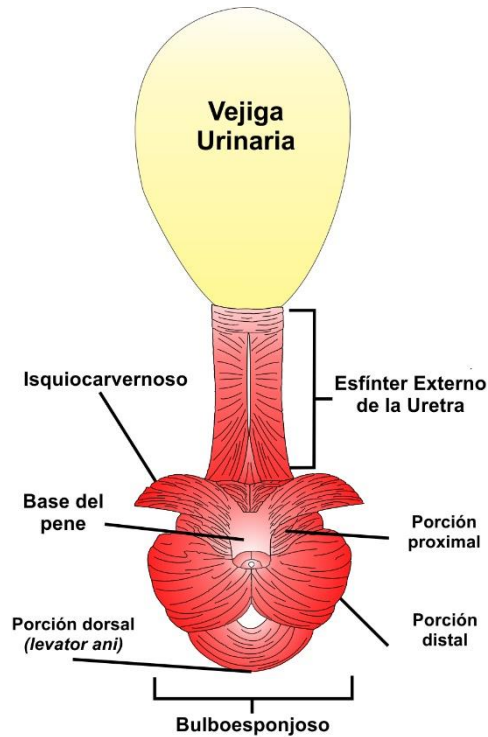


Figura 1. Musculatura estriada asociada a la uretra. Vista ventral. La nomenclatura del BE se basa en la utilizada por Holmes et al., 1991.

2.2 Fisiología del aparato urogenital de la rata macho

La uretra masculina realiza funciones urinarias y sexuales, durante la micción y la eyaculación por este conducto pasan la orina y el semen, respectivamente.

La micción es el proceso fisiológico por el cual la vejiga urinaria expulsa periódicamente la orina almacenada. Comprende dos fases: 1) de almacenamiento y 2) de expulsión. Durante la fase de almacenamiento el EEU se mantiene contraído, lo que incrementa la presión intrauretral y contribuye al mantenimiento de la continencia urinaria. Durante la fase de expulsión de orina, se contrae la vejiga urinaria y concurrentemente se contraen los músculos estriados EEU, BE e IC (Cruz & Downie, 2005).

La erección peneana es la condición fisiológica de rigidez, alargamiento, engrosamiento y elevación del pene. Es producida por una dilatación arteriolar y el incremento en el flujo sanguíneo hacia los tejidos eréctiles del pene, lo cual es controlado por nervios simpáticos y parasimpáticos que emergen de la médula espinal toracolumbar y sacra (De Groat & Booth, 1980). La erección es un reflejo que se presenta en respuesta a estímulos visuales, olfatorios o imaginarios, los cuales al igual que la estimulación genital activan circuitos nerviosos que inciden sobre los centros supraespinales. Además de la respuesta refleja vascular, durante la erección peneana también se presenta actividad refleja de los músculos IC y BE. Se presume que la contracción del IC de la rata contribuye a la retención de sangre en el pene (Hart & Melese-D'Hospital, 1983).

La eyaculación es un proceso que comprende dos fases: la emisión seminal y la expulsión. La emisión seminal se presenta en respuesta a una contracción rítmica de la musculatura lisa de las glándulas sexuales accesorias y de los conductos deferentes. Durante este proceso el cuello vesical es ocluido y el fluido seminal vertido a la uretra membranosa (De Groat & Booth, 1980; Ellenberg, 1980b; Pontes et al., 2011).

Se sugiere que durante la fase de expulsión, la musculatura uretral (Juárez et al., 2014, 2016) y la perineal se contraen clónicamente, lo que permite el transporte del semen hacia el meato urinario (Hart & Melese-D'Hospital, 1983; Holmes et al., 1991; Langdale & Grill, 2016; Lehtoranta et al., 2006; Sachs, 1982). El proceso de eyaculación requiere de agentes coadyuvantes para ejecutarse correctamente tales como: testosterona, oxitocina, neuropeptido Y, péptido intestinal vasoactivo y óxido nítrico (Dean & Lue, 2005).

La contracción refleja de la musculatura estriada uretral y perineal durante la micción y la cópula depende de una fina regulación nerviosa que involucra a cinco elementos: 1) receptores sensoriales localizados en el tracto urogenital, 2) vías aferentes que viajan a la médula espinal por los nervios pélvicos y pudendos, 3) centro integrador (neuronas espinales y supraespinales), 4) vías eferentes con axones que viajan por la rama motora del plexo sacro y los 5) efectores, el EEU, el BE y el IC. La lesión de algunos de estos elementos inducirá disfunciones urinarias y sexuales, tal como ocurre con la denervación selectiva de los músculos antes descritos (Juárez, Hernández, & Cruz, 2012; Juárez & Cruz, 2014).

La contracción refleja del EEU, BE e IC puede inducirse experimentalmente en animales anestesiados. Por ejemplo, estimulando a los mecanorreceptores vesicales o a los uretrales (Juárez et al., 2015). Tal estimulación activa cuyos axones viajan por el nervio pélvico. La estimulación mecánica de la uretra peneana activa aferentes cuyos axones viajan por la rama sensorial del nervio pudiendo (Pastelín, Zempoalteca, Pacheco, Downie, & Cruz, 2008).

Los nervios que inervan al aparato urogenital presentan diferente composición axonal, por ejemplo, el nervio pudendo tiene 3,714 fibras amielínicas y 741 fibras mielínicas (razón de 2:1). Con respecto a los nervios hipogástricos, las fibras amielínicas superan a las mielínicas a razón de 6:1 (1,359/218), mientras que el nervio pélvico tiene 4,134 de fibras amielínicas y 979 fibras mielínicas, una razón de 4:1 (Hulsebosch & Coggeshall, 1982). De manera similar, la rama sensorial del nervio pudendo presenta ~ 4 mil fibras amielínicas y ~ 1 mil 900 fibras mielínicas y la rama motora tiene ~ 700 fibras amielínicas y ~ 500 mielínicas, éstas últimas son de tipo A δ (Moore & White, 1996).

Dado que la DM es una enfermedad que produce neuropatías, es probable que los nervios que controlan a estos reflejos se vean lesionados conforme la enfermedad evoluciona y que el patrón de la actividad electromiográfica del EEU, BE e IC se modifique.

2.3 Tipos y modelos de inducción de DM en animales

En animales de laboratorio se han desarrollado técnicas para inducir modelos de DM. Por ejemplo, se puede inducir la enfermedad usando sustancias químicas que destruyen en forma selectiva a las células β del páncreas, tales como aloxana (ALX) o la estreptozotocina (STZ) (Szkudelski, 2001). Esta última es un agente antibacterial de amplio espectro producido por *Streptomyces achromogenus* sub. *Streptototicus*. También se ha usado en la clínica como agente anti-tumoral para el tratamiento de cáncer de los islotes de Langerhans del páncreas (Wiley et al., 1979).

En ratas, la DM inducida por una dosis de STZ de 65mg/Kg produce cambios anatómicos-estructurales y fisiológicos, a las 9 semanas la musculatura lisa de la vejiga urinaria

(detrusor) se hipertrofia y disminuye su contractilidad. También se alteran las vías colinérgicas (Guiming Liu & Daneshgari, 2005).

La estreptozotocina también induce en animales no anestesiados signos de disfunción genitourinaria, por ejemplo, se incrementa la frecuencia de micción desde la semana 3 (Xiao, Huang, Kavran, Elrashidy, & Liu, 2015) y disminuye el número de animales que presentan conducta sexual a las 2 (Saito et al., 2004) y 3 semanas postratamiento (Pontes et al., 2011).

Se presume que la disfunción sexual es consecuencia de alteraciones neurogénicas ya que aunque la concentración plasmática de testosterona disminuye en los animales diabéticos (Hassan et al., 1993; Scarano, Messias, Olivia, Klinefelter, & Kempinas, 2006; Steger, 1990), la administración exógena de testosterona no reestablece la eyaculación (Oger-Roussel et al., 2014; Pontes et al., 2011; Steger, 1990).

Así entonces, los modelos de DM han permitido replicar algunos de los signos de la enfermedad, y dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a ella. Pero aún falta mucho para identificar los signos tempranos de la enfermedad y conocer en detalle el grado de afectación de las estructuras nerviosas y musculares estriadas del aparato genitourinario inferior conforme evoluciona la enfermedad. Esta información podría proponer hallar tratamientos específicos que permitan limitar el daño o incluso revertirlo.

3 Justificación

Más del 80% de los pacientes diabéticos presentan complicaciones del tracto urinario bajo. La disfunción vesical diabética es un fenómeno complejo que involucra diferentes mecanismos fisiopatológicos y manifestaciones morfológicas dependientes del tiempo de evolución. Al inicio se presentan síntomas de hiperactividad vesical, después una fase de hiposensibilidad vesical y pobre vaciamiento de orina y por último retención urinaria crónica con recurrentes infecciones del tracto urinario (Nirmal et al., 2014). Por otra parte, las discapacidades de la función sexual derivadas de la DM son comunes en varones (Fedele, 2005; Kolondy et al., 1979) y se presentan en el 60% de los pacientes diabéticos (Ellenberg, 1980b).

Los antecedentes antes descritos han sido evaluados en estudios a largo plazo, sin embargo, es pertinente determinar cómo evolucionan las alteraciones urinarias y sexuales desde un punto de vista conductual y fisiológico y conocer si la actividad refleja muscular de la musculatura uretral se deteriora conforme pasa el tiempo. Lo anterior con el objeto de conocer los mecanismos fisiológicos alterados en la enfermedad.

4 Preguntas de investigación

¿Existe concurrencia en la aparición y evolución de los signos de disfunción urinaria y sexual en ratas macho con diabetes mellitus?

Considerando que los nervios pélvico y pudendo varían en su composición axonal, ¿existe alteración diferencial de la actividad eléctrica de los reflejos uretromotores de los músculos periuretrales?

5 Hipótesis

En la rata macho, la DM inducida con estreptozotocina produce signos conductuales de disfunciones urogenitales, cuya evolución conduce a alteraciones neurofisiológicas de nervios pélvicos, evidenciadas por disfunción de la actividad refleja de músculos periuretrales.

6 Objetivo general

Caracterizar la evolución de los signos conductuales de disfunciones urinarias y sexuales en ratas macho diabéticas y la actividad electromiográfica de los músculos periuretrales.

7 Objetivos específicos

- 1 Determinar los parámetros urinarios y la conducta de micción a corto (días post-tratamiento 4, 7 y 15), mediano (días post-tratamiento 30, 45) y largo plazo (días post-tratamiento 90) de ratas macho con DM inducido por estreptozotocina.
- 2 Evaluar a corto, mediano y largo plazo los parámetros copulatorios de ratas macho con DM inducido por estreptozotocina.
- 3 Analizar en ratas macho el efecto de la DM inducida por estreptozotocina, a corto, mediano y largo plazo sobre la actividad EMG de los músculos EEU y BE, evocada por la estimulación mecánica de la uretra prostática y el divertículo.

8 Material y métodos

8.1 Diseño experimental

Se utilizaron 38 ratas macho Wistar, todas sexualmente expertas, de las cuales 21 de ellas fueron inyectadas con STZ para conformar el grupo de animales diabéticos. Otros 17 machos fueron inyectados con buffer de citratos para el grupo vehículo. Del grupo diabético, 8 animales se utilizaron para realizar los experimentos de conducta de micción y sexual. 13 animales diabéticos fueron utilizados para la realización de los experimentos de EMG a corto y mediano plazo.

Del grupo de animales vehículo, 6 fueron utilizados para la realización de los experimentos de conducta, y los 11 restantes fueron utilizados para los experimentos EMG a corto y mediano plazo.

En el grupo DM se realizaron registros EMG a corto (días 4, 7 y 15, n=6), mediano plazo (días 30 y 45, n=7) y largo plazo (día 90, n=6). En el grupo vehículo, se registraron 6, 5 y 6 animales para el corto, mediano y largo plazo, respectivamente. En ambos grupos, los animales del largo plazo fueron los mismos que se utilizaron para los experimentos de conducta sexual y de micción (Figura 2).

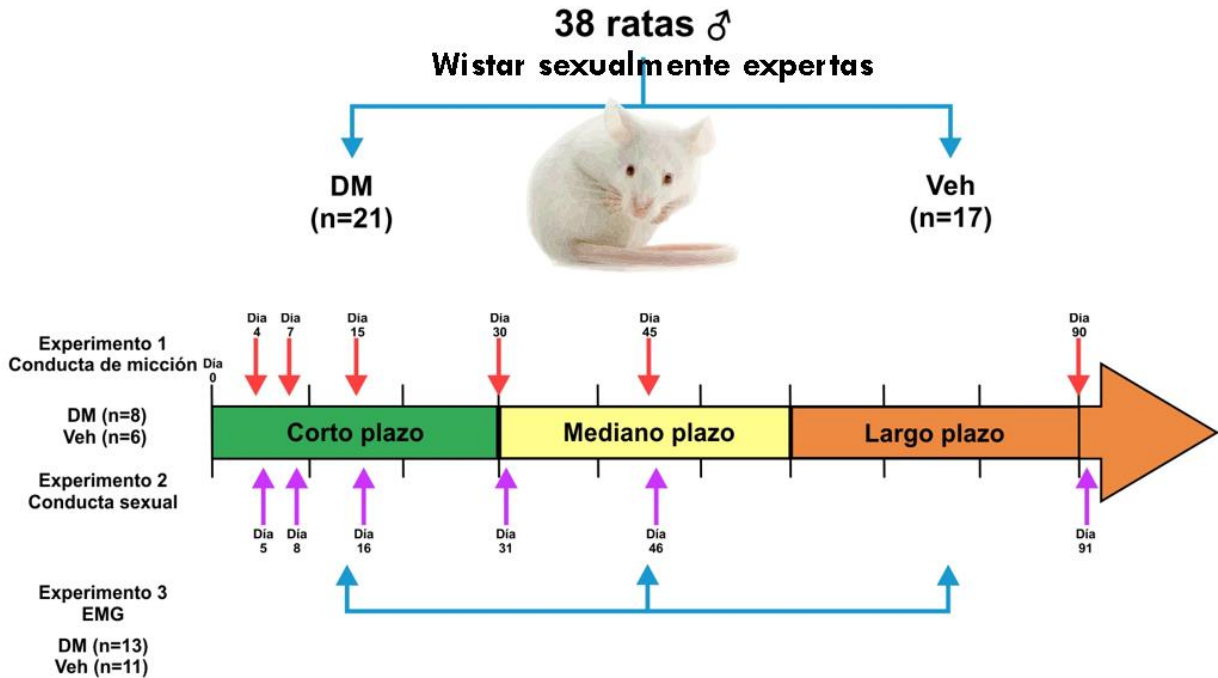


Figura 2. Diseño experimental. Número de animales utilizados para cada grupo experimental. Note que para el largo plazo del experimento 3 (EMG), se utilizaron los mismos animales de los experimentos 1 y 2.

8.2 Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de ~ 3 meses de edad que se obtuvieron del bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Los animales se mantuvieron en un bioterio a una temperatura de 21 - 26°C, con ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas y con agua y alimento (Rodent Laboratory Chow) *ad libitum*.

8.3 Inducción de DM

La inducción de la DM (grupo diabéticos n = 8) se realizó mediante la administración intraperitoneal de STZ a dosis de 60mg/kg de peso. La STZ fue inyectada en los animales experimentales después de 6 horas de ayuno. Posterior a la administración del agente diabetogénico se proporcionó solución glucosada al 5% durante las primeras 12 horas y solución glucosada al 2.5% durante las siguientes 12 horas, para evitar un cuadro de hipoglicemia (Fröde & Medeiros, 2008; Furman, 2015). A los animales vehículo (Veh n=6) se les inyectó intraperitonealmente buffer de citratos 0.1 M a pH 4.5, bajo las mismas condiciones de ayuno y administración de solución glucosada que los del grupo diabéticos. Antes y posterior al tratamiento se midió la glucemia preprandial en muestras de sangre capilar periférica, la cual fue obtenida por punción de la punta de la cola usando dispositivo de punción semiautomático. La muestra fue procesada usando tiras reactivas y glucómetro Accu Chek Active®, Roche Diabetes Care™.

Las conductas de micción y sexual fueron evaluadas antes y después de establecer el diagnóstico de DM acorde a los criterios de diagnóstico de la American Diabetes Association (ADA) de 2018 (Tabla 1. Anexo).

La solución de STZ se preparó minutos antes de ser utilizada calculando la dosis total requerida según el peso de los animales y el número de ellos. Se disolvió el fármaco a razón de 30mg/ml de solución buffer de citratos 0.1M a un pH de 4.5. La solución buffer de citratos 0.1M se preparó con citrato de sodio monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) con peso molecular (PM) de 210.14 y citrato trisódico dihidratado ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) con PM de 294.12.

Para preparar 50 mililitros de solución buffer 0.1M a un pH de 4.5, se disolvieron en un matraz aforado 1.05 gramos de citrato de sodio monohidratado en 40 ml de agua destilada, luego se aforó a 50 mililitros (solución A). En un matraz diferente se disolvieron 1.47 gramos de citrato trisódico dihidratado en 40 mililitros de agua destilada y se aforó a 50 mililitros (solución B). Con ayuda de una probeta graduada se midieron 23.5 mililitros de la solución A y se vertieron en un vaso de precipitado al que se le añadieron 26.5 mililitros de la solución B. La homogenización de ambas soluciones (A+B) se realizó con ayuda de un mezclador magnético

(Corning PC-420D Marshal Scientific™) a 100 revoluciones por minuto, durante 5 minutos. El pH de la solución fue ajustado a 4.5 usando un potenciómetro (Conductronic PH120™) calibrado en temperatura y en pH con soluciones control pH 4 y pH 7.

8.4 Entrenamiento y evaluación de la conducta sexual

Para el entrenamiento sexual todos los machos (n=38) pasaron a cuatro o seis pruebas copulatorias, cada uno con al menos una serie eyaculatoria (Lucio & Tlachi-López, 2008). Los entrenamientos sexuales se realizaron dentro de las instalaciones del bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, durante la fase de oscuridad. Para ello, los machos fueron colocados en un cilindro de Plexiglas™ de 3mm de espesor por 60 cm de altura y 60 cm de diámetro (Figura 3), mismo que se colocó sobre una superficie plana y con el piso cubierto por una capa de aserrín de no más de 1 cm de espesor. El macho fue introducido primero a la arena para su habituación durante cinco minutos (Lucio & Tlachi-López, 2008). Después se introdujo una hembra ovariectomizada cuya receptividad sexual fue inducida con la administración de 10 µg de benzoato de estradiol 48 horas antes de la prueba y 2 mg de progesterona 4 h antes de la prueba. En el momento en el que la hembra fue introducida a la arena se inició la prueba. Si en un periodo de 15 minutos no hubo intromisión la prueba se terminaba. En caso de haber una intromisión la prueba continuaba hasta la eyaculación o hasta los 30 minutos posteriores a la última intromisión.



Figura 3. Sistema de entrenamiento de conducta sexual. El área dentro del cilindro de Plexiglas es cubierta por una delgada capa de aserrín. El macho y la hembra se colocan dentro del sistema. La prueba culmina cuando el macho eyacula.

Se determinaron los siguientes parámetros copulatorios: latencia de montas, definido como el tiempo transcurrido desde la introducción de la hembra hasta la primera monta; número total de montas; latencia de intromisión, definido como el tiempo transcurrido desde la introducción de la hembra hasta la primera intromisión; número total de intromisiones y latencia de eyaculación, definido como el tiempo transcurrido desde la primera intromisión hasta la eyaculación. La conducta sexual fue videograbada con dos cámaras, una en vista lateral del redondel y la otra en vista ventral de los animales (Figura 4).

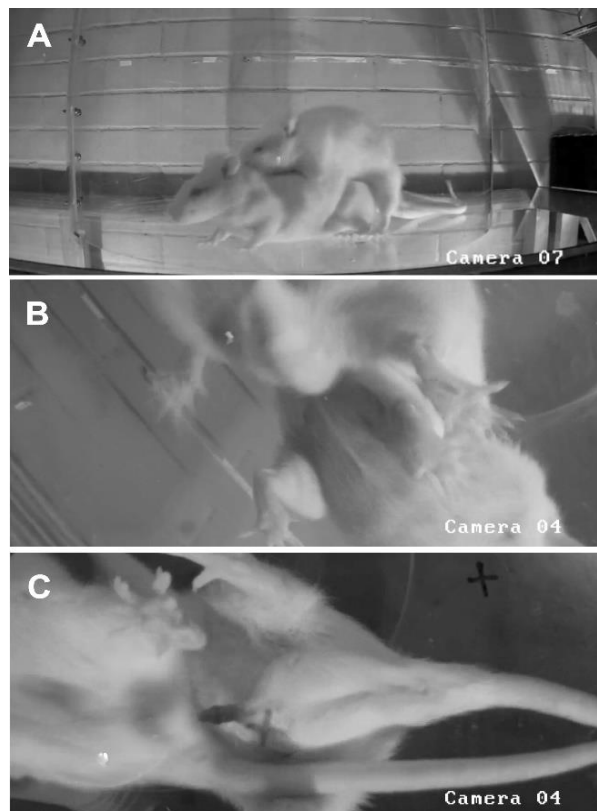


Figura 4. Sistema de observación de conducta sexual. Panel A: vista frontal, panel B y C: vista ventral. Note que el piso del sistema es un vidrio transparente que permite la grabación de la zona ventral de los animales. En panel C, se aprecia el momento en el que el pene erecto se dirige al introito vaginal de la hembra.

8.5 Evaluación de la conducta de micción

Se videograbó la conducta de micción en ratas diabéticas (n=8) y vehículo (n=6). Para ello las ratas fueron colocadas en un sistema de observación que consistió en una caja estándar de polipropileno de 47 x 31.5 x 20cm, a la cual previamente se le retiró la base. Cada caja fue colocada sobre una reja de alambre de acero inoxidable, lo que permitió que la orina expelida pasara a través de la rejilla a un marco colector de plástico que se colocó debajo de la malla. Este colector de orina se podía deslizar para facilitar la obtención y medición de los volúmenes de orina (Figura 5). Los animales fueron habituados a este sistema durante 4 días previos al primer registro de micción.

El sistema de video-vigilancia consistió en un grabador digital de video de red (NVR) HIKvision® de Hikvision Digital Technology Co., Ltd. conectado a un monitor VGA Samsung™ y cuatro cámaras de video HIKVision Bullet ® de Hikvision Digital Technology Co., Ltd. las cuales estaban conectadas a la red local que suministra video-vigilancia continua a los equipos de cómputo del laboratorio mediante el programa de red HIKVISION DS-7616NI-SE/P de ©Hikvision Digital Technology Co., Ltd. Con el equipo anterior se videograbó la conducta de micción.

Los animales fueron registrados de manera continua durante 12 horas, las últimas 6 horas de la fase de oscuridad y las primeras 6 horas de la fase de luz. Cuando se observó orina en el sistema colector, el observador entró al cuarto de grabación y midió el volumen de orina expulsada utilizando una jeringa de insulina graduada de un mililitro de capacidad. Los parámetros analizados fueron: frecuencia de micción, definido como el número de micciones durante las 6 horas de cada periodo de observación; el volumen por micción, definido por el volumen recolectado por cada micción; volumen total de orina, definido como la suma de todos los volúmenes durante las 6 horas de cada fase; duración de micción, definida como la diferencia segundos desde que se expulsa la primera gota de orina y cuando se concluye la expulsión; intervalo intermicción, definida como el tiempo entre una micción y la siguiente; flujo de orina, definida como el cociente del volumen total de orina entre la suma de la duración de micción; ingesta de agua, definida como el volumen obtenido por diferencia de la suma del volumen residual y el volumen de agua derramada con respecto al volumen inicial. Usando las

grabaciones se observó el comportamiento de micción y las variantes de la conducta estereotipada que desplegaron las ratas durante cada micción (Figura 5).



Figura 5. Sistema de observación para conducta de micción. El piso de la caja de alojamiento ha sido reemplazado por una malla de alambre de acero inoxidable para dejar libre el paso a la orina que se recolecta en un marco debajo de ésta.

8.6 Evaluación de la actividad electromiográfica refleja de los músculos EEU y BE

Los animales diabéticos y vehículo fueron anestesiados con uretano al 40% a dosis de 1.2 g/kg. Usando un microscopio estereoscópico LEICA M80™, se realizó una incisión en la línea media abdominal distal, se disecó el hueso púbico y se desinsertaron los músculos abdominales de forma parcial hasta visualizar de forma completa la porción rostral del EEU.

Para la localización del músculo BE, se realizó una incisión en la línea media escrotal, se disecaron las capas de tejido conectivo hasta llegar a la porción medial del BE priorizando la visualización del lado izquierdo. Se insertaron electrodos bipolares en la región craneal del EEU y en la porción medial del BE (ambos del lado izquierdo). Se registró la actividad electromiográfica (EMG) de ambos músculos antes, durante y después de inducir la actividad refleja mediante la estimulación mecánica de la uretra prostática y el divertículo. Dicha estimulación se realizó utilizando un catéter semi-rígido de 1 mm de calibre externo que se introdujo en la uretra a través de la vejiga, pasando por la región prostática hasta alcanzar el divertículo o por la uretra peneana hasta alcanzar el divertículo.

El equipo de registro electrofisiológico estuvo integrado por dos pares de electrodos bipolares de acero inoxidable de 0.002 cm de diámetro, 2 sondas de alta impedancia conectadas al amplificador (Grass QP511®) y un transductor de señal digital (Digidata 1440A®), conectado a una computadora (Dell OptiPlex micro™) con tarjeta convertidor de señales análogas AxoScope® versión 10.2 (Figura 6).

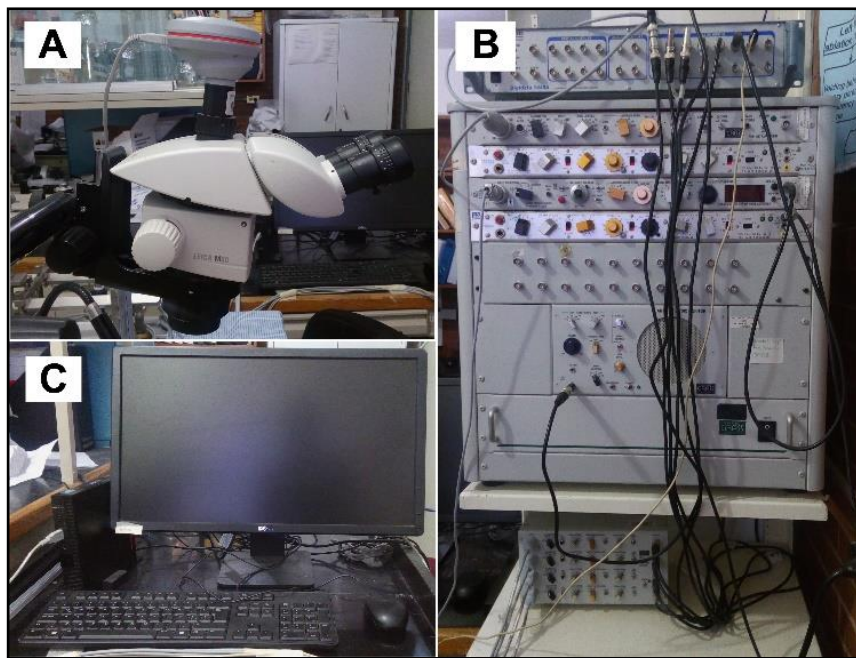


Figura 6. Equipo de registro de electromiografía. Panel A; microscopio estereoscópico. Panel B; amplificador de señales análogas en la parte superior. Panel C; equipo de cómputo para registro electromiográfico.

8.7 Análisis estadístico

Para el análisis de los parámetros de micción y de cópula se realizaron pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) para medidas repetidas. En el caso de los estudios de electromiografía, los datos se analizaron con pruebas de t-student para cada grupo. En ambos casos se utilizó un valor de alfa de 0.05.

En cada registro EMG se analizó el patrón de descarga de forma cuantitativa seleccionando un segundo de actividad antes de la mecano-estimulación, un segundo durante el estímulo y un segundo de actividad posterior a la estimulación (figura 7).

El software utilizado para generación de gráficos y análisis estadísticos fue Sigma Plot® de SYSTAT™, paquetería de ofimática de Microsoft®.

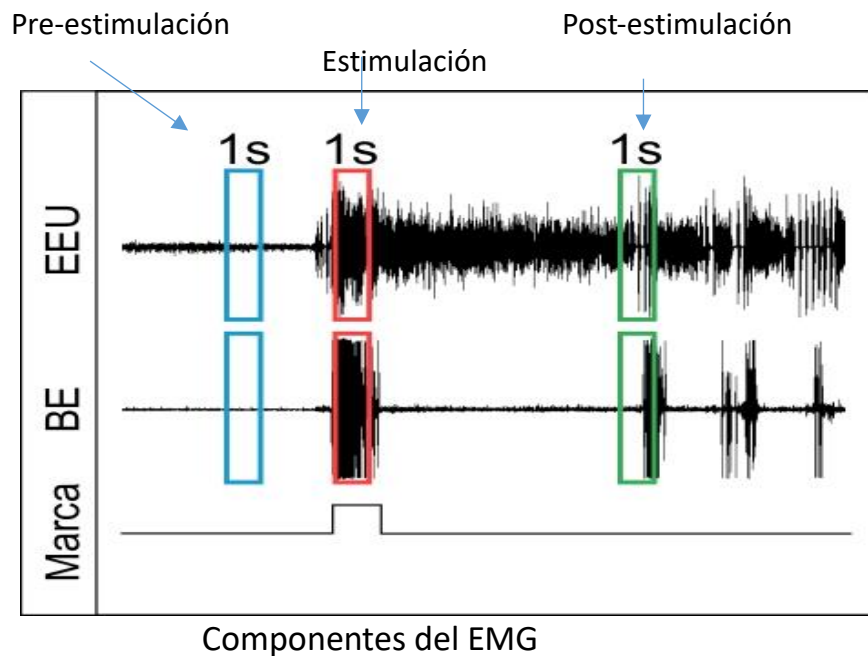


Figura 7. Análisis de la señal electromiográfica.

9 Resultados

9.1 Función urinaria

Los animales diabéticos utilizados para los experimentos de conducta sexual y de micción (n=8) tuvieron niveles de glucosa de 453.5 ± 35.7 mg/dL desde el día 3 posterior a la inyección de STZ. Dichos niveles se mantuvieron altos (510.25 ± 29.5 mg/dL) hasta el día de sacrificio. En contraste, los animales del grupo vehículo presentaron glicemias de 107 ± 4.2 mg/dL a lo largo de todo el periodo de estudio. Los valores de glicemia fueron significativamente más altos en los animales diabéticos ($P < 0.001$) (Figura 8).

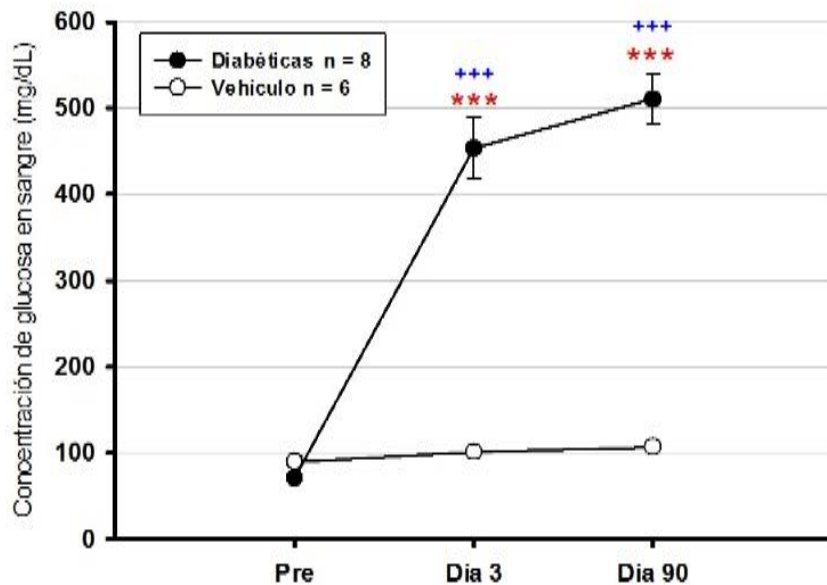


Figura 8. Nivel de glucosa en ratas macho diabéticas y vehículo. El grupo de machos diabéticos mostró concentraciones elevadas de glucosa en sangre desde el día 3 y se mantuvo elevado hasta el día 90. El grupo vehículo tuvo siempre menores concentraciones de glucosa.

9.1.1 Conducta de micción

Pretratamiento, en fase de oscuridad se registraron 103 micciones en 8 ratas diabéticas. El 100 % de las micciones fueron estereotipadas, las ratas interrumpieron la actividad que estaban ejecutando, caminaron en dirección a alguna de las paredes de la caja de observación o en las esquinas, colocaron el tren posterior muy cerca de la pared de la caja y al mismo tiempo elevaron o lateralizaron la cola y comenzaron a expeler orina (Figura 9). No hubo variantes asociadas con el cambio de fase luz-oscuridad.



Figura 9. Conducta de micción. El animal despliega un patrón de conducta estereotipada, el tren posterior del animal está dirigido hacia la esquina de la caja de observación y eleva la cola lateralizándola ligeramente durante la expulsión de orina.

En los seis animales vehículo, el 100% de los animales siguió presentando micciones con patrón de conducta estereotipada (56 micciones), tendencia que se mantuvo prácticamente sin variación hasta el día 90 (Figura 10).

Como se muestra en la figura 9, el porcentaje de la conducta estereotipada de micción se mantuvo en un rango de 80 al 90% durante los días 4, 7 y 14 post-tratamiento. En el día 30 el 22% de conductas de micción fueron atípicas. Estas conductas prevalecieron hasta el día 90.

En la fase de oscuridad, el análisis estadístico muestra una disminución significativa en la frecuencia de presentación de conducta estereotipada del grupo DM *versus* Veh ($p < 0.5$) en todos los días de registro. En cambio, en la fase de luz solo hubo diferencias significativas en los días 7, 30, 45 y 90 ($p < 0.5$). Los patrones atípicos incluyeron las micciones pausadas y las que ocurrieron en sitios inusuales, sin desplegar el comportamiento estereotipado (Figura 11).

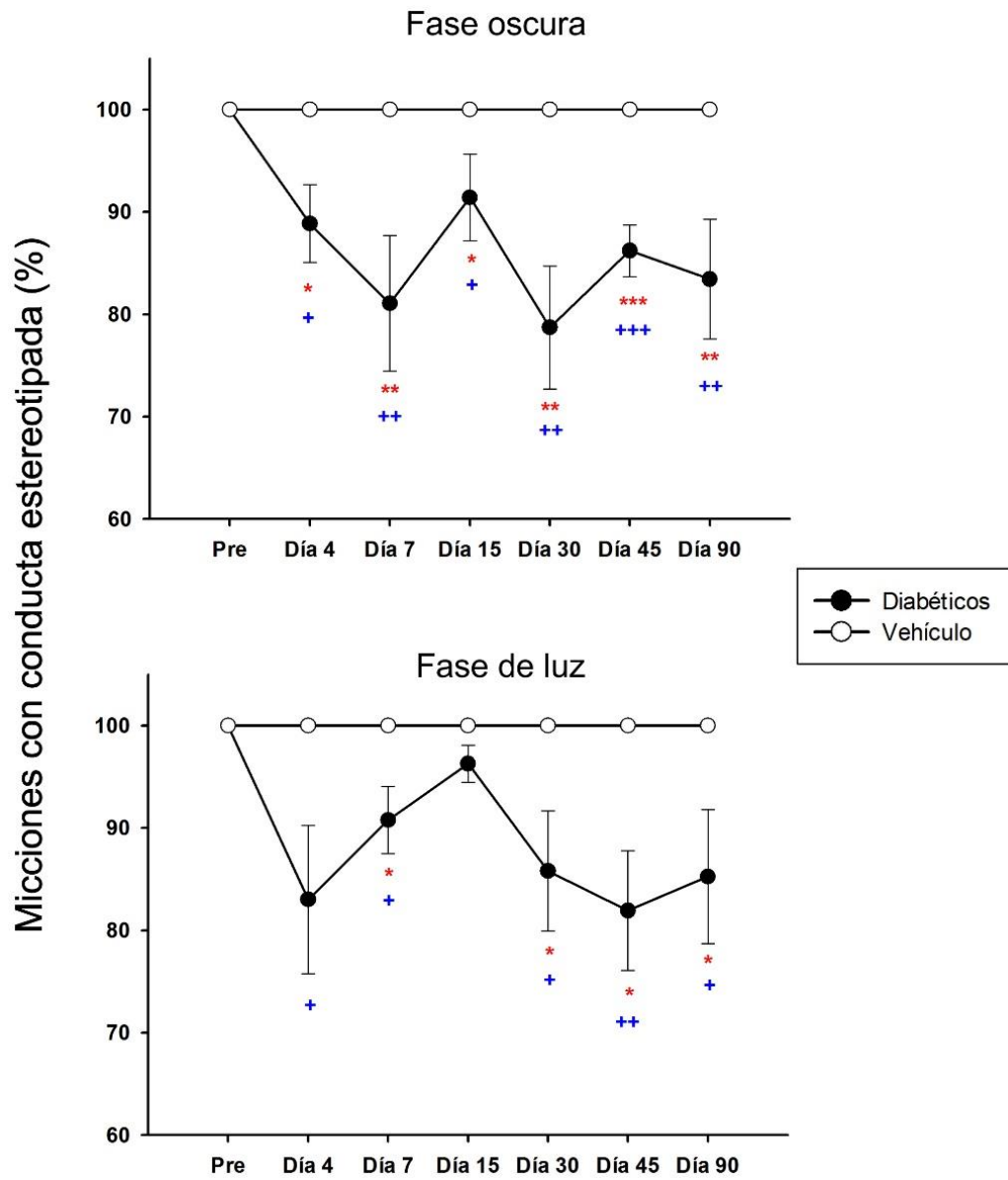


Figura 10. Gráfica de los porcentajes de conducta de micción estereotipada. Note la linealidad sin variación en el grupo vehículo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las cruces indican diferencias significativas intra grupo DM (+ < 0.05, ++ < 0.01, +++ < 0.001).

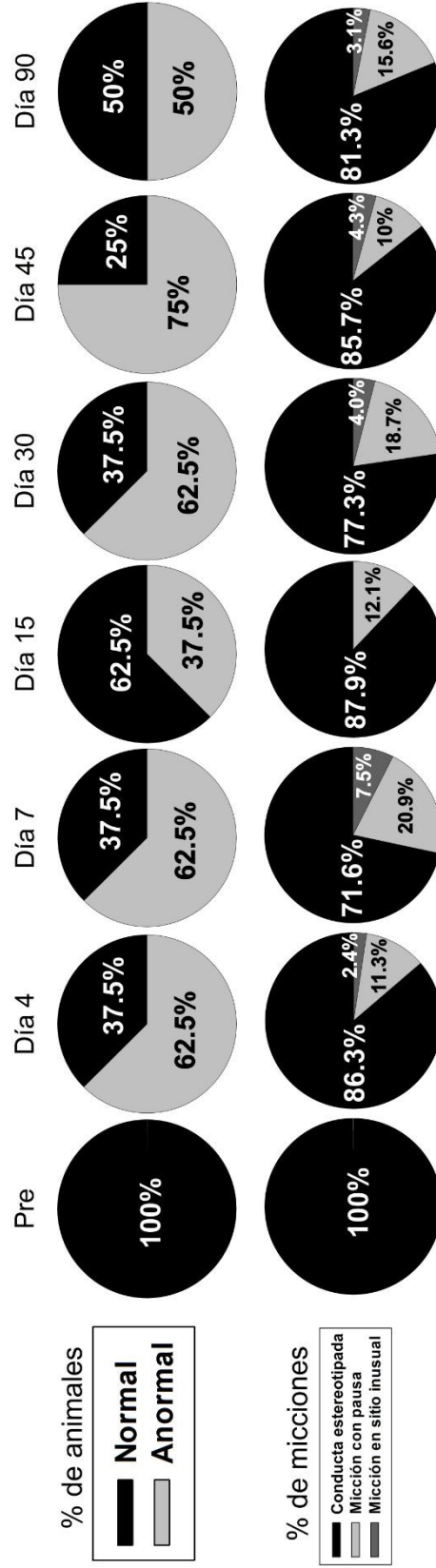


Figura 11. Conducta de micción de animales diabéticos durante fase de oscuridad. Se muestran en el gráfico superior los porcentajes de animales que presentaron micciones normales y anormales a lo largo del periodo de registro. El gráfico inferior muestra los porcentajes de cada tipo de micción a lo largo del periodo de registro.

9.1.2 Frecuencia de micción

Previo a la inducción de DM los machos presentaron un promedio de 13 micciones durante la fase de oscuridad y de 3 micciones durante la fase de luz. La frecuencia se incrementó significativamente ($P < 0.03$) a partir de día 4 con respecto al vehículo, y se mantuvo elevada hasta el día 90 durante la fase de oscuridad, sin embargo, solo hubo diferencias significativas en el grupo DM en los días 4 y 7 comparados con el valor de pretratamiento; $P < 0.001$ y $P = 0.003$, respectivamente.

En la fase de luz del grupo DM se incrementó la frecuencia de micción a partir del día 4 y hasta el día 45, comparado con el valor pretratamiento ($P < 0.005$). Las diferencias entre DM y Veh se observaron a partir del día 4 hasta el día 90 ($P < 0.008$). Las frecuencias más altas se observaron en los días 4 y 7 de la fase de oscuridad (26.5 micciones) y al día 15 en la fase de luz (9.87 micciones).

Para los animales vehículo, la frecuencia de micción media pretratamiento fue de 9 micciones durante la fase de oscuridad y 2 micciones para la fase de luz. Los valores se mantuvieron relativamente constantes en ambas fases (Figura 12).

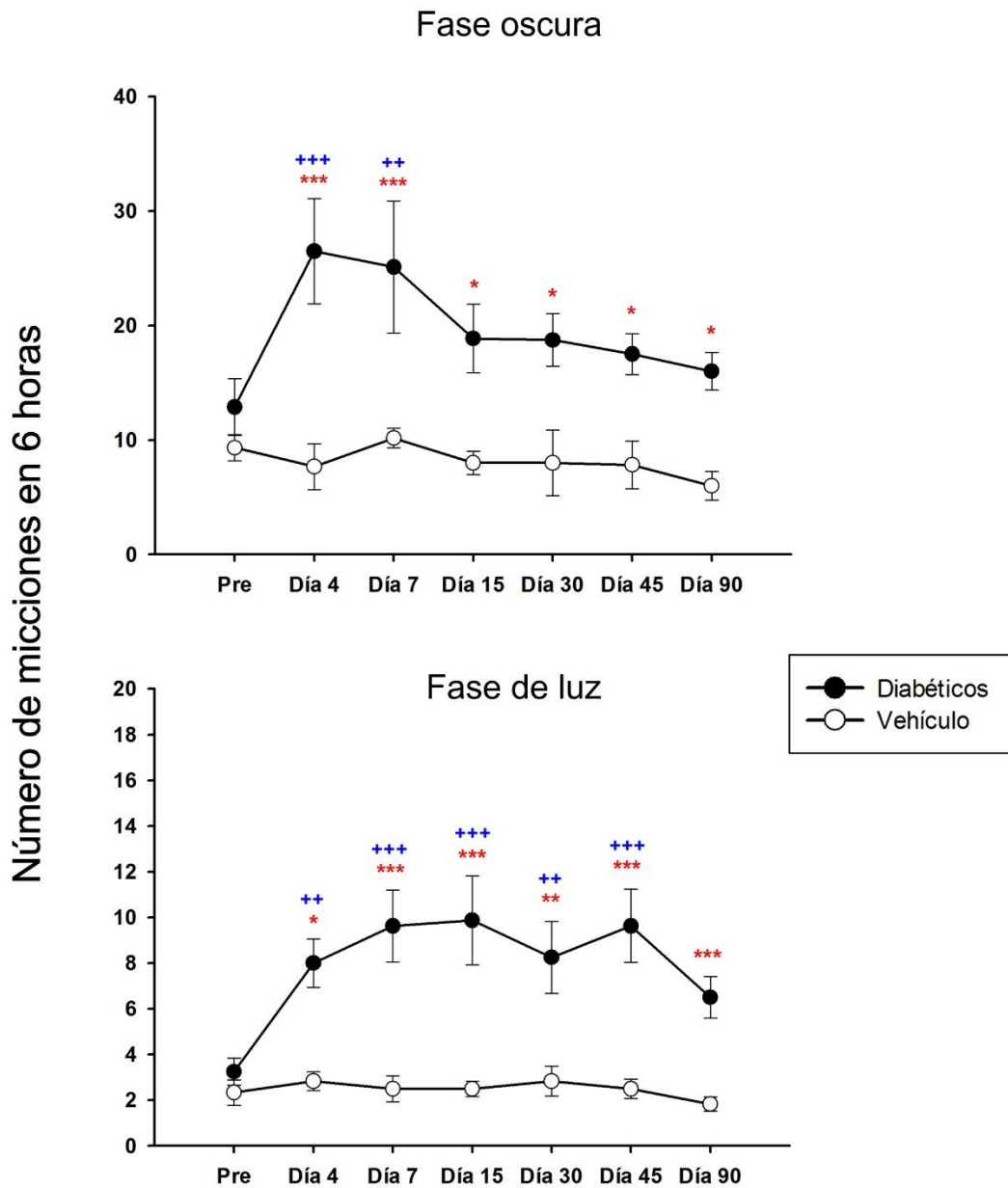


Figura 12. Gráfica de la frecuencia de micción en animales DM y Veh. Inmediatamente después del tratamiento aumentó la frecuencia de micción en los animales DM. El grupo Veh no difiere a lo largo del registro en ninguna de las fases. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las cruces indican diferencias significativas intragrupo (+ < 0.05, ++ < 0.01, +++ < 0.001).

9.1.3 Intervalo intermicción

Pretratamiento, en el grupo vehículo los intervalos intermicción fueron aproximadamente de 49 minutos para la fase de oscuridad y 169 minutos durante la fase de luz. A lo largo del periodo de estudio no hubo variación estadísticamente significativa para ninguna de las fases (Figura 13).

En cambio, en los animales DM los intervalos intermicción disminuyeron después del tratamiento con STZ. En el día 4, se observó en la fase oscura una disminución del 63% del valor pretratamiento, mientras que en la fase de luz la disminución fue más marcada, 70%. El decremento en el intervalo intermicción se mantuvo constante hasta el día 90 ($P < 0.01$). En la fase de oscuridad, a pesar de la disminución del intervalo intermicción, no hubo diferencias significativas intragrupo.

Comparando los valores entre los grupos DM y Veh, en ambas fases las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

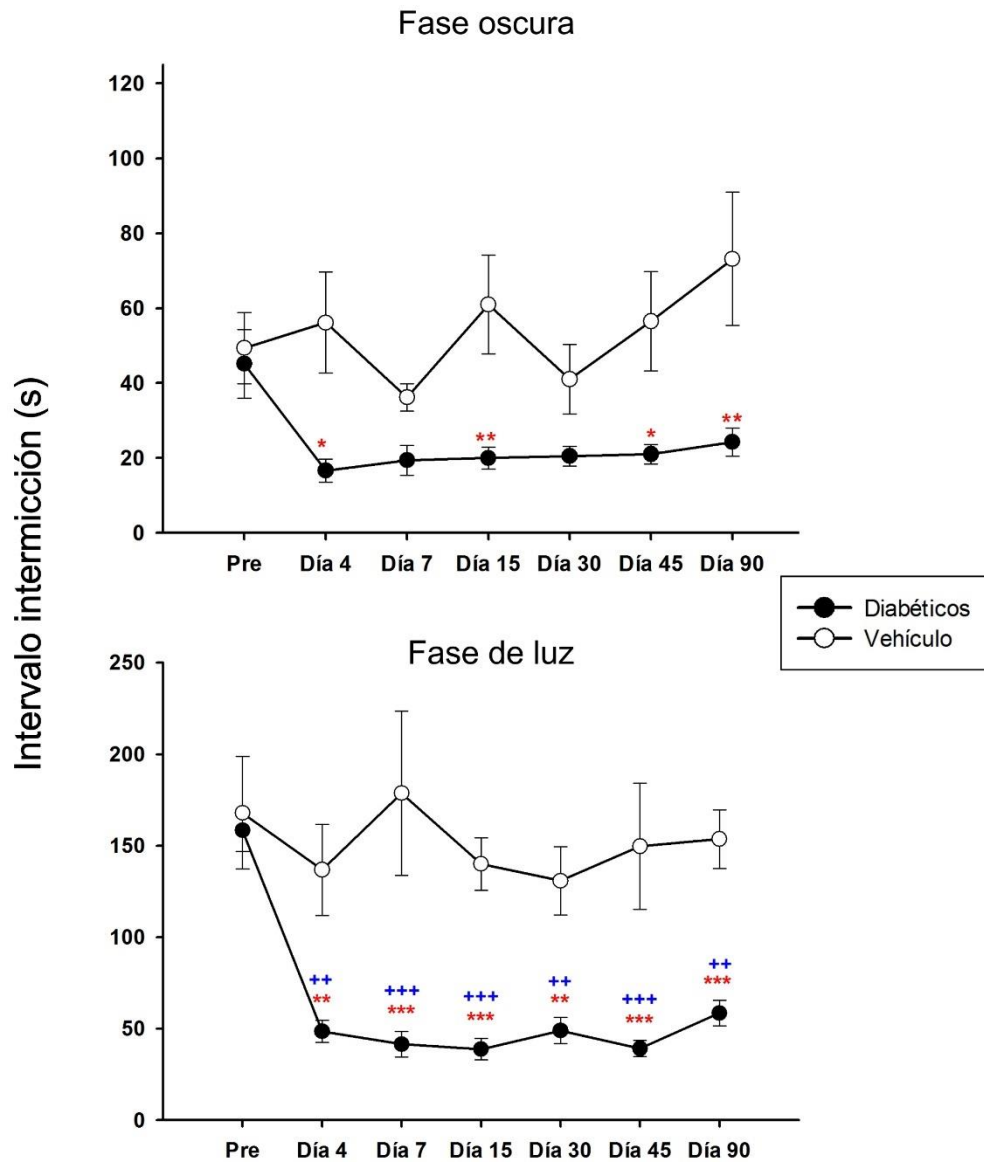


Figura 13. Gráfica del intervalo intermisión en animales DM y Veh. Los gráficos muestran una mayor variación en el grupo Veh comparado con el DM en ambas fases de registro. Sólo hubo diferencias significativas en la fase de luz intragrupo en animales DM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las cruces indican diferencias significativas intragrupo (+ < 0.05, ++ < 0.01, +++ < 0.001).

9.1.4 Volumen de micción

Los animales vehículo pretratamiento, expelieron un volumen de micción promedio de 0.68 mL en la fase oscura y 1.36 mL en la fase de luz. En ambos casos el volumen tuvo variaciones a lo largo del periodo de registro, pero no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.08$ para la fase de oscuridad y $P > 0.87$ para la fase de luz).

En el grupo DM el volumen promedio de micción pretratamiento fue de 0.56 mL en la fase de oscuridad y de 1.35 mL en la fase de luz. A los cuatro días postratamiento, el volumen promedio de micción fue de 1.18 para la fase de oscuridad y 1.68 mL para la fase de luz. Así mismo, el incremento progresivo en los volúmenes de micción fue evidente durante el resto del estudio, hasta el día 90. El análisis estadístico muestra diferencias significativas en la fase de oscuridad para todos los días de registro *versus* pretratamiento ($P < 0.001$). En la fase de luz las diferencias solo se encontraron a partir del día 30 y hasta el 90 *versus* pretratamiento ($P = 0.002$). En ambas fases el volumen por micción del grupo DM fue estadísticamente más elevado comparado con el del grupo Veh a partir del día 4 ($P < 0.05$) (Fig. 14).

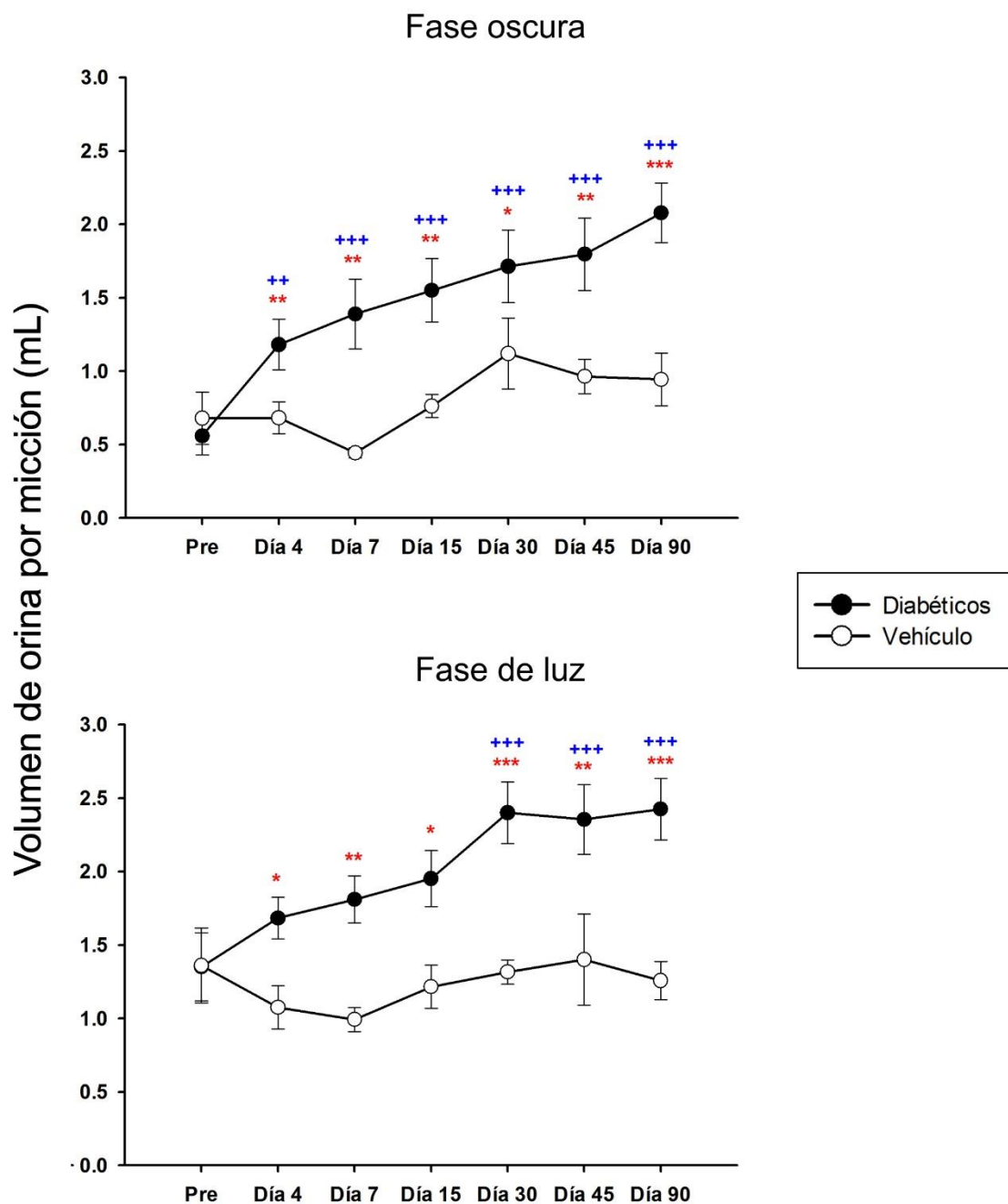


Figura 14. Gráfica del volumen promedio de orina expulsada por micción en ratas DM y Veh. En el grupo diabético el volumen incrementó significativamente en ambas fases a lo largo del periodo de registro. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las cruces indican diferencias significativas intragrupo (+ < 0.05, ++ < 0.01, +++ < 0.001).

9.1.5 Volumen total de orina

Pretratamiento, los animales vehículo expulsaron un volumen total de orina de 3.35 mL en la fase de oscuridad y 2.77 mL en la fase de luz. Los volúmenes de orina se mantuvieron sin variaciones significativas a lo largo de las fechas de registro en la fase de oscuridad y en la fase de luz ($P > 0.99$) (Figura 15).

En el grupo DM volumen total de orina pretratamiento fue de 5.6 mL para la fase de oscuridad y 3.30 mL para la fase de luz. En el cuarto día postratamiento aumentó a 26.7 mL para la fase oscura y 13.15 mL para la fase de luz. Ese aumento se mantuvo constante a lo largo del tiempo, tanto en la fase de oscuridad ($P < 0.001$) como en la fase de luz ($P < 0.001$). El análisis estadístico muestra diferencias significativas para ambas fases en todos los registros a partir de día 4 entre el grupo DM comparado con Veh ($P < 0.05$) (Fig. 15).

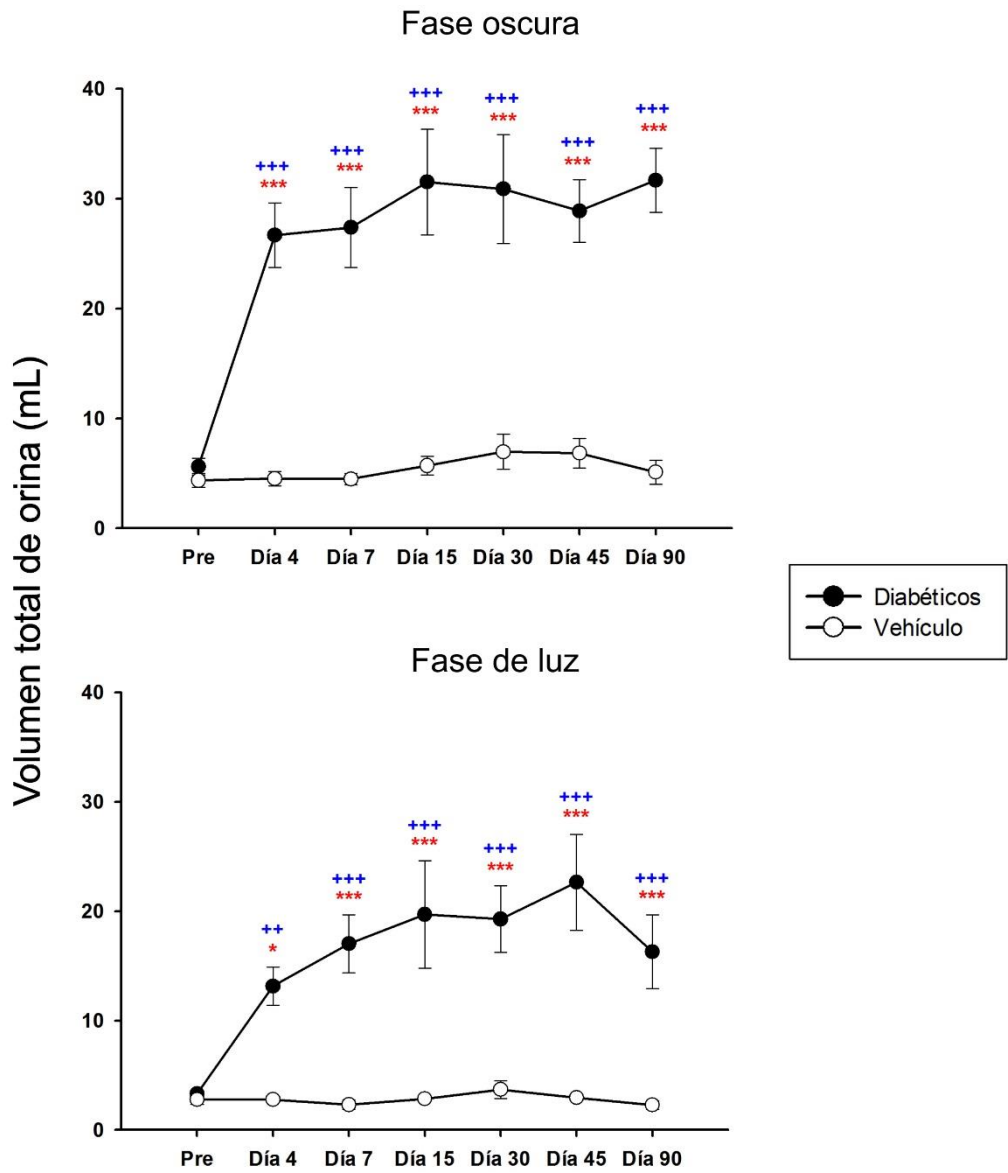


Figura 15. Gráfica del volumen total de orina en ratas DM y Veh. Note que hubo un incremento desde el día 4 (~400 % en la fase de oscuridad y ~300 % en la fase de luz) y que se mantuvo hasta el día 90. En el grupo Veh en ambos gráficos se observa que el volumen total de orina fue casi invariable. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las cruces indican diferencias significativas intragrupo (+ < 0.05, ++ < 0.01, +++ < 0.001).

9.1.6 Ingesta de agua

En el grupo vehículo, la ingesta de agua pretratamiento fue de 20.08 mL en la fase de oscuridad y 2.39 mL en la fase de luz. Los valores del volumen de agua ingerido no variaron significativamente en ambas fases ($P > 0.96$) (Figura 16). En contraste, los volúmenes de ingestión de agua en el grupo DM incrementaron a partir del día 4 postratamiento. Los valores pretratamiento fueron de 22.25 mL para la fase de oscuridad y de 2.58 mL para la fase de luz y al día 4 en la fase de oscuridad fue de 44.69 mL (aumentó 100%) y 8.35 mL en la fase de luz (aumento 220%).

Comparadas con pretratamiento, las diferencias intragrupo DM en la fase de oscuridad fueron estadísticamente significativas en todas las fechas ($P < 0.001$). En cambio, en la fase de luz solo se observaron diferencias significativas en los días 15, 30 y 45 comparados con pretratamiento ($P < 0.05$).

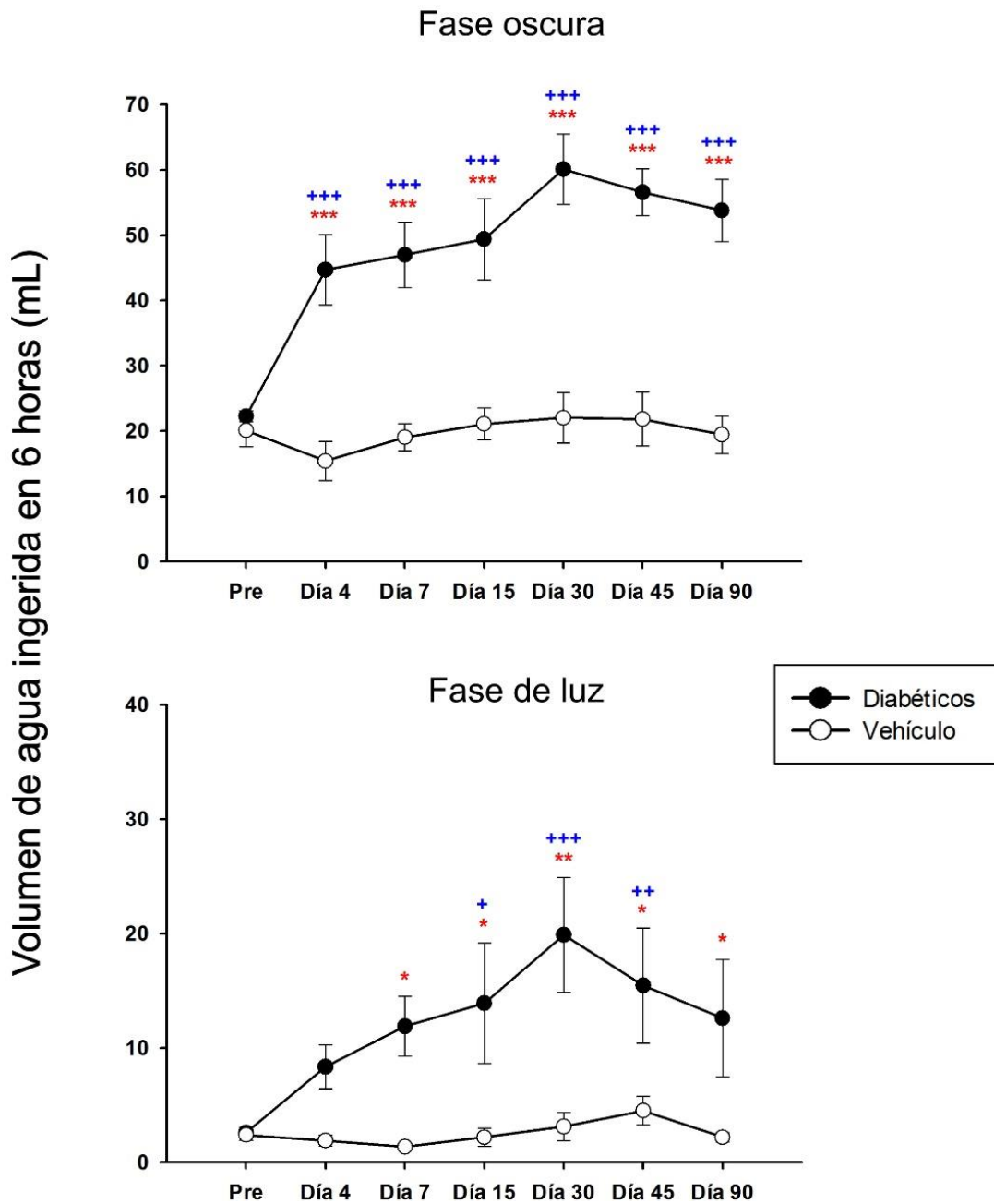


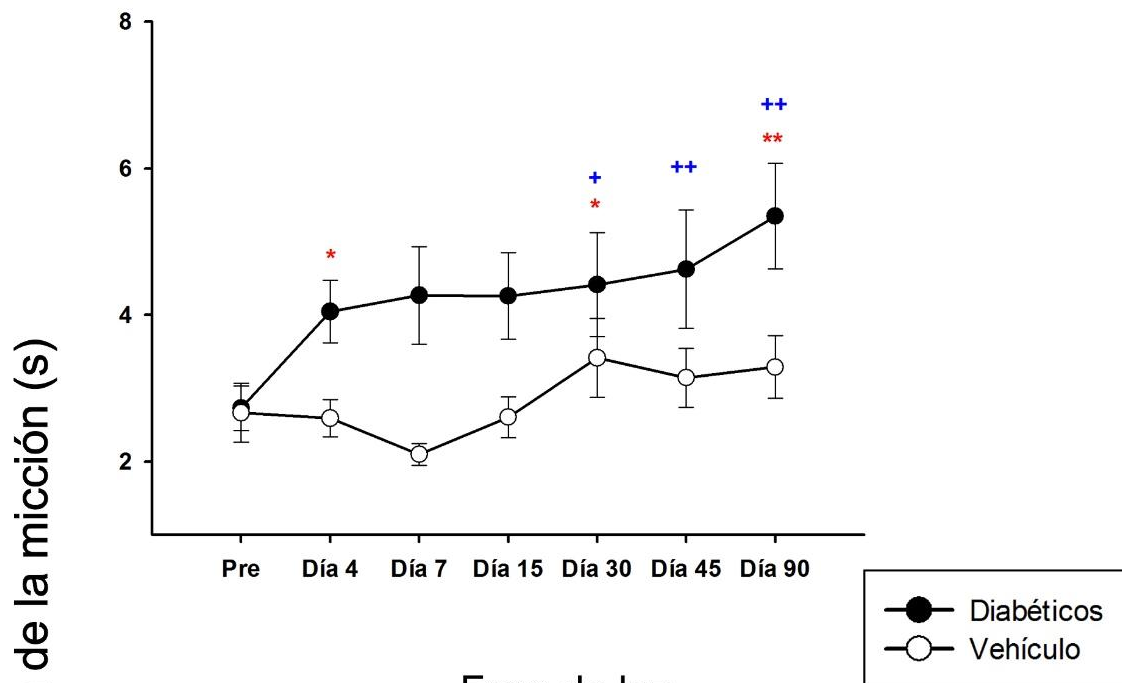
Figura 16. Gráfica de la ingesta de agua en animales DM y Veh. Note que el pico máximo de agua ingerida (~300% fase oscura y ~600% fase de luz) en los animales DM se observó en los días 30 en ambas fases. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las cruces indican diferencias significativas intragrupo (+ < 0.05, ++ < 0.01, +++ < 0.001).

9.1.7 Duración de micción

En el grupo vehículo la duración media de micción fue de 2.66 segundos para la fase de oscuridad y 4.63 segundos para la fase de luz. En ambos casos no hubo variaciones significativas a lo largo del periodo de registro comparados con el valor pretratamiento ($P > 0.05$)

En el grupo DM, pretratamiento los animales presentaron una duración promedio de micción de 2.73 segundos en la fase de oscuridad y 4.22 segundos en la fase de luz. Al día 4 en la fase de oscuridad se observó un incremento significativo que solo se repitió en los días 30 y 90 con respecto a la duración del grupo Veh ($P < 0.048$). En la fase de luz las diferencias significativas entre DM y Veh se encontraron en los días 7, 15 y 90 ($P < 0.021$). Las diferencias entre las fechas de registro dentro del grupo DM solo se observaron en los últimos registros en la fase oscura ($P < 0.008$) y a partir del día 7 en la fase de luz ($P < 0.048$) (Figura 17).

Fase oscura



Fase de luz

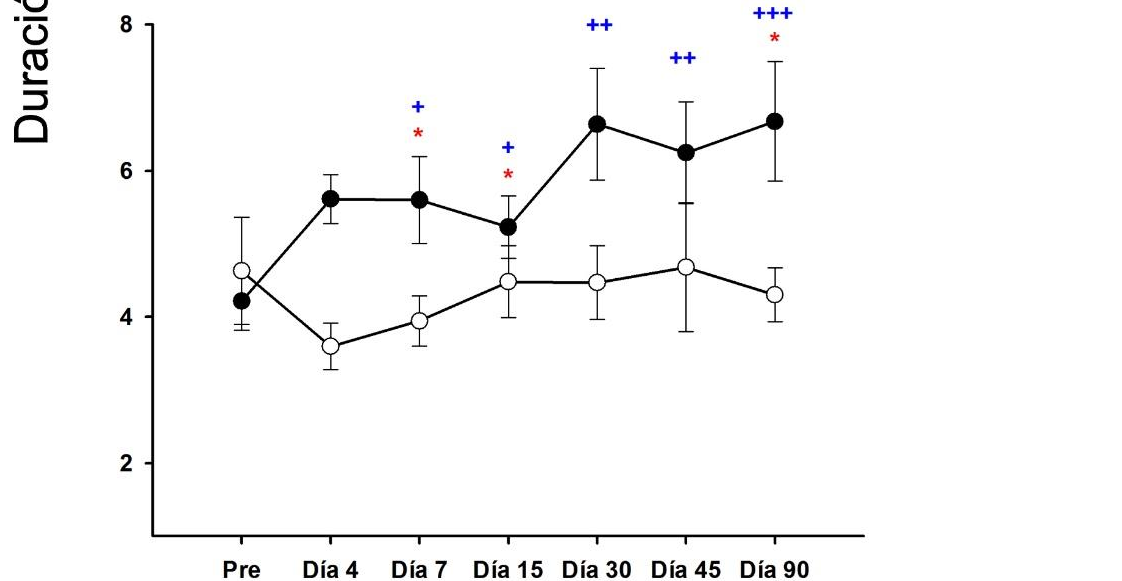


Figura 17. Gráficas de la duración de la micción en animales DM y Veh. En la fase oscura el incremento es continuo y lineal. Los incrementos observados en el grupo Veh no son estadísticamente significativos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las cruces indican diferencias significativas intragrupo (+ < 0.05, ++ < 0.01, +++ < 0.001).

9.1.8 Flujo de orina

Previo a la inducción de la diabetes, el flujo de orina en la fase de oscuridad fue de 0.19 mL/s y de 0.27 mL/s en la fase de luz. El flujo de orina incrementó significativamente postratamiento, desde el día 4 (51%) hasta el fin del registro en el día 90 ($P < 0.001$). Durante la fase de luz, existió una tendencia a incrementar el flujo de orina desde el día 4 (8% de incremento), sin embargo, sólo fue significativa esta diferencia a partir del día 7 ($P = 0.005$). En ambas fases las diferencias significativas se observaron entre DM y Veh a partir del día 7 ($P < 0.014$ para la fase oscura y $P < 0.045$ para la de luz).

Los animales del grupo vehículo en cambio, conservaron el valor de flujo de orina inicial (0.27 mL/s y 0.3 mL/s para la fase de oscuridad, $P > 0.05$ y luz respectivamente, $P = 0.973$) a lo largo de todo el periodo de registro (Figura 18).

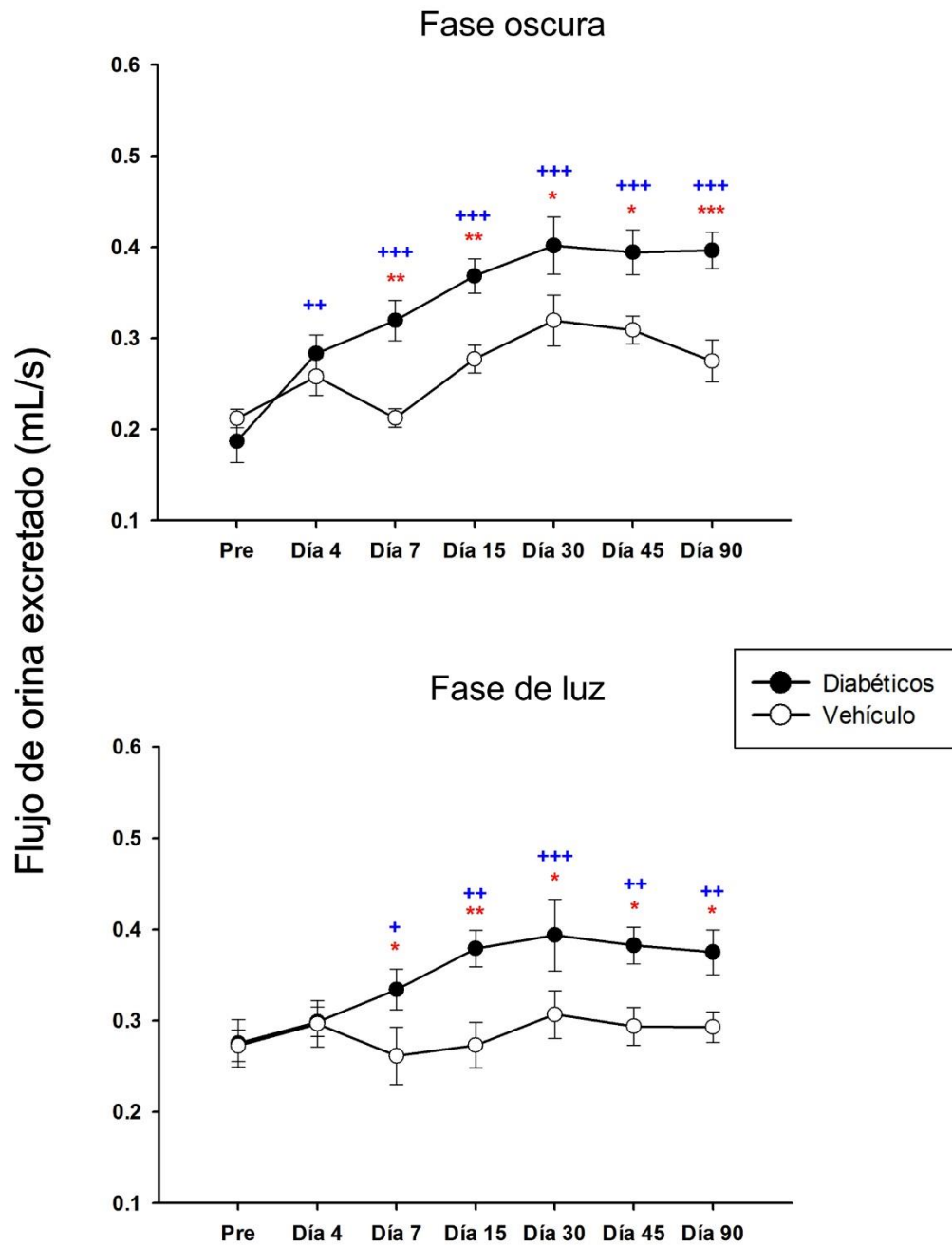


Figura 18. Gráfica del flujo de orina de animales DM y Veh. En la fase oscura del grupo DM el flujo incrementa a partir del día 4 hasta el día 90. En la fase de luz, en cambio las diferencias sólo son significativas *versus* pretratamiento a partir del día 7. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las cruces indican diferencias significativas intragrupo (+ < 0.05, ++ < 0.01, +++ < 0.001).

9.2 Función sexual

9.2.1 Conducta sexual

En el grupo vehículo, la conducta sexual se mantuvo sin cambios desde el primero hasta el último registro, en el día 91. El 100% de los animales copuló en la primera y segunda serie.

Pretratamiento el 100% de los animales mostró conducta sexual hasta la eyaculación. En cambio, la conducta sexual disminuyó a partir del día 8 post-inyección con STZ, un animal mostró montas e intromisiones sin llegar a alcanzar la eyaculación. Al día 16, 100% de animales alcanzó la eyaculación. A partir del día 31 solo entre el 25 – 37% de animales alcanzaron a eyacular en ambas series (Fig. 19).

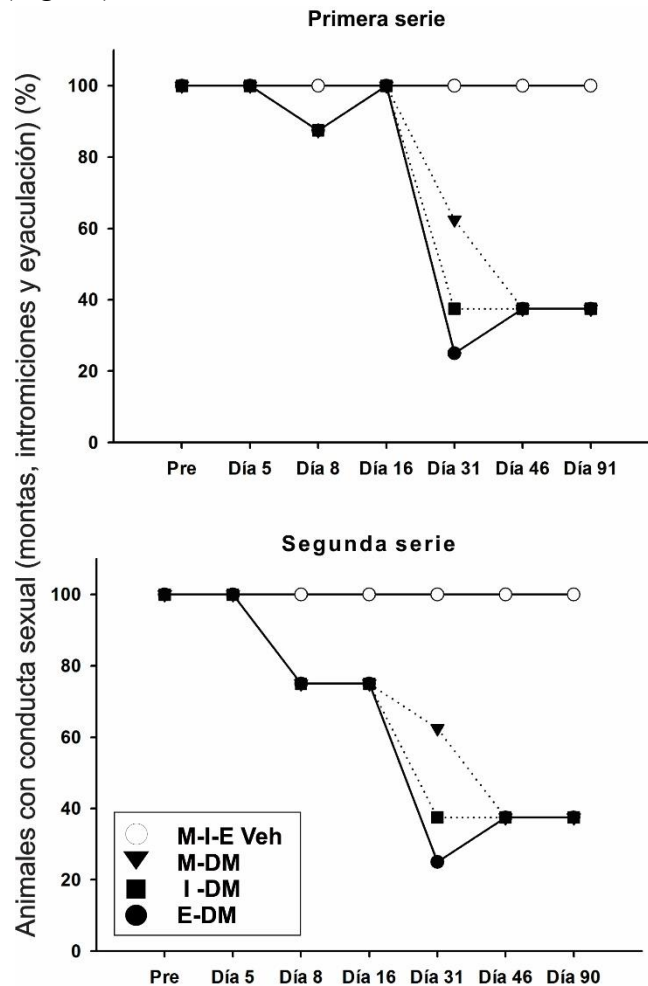


Figura 19. Gráfica del porcentaje de animales DM y Veh que presentaron conducta sexual. A partir del día 31, 60% de los machos mostraron conducta sexual pero solo el 25% de los machos diabéticos eyacularon ($n = 3$). Al final del registro, en el día 91 37% de los machos mostró conducta sexual hasta alcanzar a eyaculación. Note que todos los animales vehículo ($n=6$) presentaron conducta sexual hasta alcanzar la eyaculación en cada una de las pruebas.

9.2.1 Latencia de monta

Pretratamiento en el grupo vehículo, la latencia de monta fue de 50 segundos para la primera serie y de 9 segundos para la segunda serie. No hubo cambios significativos en los valores de los registros ulteriores

En el grupo DM, la latencia de monta pretratamiento fue de 85 segundos en la primera serie y de 40 segundos en la segunda serie. En los días 31 y 46 se observó un incremento significativo comparado contra el Veh ($P = 0.012$ y $P = 0.003$, respectivamente). Para la segunda serie, hubo una tendencia a disminuir la latencia a lo largo de los días de registro, sin ser estadísticamente significativa (Figura 20).

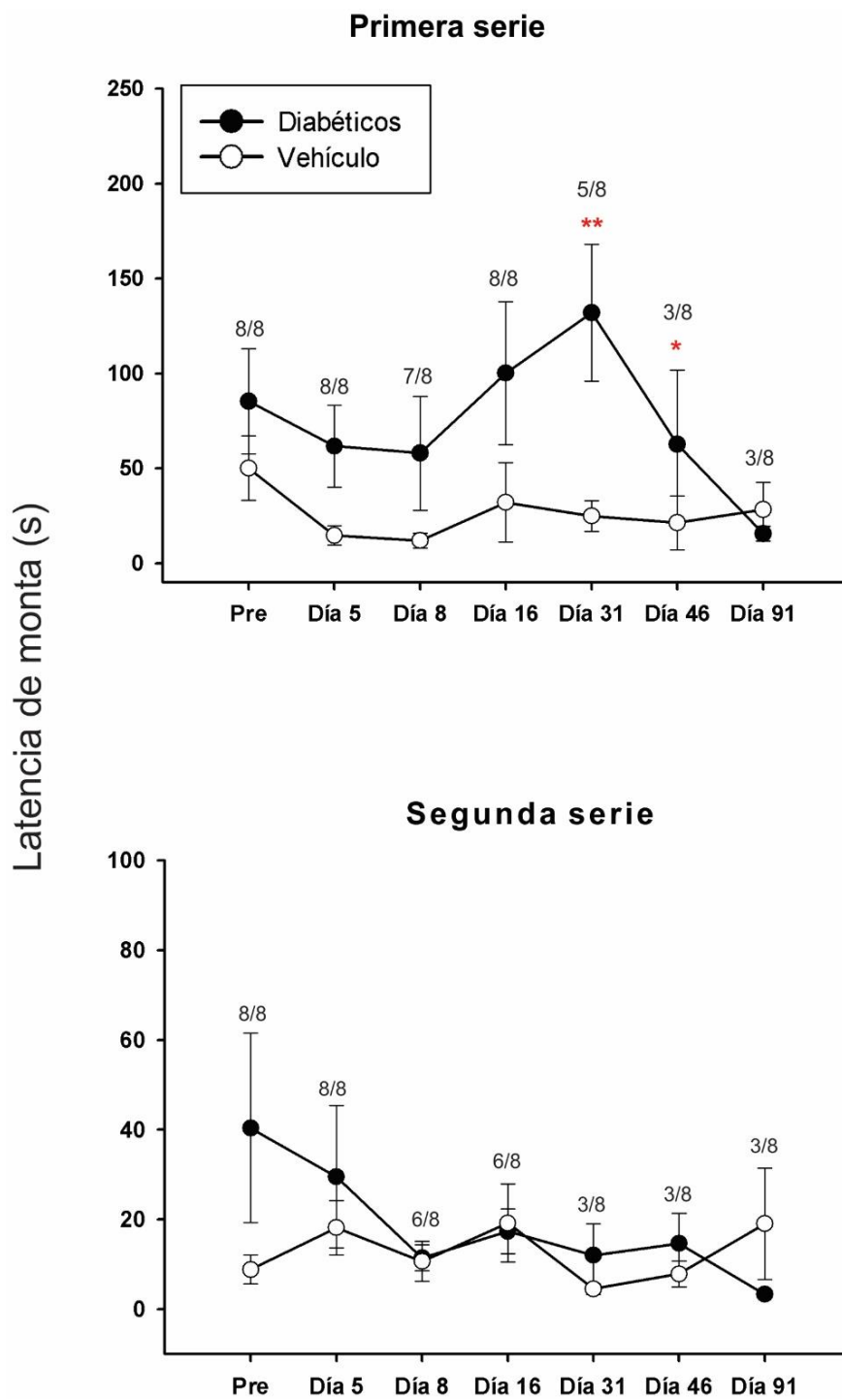


Figura 20. Gráfica de la latencia de monta de animales DM y Veh. Note la tendencia a disminuir en el grupo DM en la segunda serie. En la primera serie se observa el pico del incremento el día 31 y 46, sin embargo, note el número de animales en esos registros. Los números del gráfico indican el número de animales que presentaron conducta sexual en el día de registro indicado. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001).

9.2.2 Número de montas

Pretratamiento, en el grupo vehículo, los animales presentaron 10 montas en la primera serie y de 7 en la segunda. Hubo una tendencia a disminuir el número de montas a lo largo del estudio, sin embargo, no fue estadísticamente significativo

En el grupo de los machos diabéticos se registró pretratamiento una media de 7 montas en la primera serie y 5 montas en la segunda serie eyaculatoria. No hubo diferencias significativas en el número de montas postratamiento comparado con el valor de pretratamiento ($P > 0.05$), en ninguna de las dos series eyaculatorias (Figura 21).

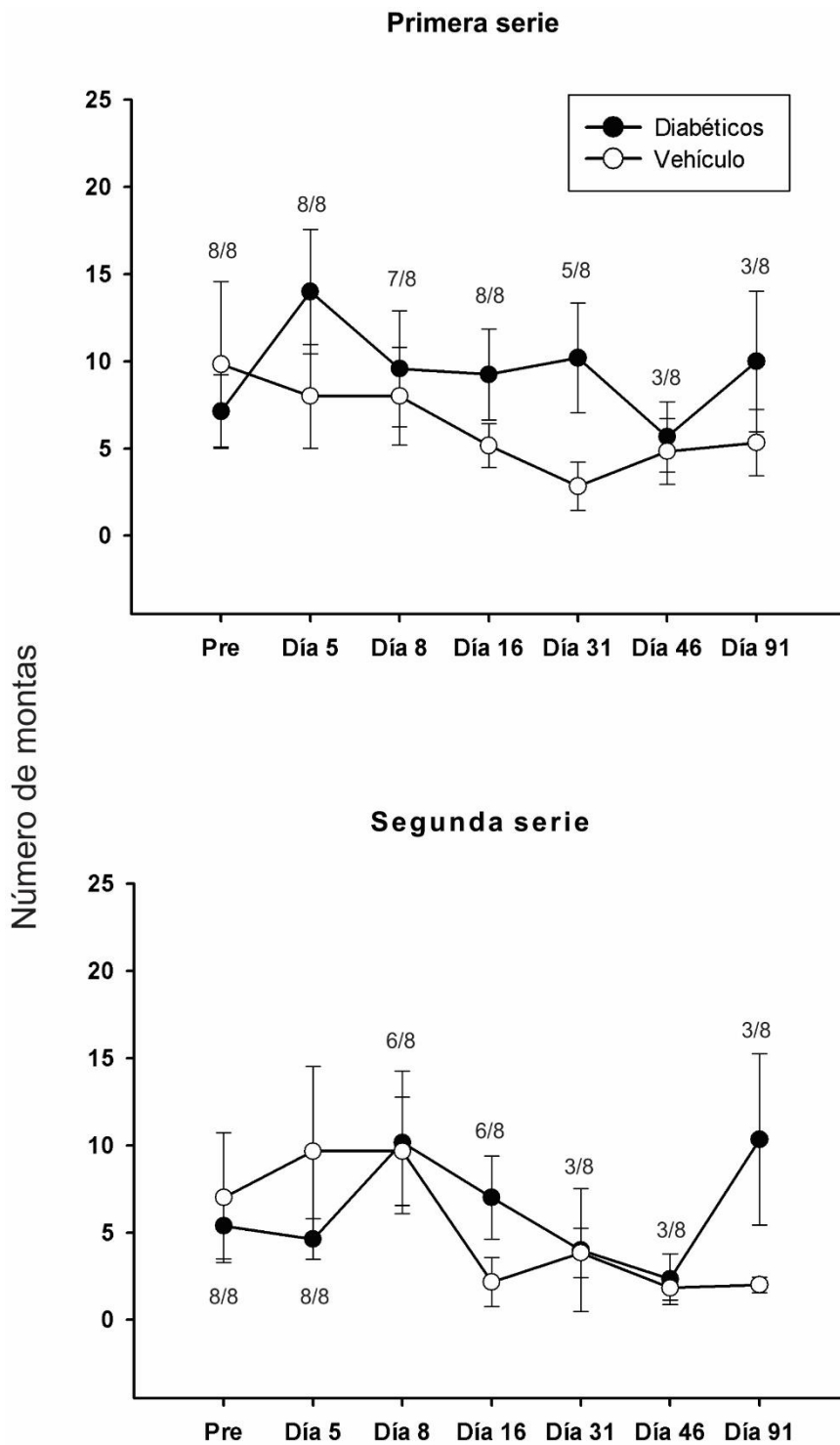


Figura 21. Gráficas del número de montas de animales Dm y Veh. Note que en los animales diabéticos se nota un incremento en el número de montas en el día 91. En este grupo solo se consideraron los tres animales que mostraron conducta de cópula al día 91. Los números en el gráfico indican el número de animales que presentaron conducta sexual en el día de registro indicado.

9.2.3 Latencia de intromisión

Pretratamiento, el grupo vehículo tuvo una latencia de intromisión promedio de 56 segundos en la primera serie y de 21 segundos para la segunda serie. Los valores de registros posteriores no difirieron significativamente del registro pretratamiento en ninguna de las dos series ($P = 0.97$)

El valor promedio pretratamiento del grupo DM fue de 95 segundos para la primera serie y 52 segundos para la segunda. Durante el periodo de registro no se observaron variaciones estadísticamente significativas ($P > 0.05$) (Figura 22).

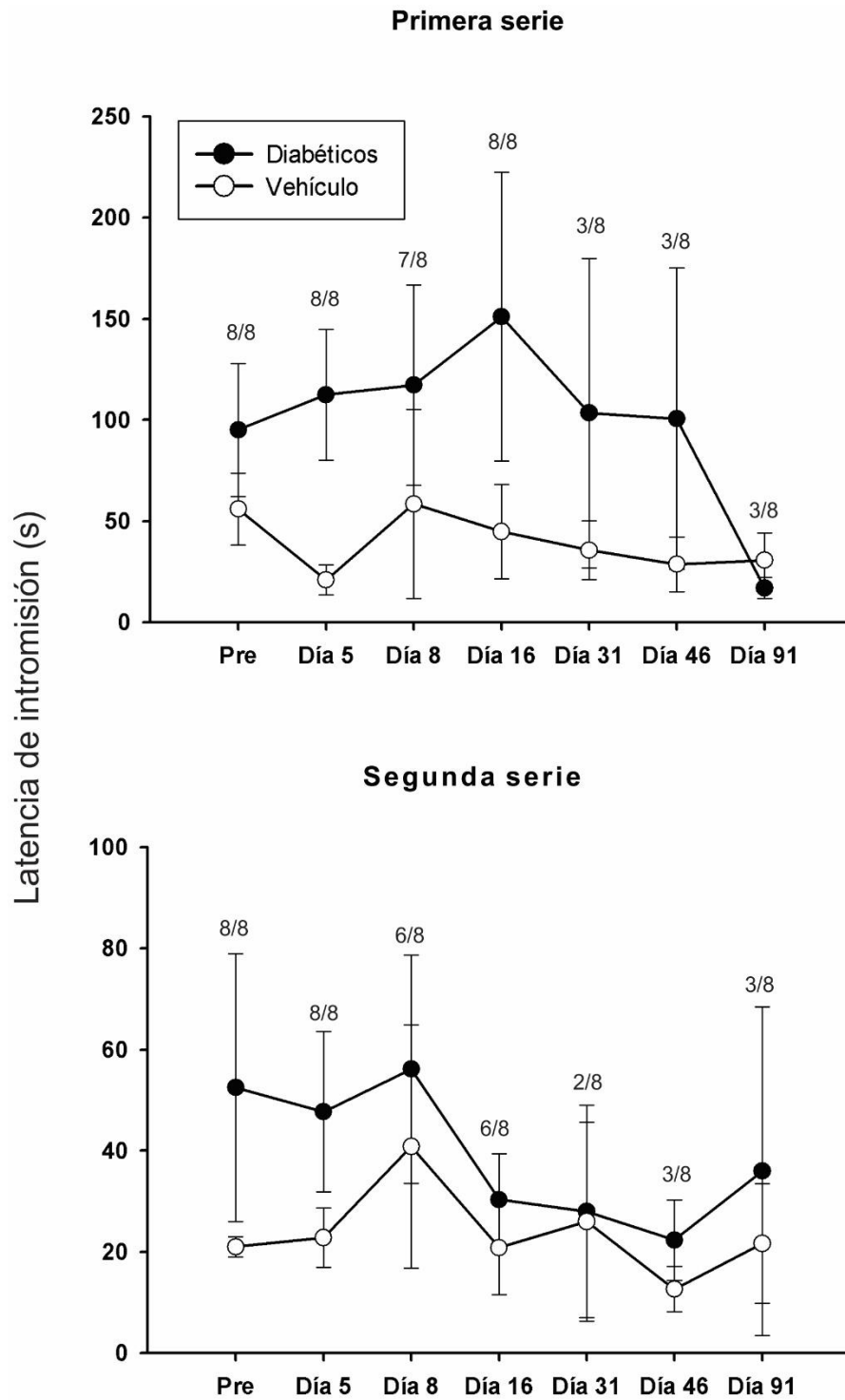


Figura 22. Gráficas de la latencia de intromisión en animales DM y Veh. Las grandes variaciones del grupo diabético son más evidentes en los últimos registros debido al número de animales que mostraron intromisiones en esas fechas (2 y 3 animales). Los números del gráfico indican el número de animales que presentaron conducta sexual en el día de registro indicado.

9.2.4 Número de intromisiones

Pretratamiento, los animales del grupo vehículo tuvieron alrededor de 10 intromisiones en la primera serie y 5 en la segunda. No hubo variaciones significativas a lo largo de los periodos de registro ($P > 0.05$).

La DM no afectó significativamente el número de intromisiones pretratamiento, la media fue de 10 intromisiones en la primera serie y 6 en la segunda. A pesar de incremento en el número de intromisiones en los días 31 y 45, no se encontraron diferencias significativas ($P = 0.67$). Para la segunda serie la variación a lo largo de los diferentes registros fue menor ($P = 0.47$) (Figura 23).

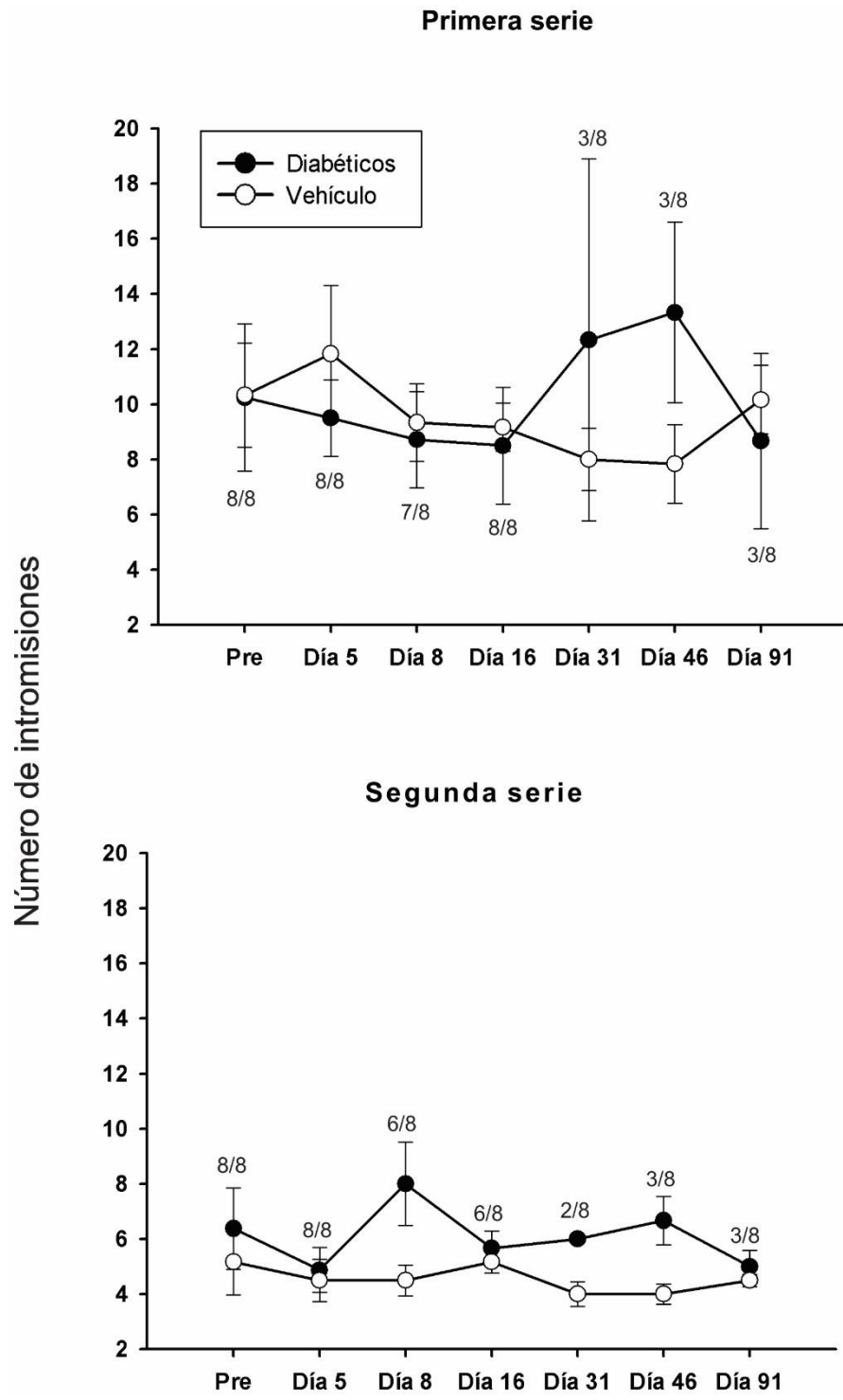


Figura 23. Gráficas del número de intromisiones en animales Dm y Veh. No se observaron variaciones significativas en ninguno de los dos grupos a lo largo del periodo de registro. Los números del gráfico indican el número de animales que presentaron conducta sexual en el día de registro indicado.

9.2.5 Latencia de eyaculación

Pretratamiento, el grupo vehículo presentó una latencia media de eyaculación de 429 segundos en la primera serie y de 216 segundos en la segunda. A lo largo del estudio no hubo diferencias significativas *versus* pretratamiento en ninguna de las dos series (P = 0.94 en la primer serie y P = 0.84 en la segunda serie)

En el grupo de animales DM la latencia de eyaculación promedio pretratamiento fue de 277 segundos en la primera serie y de 175 segundos para la segunda. La diabetes no produjo cambios significativos en la latencia en ninguna de las dos series (P = 0.33 en la primer serie y P = 0.29 para la segunda serie) (Figura 24).

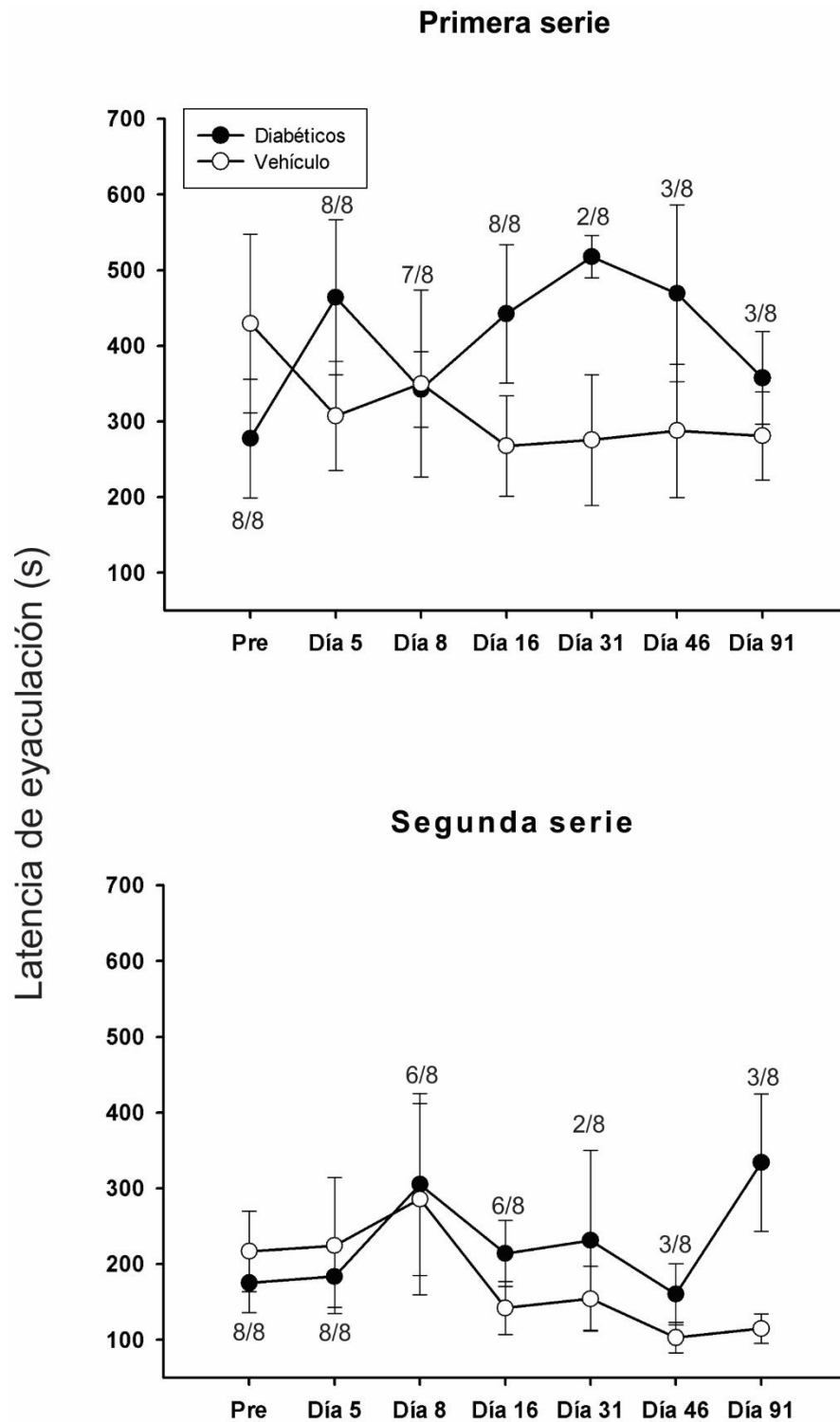


Figura 24. Latencia de eyaculación. El grupo de diabéticos muestra un incremento en la latencia de forma notable al día 90. En cambio, el grupo vehículo muestra una tendencia a disminuir su valor. Los números en la parte superior del gráfico indican el número de animales que presentaron conducta de cópula en el día de registro indicado.

9.3 Peso corporal

En el 100% de animales diabéticos ($n = 8$) perdieron peso durante los primeros 16 días postratamiento. En algunos animales, a partir del día 46, se observó una recuperación de peso, y se mantuvo hasta el día 91. Sin embargo, no fue suficiente para alcanzar el peso de los animales Veh, cuya tendencia del peso siempre fue al alta (Figura 25). El 50% de los animales diabéticos (468, 471, 556 y 604) tuvieron una recuperación del peso corporal y continuaron incrementando hasta el día 91 posterior a la inducción de la DM. 25% de los animales (549 y 555) no lograron recuperar el peso inicial pero tampoco perdieron peso de forma excesiva. Otro animal (550) no logró recuperar peso y siempre tuvo una tendencia a disminuir (Figura 26).

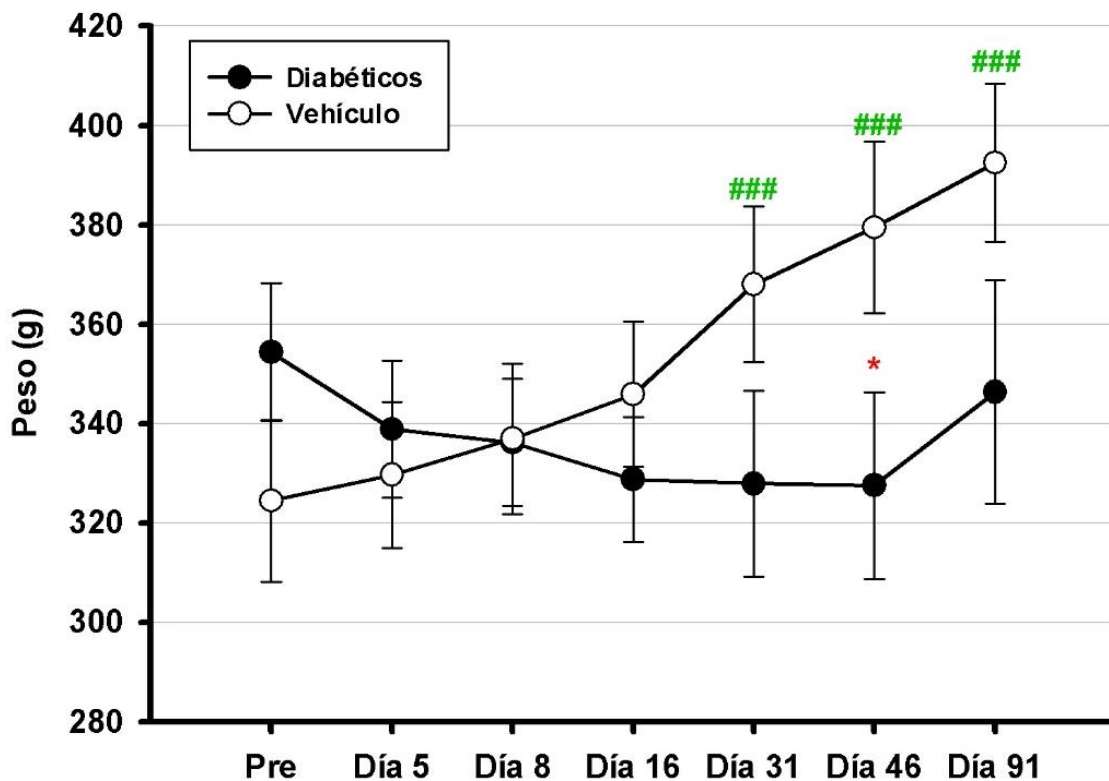


Figura 25. Gráfica del peso corporal de los animales de estudio. Note que el peso de los que fueron inyectados con STZ disminuyó desde el día 5. En cambio, hubo un incremento casi lineal del peso corporal en el grupo Veh. Solo se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos al día 46. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001). Las almohadillas indican diferencias significativas entre las fechas de registro del grupo Veh (# < 0.05, ## < 0.01, ### < 0.001).

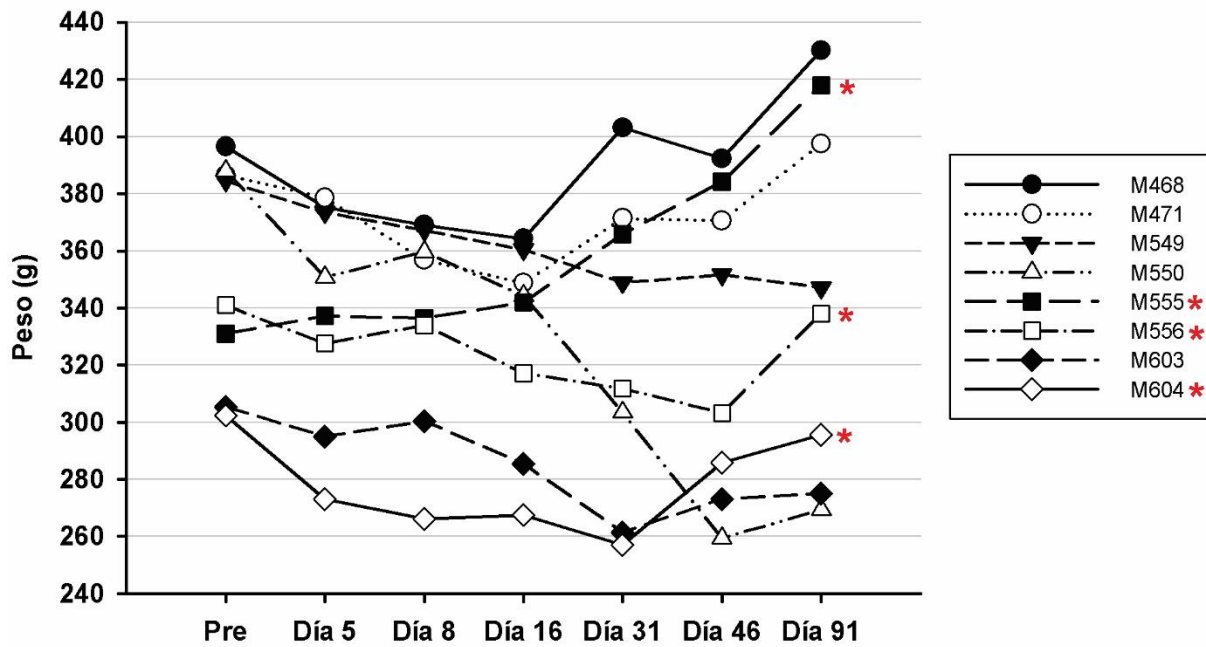


Figura 26. Gráfica del peso corporal individual de los animales que fueron inyectados con STZ. Note que el peso disminuyó a partir del día 4. Algunos de los animales recuperaron (e incluso superaron) peso a partir del día 16, al final de los registros claramente se observan tres conjuntos de animales según el peso: Quienes recuperaron, quienes lo mantuvieron y los que continuaron perdiendo. Los asteriscos señalan a los animales DM que presentaron conducta sexual a lo largo del periodo de evaluación (día 91).

9.4 Electromiografía

Se realizaron estudios electromiográficos en los animales al término de los registros de conducta de micción y de cópula (DM, n=6 y Veh, n=6), y a los grupos de corto y mediano plazo, tal como se describió arriba.

En los animales Veh el músculo EEU tuvo un patrón de descarga caracterizado por una actividad basal, misma que incrementó en amplitud y frecuencia con la estimulación mecánica de la uretra a nivel prostático o diverticular. Dicha actividad (posdescarga) persistió por varios minutos aún después de haber cesado el estímulo. Por otro lado, el músculo BE presentó actividad contráctil en respuesta a la estimulación mecánica de la uretra. Dicha actividad tuvo una duración menor a un segundo, asociado al tiempo de estimulación de la uretra. Este tipo de actividad fue análoga a un mecanismo de encendido-apagado. En algunos animales se observó actividad de postdescarga a manera de espasmos, en los primeros minutos posteriores a la estimulación del divertículo a través del pene (Figura 27).

La diabetes modificó la respuesta característica del EEU especialmente en los animales de largo plazo. La amplitud de la actividad muscular durante la estimulación disminuyó significativamente en comparación con los Veh. En la mayoría de los casos, la respuesta de postdescarga fue poca o nula.

Con respecto al BE, los animales DM mostraron una menor actividad muscular refleja a la estimulación de la uretra, solo en algunos animales se observó actividad de postdescarga. El patrón de actividad muscular no se modificó de manera significativa (Figura 27).

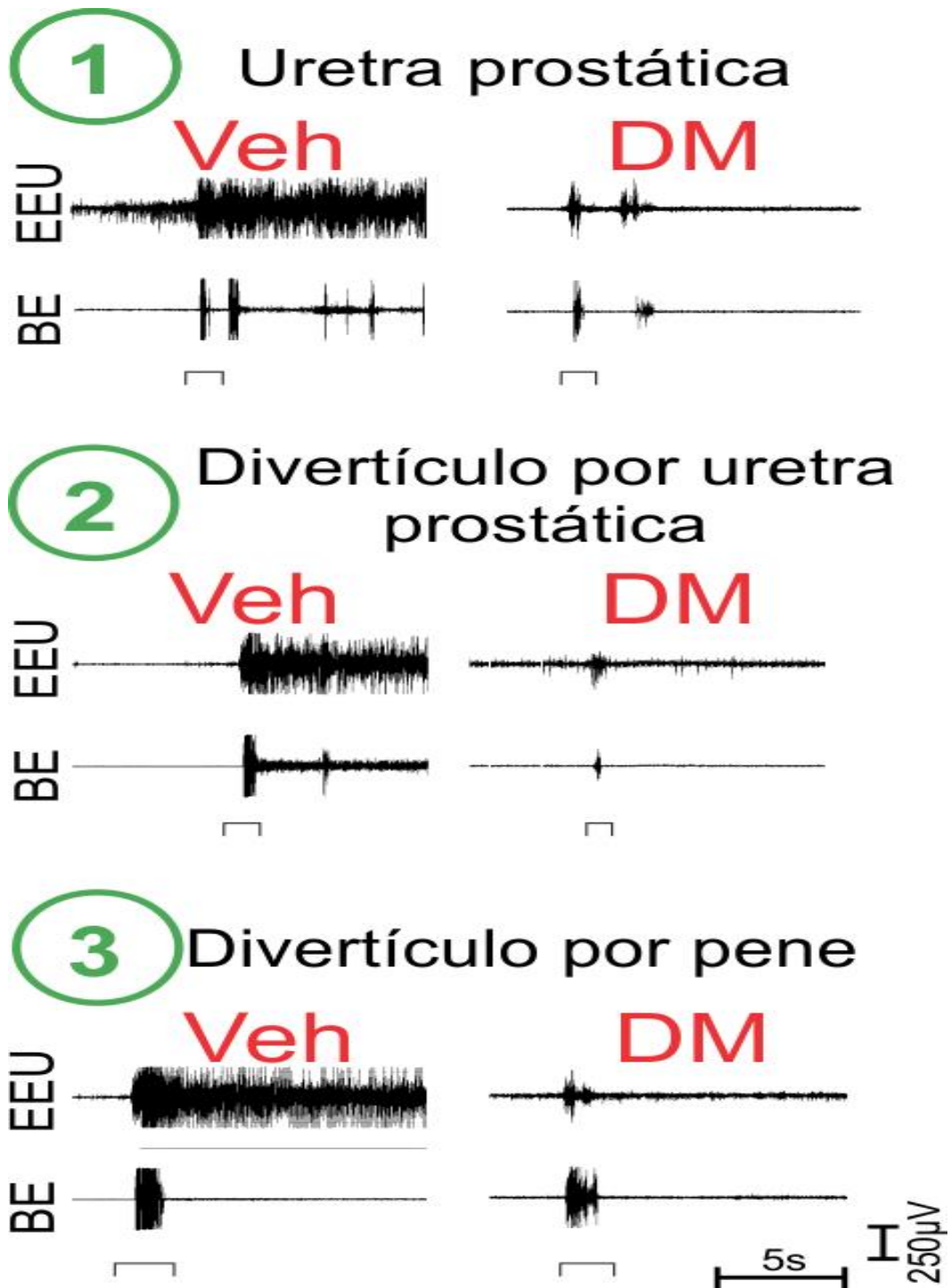


Figura 27. Trazo EMG del EEU y BE antes, durante y después de la estimulación mecánica de la uretra en animales DM y Veh en el día 90 postratamiento. Note en los trazos de la izquierda (Veh) el patrón característico del EEU con actividad de postdescarga continua. En los animales DM se aprecia la disminución de la actividad muscular del EEU y del BE.

Cuantitativamente se encontró que a corto plazo la amplitud de descarga basal (en los tres tipos de estimulación) del EEU fue de 19.35 μV . Durante la estimulación de la uretra prostática aumentó la amplitud a 134 μV . En todos los casos, tanto animales DM como Veh presentaron actividad postdescarga. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre grupos ($P = 0.059$) (Figura 28).

En los grupos de mediano plazo, la actividad basal previa a cualquiera de los tres tipos de estimulación fue de 14.65 μV . Sin embargo, cuando se realizó el estímulo a nivel de uretra prostática, hasta alcanzar el divertículo o a través de la uretra peneana, se obtuvieron amplitudes significativamente más bajas en los animales del grupo DM: 94.28 μV , 79.64 μV y 80.73 μV ($P = 0.031$ en la estimulación prostática, $P < 0.001$ divertículo a través de la uretra prostática y $P = 0.014$ divertículo a través de uretra peneana). En cambio, en los animales Veh la amplitud fue de 133.21 μV .

En los tres tipos de estimulación hubo actividad postdescarga, en todos los casos la amplitud de la actividad fue significativamente menor en el grupo DM (39.75 μV) comparada con el Veh (81.86 μV) ($P < 0.026$) (Figura 28).

Para el grupo a largo plazo (día 91), la amplitud del EEU en estado basal fue igual en ambos grupos. Durante la estimulación en uretra prostática y hasta alcanzar el divertículo fue menor en los animales DM (99 μV) comparada con los Veh (168.1 μV). Cuando el estímulo se realizó en la uretra peneana, no se encontró diferencia. La actividad postdescarga fue significativamente menor en todos estímulos de los animales DM (61.4 μV) comparada contra los animales Veh (99.03 μV) ($P < 0.01$) (Figura 28).

Amplitud del EEU

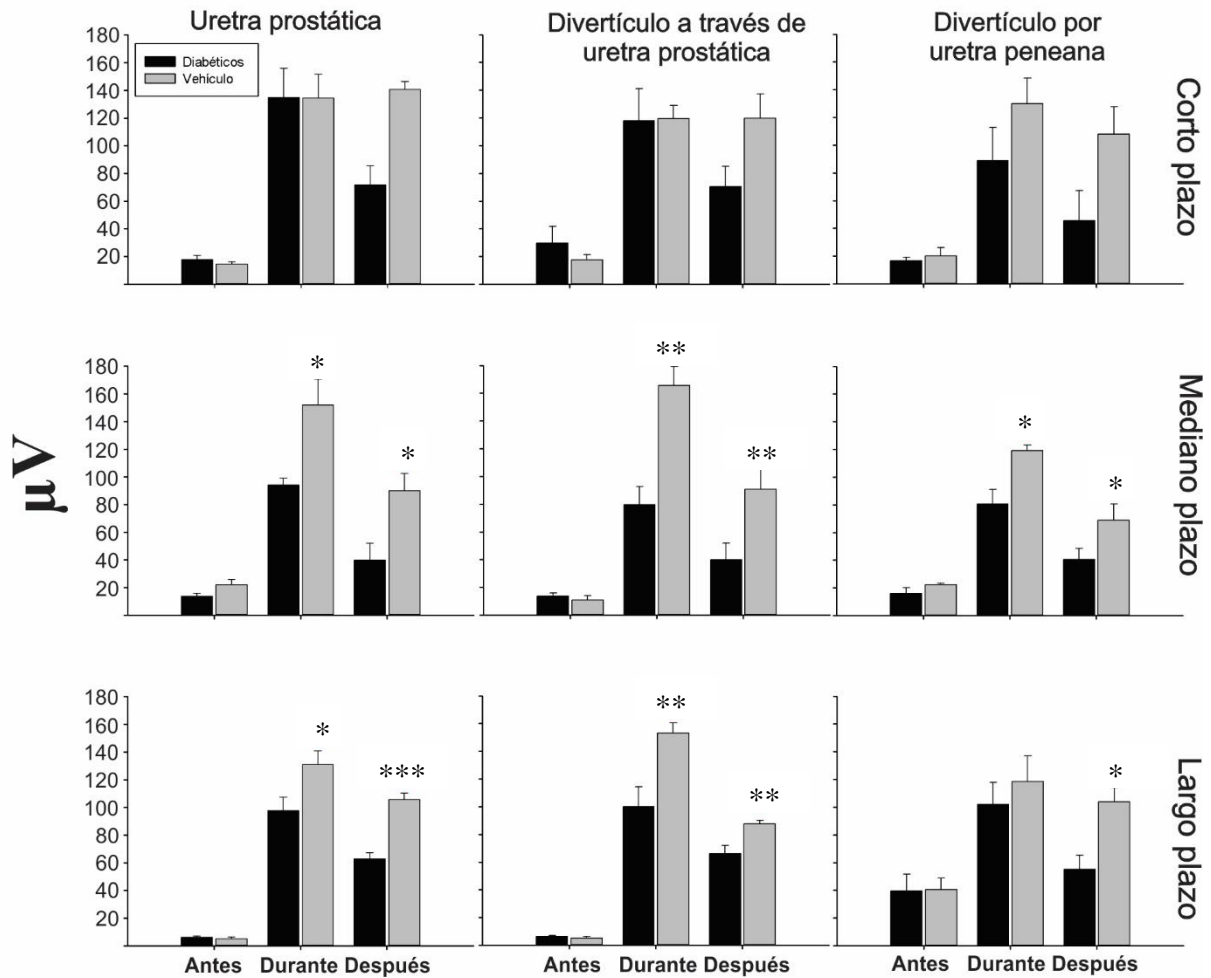


Figura 28. Amplitud de la actividad EMG del músculo EEU en DM y Veh. Los animales DM tuvieron una menor actividad muscular a partir del mediano plazo durante y después del estímulo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001).

La frecuencia de la actividad muscular del EEU, en estado basal fue de 23.4 Hz en animales Veh y DM. A corto plazo, solo hubo diferencias significativas durante la actividad postdescarga cuando se estimuló la uretra peneana, siendo más baja en el grupo DM (58.8Hz) en comparación con el Veh (121.7 Hz) ($P = 0.017$).

A mediano plazo, la frecuencia fue significativamente menor en los animales DM comparados con los Veh durante la estimulación de la uretra peneana ($P = 0.019$), con una disminución del 40% respecto a los 148.99 Hz que se registraron en los animales Veh. La actividad postdescarga mostró frecuencias significativamente menores en el grupo DM (33.8 Hz) comparada con el grupo Veh (87.4 Hz) ($P < 0.01$).

A largo plazo, la frecuencia de la actividad postdescarga fue 50% menor en los animales DM (49 Hz) comparados con los Veh (99.4 Hz) ($P < 0.018$) (Figura 29).

Frecuencia del EEU

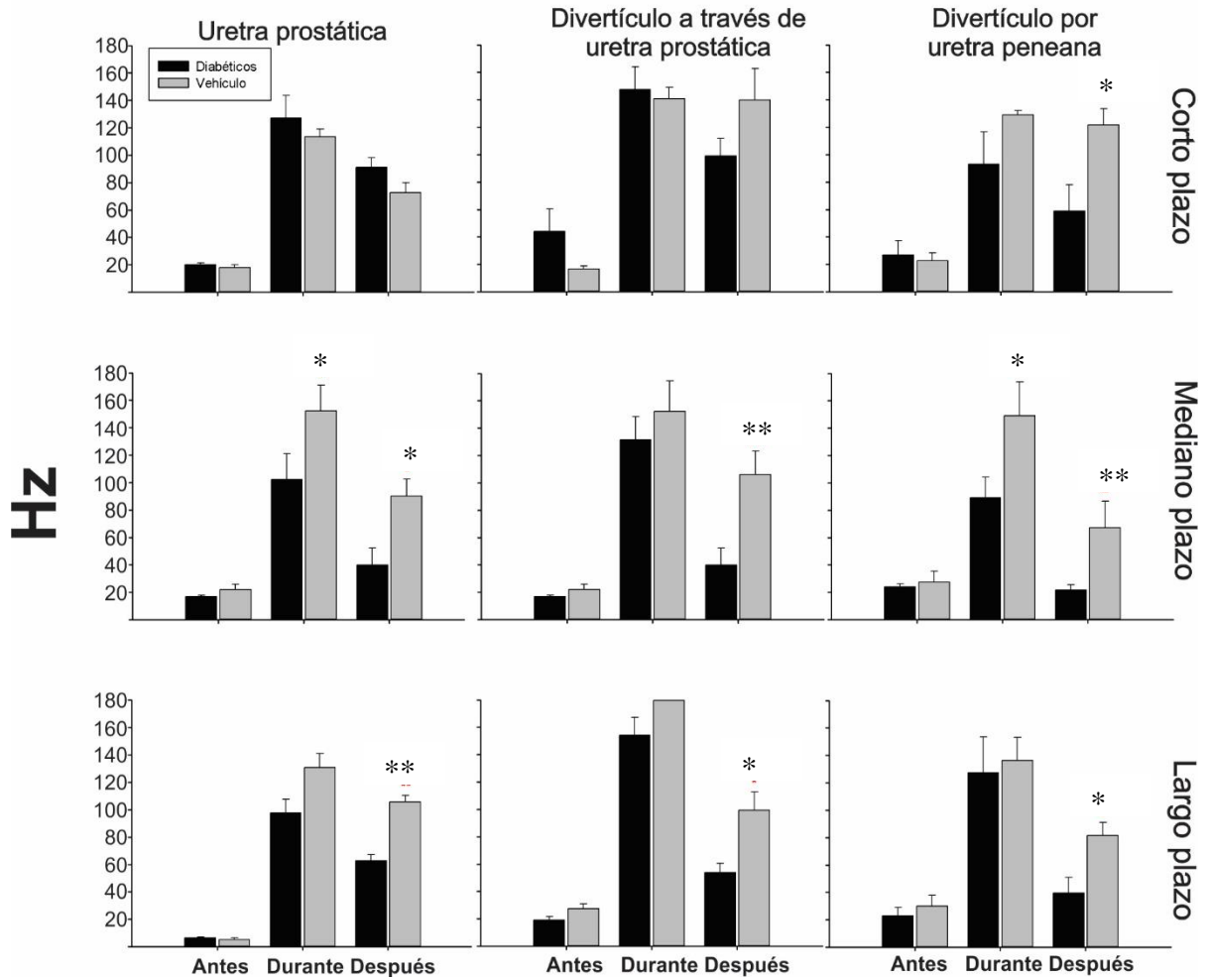


Figura 29 Frecuencia de la actividad EMG del músculo EEU en DM y Veh. Los animales DM tuvieron una menor frecuencia a partir del mediano plazo, durante y después del estímulo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001).

La amplitud de la actividad muscular del BE en estado basal fue similar para animales DM y Veh (8.36 μV). Solo en el caso de la estimulación de la uretra prostática en el corto plazo, se observó una amplitud estadísticamente mayor en los animales Veh comparada con la amplitud de los DM ($P = 0.009$). A mediano plazo, en la estimulación del divertículo a través de la uretra prostática la amplitud fue menor en los animales DM (136.442 μV) comparada con la del grupo Veh (194.17 μV) ($P = 0.022$). A largo plazo en todos los estímulos provocados, la amplitud fue 40% menor en los animales DM (115.9 μV) comparados con la de los animales Veh (192.7 μV), ($P < 0.042$) (Figura 30).

Amplitud del BE

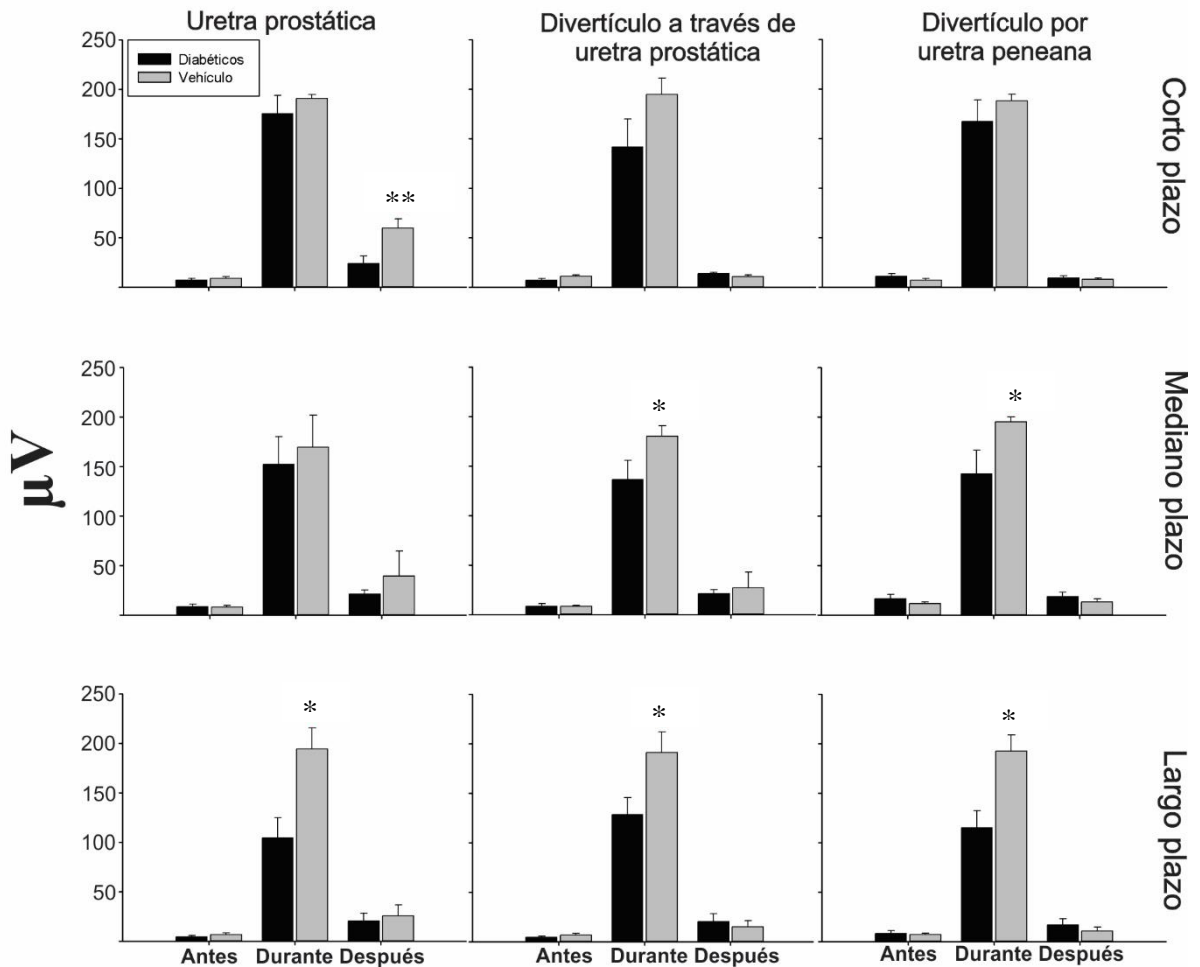


Figura 30. Amplitud de la actividad EMG del músculo BE en DM y Veh. Los animales DM tuvieron una menor actividad muscular a partir del mediano plazo durante el estímulo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001).

La frecuencia de la actividad muscular del BE fue igual entre DM y Veh independientemente del plazo o del estímulo provocado. La única excepción se observó a corto plazo en la estimulación de la uretra prostática, donde se apreció en el grupo Veh una mayor frecuencia posterior al estímulo. Esta frecuencia fue significativamente mayor que la de los animales DM ($P < 0.001$) (Figura 31).

Frecuencia del BE

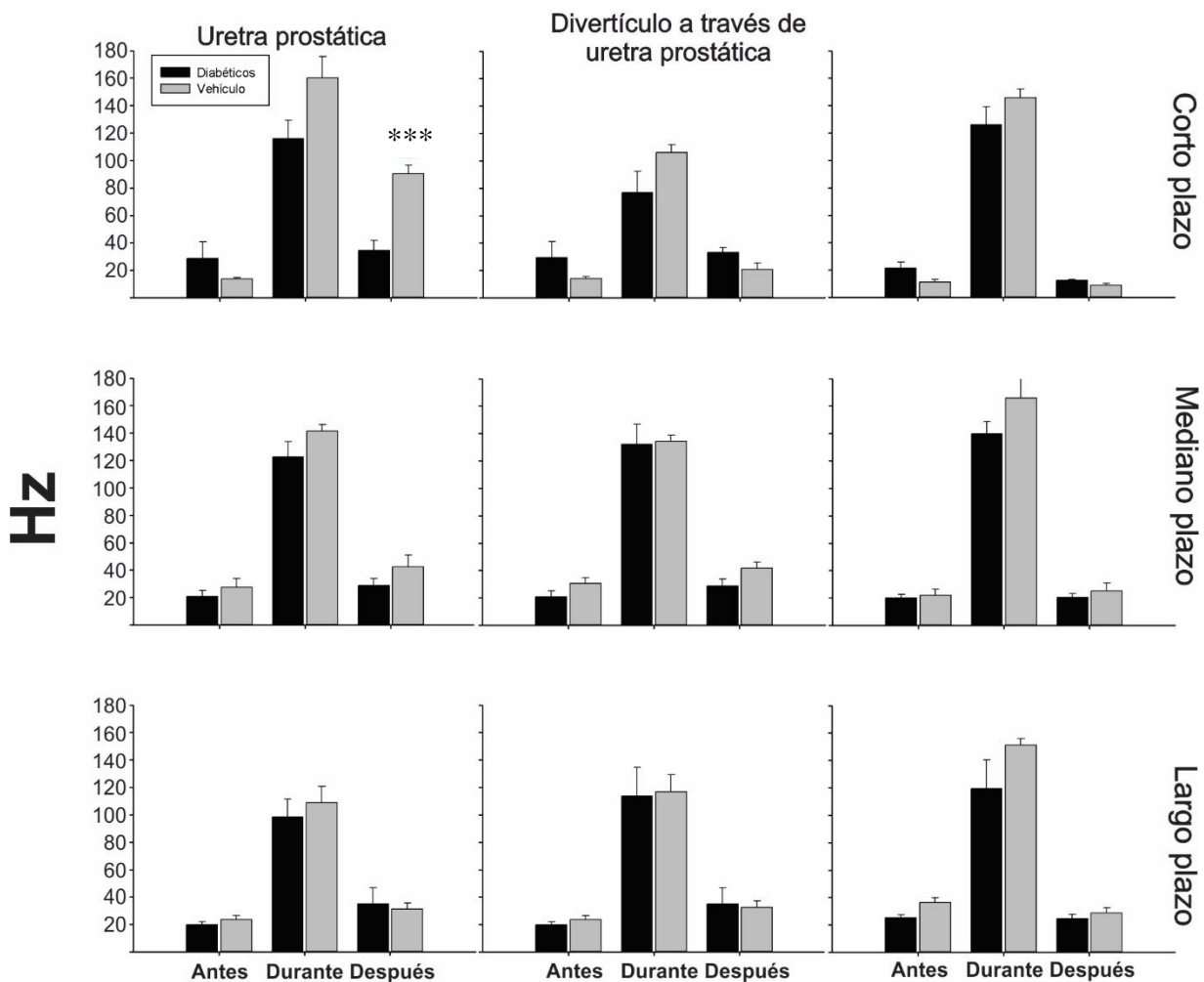


Figura 31. Frecuencia de la actividad EMG del músculo BE en DM y Veh. Los animales DM y Veh no tuvieron diferencias en los diferentes plazos de estudio. Los asteriscos indican diferencias significativas entre DM y Veh (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001).

10. Discusión

En nuestra hipótesis planteamos que las alteraciones urinarias se presentarían antes que las alteraciones sexuales, y nuestros resultados nos ayudan a sustentarla. En primera instancia, porque hemos observado los signos clásicos de la enfermedad como la poliuria, polidipsia, polifagia (Blair, 2003; Salemi, Rafie, Goodarzi, & Ghaffari, 2016) y pérdida de peso (Scarano et al., 2006) desde el cuarto día posterior a la administración de la STZ. De manera similar a lo descrito en la revisión de Daneshgari et al, (2006) encontramos un incremento inmediato en los valores directamente dependientes del incremento de la osmolaridad plasmática: volumen total de orina e ingesta de agua.

La elevada ingesta de agua es un mecanismo de compensación al incremento de los solutos de la sangre (la glucosa). Este mecanismo que trata de compensar la hiperosmolaridad sanguínea, da pie a un incremento del volumen circulante, lo que se traduce entonces en una elevada diuresis. De manera que los animales inmediatamente después de la inducción de la diabetes (al día 4), ante un estado de hiperosmolaridad manifiestan volúmenes de micción elevados (Melman et al., 2009). La magnitud del cambio del volumen de micción varía de manera directa a la ingesta de agua, que a su vez dependerá de la concentración de glucosa en la sangre tal como lo indican los estudios longitudinales de Melman et al, (2009), donde al tratar animales diabéticos con insulina, hay una reducción de los niveles de glicemia y de forma subsecuente, del volumen expelido de orina en 24 horas.

El incremento en el volumen de orina es congruente con los resultados de la duración de la micción, parámetro que se incrementa desde el día 4 y que continúa elevado hasta el día 90 en las fases de oscuridad y de luz. Los valores normales de duración de la micción o expulsión de orina, obtenidos mediante estudios conductuales (Juárez & Cruz, 2014) y cistometrográficos (Cruz & Downie, 2005) son de 2.7-3.3 segundos en machos adultos, en cambio, en los animales diabéticos estos valores se triplicaron al final del registro y sobre todo en la fase de luz, donde se observaron micciones de hasta 25 segundos de duración, lo que implica sobredistención vesical, que conlleva a un agrandamiento de la vejiga urinaria y por lo tanto cambios en la diuresis y a largo plazo cambios estructurales.

En relación a la frecuencia de micción, este parámetro nos podría indicar clínicamente alteraciones vesicales relacionadas con la contracción del músculo detrusor, así como del funcionamiento de la musculatura estriada periuretral (Holmes et al., 1991; Mallory, Steers, & de Groat, 1989). El incremento del número de micciones desde el primer registro (día 4) y un descenso que tiende a estabilizarse alrededor del día 15 hasta el tercer mes de registro, se puede relacionar con el comienzo de la alteración de la contractibilidad vesical que de manera secundaria a la elevada diuresis ocasiona hipertrofia del detrusor (Lin & Scott, 2012; Xiao et al., 2015), y la modificación tisular que sufre la vejiga urinaria para lidiar con la elevación de la diuresis, principalmente en la capa muscular que incrementa a las 2 semanas, y de tejido conectivo que disminuye alrededor del mismo tiempo (G Liu & Daneshgari, 2006).

Por otra parte, es importante recordar, que además de los cambios relacionados con la estructura vesical que señalan a la hipertrofia del detrusor como la principal modificación, Nirmal et al, 2014, encuentran que existe adelgazamiento de la capa submucosa y reacciones inflamatorias con infiltrados celulares e incluso apoptosis alrededor de las 4 y 12 semanas posteriores a la inducción de la diabetes.

Nuestros resultados de conducta de micción nos arrojaron información que se puede correlacionar con los parámetros antes descritos ya que a partir del día 4 posterior a la inducción de la DM se observaron alteraciones en las conductas de micción, tales como: micciones con pausas y en sitios inusuales. Las alteraciones más frecuentes fueron las primeras. En contraparte, las micciones en sitios inusuales se presentaron de forma inconstante, lo que sugiere que el circuito nervioso aferente no ha sido afectado, ya que el animal sigue percibiendo el llenado vesical.

Para que estos resultados sean trasladados a una temporalidad comparable con la de los seres humanos consideramos a un día de los animales equivalente a 34.8 de los humanos (Sengupta, 2014), de manera que los primeros hallazgos de disfunción urinaria ligados a mecanismos de compensación se presentarían en los primeros 4 a 5 meses del inicio de la hiperglicemia (en los animales experimentales la concentración media de glucosa 482.86 ± 11.1 EE) y aquellos relacionados con alteraciones propiamente vesicales alrededor de los 4 años 4 meses.

Los días con mayor presencia de alteraciones de la conducta de micción fueron a los 30 y 45 posteriores a la inducción de la diabetes, hecho que se correlaciona de forma importante con las alteraciones de la estructura muscular vesical reportadas (Xiao et al., 2015), mencionadas como reversibles. Esto también es congruente con las alteraciones clínicas propuestas como criterios diagnósticos de disfunción urinaria en diabéticos (Ellenberg, 1980a).

Con respecto a las alteraciones de la conducta sexual, estas consistieron en la desaparición paulatina de los parámetros copulatorios, iniciando con las intromisiones, la ausencia de eyaculación hasta llegar a la ausencia completa de conducta de cópula. 12.5% de los animales diabéticos comenzaron a tener dificultad para llegar a eyacular al día 8, pero mantuvo la presencia de montas e intromisiones. 25% de los animales que lograron eyacular en la primera serie, no lo lograron en una segunda serie. Este comportamiento se repitió en el día 16. A partir del día 31 solo entre el 25 - 37% de los animales desplegó conducta sexual. Este valor bajo de animales que lograron copular se mantuvo hasta el día 91. Del total de animales DM, solo un animal recuperó la actividad sexual hasta el día 91, en donde desplegó sin problemas la conducta de cópula con latencias de monta, intromisión y eyaculación normales y en ambas series eyaculatorias. Debido a que la conducta sexual depende de centros de regulación espinales y supraespinales (Meuleman, 2011) hay muchas posibles estructuras y sistemas que al afectarse pudieran explicar los resultados que hallamos en nuestros experimentos, sobre todo el hecho de que un animal haya perdido y recuperado posteriormente la conducta sexual. Este tipo de hechos no ha sido reportado por estudios de conducta sexual como los de Pontes et al, 2011, donde sólo indica que un 33% de machos diabético fue sexualmente activo, pero solo 22% logró alcanzar la eyaculación. En nuestra hipótesis planteamos la posibilidad de que la neuropatía autonómica y somática pudieran reflejarse con alteraciones en los parámetros electrofisiológicos de los músculos EEU y BE en un periodo de tiempo corto (un mes) (Melman et al., 2009) a relativamente largo (3 meses, que traspalado a el tiempo de nosotros representaría alrededor de 9 años (Sengupta, 2014)). Este conocimiento podría explicar en parte las alteraciones de la conducta sexual en los machos DM que se hicieron manifiestas alrededor de las 3 semanas posterior a la inducción de la diabetes. Tomando lo anterior en consideración, existe la posibilidad de una disminución en el tamaño de los genitales (Hassan et al., 1993), así como el

efecto que pudiera tener esto en la producción de hormonas relacionadas con la motivación sexual como la testosterona, la oxitocina y/o la melanocortina (Dean & Lue, 2005). Es probable que la disminución brusca de la conducta sexual sea debida a una combinación de estos factores y de alteraciones en los centros de control supraespinales que son considerados como reguladores de la conducta sexual (Meuleman, 2011).

Un hallazgo importante (relacionado con la conducta copulatoria) que ha sido reportado por Hassan et al, 1993, fue la pérdida de masa y volumen en por lo menos dos glándulas accesorias del aparato genitourinario: vesícula seminal y próstata ventral. En este sentido, las medidas de longitud y espesor de los testículos no variaron (21.7 mm de longitud y 11.5 mm de anchura en el grupo DM vs 20.23 mm y 10.9 mm del grupo Veh), pero aún tenemos un número reducido de animales por lo que existe aún la posibilidad de que la hipotrofia pueda tener un papel importante como efecto causal de la desaparición de la conducta de cópula en los animales diabéticos en relación al tiempo de evolución de la enfermedad, esto debido a la posible reducción de las hormonas gonadales que generalmente se afectan ante casos de hipogonadismo como este (El-Hossary, Hassanein, El-Ghareeb, & Issa, 2016; Scarano et al., 2006; Steger, 1990). Los efectos catabólicos causados por la DM pueden explicar la disminución del tamaño de las vísceras antes mencionadas, así como la pérdida de peso de algunos animales.

Los resultados de los estudios electromiográficos nos mostraron que de *facto* hay alteraciones en la fisiología del EEU y el BE. El periodo de tiempo en el cual se hizo evidente la reducción de la amplitud y la frecuencia de la actividad refleja a la mecanoestimulación fue a mediano plazo (entre 30 y 45 días), resultados que concuerdan con lo reportado por Melman et al en 2009 sobre la disminución de la velocidad de conducción nerviosa en machos diabéticos, que categoriza como neuropatía diabética.

Específicamente haciendo la distinción entre ambos músculos, el EEU parece ser el más afectado, debido a que la disminución de la actividad refleja y (muy importante) de postdescarga se evidenció desde los 30 a 45 días, resultados son controversiales con los encontrados durante la EMG observada durante la micción que indican incremento de la actividad en “bursting” a los 45 días (Grape, Dederling, & Jonasson, 2009). En el caso del BE, los efectos más notorios, sobre todo en la amplitud durante la estimulación de la uretra se observó hasta los 90 días.

Además, debe considerarse que la propia naturaleza del BE para contraerse de manera refleja en forma de switch on-off, hace menos evidente la lesión que se observa temprano en el EEU. La frecuencia en ambos casos acompañó de manera paralela las afectaciones en el grupo de animales DM iniciando en el mediano plazo en el EEU y en el largo plazo en el BE.

La relevancia de los resultados anteriores se pone de manifiesto cuando relacionamos el gran efecto catabólico que trae consigo la diabetes mellitus (Guyton & Hall, 2009), mismo que ocasiona una pérdida de masa magra a nivel sistémico y que fue observado durante el desarrollo de los experimentos electromiográficos y por la disminución del peso corporal que se registró a lo largo de todo el periodo de registro. De tal manera que se esperaba que los principales grupos musculares disminuyan en grosor, tal como se expresa en la disminución de la síntesis proteica en animales diabéticos y que se restaura con la aplicación de insulina (Pepato et al., 1996), y con ello una disminución en la amplitud y frecuencia de la actividad muscular.

11. Conclusiones y perspectivas

Las alteraciones urinarias secundarias a la diabetes mellitus aparecen a corto plazo (desde el día 4 de hiperglicemia) y preceden a las alteraciones sexuales.

Las alteraciones sexuales secundarias a la DM aparecen a mediano plazo (alrededor del día 30), evidenciadas principalmente por la abolición de la conducta sexual.

Las alteraciones en la actividad electromiográfica de la musculatura estriada periuretral aparecen a mediano plazo, siendo más afectada la respuesta del músculo esfínter externo de la uretra que la del bulboesponjoso.

Las perspectivas para este trabajo de investigación se dirigen hacia determinar específicamente el tipo de daño que genera la diabetes en los tejidos del aparato urogenital, por ejemplo, si hay disminución en el número de fibras musculares y/o de las unidades motoras que pudieran estar participando en la alteración de la actividad electromiográfica, así mismo, realizar estudios que nos permitan discernir si la alteración es propiamente nerviosa, y si existe alguna diferencia en el grado de afectación de los diferentes nervios que controlan a los órganos y músculos periuretrales.

12. Referencias

- American Diabetes Association. (2018). *Diabetes Care. Standards of medical care in diabetes* (Vol. 41). <https://doi.org/https://doi.org/10.2337/dc18-Sint01>
- Bacon, C. G., Hu, F. B., Giovannucci, E., Glasser, D. B., Mittleman, M. A., & Rimm, E. B. (2002). Association of type and duration of diabetes with erectile dysfunction in a large cohort of men. *Diabetes Care*, *25*(8), 1458–1463. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.8.1458>
- Biessels, G. J. (2013). Sweet memories: 20 years of progress in research on cognitive functioning in diabetes. *European Journal of Pharmacology*, *719*(1–3), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.055>
- Biessels, G. J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., & Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurology*, *5*(1), 64–74. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70284-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70284-2)
- Blair, M. (2003). Diabetes Mellitus Review. *Urologic Nursing*, *36*(1), 27–36. <https://doi.org/10.7257/1053-816X.2016.36.1.27>
- Cruz, Y., & Downie, J. W. (2005). Sexually dimorphic micturition in rats: relationship of perineal muscle activity to voiding pattern. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *289*, R1307–R1318. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00088.2005>
- Daneshgari, F., Liu, G., Birder, L., Hanna-Mitchell, A. T., & Chacko, S. (2009). Diabetic Bladder Dysfunction: Current Translational Knowledge. *Journal of Urology*, *182*(6 SUPPL.), S18–S26. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.08.070>
- Daneshgari, F., & Moore, C. (2006). Diabetic uropathy. *Seminars in Nephrology*, *26*(2), 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2005.09.009>
- De Groat, W. C., & Booth, A. M. (1980). Physiology of male sexual function. *Annals of Internal Medicine*, *92*(2 II), 329–331.
- Dean, R. C., & Lue, T. F. (2005). Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *Urologic Clinics of North America*, *32*, 379–395. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2005.08.007>
- El-Hossary, N., Hassanein, H., El-Ghareeb, A. W., & Issa, H. (2016). Intravenous vs intraperitoneal transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *121*, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2016.09.008>
- Elabbady, A., Hassouna, M., & Elhilali, M. (1995). Apomorphine versus mating behavior in testing erectile capabilities of diabetic rats. *Urology*, *45*(4), 715–719.
- Ellenberg, M. (1980a). Diagnosis of urinary bladder dysfunction in diabetes mellitus. *Ann*

- Intern Med*, 92(2 Pt 2), 323–326. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7188844
- Ellenberg, M. (1980b). Sexual Function in Diabetic Patients. *Annals of Internal Medicine*, 92(2_Part_2), 331. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-92-2-331>
- Fedele, D. (2005). Therapy Insight: sexual and bladder dysfunction associated with diabetes mellitus. *Nature Clinical Practice. Urology*, 2(6), 282–90; quiz 309. <https://doi.org/10.1038/ncpuro0211>
- Federación Mexicana de Diabetes A.C. (2016). Retrieved from <http://fmdiabetes.org/diabetes-en-mexico/>
- Fröde, T. S., & Medeiros, Y. S. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(2), 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.038>
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Currents Protocols in Pharmacology*, 70(September), 5.47.1-5.47.20. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70>
- Grape, H., Dederig, A., & Jonasson, A. (2009). Retest reliability of surface electromyography on the pelvic floor muscles. *Neurol Urodyn.*, 28(5), 395–399. <https://doi.org/10.1002/nau>
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2009). *Tratado de fisiología médica*. (Elsevier, Ed.) (11th ed.). Barcelona, España.
- Guzmán, J. R., Lyra, R., Aguilar-Salinas, C. a, Cavalcanti, S., Escaño, F., Tambasia, M., ... ALAD Consensus Group. (2010). Treatment of type 2 diabetes in Latin America: a consensus statement by the medical associations of 17 Latin American countries. *Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, 28(6), 463–471. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892010001200008>
- Hart, B. L., & Melese-D'Hospital, P. Y. (1983). Penile mechanisms and the role of the striated penile muscles in penile reflexes. *Physiology and Behavior*, 31(6), 807–813. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90277-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90277-9)
- Hassan, A., Hassouna, M., Taketo, T., Gagnon, C., & Elhilali, M. (1993). The effect of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *Urology*, 149(1), 148–154.
- Hebel, R., & Stromberg, M. W. (1986). *Anatomy and embriology of the rat*. BioMed.
- Holmes, G. M., Chapple, W. D., Leipheimer, R. E., & Sachs, Benjamin, D. (1991). Electromyographic Analysis of Male Rat Perineal Muscles During Copulation and Reflexive Erections. *Physiology and Behavior*, 49(51), 1235–1246.
- Hulsebosch, C. E., & Coggeshall, R. E. (1982). An analysis of the axon populations in the

- nerves to the pelvic viscera in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 211(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/cne.902110102>
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2012). encuesta nacional de Salud. *Ensanut*, 1–4.
- International Diabetes Federation. (2017). *IDF Diabetes Atlas*. <https://doi.org/http://www.diabetesatlas.org/>. (accessed 7 December 2015)
- Juárez, M., Hernández, I., & Cruz, Y. (2012). Genitourinary dysfunction in male rats after bilateral neurectomy of the motor branch of the sacral plexus. *Neurourology and Urodynamics*, 9999, 1–6.
- Juárez, R., & Cruz, Y. (2014). Urinary and ejaculatory dysfunction induced by denervation of specific striated muscles anatomically related to the urethra in male rats. *Neurourology and Urodynamics*, 33, 437–442.
- Juárez, Zempoalteca, R., Pacheco, P., Lucio, R. A., Medel, A., & Cruz, Y. (2015). Activity of the extrnal urethral sphincter evoked by genital stimulation in male rats. *Neurourology and Urodynamics*, 34(3), 224–230. <https://doi.org/10.1002/nau.22850>
- Kolondy, R. c., Kahn, C. B., Gldstein, H., & Barnett, D. M. (1979). Sexual dysfunction in diabetic men. *Journal of the Tennessee Medical Association*, 72(8), 607–608.
- Langdale, C. L., & Grill, W. M. (2016). Phasic activation of the external urethral sphincter increases voiding efficiency in the rat and the cat. *Experimental Neurology*, 285, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.030>
- Lehtoranta, M., Streng, T., Yarkin, E., Paranko, J., Kolts, I., Talo, A., & Santti, R. (2006). Division of the male rat rhabdosphincter into structurally and functionally differentiated parts. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 288(5), 536–542. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20318>
- Lin, G. G., & Scott, J. G. (2012). Roles of Polyuria and Hyperglycemia on Bladder Dysfunction in Diabetes. *J Urol*, 100(2), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations
- Liu, G., & Daneshgari, F. (2005). Alterations in neurogenically mediated contractile responses of urinary bladder in rats with diabetes. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 288(6), F1220-6. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00449.2004>
- Liu, G., & Daneshgari, F. (2006). Temporal diabetes- and diuresis-induced remodeling of the urinary bladder in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(3), R837-43. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00917.2005>
- Lucio, R. A., & Tlachi-López, J. L. (2008). Análisis de la copula y el eyaculado de la rata albina (*Rattus norvegicus*). Tlaxcala, México: Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Mallory, B., Steers, W. D., & de Groat, W. C. (1989). Electrophysiological study of micturition reflexes in rats. *The American Journal of Physiology*, 257(2 Pt 2), R410-21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2764162>

- Martínez, A. (2003). *Caracterización anatómica y funcional de la uretra y de su esfínter externo de la rata maho*. Universidad Veracruzana.
- Mckenna, K. E., & Nadelhaft, I. (1986). The Organization of the Pudendal Nerve in the Male and Female Rat, *549*. <https://doi.org/10.1002/cne.902480406>
- Melman, A., Zotova, E., Kim, M., Arezzo, J., Davies, K., Disanto, M., & Tar, M. (2009). Longitudinal studies of time-dependent changes in both bladder and erectile function after streptozotocin-induced diabetes in Fischer 344 male rats. *BJU International*, *104*(9), 1292–1300. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08573.x>
- Meuleman, E. J. H. (2011). *Men 's Sexual Health and the Metabolic Syndrome* (Vol. 48). <https://doi.org/10.1080/00224499.2011.558646>
- Moore, C. L., & White, R. H. (1996). Sex Differences in Sensory and Motor Branches of the Pudendal Nerve of the Rat. *Hormones and Behavior*, *30*(0062), 590–599. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1996.0062>
- Nirmal, J., Tyagi, P., Chuang, Y. C., Lee, W. C., Yoshimura, N., Huang, C. C., ... Chancellor, M. B. (2014). Functional and molecular characterization of hyposensitive underactive bladder tissue and urine in streptozotocin-induced diabetic rat. *PLoS ONE*, *9*(7), 3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102644>
- Oger-Roussel, S., Behr-Roussel, D., Caisey, S., Kergoat, M., Charon, C., Audet, A., ... Giuliano, F. (2014). Bladder and erectile dysfunctions in the Type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. *American Journal of Physiology:Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *306*(2), R108-117. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00033.2013>
- Pastelín, C. F., Zempoalteca, R., Pacheco, P., Downie, J. W., & Cruz, Y. (2008). Sensory and somatomotor components of the “sensory branch” of the pudendal nerve in the male rat. *Brain Research*, *1222*, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.05.012>
- Pontes, D. A., Fernandes, G. S. A., Piffer, R. C., Gerardin, D. C. C., Pereira, O. C. M., & Kempinas, W. G. (2011). Ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: The role of testosterone. *Pharmacological Reports*, *63*(1), 130–138. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70407-8](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70407-8)
- Sachs, B. D. (1982). Role of striated penile muscles in penile reflexes, copulation, and induction of pregnancy in the rat. *J Reprod Fertil*, *66*(2), 433–443. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0660433>
- Saito, T. R., Tatsuno, T., Takeda, A., Hashimoto, H., Suzuki, M., Terada, M., ... Nagy, G. M. (2004). Effects of i.c.v. administration of leptin on copulatory and ingestive behavior in STZ-induced diabetic male rats. *Experimental Animals/Japanese Association for Laboratory Animal Science*, *53*(5), 445–451. <https://doi.org/10.1538/expanim.53.445>
- Salemi, Z., Rafie, E., Goodarzi, M. T., & Ghaffari, M. ali. (2016). Effect of Metformin, Acarbose and Their Combination on the Serum Visfatin Level in Nicotinamide/Streptozocin-Induced Type 2 Diabetic Rats. *Iranian Red Crescent Medical*

Journal, 18(3). <https://doi.org/10.5812/ircmj.23814>

- Scarano, W., Messias, A., Olivia, S., Klinefelter, G., & Kempinas, W. (2006). Sexual behaviour, sperm quantity after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int J Androl.*, 29(4), 482–490.
- Secretaría de Salud. (2013). Diagnóstico, metas de control y referencia oportuna de prediabetes y diabetes mellitus tipo 2 en el adulto en primer nivel de atención. CENETEC. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sengupta, P. (2014). The Laboratory Rat : Relating Its Age With Human's. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 4(6), 624–630. <https://doi.org/23930179>
- Steger, R. W. (1990). Testosterone replacement fails to reverse the adverse effects of streptozotocin-induced diabetes on sexual behavior in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 35(3), 577–582. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2140195
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50(6), 537–546.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2009). *Anatomía y fisiología humana*. (Panamericana, Ed.) (11th ed.). México.
- Velasco-Contreras, M. E. (2016). Evolución de la epidemia de diabetes mellitus tipo 2 en población derechohabiente del IMSS. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 54(4), 490–503.
- Wiley, P. F., Herr, R. R., Jahnke, H. K., Chidester, C. G., Mizesak, S. A., Spaulding, L. B., & Argoudelis, A. D. (1979). Streptozotocin: Structure and Chemistry'. *J. Org. Chem.*, 44(1), 9–16.
- World Health Organization. (2016). *Global Report on Diabetes*. Paris. Retrieved from http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
- Xiao, N., Huang, Y., Kavran, M., Elrashidy, R. A., & Liu, G. (2015). Short-term diabetes- and diuresis-induced alterations of the bladder are mostly reversible in rats. *International Journal of Urology*, 22(4), 410–415. <https://doi.org/10.1111/iju.12695>
- Yonezawa, A., Ebiko, M., Yoshizumi, M., Ise, S., Watanabe, C., Mizoguchi, H., ... Sukurada, S. (2009). Effects of insulin replacement on ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Urology*, 16, 208–211. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2008.02214.x>
- Zimmet, P. (2003). The burden of type 2 diabetes: are we doing enough? *Diabetes & Metabolism*, 29(4), 6S9-6S18. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(03\)72783-9](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(03)72783-9)

13. Anexo

13.1 Prevalencia de la Diabetes mellitus

Según el Consenso Latinoamericano del 2010, los gastos que las familias de América Latina derivan para el tratamiento de la DM va desde el 40% al 60% de su ingreso total, mismo que asciende a un costo de 55 mil millones de dólares anuales, incluyendo los costos de la enfermedad así como las consecuencias de enfermedades relacionadas (Guzmán et al., 2010). Las estadísticas en México reportan a la DM como una de las principales causas de morbimortalidad a nivel nacional, y dentro de la lista de los 10 países con mayor prevalencia a nivel mundial (Figura 32) (International Diabetes Federation, 2017; Secretaría de Salud, 2013). En el 2015 se reportaron más de 11 millones de casos de diabetes (Federación Mexicana de Diabetes A.C., 2016), de tal manera que, tomando en cuenta que el costo del tratamiento individual asciende a 911.3 dólares (International Diabetes Federation, 2017), se estima que el costo anual que implica la población diabética es de más de 10 mil millones de dólares. Según los estudios de Velasco-Contreras, (2016), el costo de atención anual de pacientes diabéticos tipo 2 atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) durante el periodo 2002 - 2004 asciende a más de 450 millones de dólares, de los cuales el promedio por paciente correspondió a 3,193.75 dólares, donde los gastos de mayor proporción son por los días/cama en hospitalización y en unidades de cuidados intensivos. Este hecho implica altos costos para los servicios de salud pública y para la economía familiar.

13.2 Clasificación

La DM se ha clasificado según los mecanismos fisiopatológicos en tres categorías bien diferenciadas: Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) y Diabetes Mellitus Gestacional (DMG). Sin embargo, existen otras clasificaciones que además categorizan a un grupo de DM ocasionadas por causas específicas como: Diabetes por Síndromes Monogénicos (DMSM): diabetes neonatal y diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY por sus siglas en inglés: maturity-onset diabetes of the young), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística), y Diabetes inducida por drogas o agentes químicos (como los

tratamientos del VIH/SIDA o fármacos usados después de trasplante de órganos) (American Diabetes Association, 2018).

2017			2045		
Clasif.	País/ territorio	Número de personas con diabetes	Clasif.	País/ territorio	Número de personas con diabetes
1	China	114,4 millones (104,1-146,3)	1	India	134,3 millones (103,4-165,2)
2	India	72,9 millones (55,5-90,2)	2	China	119,8 millones (86,3-149,7)
3	Estados Unidos	30,2 millones (28,8-31,8)	3	Estados Unidos	35,6 millones (33,9-37,9)
4	Brasil	12,5 millones (11,4-13,5)	4	México	21,8 millones (11,0-26,2)
5	México	12,0 millones (6,0-14,3)	5	Brasil	20,3 millones (18,6-22,1)
6	Indonesia	10,3 millones (8,9-11,1)	6	Egipto	16,7 millones (9,0-19,1)
7	Federación Rusa	8,5 millones (6,7-11,0)	7	Indonesia	16,7 millones (14,6-18,2)
8	Egipto	8,2 millones (4,4-9,4)	8	Pakistán	16,1 millones (11,5-23,2)
9	Alemania	7,5 millones (6,1-8,3)	9	Bangladesh	13,7 millones (11,3-18,6)
10	Pakistán	7,5 millones (5,3-10,9)	10	Turquía	11,2 millones (10,1-13,3)

Figura 32. Los países con mayor prevalencia de diabetes en pacientes adultos de 20 a 79 años. Tomado de Diabetes Atlas.

13.2.1 Prediabetes

En 1997 y en 2003 un comité experto en diagnóstico y clasificación de diabetes, reconoció un grupo de individuos cuyos niveles de glucosa no se ajustaban a los criterios de diabetes, sin embargo, eran demasiado altos para ser considerados como normales. “Prediabetes” es un término utilizado para individuos con alteración de la glucosa en ayunas (IFG, por sus siglas en inglés de Impaired Fasting Glucose), cuando los valores de glucosa en sangre en ayuno son entre 100-125mg/dL y/o alteración en la tolerancia de glucosa (IGT, por sus siglas en inglés de Impaired Glucose Tolerance), cuando los valores de glucosa en sangre después de 2 horas de ayuno son de 140-199mg/dL, que indican un elevado riesgo de desarrollar

diabetes en el futuro (American Diabetes Association, 2018; Velasco-Contreras, 2016). Sin embargo, es necesario aclarar que tanto la IFG como la IGT no deben verse como entidades clínicas morbosas *per se*, más aun, representan un riesgo para desarrollo de enfermedades cardiovasculares por la asociación que tienen con obesidad abdominal o visceral, dislipidemia con hipertrigliceridemia y/o bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) e hipertensión arterial (American Diabetes Association, 2018).

13.2.2 Diabetes tipo 1

Esta forma de diabetes que antes era llamada “diabetes insulino-dependiente” o “diabetes juvenil”, representa entre 5-10% de todos los casos de diabetes y es debida a una destrucción de células beta de los islotes pancreáticos mediada inmunológicamente. Los marcadores autoinmunes incluyen anticuerpos anti-células de los islotes, anticuerpos anti-insulina, anti-GAD (glutamato descarboxilasa, GAD65), anti-tirosinfosfatasas IA-2 y IA-2 β , y anti-transportador de zinc 8 (ZnT8). La diabetes tipo 1 se define por la presencia de uno o más marcadores autoinmunes de los arriba mencionados (American Diabetes Association, 2018).

La proporción de destrucción de células β es bastante variable, siendo rápido principalmente en niños y lento en adultos (American Diabetes Association, 2018). Los niños y adolescentes pueden presentar como primera manifestación clínica de la enfermedad, cetoacidosis, sin embargo, otros sujetos tienen discreta elevación de la glucemia en ayuno que puede cambiar rápidamente a una severa hiperglucemia acompañada o no de cetoacidosis con infección u otras patologías asociadas. Los adultos pueden conservar una función de células β lo suficiente como para prevenir cuadros de cetoacidosis durante algunos años; algunos individuos eventualmente se volverán dependientes de insulina para sobrevivir, con el riesgo de presentar cetoacidosis. En estados avanzados de la enfermedad, hay una pequeña o ninguna secreción de insulina, que se manifiesta por bajos o indetectables niveles de péptido C en plasma (American Diabetes Association, 2018).

La DM1 comúnmente afecta a niños y adolescentes, pero la enfermedad puede presentarse a cualquier edad, incluso en el extremo opuesto, tal como la octava o novena década

de la vida. Si bien el desarrollo de la DM1 tiene múltiples predisposiciones genéticas también se relaciona con factores epigenéticos que hasta el momento se encuentran poco esclarecidos, ejemplo de lo anterior es la mayor propensión que los pacientes con DM1 tienen a otras entidades autoinmunes como enfermedad de Graves-Basedow, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Adison, vitíligo, enfermedad celiaca, hepatitis autoinmune, anemia perniciosa y miastenia gravis (American Diabetes Association, 2018).

13.2.3 Diabetes idiopática

Algunas formas de DM1 no tienen etiologías conocidas de tal manera que estos pacientes presentan concentraciones bajas de insulina en sangre y están propensos a la cetoacidosis, pero no hay evidencia de autoinmunidad. Solo una minoría de pacientes con DM1 pueden ser incluidos en esta categoría, la mayor proporción corresponde a descendientes de población africana o asiática. Esta forma de diabetes tiene un componente hereditario muy fuerte, ausencia de componentes inmunológicos contra las células β y sin asociación con antígenos leucocitarios humanos (HLA) (American Diabetes Association, 2018).

13.2.4 Diabetes tipo 2

La DM2 que anteriormente era referida como “diabetes no insulino-dependiente” o “diabetes del adulto” representa la mayor proporción de todos los casos de diabetes, con aproximadamente 90 - 95% del total de casos (American Diabetes Association, 2018). Esta enfermedad abarca a pacientes que presentan resistencia a la insulina y relativa o en otros casos absoluta deficiencia de la misma. Al menos durante los inicios de la DM2, los pacientes pueden no necesitar tratamiento de administración de insulina exógena para poder sobrevivir (American Diabetes Association, 2018).

Se han propuesto varias causas de la DM2, sin embargo, la etiología específica aún permanece ignota, añadiendo el hecho de que no hay un componente autoinmune que cause destrucción o disminución de la masa celular beta del páncreas. Así la mayoría de pacientes diabéticos tipo 2, tienen como característica general la presencia de obesidad, particularmente

obesidad abdominal. Tómese en cuenta que la obesidad por sí misma es causa de resistencia a la insulina, así como síndrome metabólico (algunas veces llamado síndrome X) (Zimmet, 2003).

Ante un estado de resistencia a la insulina (causado por la obesidad p. ej.) los niveles de glucosa en sangre se encuentran elevados en pacientes con DM2, y niveles aún más elevados de insulina en sangre serían esperados como medida compensatoria a la hiperglucemia. Por lo tanto, la secreción de insulina es defectuosa en los pacientes con DM2 de tal forma que resulta insuficiente para compensar el problema inicial de resistencia a la insulina.

En comparación con la DM1 (en la cual, la presencia de cetoacidosis es una manifestación clínica frecuente en los pacientes que se diagnostican como diabéticos), la cetoacidosis en pacientes con DM2 raramente se presenta como manifestación clínica inicial, pero si lo hace, normalmente se acompaña por una entidad morbosa concomitante que desencadene un proceso de estrés celular, como las infecciones (American Diabetes Association, 2018). De esta manera, la DM2 comúnmente se mantiene en estado “silencioso” por muchos años, debido a que la hiperglucemia tiene un desarrollo insidioso, que en etapas iniciales de la enfermedad no se manifiesta de forma severa como para favorecer la presentación de los signos y síntomas clásicos de la diabetes (poliuria, polifagia, polidipsia y pérdida de peso) (Tabla 1). Así, los casos diagnosticados de DM2 representan solo una pequeña proporción, y un gran número de pacientes no diagnosticados con DM2 tienen estados de hiperglucemia crónicos que incrementan el riesgo de desarrollar complicaciones sistémicas como lesiones micro y macrovasculares (American Diabetes Association, 2018; Zimmet, 2003).

El riesgo de desarrollar DM2 se relaciona positivamente con la edad, y una sumatoria de factores modificables como obesidad y estilos de vida sedentarios, de tal forma que el incremento de la urbanización y de los trabajos sedentarios se ha asociado positivamente con el incremento de la prevalencia de DM2 (Zimmet, 2003). Tal situación ocurre con mayor frecuencia en mujeres con predisposición a DM2, sujetos con enfermedades sistémicas crónicas como hipertensión arterial o dislipidemia, y grupos étnico- raciales como Afroamericanos, Indios Americanos, Hispanos, México-americanos y Asiático-americanos) (Zimmet, 2003).

13.2.5 Diabetes Gestacional

Durante muchos años la DMG se definió como un grado de intolerancia a los carbohidratos que era observado por primera vez durante el embarazo, independientemente de si la condición pudiera haber sido anterior al embarazo o si persistía posterior al mismo. Tal definición facilita una estrategia uniforme para la detección y clasificación de la DMG, pero era limitada e imprecisa (American Diabetes Association, 2018).

Con la creciente prevalencia de obesidad, el número de casos de DM2 en mujeres en edad reproductiva resultó en un incremento en el número de mujeres gestantes con DM2 no diagnosticada, por lo que se hizo razonable el tamizaje de mujeres que tuvieran factores de riesgo para desarrollar DM2, desde la primera consulta de control prenatal usando los criterios estándar para su diagnóstico. Así, las mujeres con signos de diabetes desde y durante el primer trimestre del embarazo se han clasificado como de diabéticas tipo 2. La DMG se diagnostica a partir del segundo y tercer trimestre del embarazo, usando criterios estándar y no considerando a las mujeres afectadas de manera tajante como DM de cualquiera de los tipos arriba descritos (American Diabetes Association, 2018).

13.2.6 Diabetes debida a Síndromes monogénicos (DMSM)

La diabetes causada por disfunción de las células β debido a defectos monogénicos representa solo un pequeño porcentaje del total de casos, menos del 5%. Es frecuentemente caracterizada por el inicio del signo axial (hiperglucemia) en edades tempranas de la vida, generalmente antes de los 25 años, según señala la American Diabetes Association (2018).

13.2.7 Diabetes neonatal

El diagnóstico de diabetes durante los primeros 6 meses de vida extrauterina sin aparente componente autoinmune ha sido conceptualizado como diabetes neonatal, de tal forma que este tipo de diabetes puede tener un carácter transitorio o permanente. El defecto genético más común que provoca una expresión transitoria de hiperglucemia es un defecto en la síntesis de ZAC (proteína de dedos de zinc asociada con apoptosis y detención del ciclo celular) y HYMAI (impresa en mola hidatidiforme), mientras que en la presentación de diabetes neonatal permanente, el defecto más común es en la codificación de la subunidad Kir6.2 de los canales K_{ATP} de las células β del páncreas (American Diabetes Association, 2018).

13.2.8 Diabetes del adulto de inicio en la juventud (MODY)

Este tipo de diabetes está caracterizado por la alteración de la secreción de insulina con mínimo o sin efectos en la acción de la misma. Es un tipo de diabetes heredada por patrón de dominancia autosómica. Las anormalidades descritas se ubican en seis loci de diferentes cromosomas, por ejemplo, mutaciones del cromosoma 12 para un factor de transcripción hepática referido como (HNF)-1 α (American Diabetes Association, 2018).

13.2.9 Fibrosis quística relacionada con diabetes

Es la más común entre los pacientes con patología fibroquística, ocurre en aproximadamente 20% de los adolescentes y entre 40-50% de los adultos afectados con esta categoría de enfermedades. Esta patología se asocia con una deficiencia de insulina debida a la destrucción parcial provocada por la fibrosis del páncreas(American Diabetes Association, 2018).

13.3 Criterios diagnósticos

Tabla 1. Criterios para diagnóstico de diabetes

HbGA1C \geq 6.5%. El examen debe ser realizado en un laboratorio usando un método certificado y estandarizado por el programa nacional de estandarización de hemoglobina glicosilada NGSP del ensayo DCCT.*

O

GPA \geq 126mg/dL (7.0mmol/L). Ayuno es definido como una dieta no calórica por al menos 8 horas antes de la prueba.*

O

GP 2-h \geq 200mg/dL (11.1 mmol/L) durante una PTGO. El examen debe realizarse como describe la WHO, Usando una carga de solución glucosada equivalente a 75g de glucosa anhidra disuelta en agua.*

O

En paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémicas, una muestra de glucosa plasmática al azar \geq 200mg/dL (11.1 mmol/L).

*En ausencia de hiperglucemia inequívoca, los resultados deben ser confirmados por repetición de la prueba.

HbGA1C: Hemoglobina Glicosilada A1C

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program

DCCT: Diabetes Control and Complications Trial

GPA: Glucosa plasmática en Ayuno

GP: Glucosa Plasmática

PTGO: Prueba de Tolerancia A la Glucosa Oral.

Tomado, modificado y traducido de: American Diabetes Association (ADA). 2018.

13.4 Estandarización de la dosis para la inducción de la DM

Se inyectó STZ a tres diferentes dosis, en total a 48 animales (Figura 33). A 4 ratas, a una dosis de 50mg/Kg de peso. Al día 4 y 7 posteriores a la inyección, se obtuvieron glicemias normales ($< 200\text{mg/dL}$) en el 100% de animales. A otros cuatro animales, la dosis inyectada fue 70mg /Kg de peso. Al día 4 se obtuvieron glucemias de 468 ± 15.46 (desviación estándar) mg/dL en 50% de los animales experimentales, el resto de animales mostró normoglicemia.

Los animales que no mostraron hiperglicemia ($n = 6$), más dos animales de 10 meses de edad provenientes de otro grupo, todos sexualmente expertos, fueron inyectados con STZ a 60mg/Kg de peso. Obteniendo el 25% con concentraciones de glucosa media de 529.5 ± 4.95 mg/dL. Ambos animales de 10 meses de edad fallecieron antes de las 72 horas posteriores a la inducción de la diabetes.

9 animales fueron inyectados con STZ a dosis de 60 mg/Kg de peso corporal (diluido a razón de 60 mg de STZ por cada mililitro de buffer). Se obtuvo un 78% (siete individuos) con glicemia media de 444.37 ± 78.09 mg/dL, y el 22% restante con normoglicemia. 86% (seis animales) de los animales diabéticos fallecieron entre el cuarto y quinto día posterior a la inducción de diabetes. Todos presentaron hematuria macroscópica y grados moderados a severos de deshidratación (pérdida de peso corporal $> 10\%$).

5 animales fueron inyectados con STZ a dosis de 60 mg/Kg de peso. La STZ fue preparada e inyectada en una ventana de tiempo de entre ~ 7 minutos. La preparación y administración se realizó en ausencia de luz y con el vial de la solución cubierto con papel aluminio. El 100% de animales experimentales tuvo glicemia media de 469.2 ± 82.61 mg/dL, 40% de ellos (dos animales) perecieron entre el sexto y octavo día posterior al tratamiento.

Se realizó la inducción de un grupo más ($n=20$) con la dosis de STZ de 60 mg/Kg de peso diluidos en buffer de citratos (30 mg STZ por 1 mililitro de buffer). El 100% de los animales presentó glicemias medias de 446.73 ± 69.76 mg/dL. 2 animales fallecieron dentro de los primeros 10 días posteriores a la administración de la STZ, otro más falleció a los 45 días. 6 animales fueron registrados para conducta de micción y de cópula hasta 93 días posteriores a la inducción de la diabetes (Figura 34).

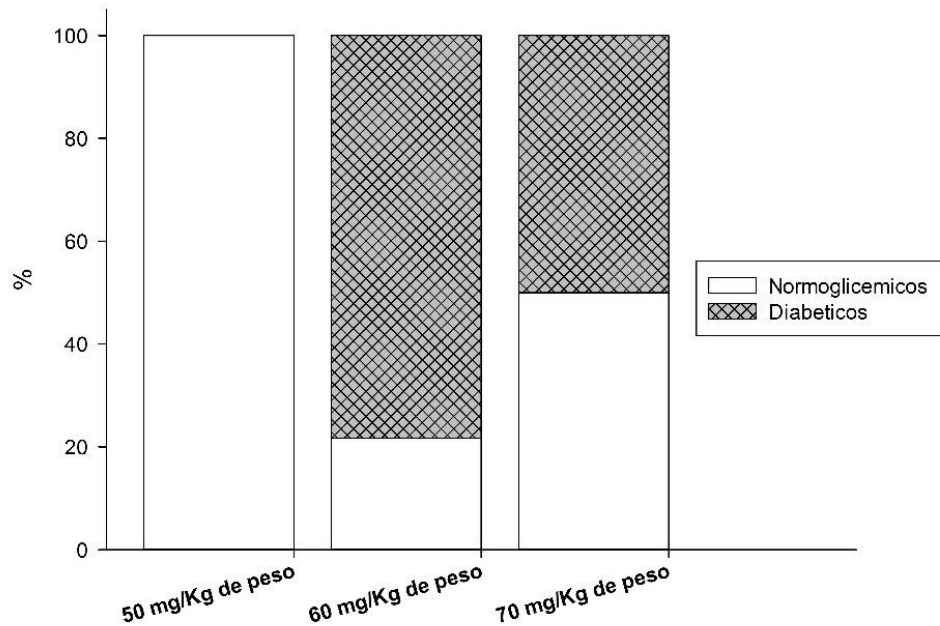


Figura 33. De las tres dosis de STZ utilizadas para la inducción de la diabetes en los animales experimentales, la dosis de 60 mg/Kg de peso corporal fue la más eficaz, con ella se logró que 78.38% de animales presentaran hiperglicemias (>200 mg/dL). Solo los grupos de los extremos tuvieron el mismo número de sujetos experimentales (n=4). Los animales que no resultaron diabéticos con la primera dosis se reinyectaron con la dosis de 60 mg/Kg de peso (n=6).

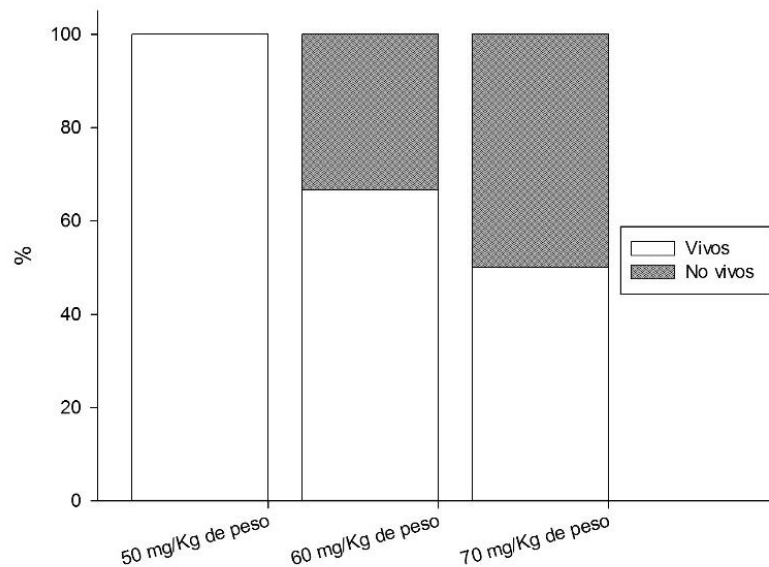


Figura 34. La supervivencia de los animales en quienes se inyectó STZ a dosis de 70 mg/Kg de peso corporal fue la menor de las tres (50%). En el caso de la dosis de 60 mg/Kg de peso, hubo variación en la disolución, pero a pesar de ello sobrevivieron 25 animales de 37. La supervivencia fue considerada como los animales que no murieron antes de los 30 días del tratamiento.