



ISSN: 1697-090X

Inicio Home

Indice del
volumen Volume
index

Comité Editorial
Editorial Board

Comité Científico
Scientific
Committee

Normas para los
autores
Instruction to
Authors

Derechos de autor
Copyright

Contacto/Contact:



EFECTO DIFERENCIAL DEL ALOXANO A CORTO Y A LARGO PLAZO EN TESTÍCULOS DE DOS LÍNEAS DE RATAS

Silvia Mariela V. Vazquez, Noriyuki Hisano

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario. Santa Fe. Rosario. Argentina

[norihisano @ yahoo.com.ar](mailto:norihisano@yahoo.com.ar)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2011;1:37-44.

[Comentario del revisor Prof. Gloria Cónsole PhD.](#) Profesora Titular, Cátedra B de Citología, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

[Comentario del revisor Prof. Aldo R. Eynard PhD.](#) Catedrático de Biología Celular, Histología y Embriología. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

RESUMEN:

El aloxano se comporta como una droga tóxica sobre las células beta pancreáticas y, por ende, produce diabetes experimental. Sin embargo, sus potenciales efectos tóxicos a corto y largo plazo sobre otros órganos no han sido ampliamente indagados aún. En consecuencia, este trabajo estudia su acción diferencial en uno y otro caso sobre un órgano de alta tasa reproductiva, como el testículo, en dos líneas de ratas. Para ello, fueron empleadas ratas macho "m" y Sprague-Dawley inyectadas en el peritoneo con aloxano (24 mg/100 mg peso corporal), durante el post-destete inmediato, y sus respectivos controles. A los 31 días y 105 días de edad, los testículos fueron extraídos, disecados, pesados y procesados para microscopía óptica.

Los cortes histológicos se colorearon con Hematoxilina-Eosina. Los pesos testiculares en las ratas "m" aloxanizadas de 31 y 105 días fueron significativamente menores que sus controles. En ambas edades, estas ratas revelaron histológicamente células aumentadas de tamaño, cariorrexis y cariólisis así como amplios espacios intercelulares respecto de sus controles. Por otro lado, los pesos testiculares en las ratas Sprague-Dawley, tratadas con aloxano, no revelaron a los 31 y 105 días diferencias significativas con los controles, excediendo una tendencia descendente en las aloxanizadas. A tales edades, estos animales evidenciaron, picnosis y signos de apoptosis cuando se los comparó con sus controles. Estos resultados, más notorios en las ratas "m", las sindicarian como más sensibles al aloxano. Los efectos tóxicos a corto plazo podrían interpretarse como consecuencias directa del aloxano mientras que los de largo plazo podrían atribuirse a la hiperglucemia de la diabetes experimental actuando sobre un testículo ya sensibilizado por la antedicha acción tóxica directa

PALABRAS CLAVE: Diabetes. Efecto tóxico. Murino. Células germinales.

SUMMARY:

Alloxan acts as a toxic drug on pancreatic beta cells, producing experimental diabetes. Exceeding it, its potential short -and long-term toxic effects on other organs have not been widely investigated yet. Consequently, this paper analyzes it in the testicles of two lines of rats. In this regard, "m" and Sprague-Dawley male rats, intraperitoneally injected with alloxan (24 mg/100 mg peso

corporal) during the immediate post-weaning period, and its respective controls. At 31 and 105 days of age, testicles were removed, dissected, weighed and routinely processed for optic microscopy. Histological slices were stained with Hematoxylin-Eosin.

Testicular weights in alloxanized "m" rats were significantly lower than those of controls at both studied ages, revealing simultaneously cells with higher size, karyorrhexis and karyolysis as well as wide intercellular spaces. When compared with controls. On the other hand and exceeding a decreasing trend in alloxanized rats, testicular weights in these group of Sprague-Dawley animals did not show significant differences with controls at 31 and 105 days of age. These animals also evidenced picnosis and signs of apoptosis in relation with controls at both ages. These results, more conspicuous in "m" rats, could be pointing out that these rats would be more sensible to alloxan. The short-term effects could be a direct consequence of the toxic action of alloxan whilst long-term ones could be attributed to hyperglycaemia resulting from experimental diabetes acting on an already sensitized testicle by that direct action.

KEYWORDS: Diabetes. Toxic effect. Murine. Germ cells.

INTRODUCCIÓN

Para el estudio experimental de la Diabetes Mellitus (DM) han sido propuestos modelos animales experimentales a los que se les han destruido las células pancreáticas β mediante tóxicos como la estreptozotocina o el aloxano, ambas generadoras de hiperglucemia. Sin embargo, han sido descritas diferencias entre la acción de ambas drogas sobre las aludidas células¹⁻⁴.

Howland y Zebrowski sugirieron que el aloxano tendría algún fenómeno tóxico extra-pancreático⁵. En tal sentido, fueron descritas lesiones en riñón e hígado a corto plazo⁶⁻⁸. Complementariamente, han sido reportadas variaciones en la insulina plasmática, la glucemia y los ácidos grasos 2 minutos después de inyectado el aloxano⁹.

Como se adelantara, el aloxano, inyectado en animales de laboratorio, genera DM por destrucción selectiva de las células β del páncreas endocrino debido a la producción de radicales libres, designados en su mayoría especies de oxígeno reactivo (Reactive Oxygen Species). A la vez, afecta la actividad de la glucoquinasa¹⁰, disminuye la concentración del transportador de la glucosa (GLUT2) y del mRNA de la glucoquinasa 2, con acción a nivel nuclear (DNA)¹¹ y/o mitocondrial¹².

En un territorio extra-pancreático como el testículo, en ratas adultas, el aloxano provocó cambios en la cito-arquitectura testicular¹³, reducción del conteo de espermatozoides y morfología espermática¹⁴ e inhibición en los niveles de las gonadotropinas FSH y LH^{15,16}.

Dado que lo referido sugiere efectos tóxicos del aloxano sobre otros sectores de la economía, cuyo análisis amplio y sistemático escasea en la bibliografía especializada, y, que a pesar de ello, persiste su empleo como inductor de DM en animales de experimentación con fines investigativos, algunos específicamente ligados con el aparato reproductor masculino¹⁷, hemos focalizado este trabajo en su efecto diferencial, a corto y a largo plazo, en testículos de dos líneas de ratas pues vislumbramos la importancia de insistir en ello al no excluir la posibilidad de que su simultáneo efecto tóxico intra y extra-pancreático podría producir concomitancias indeseables en los resultados comunicados

MATERIAL Y METODOS

Animales y diseño experimental

Ratas de la línea "m", desarrollada en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR)¹⁸, y ratas Sprague - Dawley (S-D) provistas por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR, fueron inyectadas en el post-destete inmediato con una dosis única intraperitoneal de aloxano (24 mg/100 g de peso corporal) o con solución fisiológica (1cc/100 g. de peso corporal) (controles).

A las 48 hs se registró la glucemia mediante cintas reactivas Accu-Chek (Roche®). Se consideró efecto positivo del aloxano cuando la glucemia superó los 300mg/100cc.

Las ratas machos se separaron en cuatro grupos que fueron inyectados con aloxano o solución fisiológica en el post-destete inmediato:

- 1.- "m" aloxano (n=9)
- 2.- "m" control (n=9)
- 3.- S-D aloxano (n=10)
- 4.- S-D control (n=9)

Los animales fueron eutanasiados a los 31 días y 105 días de edad y pesados. Los testículos fueron extraídos, disecados, pesados e inmediatamente fijados en líquido de Bouin, re-fijados en formaldehído 4% en PBS, incluidos en parafina y coloreados con Hematoxina-Eosina y Periodic Acid Schiff (PAS) + Hematoxilina.

Todos los procedimientos experimentales de este estudio fueron previamente aprobados por la Comisión de Bioética de nuestra escuela médica, asegurando la pertinente adhesión a los estándares fijados por al Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

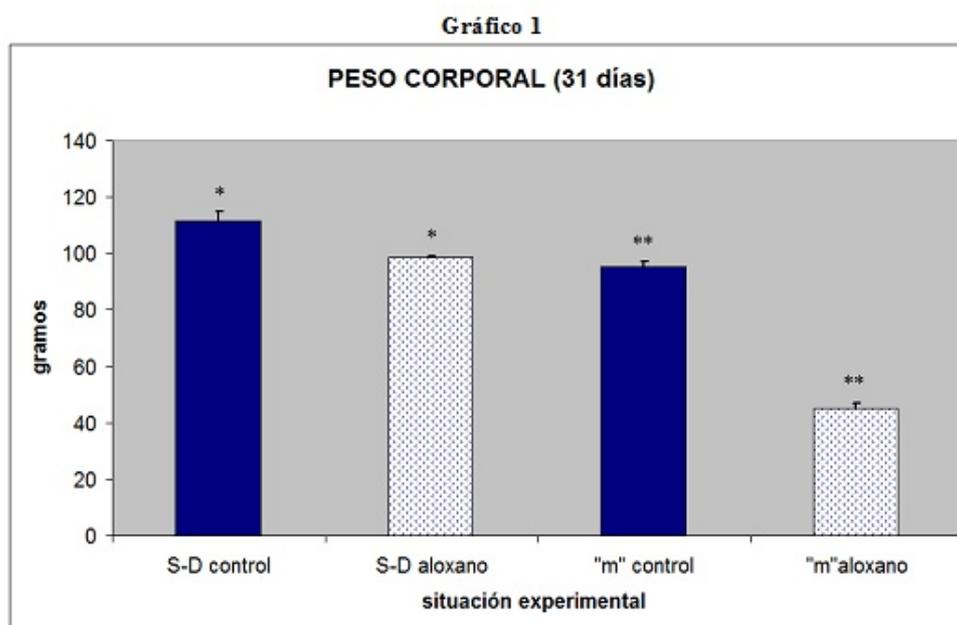
Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados en promedio \pm SEM. Para la determinación de diferencias estadísticas entre muestras se empleó el test "t" de Student.

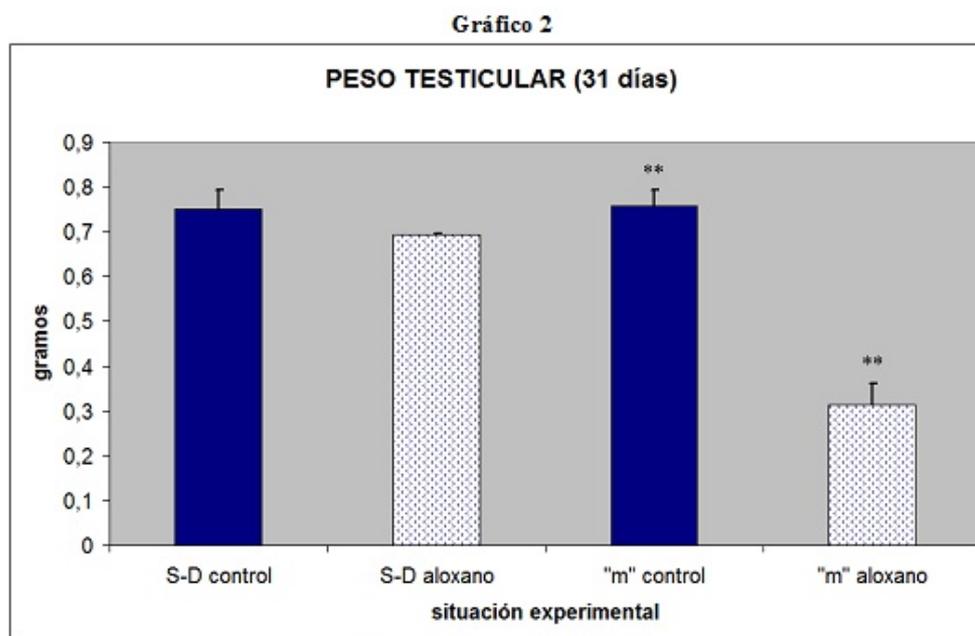
RESULTADOS

1. Pesos corporal y testicular

Los pesos corporal y testicular de los animales "m" aloxano de 31 días de edad fueron significativamente menores ($P < 0.01$) en los animales inyectados con aloxano respecto de sus controles. En las ratas S-D, los pesos corporales mostraron diferencias significativas, pero los testículos mostraron una tendencia al descenso (Gráficos 1 y 2).



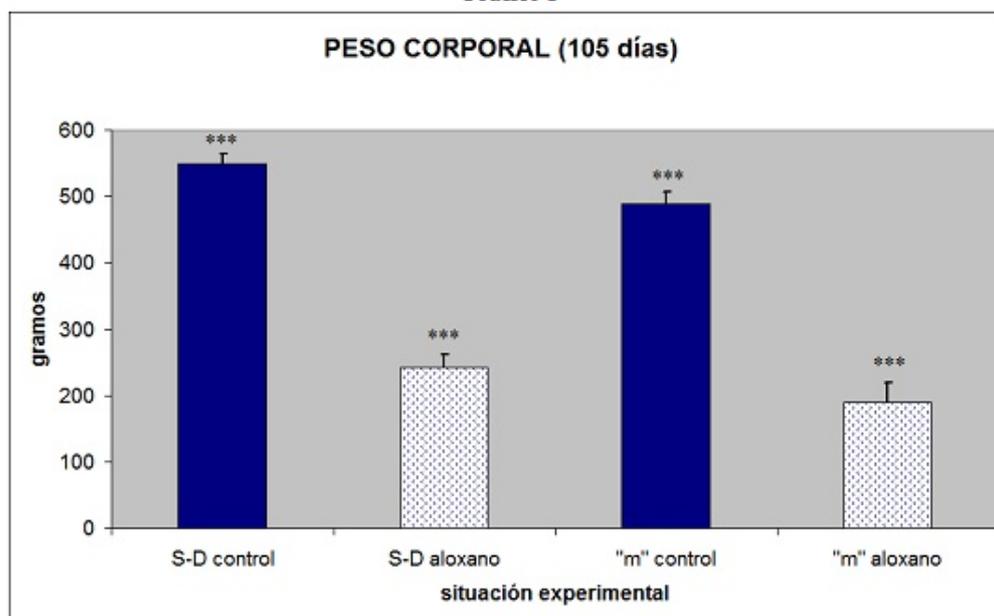
Ratas 31 días * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)
 Peso corporal: S-D control > S-D aloxano * ($P < 0.05$).
 "m" control > "m" aloxano ** ($P < 0.01$)



Ratas 31 días ** ($P < 0.01$)
 Peso testicular: S-D control vs S-D aloxano (n.s.)
 "m" control > "m" aloxano ** ($P < 0.01$)

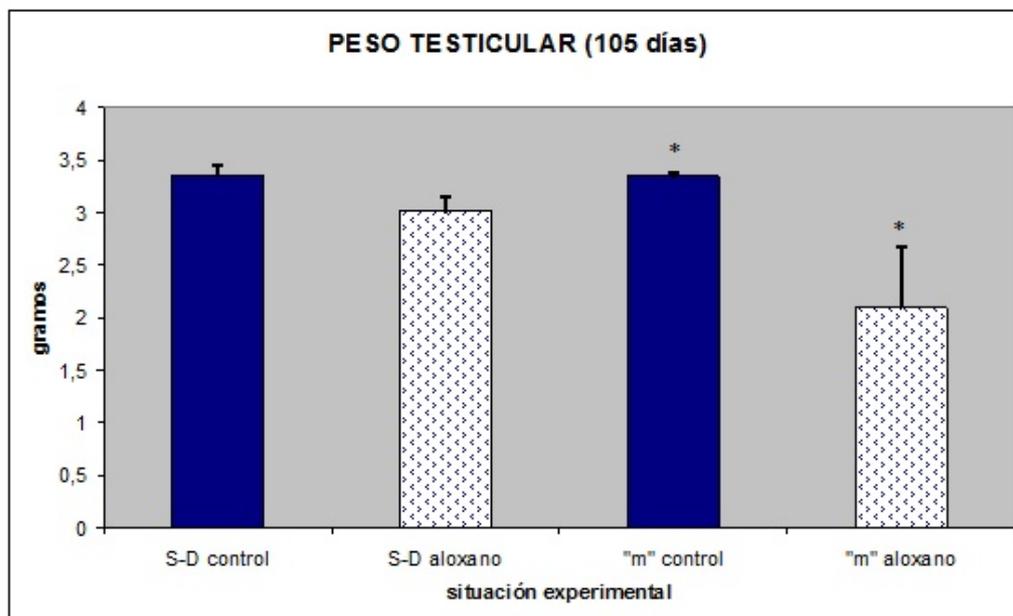
Los pesos corporales de los animales "m" y S-D de 105 días de edad fueron significativamente menores ($P < 0.001$) en los animales inyectados con aloxano, en relación con sus controles (Gráfico 3). Los pesos testiculares de los animales "m" fueron significativamente menores ($P < 0.05$) en los animales inyectados con aloxano, en comparación con sus contrapartes testigos. En cambio, en el grupo S-D, los pesos testiculares no revelaron diferencias significativas al margen de una tendencia descendente en las aloxanizadas (Gráfico 4).

Gráfico 3



Ratas 105 días *** ($P < 0.001$)
 Peso corporal: S-D control > S-D aloxano *** ($P < 0.001$)
 "m" control > "m" aloxano *** ($P < 0.001$)

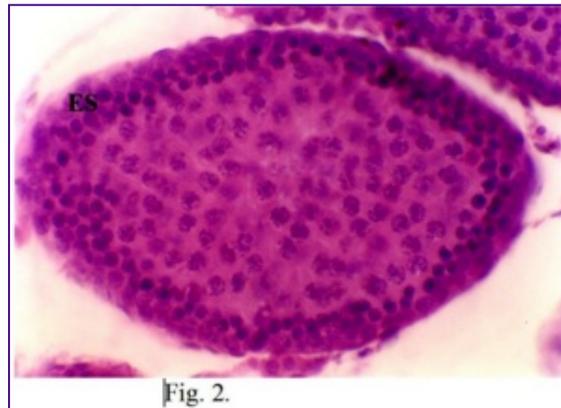
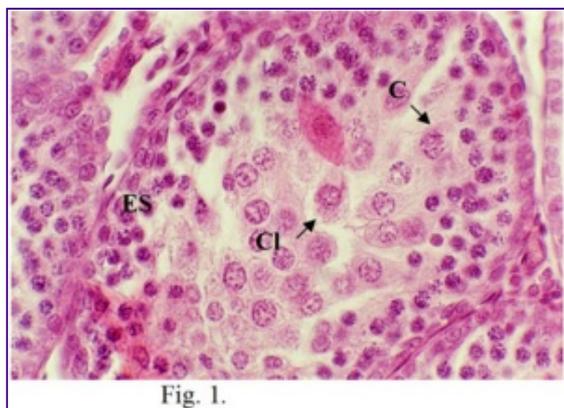
Gráfico 4



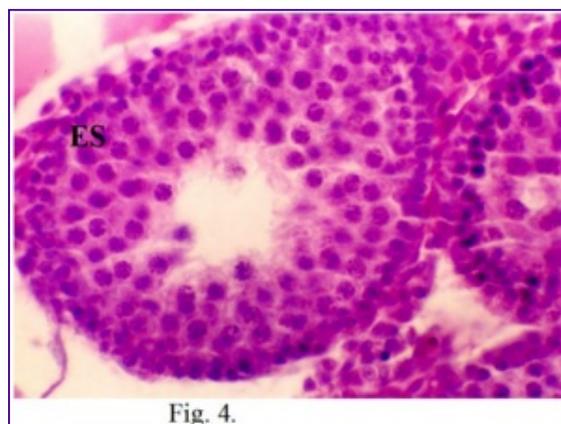
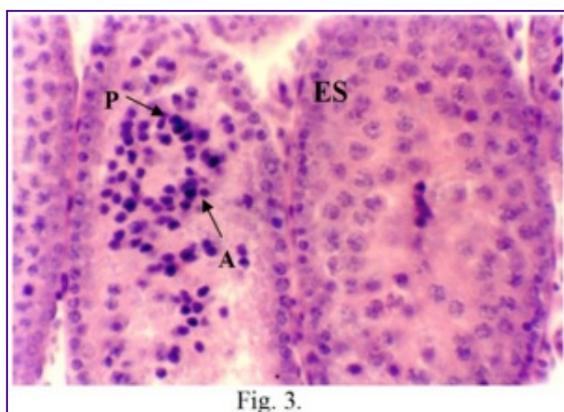
Ratas 105 días * ($P < 0.05$)
 Peso testicular: S-D control vs S-D aloxano (n.s.)
 "m" control > "m" aloxano * ($P < 0.05$)

2. Manifestaciones histológicas

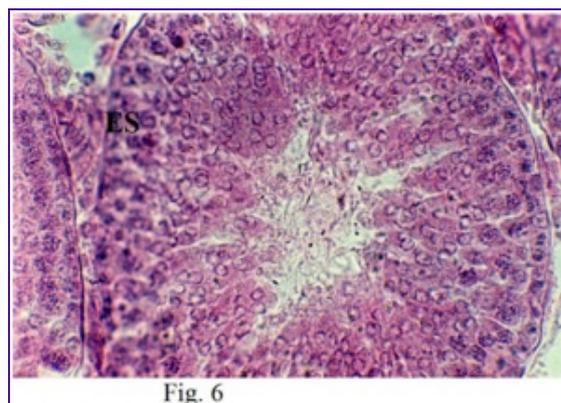
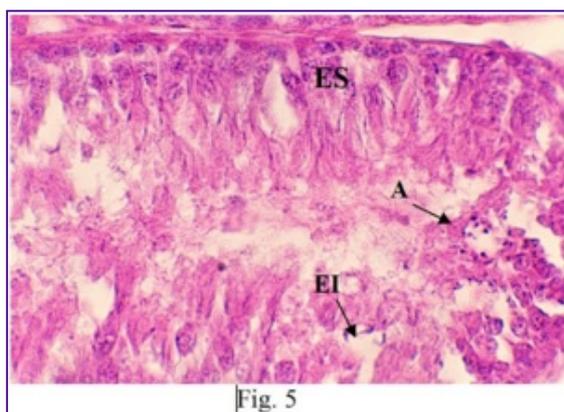
La línea "m" con aloxano presentó, a los 31 días de vida, una capa de espermatogonias adosada a la membrana basal y separada de los espermatocitos del compartimiento adluminal del epitelio seminífero. Se detectaron células en cariorrexis y cariólisis, notorios espacios intercelulares y aumento del tamaño celular (Fig. 1). Sus respectivos controles presentaron túbulos seminíferos de aspecto normal (Fig. 2).

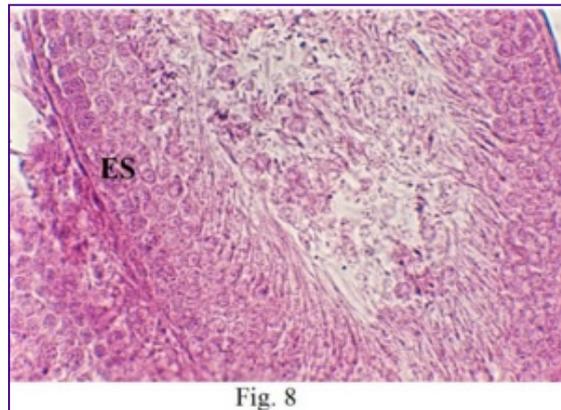
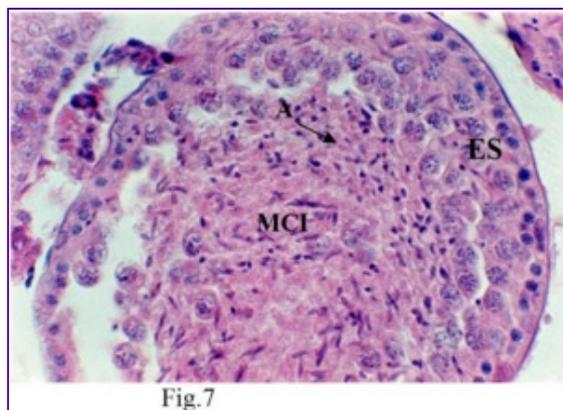


A los 31 días de edad, las ratas S-D aloxanizadas evidenciaron una masa celular intraluminal con intensa picnosis y algunos signos de apoptosis (Fig. 3), mientras que el grupo control mostró una histología del epitelio seminífero con desarrollo normal y acorde a la edad (Fig. 4).



Por su parte, a los 105 días, los animales "m" inyectados con aloxano revelaron pérdida de la arquitectura epitelial, con amplios espacios intercelulares entre las células germinales, masas celulares intraluminales e imágenes compatibles con apoptosis (Fig 5). El grupo control "m" mostró túbulos seminíferos conservados (Fig 6). A la misma edad, las ratas S-D aloxanizadas pusieron en evidencia túbulos seminíferos con bordes irregulares, células germinales con picnosis, perceptibles espacios interepiteliales e imágenes compatibles con apoptosis (Fig 7). El grupo control no se apartó de los diferentes estadios celulares que presenta el epitelio seminífero normal (Fig. 8).





3. Glucemias

Los valores de glucemia en el momento de la autopsia están presentados en la tabla 1 y 2. Se observa, como era dable esperar, que los valores de las glucemias de los animales inyectados con aloxano son elevados.

DISCUSIÓN

En la mayoría de los trabajos reportados como efecto a largo plazo del aloxano se refieren como modificaciones diabéticas realizados en animales adultos¹³. Nos pareció interesante comparar los hallazgos a largo plazo con los efectos del aloxano a corto plazo.

Coincidiendo con Ulbrich y Palmer¹⁹, quienes establecieron que el peso de los órganos y la histopatología son los mejores medios para medir la fertilidad masculina, centramos nuestro estudio en una línea autóctona ("m")¹⁸ y en otra, internacionalmente reconocida: la Sprague - Dawley en el corto y en el largo plazo (31 y 105 días, respectivamente).

Nuestros resultados vinculados con los pesos corporal y testicular en ambas líneas pusieron de relieve coincidencias y diferencias con otros autores. La histología testicular mostró algunas diferencias en las ratas "m" de 31 días de edad, llegándose a una clara destrucción tubular seminífera los 105 días de edad, fenómeno similar al descrito por Cai²⁰ en ratas adultas S-D, a los seis meses de haber sido inyectadas con estreptozotocina.

Por su parte, en el grupo S-D los efectos morfológicos en el corto plazo no fueron tan evidentes a la semana de la inyección del aloxano, mientras que los de largo plazo coincidieron con lo reportado previamente por otros autores. Relacionando los resultados obtenidos en "m" y en S-D, los de "m" fueron más llamativos y podrían estar indicando una mayor susceptibilidad al efecto del aloxano. Esto se hallaría avalado por lo aquéllos ligados a la histología de una y otra línea.

Estos hallazgos morfológicos en el corto plazo, particularmente en "m", podrían interpretarse como efectos tóxicos extra-pancreáticos directos. Los efectos en el largo plazo podrían atribuirse a la hiperglucemia, actuando sobre un órgano previamente sensibilizado por acción tóxica directa.

La posibilidad planteada de que los fenómenos tempranos sean consecuencia de un efecto directo del aloxano, coincide con otro modelo experimental como la ingesta de etanol en ratas preñadas trasuntado en daño testicular prepuberal²¹. Asimismo, el adjudicar las lesiones observadas en el largo plazo posiblemente al efecto conjunto de la toxicidad directa temprana y la ulterior hiperglucemia, se halla avalado por el mejoramiento experimentado en aquéllas tras la administración de insulina²².

Concluyendo, podríamos inferir que: (1) La línea "m" mostró, con mayor claridad y a corto plazo, los efectos del aloxano sobre el testículo; (2) Los cambios estructurales testiculares observados, a corto plazo, tras la inyección del aloxano en el post-destete, sugerirían un fenómeno tóxico directo sobre un territorio extra-pancreático, y (3) Los fenómenos a largo plazo evidenciaron mayor precocidad en la línea "m" que en S-D.

En síntesis, estimamos que la línea "m" resultaría un modelo más adecuado para el estudio del efecto del aloxano no sólo sobre el testículo sino sobre otros sectores orgánicos extra-pancreáticos. Esto último retoma una conjetura que fuera guía para este trabajo y que nuestros resultados renuevan: No inquiramos qué puede hacer el aloxano por la DM sino qué resultados puede obstaculizar o distorsionar a dicho respecto, dado su efecto tóxico extra-pancreático en el corto plazo sobre órganos que interactúan en la determinación de tal enfermedad. De allí la necesidad que percibimos acerca de profundizar el estudio de la toxicidad aloxánica en distintos sistemas, muy especialmente en aquéllos que interaccionan y coadyuvan en la génesis, perdurabilidad y complicaciones de la DM.

REFERENCIAS

1. im Walde SS, Dohle C, Schott-Ohly P et al. Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. Life Sci.

2002. 71: 1681-1694

2. Gai W, Schott-Ohly P, im Walde SS et al. Trial target for toxicity induced by streptozotocin and alloxan in pancreatic islets of mice in vitro. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2004. 112: 29-37
3. Vega P, Gaule C, Mancilla J et al. Comparison of alloxan and streptozotocin induced diabetes in rats: differential effects on microsomal drug metabolism. *Gen. Pharmacol.* 1993. 24: 489-495
4. Lee TN, Alborn WE, Knierman MD et al. Alloxan is an inhibitor of O-glcNAc-selective N-acetyl-beta-d-glucosaminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. 350: 1038-1043
5. Howland BE & Zebrowski EJ. Hyposecretion of gonadotrophins in alloxan-treated male rats. *J. Reprod. Fert.* 1972. 31: 115-118
6. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 1970. 22: 485-518
7. Germanyuk YL & Minchenko AG. Effect of insulin on RNA and protein biosynthesis in liver mitochondria from normal and alloxan diabetic rats. *Endocrinol. Exp.* 1978. 12: 233-243
8. Pachecka J, Kobylinska K, Suchocka Z et al. The effect of short-term alloxan-induced diabetes on the activity of drug metabolizing enzymes. *Acta Pol. Pharm.* 1993. 50: 435-439
9. Szkudelski T, Kanulska K & Okulicz M. Alloxan in vivo does not exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol. Res.* 1998. 47: 343-346
10. Lenzen S, Freytag S & Panten U. Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in sugar-binding site of the enzyme. *Mol. Pharmacol.* 1988. 34: 395-400
11. Blasiak J, Sikora A, Czechowska A et al. Free radical scavengers can modulate the DNA-damaging action of alloxan. *Acta Biochim. Pol.* 2003. 50: 205-210
12. Boquist L. A new hypothesis for alloxan diabetes. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (A)* 1980. 88: 201-209
13. Arikawe AP, Daramola AO, Odofin AO et al. Alloxan-induced and insulin-resistant diabetes mellitus affect semen parameters and impair spermatogenesis in male rats. *Afr J Reprod Health.* 2006. 10: 106-113
14. Azeez OI, Oyagbemi AA, Oyeyemi MO et al. Ameliorative effects of *Cnidioscolus aconitifolius* on alloxan toxicity in Wistar rats. *Afr. Health Sci.* 2010. 10:283-291
15. Cusan L, Bélanger A, Séguin C et al. Impairment of pituitary and gonadal function in alloxan-induced diabetic male rats. *Mol. Cell Endocrinol.* 1980. 18: 165-176
16. Howland BE & Zebrowski EJ. Some effects of experimentally-induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats. *Horm. Metabol. Res.* 1976. 8: 465-469
17. Didebulidze NA, Sumbadze TM, Melikadze EB et al. Modulating effects of androgens on development adaptive-compensatory processes in organism of experimental animals-males. *Georgian Med News.* 2010. 186: 62-67
18. Calderari, SA; Font, MT; Garroq, O et al. The inbred IIM/Fm stock. *Rat News Let.*1991. 25: 28-29
19. Ulbrich B & Palmer AK. Detection on male reproduction -A literature survey. *Int. J. Toxicol.* 1995. 14: 293-327
20. Cai L, Chen S, Evans T et al. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res.* 2000. 28: 342-347
21. Fakoya FA & Caxton-Martins EA. Morphological alterations in the seminiferous tubules of adult Wistar rats: the effects of prenatal ethanol exposure. *Folia Morphol (Warsz).* 2004. 63: 195-202
22. Sudha S, Valli G, Julie PM et al. Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2000. 108: 14-20

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Roxana Lattante, docente de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Médicas, por su asesoramiento y a la Srta. Agustina Tardivo por su aporte en la confección de los gráficos.

CORRESPONDENCIA:

Noriyuki Hisano
Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario
Santa Fe 3100
2000 Rosario
ARGENTINA
Email: [norihisano @ yahoo.com.ar](mailto:norihisano@yahoo.com.ar)

Comentario del revisor Prof. Gloria Cónsole PhD. Profesora Titular, Cátedra B de Citología, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Existen actualmente en la bibliografía especializada varios trabajos que continúan empleando el aloxano como inductor de diabetes experimental en ratas, alternativamente con la estreptozotocina. Hisano y col. hacen hincapié en ello y derivan datos de su trabajo de potencial interés para quienes emplean dicho agente diabético.

Comentario del revisor Dr. Aldo R. Eynard. Catedrático de Biología Celular, Histología y Embriología. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

La estreptozotocina y el aloxano han sido utilizados frecuentemente como inductores de diabetes experimental en animales de laboratorio. Al margen de las ventajas y desventajas de cada uno de ellos, el aloxano prosigue empleándose como agente diabético en publicaciones periódicas. En ese contexto, el trabajo de Hisano y col, puede contribuir a completar determinados vacíos sobre este agente antineoplásico que destruye selectivamente las células β del páncreas.

**Recibido, 1 de marzo 2011. Recibido revisado, 20 de mayo de 2011
Publicado, 2 de junio de 2011**