

# OBTENCIÓN DE UN MODELO MÚRIDO DE DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA ÚTIL EN LA EVALUACIÓN FARMACODINÁMICA DE LA INSULINA REGULAR

OBTAINING A MURINE MODEL OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES USEFUL IN THE PHARMACODYNAMIC EVALUATION OF REGULAR INSULIN

Laura M. RENDON<sup>1,2,3</sup>, Andrés F. ZULUAGA<sup>1,2\*</sup>, Carlos A. RODRÍGUEZ<sup>1,2</sup>, María AGUDELO<sup>1,3</sup>, Omar VESGA<sup>1,3</sup>

Recibido: Junio 02 de 2016 Aprobado: Noviembre 02 de 2017

## RESUMEN

**Antecedentes:** Existen múltiples modelos animales de diabetes, pero todavía no se ha validado uno útil para determinar la farmacodinamia de medicamentos. **Objetivos.** Usar el modelo de inducción de diabetes mediante estreptozotocina equilibrada en ratones no emparentados, para determinar de forma precisa y reproducible la farmacodinamia de insulina regular. **Métodos.** En ratones machos no emparentados de aproximadamente 37 g, se inyectó una dosis intraperitoneal de 150 mg/kg de una solución equilibrada de estreptozotocina. La glucemia (mg/dL) se midió a los 0, 7, 9, 14, 16, 17 y 18 días post-inducción. Una vez los ratones alcanzaron glucemias >300 mg/dL, se determinó la eficacia hipoglucemiante de insulina regular en tres experimentos independientes. El rango de dosis fue 0,25 UI/kg a 4 UI/kg. Una ecuación de decaimiento exponencial de dos parámetros se ajustó a los datos. **Resultados.** Al día 18, el modelo tuvo una efectividad del 80% para producir diabetes (glucemia  $446 \pm 59$  mg/dL), con mortalidad de sólo 2%. El coeficiente de variación intra e interexperimento fue  $\leq 13\%$ . Los parámetros farmacodinámicos de insulina fueron indistinguibles después de tres experimentos ( $P=0,32$ ). La magnitud del efecto máximo fue  $-374 \pm 30,7$  mg/dL y la dosis efectiva 50 fue  $1,34 \pm 0,2$  UI/kg. **Conclusión.** El modelo de diabetes inducida por estreptozotocina equilibrada permitió determinar de manera reproducible la farmacodinamia de la insulina regular.

**Palabras clave:** Diabetes Inducida por Estreptozotocina, Estreptozotocina, Insulina, Modelos Animales de Enfermedad, Farmacología.

## ABSTRACT

**BACKGROUND.** There are multiple animal models of diabetes, but still no one has been validated useful to determine the pharmacodynamics of drugs. **Objectives:** To use the streptozotocin-induced model of diabetes in outbred mice, to reliably determine the pharmacodynamics of regular insulin. **Methods.** Outbred mice weighing 37 g in average, were injected by intraperitoneal route with 150 mg/kg of an equilibrated solution of streptozotocin. Blood glucose (mg/dL) was measured at 0, 7, 9, 14, 16, 17

<sup>1</sup> Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas (GRIFE), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Centro de Información y Estudio de Medicamentos y Tóxicos (CIEMTO), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>3</sup> Hospital Universitario San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

\* Autor de correspondencia: [andres.zuluaga@udea.edu.co](mailto:andres.zuluaga@udea.edu.co)

and 18 days post-induction. Once the animals attain  $>300$  mg/dL of blood glucose, the efficacy of regular insulin was determined in three independent experiments. The insulin dose ranged from 0.25 to 4 IU/kg. An exponential decay equation with two parameters was fitted to the data. **Results:** At day 18, the optimized model achieved an effectiveness of 80% for inducing diabetes (glycemia  $446 \pm 59$  mg/dL) in male mice, with mortality of only 2%. The coefficient of variation within and between experiments was  $\leq 13\%$ . Pharmacodynamic parameters of insulin were indistinguishable among the three experiments ( $P = 0.32$ ). The magnitude of the maximum effect was  $-374 \pm 30.7$  mg/dL and the effective dose 50 was  $1.34 \pm 0.2$  IU/kg. **Conclusion.** The diabetes model induced by equilibrated-streptozotocin allowed the reliable determination of regular insulin pharmacodynamics.

**Keywords:** Diabetes mellitus, experimental; streptozocin, insulin, disease models, animal, pharmacology.

## INTRODUCCIÓN

La incidencia de diabetes mellitus está aumentando. En el año 2014, hubo 387 millones de personas diagnosticadas, cinco millones murieron por la enfermedad, y se esperan 205 millones de casos adicionales durante los próximos 20 años (2, 3). Ante este panorama, es indispensable la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos o la optimización de los existentes (4).

Los modelos animales de diabetes pueden ser una herramienta valiosa en dicha búsqueda. Estos modelos se clasifican en espontáneos e inducidos (5). Entre los espontáneos se encuentran los análogos (i.e., ratón obeso de Nueva Zelanda) y los intrínsecos (i.e., ratón  $db^+/db^+$ ) (6), mientras los inducidos son secundarios a la administración de fármacos u hormonas (7, 8). El modelo de diabetes inducido por estreptozotocina (STZ) ha sido uno de los más usados (9). En junio de 2016 realizamos una búsqueda en PubMed con el descriptor “*Streptozotocin induced diabetes*”, obteniendo 18.304 artículos, generalmente dirigidos para estudios de fisiopatología (10) y dieta (11), pero poco en farmacología (12). El análisis de esos artículos muestra una gran diversidad de opciones en términos de especie animal (rata versus ratón), cepa (emparentados versus no emparentados), sexo, edad, dosis de STZ (de 40 mg/kg a 220 mg/kg), frecuencia (dosis única versus múltiple), ruta de administración (intravenosa versus intraperitoneal) y preparación (8, 13, 14). En ratones, el modelo más usado incluye la administración intraperitoneal de múltiples dosis (50 mg/kg/día durante cinco días consecutivos) de una solución fresca de STZ (9). Sin embargo, no parece existir un estándar internacional respecto a la dosis (15) y frecuencia de administración de STZ (16), y es posible que esto explique la enorme variabilidad de los resultados obtenidos y el uso limitado del modelo para estudios de farmacodinamia.

Adicionalmente, la estabilidad de la STZ depende de la concentración del anómero alfa (17) y como éste tiene una alta variación durante los 30 minutos posteriores a la reconstitución, generalmente se prefiere usar una solución fresca de STZ (recién reconstituida) (8, 18). Garza-Rodea y cols (17), le administraron a ratones emparentados una solución equilibrada de STZ (eSTZ) por 2 a 3 horas tras la reconstitución, concluyendo que este cambio disminuye la mortalidad relacionada con la dosis e incrementa el número final de animales diabéticos (17). Hasta la fecha, estos resultados no se han reproducido en cepas no emparentadas (exocriadas), ni tampoco se ha validado la utilización del modelo para el estudio de la farmacodinamia de medicamentos antidiabéticos.

Nuestro objetivo fue validar en ratones exocriados un modelo de diabetes inducida por eSTZ, para determinar de forma reproducible la farmacodinamia de insulina regular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se usaron ratones de la cepa libre de patógenos UdeA:ICR(CD-2) de 10 semanas de edad, con un peso entre 32,5 y 41,5 g. Durante su crecimiento en microaisladores, los animales tuvieron libre acceso a comida y agua estéril suplementada con vitamina K<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura aproximada de 22°C (19). Una vez cumplidas tres semanas de edad, los animales permanecieron en un área de experimentación por fuera de los microaisladores, conservando las mismas condiciones ambientales y proporcionándoles un bebedero adicional con agua. El estudio fue aprobado por el comité de ética para la investigación con animales de la Universidad de Antioquia.

### Descripción de la glucemia en ratones sanos

Para establecer la condición fisiológica de la variable de interés (glucemia) y escoger el sexo a utilizar en los experimentos sucesivos, se determinó la glucemia cada 3 horas durante 24 horas en cinco machos (32 g a 44 g) y cinco hembras (26 g a 39 g). Todos los ratones tuvieron libre acceso a agua y comida.

Considerando que nuestro objetivo fue validar el modelo para el estudio de la farmacodinamia de medicamentos hipoglucemiantes, se definió que el sexo ideal sería aquel cuyo límite inferior del rango de datos fuera  $>80$  mg/dL durante las 24 h; con el fin de poder describir cualquier efecto hipoglucemiante grave asociado con un producto.

### Preparación del amortiguador de citrato de sodio

Producto indispensable para la dilución de la STZ. Se obtuvo disolviendo por separado 0,74 g de trisodio citrato dihidratado (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 0,52 g de ácido cítrico monohidratado (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en 25 mL de agua desionizada, obteniendo dos soluciones a 0,1 M. Posteriormente, se mezclaron 15 mL de cada solución para un volumen final de 30 mL, ajustando el pH a 4,5.

### Preparación de la estreptozotocina

Se preparó un stock de STZ (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) a una concentración de 18,7 mg/mL mediante la dilución de 247,5 mg de STZ en 13,2 mL de la solución de citrato de sodio, suficiente para inducir diabetes a 44 animales por experimento. La solución resultante se pasó por un filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$  y se almacenó protegida de la luz y a una temperatura promedio de  $5^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas, con el fin de equilibrar el anómero alfa (eSTZ).

### Estandarización del modelo *in vivo*

Antes de administrar la eSTZ, los animales tuvieron 4 horas de ayuno. El experimento inició con una inyección intraperitoneal única de 0,3 mL de eSTZ (equivalente a 150 mg/kg), previa sedación profunda con isoflurano (Isorane, Abbott, Argentina). En cada experimento se emplearon al menos 41 animales expuestos a eSTZ y 3 animales control no expuestos que recibieron la solución de citrato de sodio.

A todos los ratones se les registró el peso y la glucemia en los siguientes tiempos: 2 horas antes de la inducción con eSTZ (hora 0), y a los 7, 9, 14, 16, 17 y 18 días post-inducción. En cada punto de corte se usaron  $0,6\ \mu\text{L}$  de sangre por ratón, obteniendo la muestra por punción de las venas de la cola y mediante un glucómetro se determinó la concentración de glucosa en sangre (Accu-Check performa, Roche, Alemania). El límite superior del equipo fue 600 mg/dL, entonces los resultados superiores se fijaron en ese valor.

Para efectos de validación, se definió como animal diabético aquel que alcanzara un valor de glucemia 2 veces superior al promedio obtenido en el grupo control no expuesto.

### Farmacodinamia de la insulina regular

Se utilizó una insulina humana monocompone- nte ADN recombinante (insulina regular) aprobada por INVIMA para uso en humanos, con el fin de determinar si tres curvas *in vivo* dosis-respuesta obtenidas en experimentos independientes eran indistinguibles estadísticamente (reproducibilidad). En cada experimento se utilizaron los siguientes animales distribuidos en tres grupos: (a) cuatro ratones con diabetes inducida por eSTZ por cada dosis de insulina, (b) tres controles con diabetes inducida por eSTZ sin tratamiento que recibieron solución salina y (c) tres ratones control sanos no expuestos a eSTZ que recibieron solución salina. A todos los animales se les registró la glucemia en los mismos tiempos descritos en la estandarización del modelo. El día 18, a ratones con un peso entre 32,5 y 41,5 g se les determinó la glucemia luego de un ayuno de dos horas (hora 0); inmediatamente después se les administró una inyección subcutánea de 0,2 mL con la dosis de insulina correspondiente o la solución salina, según el grupo. Para la dosis de insulina, se usó un rango entre 0,25 UI/kg (dosis ineficaz) y 4 UI/kg (dosis eficaz). Dos horas después de la dosis (hora 2), se registró nuevamente la glucemia y se procedió a sacrificar los animales mediante asfixia con dióxido de carbono.

### Análisis estadístico de los datos

Los datos crudos de glucemia y peso de cada animal fueron almacenados en Microsoft Excel (Microsoft Corp., Seattle, WA, EE.UU). Excepto se especifique lo contrario, los datos son representados como medianas y rangos intercuartílicos (para datos con distribución anormal) o promedios y desviacio-

nes estándar (en datos distribuidos normalmente). La comparación entre dos grupos con distribución normal fue realizada por prueba *t* múltiple seguida de la prueba post hoc de Holm-Sidak y para más de dos grupos mediante el método de comparaciones múltiples de Dunnett. En caso de distribución anormal se usó Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, respectivamente. Las gráficas fueron realizadas en GraphPad Prism (San Diego, CA, EEUU).

Para la farmacodinamia de insulina, se calculó el efecto hipoglucemiante de cada dosis de insulina, mediante una ponderación matemática que seguía la ecuación [1]:

$$E_p = (G_{2h} + 0,5 \cdot MC_{2h}) - (G_{0h} + 0,5 \cdot MC_{0h}) \quad \text{Ecuación [1];}$$

donde  $E_p$  es el efecto hipoglucemiante ponderado,  $G$  es la glucemia de cada ratón,  $MC$  representa el promedio de la glucemia de los controles diabéticos no tratados, y los subíndices de cada letra determinan si el valor fue obtenido a la hora 0 (0h) ó 2 horas después de tratar (2h).

Como  $E_p$  implica reducción en la glucemia, este dará un número negativo, excepto en aquellos casos de dosis ineficaces de insulina en las cuales es posible que la glucemia aumente en las dos horas de duración del experimento.

La curva sigmoide dosis-respuesta se obtuvo por regresión no lineal de mínimos cuadrados (GraphPad Prism 6, EEUU), descrita mediante la ecuación [2]:

$$E = E_{\max} / (1 + e^{ED_{50} - D}) \quad \text{Ecuación [2]}$$

donde  $E$  es el efecto (variable dependiente),  $D$  es la dosis en UI/kg (variable independiente), y los dos parámetros farmacodinámicos primarios son:  $E_{\max}$  (máximo efecto hipoglucemiante) y  $ED_{50}$  (dosis necesaria para alcanzar la mitad del  $E_{\max}$  y que define la potencia *in vivo* del medicamento). La magnitud de los parámetros farmacodinámicos se expresó como promedio con su respectivo error estándar. Se realizaron tres experimentos independientes con el fin de probar la reproducibilidad del modelo animal. Los resultados se compararon entre experimentos, mediante análisis de ajuste de curva (AAC) (20).

La bondad de ajuste de la regresión se evaluó mediante el coeficiente de determinación ajustado

(Adj. $R^2$ ) y el error estándar del estimado ( $S_{y|x}$ ), y se determinó el cumplimiento de los supuestos de normalidad, homocedasticidad y ausencia de multicolinealidad mediante las pruebas D'Agostino & Pearson omnibus  $K^2$ , varianza constante y factor de inflación de la varianza, respectivamente.

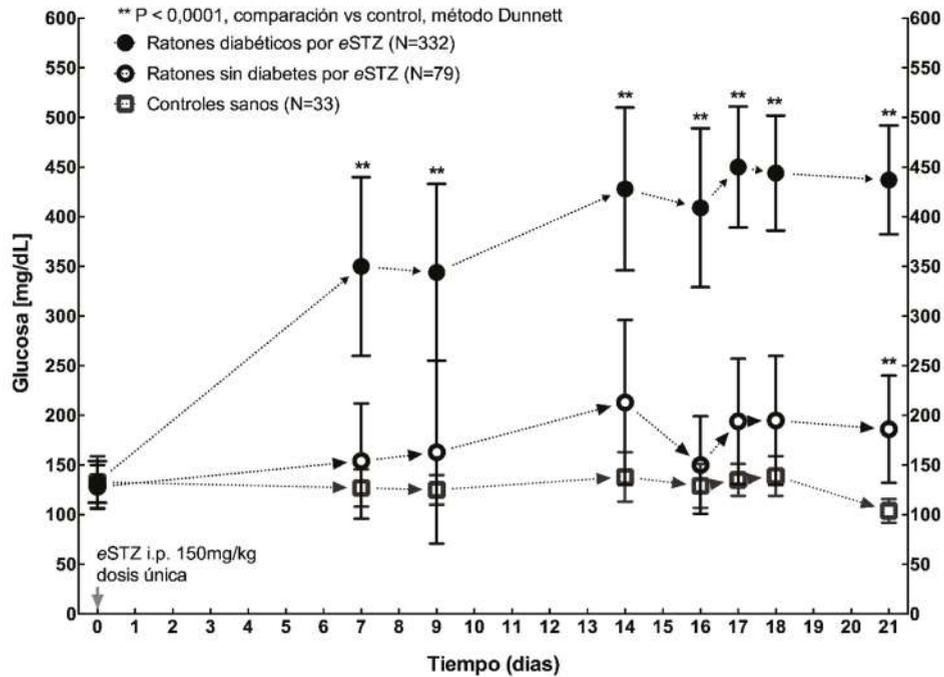
## RESULTADOS

### Descripción de la glucemia basal por sexo

Durante 24 horas de seguimiento, los cinco machos alcanzaron una mediana de glucemia de 121 mg/dL (rango: 89 mg/dL a 157 mg/dL), mientras para las cinco hembras el valor fue 106 mg/dL (rango: 79 mg/dL a 133 mg/dL). La comparación de estos valores no fue estadísticamente significativa ( $P=0,25$  por Mann-Whitney) y corresponden con los reportados en la literatura para la cepa ICR (<http://www.taconic.com/mouse-model/icr>). Sin embargo, debido a que sólo las hembras tuvieron glucemias menores a 80 mg/dL, se seleccionaron los machos para adelantar la validación de modelo.

### Estandarización del modelo de diabetes inducido por eSTZ

Se realizaron 10 experimentos independientes utilizando mínimo 44 ratones machos en cada uno (444 animales en total). Antes de recibir la estreptozotocina (día 0), la glucemia promedio fue  $133 \pm 26$  mg/dL. Cuatrocientos once ratones recibieron eSTZ (93%) y 33 (7%) fueron utilizados como controles sanos. Debido a trauma grave por agresión intraespecie se descartaron 8 ratones durante el seguimiento, 5 expuestos y 3 no expuestos a eSTZ. La variación de la glucemia de cada grupo a lo largo de los días de seguimiento puede apreciarse en la Figura 1. Al día dieciocho, 79 de los 411 (19%) ratones expuestos a eSTZ no cumplieron el criterio de diabetes, con valores de glucemia de  $195 \pm 64$  mg/dL. Es decir, 8 de cada 10 animales expuestos a eSTZ efectivamente estaban diabéticos, alcanzando promedios de glucemia significativamente mayores respecto a los basales ( $446 \pm 59$  vs  $137 \pm 19$  mg/dL, respectivamente,  $P < 0,05$  por método de Dunnett). El coeficiente de variación inter-individual e inter-experimento en los animales diabéticos al día 18 de inducción fue máximo 13%.



**Figura 1.** Estandarización del modelo de diabetes inducido por eSTZ. Fluctuación en los niveles de glucemia para los animales diabéticos (332), no diabéticos expuestos a estreptozotocina (79) y controles sanos (33) durante los 18 días de seguimiento. Los símbolos corresponden al promedio de cada grupo y las barras verticales a la desviación estándar.

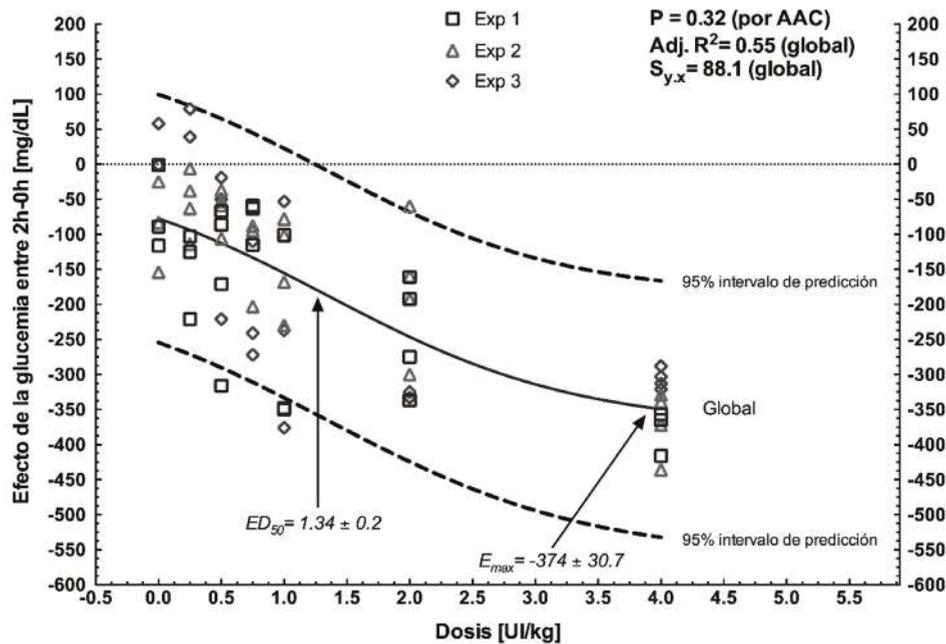
Todos los animales comenzaron con un rango de peso entre 32,5 g y 41,5 g. Sin embargo, al día 18 se observó que 8% de los ratones expuestos a eSTZ pesaban menos de 32,5 g mientras que 6% de los controles no tratados excedían 41,5 g.

De diez animales con diabetes inducida por eSTZ usados para definir supervivencia, 8 alcanzaron a sobrevivir hasta 90 días post-inducción y en todos los casos conservando la glucemia por encima de 300 mg/dL.

### Farmacodinamia de la insulina

A lo largo de las dos horas de experimento, los controles sanos tuvieron una glucemia entre

100 mg/dL y 150 mg/dL, mientras los controles diabéticos no tratados se mantuvieron entre 380 mg/dL y 450 mg/dL. La Figura 2 muestra la relación no lineal dosis respuesta derivada de la ecuación de dos parámetros que se ajustó a los datos ( $\text{Adj. } R^2=0,55$ ), sin multicolinealidad, cumpliendo con las presunciones de normalidad y varianza constante. Los parámetros de los tres experimentos fueron indistinguibles por análisis de ajuste de curva ( $P=0,32$ ), indicando que una curva describe mejor los datos que las tres regresiones independientes. La magnitud del efecto máximo fue  $-374 \pm 30,7$  mg/dL y la  $\text{ED}_{50}$  fue  $1,34 \pm 0,22$  UI/kg.



**Figura 2.** Reproducibilidad de los datos farmacodinámicos obtenidos usando el modelo de diabetes inducido por eSTZ en ratón. Relación dosis respuesta obtenida en tres experimentos desarrollados en días diferentes, con un total de 68 animales tratados con insulina regular (exp. 1 = 23, exp. 2 = 26 y exp. 3 = 19) y 9 ratones control no tratados con insulina (3 por experimento). Los símbolos representan el efecto obtenido en cada ratón según el día del experimento (Exp 1, Exp 2 y Exp 3). El análisis por AAC indica que una sola curva describe todos los datos, confirmando la reproducibilidad del modelo optimizado y su aplicabilidad para el estudio de la farmacodinamia de agentes antidiabéticos.

## DISCUSIÓN

Aunque existen múltiples estudios que describen el uso de estreptozotocina como inductor de diabetes en roedores (13), todavía hay disparidad en cuanto a la selección de especie, cepa, sexo y edad de los animales, y a la dosis, preparación y frecuencia de administración del medicamento.

Nuestros resultados muestran que una dosis única intraperitoneal de 150 mg/kg de estreptozotocina equilibrada, inyectada en ratones machos no emparentados, con peso entre 32,5 g y 41,5 g, permite inducir diabetes en 80% de los animales a los 18 días. Además, por primera vez, se describe la magnitud de los parámetros farmacodinámicos relacionados *in vivo*, con el efecto hipoglucemiante de la insulina regular. La reproducibilidad de los resultados demuestra que este modelo animal es válido para estudiar la eficacia *in vivo* de diferentes medicamentos.

La validación de los modelos animales es una exigencia de algunas agencias reguladoras como la FDA para estudiar la eficacia de medicamentos (21),

y ha sido esencial para estudiar la farmacodinamia de medicamentos en enfermedades infecciosas (22) o en psiquiatría (23).

Un punto clave para alcanzar nuestros resultados fue la estabilización del anómero alfa de STZ. Garza-Rodea y cols previamente habían descrito el uso de la dosis de 150 mg/kg de eSTZ en una cepa emparentada, obteniendo diabetes en 78% de los animales al día 24 post-inducción, con una mortalidad de 7% (17); en nuestra cepa de ratones no emparentados la efectividad fue similar (80%) pero en sólo 18 días post-inducción, y con una mortalidad menor (2%). Esta mejora implica un ahorro de recursos derivado de tener la especie alojada una semana menos en el bioterio, así como incrementar el número de experimentos posibles en un año calendario. Además, la cepa exocriada es una ventaja para los estudios en farmacología, pues imita la variación interindividual observada en humanos (23). Los resultados confirman que el modelo de Garza y colaboradores es reproducible en una cepa de ratones exocriados, y nuestro aporte novedoso fue utilizar dicho modelo para describir por primera

vez los parámetros farmacodinámicos primarios de la insulina regular ( $E_{\max}$  y  $ED_{50}$ ).

En contraste, en el modelo de múltiples dosis bajas de STZ sin equilibrar, se describe una inducción de diabetes de 56% y una mortalidad cercana a 36% (17). Entonces, la dosis única de eSTZ tiene como ventaja, manipular menos los animales, comparado con el esquema de dosis bajas durante 5 días consecutivos, y es más económico porque 150 mg/kg versus 250 mg/kg de STZ, representa una disminución de 40% en uso de reactivo.

La estreptozotocina se asocia con varios mecanismos de daño (24, 25), pero el más importante es la alquilación del ADN que conlleva a la muerte de las células beta pancreáticas (26, 27). Debido a su similitud estructural con la glucosa, la STZ es capturada por las células beta pancreáticas vía el transportador GLUT2. Wang y Gleichmann observaron *in vitro* e *in vivo* que las dosis múltiples pueden autorestringir la expresión de GLUT2, lo que limitaría su efecto diabetogénico (28). Una vez la STZ es transportada vía GLUT2 al interior celular, se metaboliza y actúa como donador de óxido nítrico (ON), aumentando el anión peroxinitrito (tóxico del ADN). El ON se une a la aconitasa, inhibiendo su actividad dentro del ciclo de Krebs mitocondrial, reduciendo la producción de ATP en la célula beta pancreática. En consecuencia, se incrementan los sustratos de la xantina oxidasa (e.g., inosina e hipoxantina), favoreciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (e.g. peróxido de hidrógeno y aniones superóxidos). Sandler y Swenne (1983), describieron que el daño sobre el ADN inducido por la STZ activa mecanismos de reparación (29), como PARP (poli ADP-ribosa polimerasa) (30). Esta enzima cataliza la ADP-ribosilación usando  $NAD^+$  como sustrato. La depleción de  $NAD^+$  y ATP secundaria a la activación de PARP inhibe la síntesis y secreción de insulina, lo que explicaría el efecto diabetogénico. De hecho, inhibidores de PARP como 3-aminobenzamida o nicotinamida evitan la inducción de diabetes por estreptozotocina en roedores (31).

## CONCLUSIÓN

Se obtuvo un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina equilibrada en una cepa de ratones exocriados, con una efectividad mayor y una mortalidad menor (80% de animales diabéticos y 2% de mortalidad) respecto a lo reportado en la literatura

para otras cepas. Este modelo permitió determinar de manera reproducible la farmacodinamia de la insulina regular, modelando la relación dosis-respuesta mediante una ecuación no lineal de dos parámetros, y podrá emplearse en la evaluación preclínica de nuevas insulinas, así como la verificación *in vivo* de la eficacia de diferentes medicamentos hipoglucemiantes en uso clínico.

## CONFLICTO DE INTERESES Y FINANCIACIÓN

Agudelo, Rendón y Vesga no tienen conflicto de intereses que declarar. Zuluaga ha recibido honorarios por conferencias independientes o fue invitado a eventos patrocinados por Allergan, Amgen, Lilly, Mundipharma, Novartis, Novo Nordisk, Pfizer, Roche y Sanofi. Rodríguez ha recibido honorarios por conferencias independientes de Pfizer, Roche, Amgen y Novo Nordisk. Ninguna de estas compañías o cualquier otra farmacéutica estuvieron involucradas en la financiación, diseño, análisis, ejecución, o la publicación de este estudio.

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Antioquia UdeA y el Sistema General de Regalías de Colombia de la Gobernación de Antioquia (BPIN: 2013000100183) - Ruta N.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Aplicamos la aproximación SDC para la secuencia de los autores. Rendón redactó la primera versión del manuscrito. Zuluaga diseñó el estudio, obtuvo la financiación y fue el responsable de la versión final del artículo. Los otros autores participaron en la adquisición o el análisis de los datos, o con la revisión crítica del texto, y todos aprobaron la última versión del manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tscharrntke T, Hochberg ME, Rand TA, Resh VH, Krauss J. Author sequence and credit for contributions in multiauthored publications. *PLoS Biol.* 2007;5(1):e18.
2. Federation ID. IDF Diabetes Atlas. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>.
3. Salud OMD. 10 datos sobre la diabetes <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/es/index1.htmlv2016> [
4. van Dijk PR, Logtenberg SJ, Gans RO, Bilo HJ, Kleefstra N. Intraperitoneal insulin infusion: treatment option for type 1 diabetes resulting in beneficial endocrine effects beyond glycaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;81(4):488-97.
5. Arias-Díaz JB, J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición Hospitalaria.* 2007;22(2):160-8.

6. Grewal IS, Flavell RA. New insights into insulin dependent diabetes mellitus from studies with transgenic mouse models. *Lab Invest.* 1997;76(1):3-10.
7. Papaccio G, Chieffi Baccari G, Esposito V. Immunomodulation of low dose streptozocin diabetes in mice reveals that insulinitis is not obligatory for B cell destruction. *J Anat.* 1992;181 ( Pt 3):403-7.
8. Lu Y, Liu Y, Li H, Wang X, Wu W, Gao L. Effect and mechanisms of zinc supplementation in protecting against diabetic cardiomyopathy in a rat model of type 2 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015;15(1):14-20.
9. Iwakiri R, Nagafuchi S. Inhibition of streptozocin-induced insulinitis and diabetes with lobenzarit in CD-1 mice. *Diabetes.* 1989;38(5):558-61.
10. Bequer L, Gómez T, Molina JL, Artiles D, Bermúdez R, Clapés S. Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomédica.* 2016;36(2):230-8.
11. Hogan S, Zhang L, Li J, Sun S, Canning C, Zhou K. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:71.
12. Park CJ, Han JS. Hypoglycemic Effect of Jicama (*Pachyrhizus erosus*) Extract on Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Prev Nutr Food Sci.* 2015;20(2):88-93.
13. Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 1976;25(7):595-603.
14. Hernández BHR-G, J.C.; Rodríguez-González, J.C.; Marrero-Rodríguez, M.T. Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Cubana Endocrinol.* 2002;13(2):163-72.
15. Wang J, Lv C, Xie T, Ouyang J. The variance of peripheral blood lymphocyte subsets of streptozotocin-induced diabetic mice after bone marrow transplantation. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(3):4115-21.
16. Shinjo T, Nakatsu Y, Iwashita M, Sano T, Sakoda H, Ishihara H, et al. High-fat diet feeding significantly attenuates anagliptin-induced regeneration of islets of Langerhans in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetol Metab Syndr.* 2015;7:50.
17. de la Garza-Rodea AS, Knaan-Shanzer S, den Hartigh JD, Verhaegen AP, van Bekkum DW. Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(1):40-4.
18. Low-dose streptozotocin induction protocol (mouse): Animal Models of Diabetic Complications Consortium; 2003 [Available from: <http://www.amdcc.org/shared/showFile.aspx?doctypeid=3&docid=19>.
19. Zuluaga AF, Salazar BE, Galvis W, Loaiza SA, Agudelo M, Vesga O. Fundación del primer bioterio MPF funcional de Colombia. *IATREIA.* 2003;16(2):115-31.
20. Vesga O, Agudelo M, Salazar BE, Rodríguez CA, Zuluaga AF. Generic vancomycin products fail in vivo despite being pharmaceutical equivalents of the innovator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(8):3271-9.
21. Snoy PJ. Establishing efficacy of human products using animals: the US food and drug administration's "animal rule". *Vet Pathol.* 2010;47(5):774-8.
22. Zuluaga AF, Rodríguez CA, Agudelo M, Vesga O. About the validation of animal models to study the pharmacodynamics of generic antimicrobials. *Clin Infect Dis.* 2014;59(3):459-61.
23. Willner P, Mitchell PJ. Animal Models of Depression: A Diathesis/Stress Approach. *Biological Psychiatry: John Wiley & Sons, Ltd;* 2003. p. 701-26.
24. Ziegler M, Ziegler B, Hehmke B. Severe hyperglycaemia caused by autoimmunization to beta cells in rats. *Diabetologia.* 1984;27 Suppl:163-5.
25. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.
26. Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(12):2015-20.
27. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia.* 2000;43(12):1528-33.
28. Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes.* 1998;47(1):50-6.
29. Sandler S, Swenne I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets *in vitro*. *Diabetologia.* 1983;25(5):444-7.
30. O'Valle F, Benítez MdC, Martín-Oliva D, del Moral RMG, Gómez-Morales M, Godoy C, et al. La sobreexpresión de poli (ADP-ribosa) polimerasa se correlaciona con el desarrollo de necrosis tubular aguda y con la función precoz del trasplante renal. *Rev Esp Patol.* 2006;39(4):235-41.
31. Masiello P, Novelli M, Fierabracci V, Bergamini E. Protection by 3-aminobenzamide and nicotinamide against streptozotocin-induced beta-cell toxicity *in vivo* and *in vitro*. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1990;69(1):17-32.