

UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTO TORIBIO DE MOGROVEJO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE MEDICINA HUMANA



Efecto de la suplementación con vitamina D como coadyuvante terapéutico en el control glicémico en *Rattus rattus* con diabetes mellitus inducida

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO CIRUJANO**

AUTOR

Maria Lourdes Llontop Ruiz

ASESOR

Alejandro Hermann Arellano Hoffmann

<https://orcid.org/0000-0002-3943-9542>

Chiclayo, 2022

**Efecto de la suplementación con vitamina D como
coadyuvante terapéutico en el control glicémico en *Rattus
rattus* con diabetes mellitus inducida**

PRESENTADA POR

Maria Lourdes Llontop Ruiz

A la Facultad de Medicina de la
Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo
para optar el título de:

MÉDICO CIRUJANO

APROBADA POR

Víctor Daniel Linares Baca

PRESIDENTE

Alexis José Ormeño Julca

SECRETARIO

Alejandro Hermann Arellano Hoffmann

VOCAL

Dedicatoria

A Dios, por brindarme cada día la oportunidad de gozar de vida, salud, fortaleza y bienestar para lograr un propósito más en mi vida.

A mis padres, por su impresionante esfuerzo y dedicación para apoyarme a lo largo de toda mi formación profesional. Por ser mi guía y nunca dejar de creer en mí.

A mi abuelo Julio Ruiz, por su confianza, cariño y orientación de vida.

A la memoria de mis abuelas Virginia Graus y María Llaque, que desde el cielo son mis ángeles y ejemplos de amor a Dios.

Agradecimiento

A mi asesor, Dr. Alejandro Arellano Hoffmann, por su orientación acertada en la ejecución de la presente tesis.

Al profesor Antero Yacarini, por su labor de asesor al inicio de este trabajo de investigación.

A la Dra. Lizi y al Dr. Quenema por su apoyo desinteresado durante toda la fase de ejecución de mi proyecto, por instruirme en los aspectos básicos de manipulación de especímenes.

A todas las personas que contribuyeron en la culminación de este trabajo.

Índice

Resumen.....	7
Abstract	8
I. Introducción	9
II. Marco Teórico	10
i. Antecedentes del problema.....	10
ii. Bases teórico-científicas	10
iii. Definición de términos básicos.....	12
III. Metodología	13
i. Tipo y diseño del estudio	13
ii. Escenario.....	13
iii. Población de estudio	13
iv. Muestra de estudio	13
v. Proceso de recolección de información	13
vi. Análisis de datos	14
vii. Aspectos éticos	14
IV. Resultados	15
V. Discusión.....	19
VI. Conclusiones	21
VII. Recomendaciones.....	21
VIII.Referencias	22
IX. Anexos.....	26

Lista de tablas

Tabla 1. Niveles de HbA1c en grupo control y experimental, previa inducción en animales de experimentación	15
Tabla 2. Niveles de calcio sérico total en grupo control y experimental, en animales de experimentación	18
Tabla 3. Prueba de hipótesis para para las variables: Suplementación con vitamina D y control glucémico en ratas diabéticas.....	19

Lista de figuras

Figura 1. Variación de la glucosa en el grupo control antes y después de la inducción a diabetes en animales de experimentación.....	16
Figura 2. Variación de la glucosa en el grupo experimental antes y después de la inducción a diabetes en animales de experimentación.....	17
Figura 3. Variación de los promedios de niveles de glucosa entre el grupo control y grupo experimental, antes y después de la inducción a diabetes en animales de experimentación	18

Resumen

Objetivo: Evaluar el efecto de la suplementación con Vitamina D, como coadyuvante terapéutico en el control glicémico, en ratas Long-Evans con normovitaminosis D inducidas a diabetes experimental. **Materiales y métodos:** Estudio experimental, ejecutado en 10 ratas Long-Evans machos, inducidas a diabetes, mediante la administración de aloxano al 5%. Se obtuvieron valores de glucosa y hemoglobina glicosilada previamente al tratamiento con metformina, en el grupo control, y metformina con vitamina D, en el grupo experimental. Se sometieron a seguimiento por cuatro semanas mediante un dosaje de glucosa en ayunas semanal. Para el grupo experimental, se añadió el dosaje de calcio sérico total pre y post tratamiento. Se compararon resultados mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. **Resultados:** Tras 4 semanas de seguimiento, se realizó el análisis bivariado, en el cual se compararon los niveles de glucosa en ayunas entre el grupo control y experimental, hallándose que los resultados no fueron significativamente diferentes ($p>0.05$). **Conclusiones:** La suplementación con vitamina D como coadyuvante a la metformina no disminuye significativamente el nivel glucosa en ratas inducidas a diabetes mellitus experimental.

Palabras clave: Long-Evans, Metformina, Vitamina D, Control glicémico.

Abstract

Objective: To evaluate the effect of Vitamin D supplementation, as a therapeutic adjuvant in glycemic control, in Long-Evans rats with normovitaminosis D induced to experimental diabetes. **Materials and methods:** Experimental study, executed in 10 male Long-Evans rats, induced by diabetes, by administering 5% alloxane. Glucose and glycosylated hemoglobin values were obtained prior to treatment with metformin, in the control group, and metformin with vitamin D, in the experimental group. They were followed for four weeks by weekly fasting glucose measurement. For the experimental group, the pre and post treatment total serum calcium dosage was added. Results were compared using the Mann-Whitney U nonparametric test. **Results:** After 4 weeks of follow-up, the bivariate analysis was performed, in which the fasting glucose levels were compared between the control and experimental groups, finding that the results were not significantly different ($p > 0.05$). **Conclusions:** Supplementation with vitamin D as an adjunct to metformin does not significantly decrease glucose level in rats induced to experimental diabetes mellitus.

Keywords: Long-Evans, Metformin, Vitamin D, Glycemic control.

I. Introducción

La diabetes mellitus (DM) es el principal trastorno endocrinológico causante de discapacidad y muerte a nivel mundial (1). Su progresivo desarrollo se asocia a resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión y disfunción inmunológica (2), así como complicaciones microvasculares y macrovasculares, entre ellas la retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedad cerebrovascular y patologías cardiovasculares (3).

Actualmente, el número de casos de DM ha crecido considerablemente a nivel mundial. Según la Federación Internacional de Diabetes (IFB), en el año 2019 se registraron 463 millones de casos. Sin embargo, se espera un aumento del 50% para el año 2045, con aproximadamente 700 millones de diabéticos. Asimismo, cerca de 32 millones presentaron DM en el año 2021 en América Latina y el Caribe. En el Perú, se registraron 1.3 millones de casos hasta el 2019, entre ellos el 39.2% desconoce su enfermedad (4).

Para estudiar la relación entre la vitamina D y la patogenia de la DM, Erkus et al. determinaron los niveles séricos de esta vitamina en pacientes asistentes a clínicas ambulatorias, concluyendo que su deficiencia está fuertemente asociada a un peor pronóstico y regulación de los niveles séricos en diabéticos tipo 2 (5). De igual manera, Fagundes et al. realizaron un estudio donde participaron 75 pacientes diabéticos tipo 2, y que tras 8 semanas de suplementación con vitamina D, evidenciaron cambios significativos en la homeostasis de la glucosa y otros parámetros, demostrando que este trastorno endocrinológico presenta relación con la deficiencia de vitamina D (6). Así, múltiples investigaciones afirman que la suplementación con esta vitamina produce mejoría en los parámetros glucémicos (7). Otras investigaciones afirman que la suplementación con altas dosis de vitamina D también reduce la resistencia a la insulina en un período corto de tiempo (8), así como los valores séricos hemoglobina glicosilada (HbA1c) y glucosa plasmática en ayunas (9).

Sin embargo, en otros estudios no se encontraron resultados a favor, demostrando que la suplementación oral con la vitamina D se asocia a una mejoría transitoria en la glucemia (10), y que a largo plazo no se evidencian diferencias significativas (11). Así mismo, Lee et al en 2017, reafirmaron dichas conclusiones al evidenciar mínimas variaciones en sus parámetros glicémicos de estudio como la HbA1c y glucosa en ayunas (12).

Por tal motivo, este trabajo de investigación tiene por objetivo principal evaluar el efecto de la suplementación con Vitamina D, como coadyuvante terapéutico en el control glicémico, en ratas Long-Evans con normovitaminosis D inducidas a diabetes experimental. Así mismo, se precisaron objetivos específicos como determinar niveles de HbA1c en los grupos de ratas Long-Evans previa inducción a diabetes mellitus, determinar niveles de glucosa en sangre en los grupos de ratas Long-Evans previa inducción a diabetes mellitus y durante su tratamiento, determinar niveles de calcio en sangre en el grupo experimental de ratas Long-Evans previa inducción a diabetes mellitus y al finalizar el tratamiento y finalmente, comparar los niveles de glucosa en sangre entre grupos de ratas Long-Evans en tratamiento con solo metformina y grupos tratados con metformina y vitamina D.

II. Marco Teórico

i. *Antecedentes del problema*

Wafaa et al en 2018 estudió los efectos antidiabéticos de los agonistas de los receptores de vitamina D, en 50 ratas con diabetes tipo 2 inducidas mediante una dieta rica en grasa e inyección intraperitoneal de estreptozotocina, de las cuales se formaron 4 grupos (sin tratamiento, con metformina, con alfacalcidol y con combinación metformina + alfacalcidol), en los resultados el alfacalcidol, solo o combinado con metformina, mejoró significativamente la homeostasis de la glucosa y también del perfil lipídico ($P < 0,001$) (13).

Derakhshanian et al en 2017, experimentaron en ratas diabéticas Sprague-Dawley macho de seis a siete meses de edad, inducidas con estreptozocina a dosis de 45 mg/kg, y bajo tratamiento por 4 semanas. El efecto de la vitamina D (dos inyecciones de 20,000 UI/kg), demostró que esta podría mejorar significativamente la glucosa plasmática en ayunas, la insulina y la IGF-1 (14).

Adriazola et al en 2017, evaluaron niveles de glucosa, mediante glucómetro digital, en ratas machos Wistar de 12 semanas de edad, a las cuales se les administró dieta modificada y vitamina D2 (10000, 35000 y 70000 UI/kg); y a otros grupos, dieta modificada y vitamina D3 (10000, 35000 y 70000 UI/kg), encontrando que ambos tipos de vitamina D disminuyen los niveles de glicemia (15).

Akagawa et al en 2018, examinaron la capacidad del alfacalcidol (Vitamina D3) y el ejercicio para inhibir la osteoporosis y la atrofia muscular en ratas Long-Evans de 20 semanas de edad, con diabetes mellitus tipo 2. Tras el tratamiento de 2 a 6 semanas, se concluye que el uso del alfacalcidol en monoterapia no inhibió el aumento de los niveles de glucosa y, que además, en combinación con ejercicio, la disminución de estos valores fue no significativa (16).

ii. *Bases teórico-científicas*

Diabetes mellitus:

El término diabetes describe una enfermedad metabólica de etiología múltiple caracterizada por la hiperglucemia crónica y la alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas causada por defectos en la secreción de la insulina, en su acción o en ambas (1).

La mayoría de los casos de diabetes se pueden encuadrar en dos grandes categorías: DM tipo 1, donde se observa un déficit absoluto en la secreción de insulina, y la DM tipo 2, cuya causa es la combinación de una resistencia a la acción de la insulina y la respuesta compensatoria de insulina inadecuada (17).

La DM tipo 2 se asocia a complicaciones macrovasculares y microvasculares, tales como retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedades cardiovasculares. La prevención y el manejo de estas complicaciones se han convertido en aspectos importantes de la atención actual de la diabetes.

Además de estas complicaciones, bien conocidas, también se pueden esperar complicaciones orales (3).

La patogenia de estas complicaciones es compleja e involucra trastornos metabólicos y hemodinámicos, que incluyen hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión y disfunción inmunológica. Estas alteraciones inician procesos de estrés celular a nivel endotelial y nervioso, tales como el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inflamación y la isquemia, lo que explica la susceptibilidad de los sitios densamente vascularizados e inervados, como los ojos, los riñones y los nervios (2).

Vitamina D.

La vitamina D (calciferol) es una vitamina liposoluble sintetizada a partir de un precursor en la piel tras la exposición a la radiación ultravioleta B (UVB) del sol. También se obtiene de fuentes dietéticas (por ejemplo, pescado graso, vitamina D fortificada, leche y cereales), de origen vegetal (vitamina D₂ o ergocalciferol) o de origen animal (vitamina D₃ o colecalciferol).

La vitamina D de la piel y la dieta se metaboliza en el hígado a 25-hidroxivitamina D, y aún más en los riñones a su forma activa, 1,25-dihidroxivitamina D, la cual ejerce sus efectos mediante la modulación de la expresión génica después de unirse a su receptor nuclear de vitamina D. La mayoría de los tejidos del cuerpo humano expresan estos receptores (5,18).

Según Neelankal, entre las acciones de la vitamina D, enfocadas en el control glicémico, destaca la estimulación de la secreción pancreática de insulina que puede estar influenciada por un flujo intracelular de calcio sobre las células β , por una acción no genómica desarrollada por el receptor VDR presente en las caveolas de la membrana celular. Asimismo, mejora la sensibilidad insulínica sobre células diana hepáticas, músculo esqueléticas y adiposas. Adicionalmente, efectúa una acción protectora contra el daño inmune causado por linfocitos B y T, macrófagos y células dendríticas (19).

Muchos estudios in vivo han demostrado que la deficiencia de vitamina D da como resultado una reducción en la secreción de insulina que conduce a hiperglucemia, aumento de la hemoglobina glicosilada y resistencia a la insulina (20).

A través de la vía no genómica, la función principal de la vitamina D consiste en la homeostasis del calcio, estimulando su absorción activa, por las células epiteliales, a nivel de los segmentos proximales del intestino, mediante su unión con el receptor de vitamina D. Un exceso de vitamina D, provoca característicamente un aumento de la absorción de calcio en un 65% y, por ende, hipercalcemia leve que evoluciona a grave, incluso suprimiendo la hormona paratiroidea. Por ello, el dosaje de calcio sérico se considera una forma indirecta para valorar el estado de esta vitamina (14,21–23).

La deficiencia de vitamina D puede surgir por varias causas, incluida una exposición insuficiente a los rayos UVB, una biodisponibilidad disminuida (por ejemplo, trastornos de malabsorción) o enfermedades que afectan el metabolismo

de la vitamina D, como la enfermedad hepática y renal. Asimismo, algunos medicamentos también pueden causar deficiencia de vitamina D, estos incluyen anticonvulsivos, glucocorticoides y medicamentos antirretrovirales (7).

Se sabe que la falta de vitamina D está implicada en enfermedades del sistema musculoesquelético, donde su deficiencia es clásicamente una causa de raquitismo (en niños) y osteomalacia (en adultos). De igual forma, su deficiencia se ha relacionado con una variedad de enfermedades que afectan a otros sistemas corporales, incluidos los trastornos metabólicos como DM, autoinmunes, psiquiátricos, respiratorios y cardiovasculares; cáncer (especialmente cáncer de colon, próstata y mama); y dolor crónico (24).

iii. *Definición de términos básicos.*

COADYUVANTE TERAPÉUTICO: Aquel que contribuye o ayuda a la solución del problema o enfermedad, de manera suplementaria, que se administra en conjunto con el tratamiento primario o principal, con el objetivo de disminuir la tolerancia, la toxicidad y/o los efectos colaterales (25,26).

CONTROL GLICÉMICO: Proceso que busca estabilizar el nivel de glucosa dentro de los límites de la normalidad, cuyo objetivo es reducir, a largo plazo, complicaciones microvasculares y macrovasculares (27).

DIABETES MELLITUS: Enfermedad caracterizada por una concentración excesiva de glucosa en sangre, cuyo origen involucra múltiples procesos fisiopatológicos, desde la destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas, con consecuente alteración de la secreción de la insulina, hasta mecanismos que conducen a la resistencia a la acción de la misma (28).

VITAMINA D: Es una prohormona orgánica liposoluble imprescindible para la formación y desarrollo óseo y dental, así también, estimula la absorción del calcio a nivel intestinal. Se caracteriza por ejercer un efecto endocrino, paracrino y autocrino (18).

CALCIO SÉRICO TOTAL: Es la suma de las cantidades de calcio ionizado (también llamado calcio libre) y no ionizado (calcio unido a proteínas específicas en sangre). Sirve como indicador indirecto para determinar si los niveles de vitamina D de encuentran dentro de los parámetros normales (21).

***Rattus rattus* (Cepa Long Evans):** Cepa de ratas albinas utilizadas en la investigación biomédica experimental, fáciles de manipular y desarrolladas a partir de ratas hembras de la cepa Wistar con un macho color gris salvaje (29).

DIABETES MELLITUS INDUCIDA: Diabetes mellitus provocada por la administración de sustancias con efectos tóxicos sobre las células β o tras pancreatectomía, generando una insuficiencia de carácter progresivo y total de insulina (30).

ETAPA DE CUARENTENA: Fase de acondicionamiento y adaptación de los especímenes en una determinada área, durante un tiempo preestablecido, previa experimentación.

III. Metodología

Diseño metodológico:

- i. **Tipo y diseño del estudio:** Estudio analítico experimental de dos grupos con medida pre y post- tratamiento. El muestreo fue no probabilístico consecutivo.
- ii. **Escenario:** La etapa de cuarentena, identificación de cada animal, inducción a diabetes mellitus, determinación de glucosa, procedimiento experimental, evaluación y sacrificio se llevó a cabo en el bioterio del Hospital Regional de Lambayeque (HRL).

La determinación de hemoglobina glicosilada y calcio sérico total se realizó en un laboratorio de la ciudad.

- iii. **Población de estudio:** Conformada por ratas albinas *Rattus rattus* de la cepa Long-Evans, procedentes del bioterio del HRL, que cumplen los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Ratas machos de la cepa Long-Evans
- Ratas jóvenes de 24 semanas de edad
- Ratas jóvenes con pesos entre 250 ± 50 gramos
- Ratas que pertenezcan a la misma camada
- Ratas no utilizadas en estudios anteriores.
- Ratas sanas, considerando parámetros de glucosa en ayunas, hemoglobina glicosilada y calcio total normales.

Criterios de exclusión

- Ratas que no respondan favorablemente a la inducción con aloxano

- iv. **Muestra de estudio:** Se seleccionaron las primeras 10 ratas sanas, incluyendo un ajuste de pérdidas del 25%, para asegurar una cantidad mínima de 4 ratas por grupo.

- v. **Proceso de recolección de información:**

Insumos químicos: El aloxano, en frasco de 10gr, fue producido por Sigma Chemicals (St. Louis, MO, EUA). La metformina, como tableta de 500gr, fue fabricada por Reyoung Pharmaceutical Co., Ltd. (China). La vitamina D (Colecalciferol), como cápsula blanda de 400 UI fue manufacturado por Mason Vitamins, INC (Miami Lakes, FL, EUA).

Animales de experimentación: Se utilizaron 10 ratas machos Long-Evans de 24 semanas de edad, con un peso de 250 ± 50 gr, las cuales fueron obtenidas del bioterio del HRL (31). Todas fueron sometidas a acondicionamiento y aclimatación en las instalaciones del bioterio del HRL durante 15 días, según las indicaciones de la Guía de manejo y cuidado de animales de Laboratorio del Ministerio de salud. Asimismo, el siguiente protocolo fue aprobado por las autoridades del HRL. Entre dichas condiciones incluyeron una temperatura entre $20 - 25^{\circ}\text{C}$, humedad entre $40 - 70\%$ y el ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Además, contaron con libre acceso al alimento balanceado “La Molina” para ratas, con un consumo diario entre 3-6 gramos, con un estándar de 1000 UI Vitamina D3/kg de alimento, y 3-7 mL diarios de agua (32).

Los animales fueron cuidados cumpliendo con lo mencionado en la Declaración de la ANM sobre el Uso de Animales en Investigación Biomédica y bajo la Ley N°30407 “Ley de Protección y Bienestar animal”, para minimizar el dolor y el sufrimiento (33,34).

Modelo de Experimentación: Los animales fueron distribuidos, de manera aleatoria, en un grupo control y un grupo experimental, de 5 ratas cada uno. A cada animal se le asignó una jaula numerada. Estas se ordenaron del número 1 al número 10, empezando por el grupo control. Se excluyeron ratas con alteración en los parámetros glicémicos (HbA1c y glucosa en ayunas) y de calcio sérico total. Los valores normales considerados fueron glucosa: 80 – 130 mg/dL (35), hemoglobina glicosilada (HbA1c): 4.0 - 7.0% (36) y calcio sérico total: 2.19 - 3.27 mmol/L (37).

Para la determinación de glucosa en ayunas, los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 horas. Según lo recomienda Graham, la cola fue colocada en agua tibia para vasodilatar la vena cauda, y tras asepsia con alcohol, se realizó una punción con una aguja 25G a la altura del tercio distal de la cola en su porción lateral. Se aplicó suave presión, desechando la primera gota y recibiendo la siguiente sobre la tira reactiva para su lectura con el glucómetro digital (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics®) (15,38).

Para la determinación de HbA1c y calcio sérico total, se obtuvo una muestra sanguínea de 300 µL por venopunción de la vena cauda en el ápice de la cola de la rata y extracción continua con aguja mariposa y jeringa, siguiendo previamente el protocolo de asepsia anterior. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en tubos MiniCollect de 1mL con y sin EDTA, y luego trasladadas a un laboratorio de la ciudad, con las medidas de seguridad necesaria, el cual brindó los resultados a las 24 horas (21,39).

Tras una semana, fueron inducidas a diabetes mediante la inoculación de aloxano al 5% a dosis única de 100 mg/kg de peso corporal, por vía intraperitoneal. Tras 48 horas y previo ayuno, se evaluó la glucosa para determinar si el nivel de glicemia fue >200 mg/dL, y así incluir a dichas ratas en la investigación (40,41). Al grupo control se le administró, con ayuda de una cánula orogástrica, metformina vía oral a dosis de 300 mg/kg/día, diluida en agua, durante las mañanas tras su primer alimento (42,43). A su vez, el grupo experimental recibió vitamina D vía oral a dosis 170 UI/semana, juntamente con metformina vía oral a la misma dosis (44).

El periodo de tratamiento fue de 4 semanas, con determinaciones de glucosa en ayunas por semana, y de calcio sérico total al final de la experimentación (13,14). Al concluir la experimentación, los animales fueron sacrificados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a dosis de 150 mg/kg (16,42).

La duración total del estudio fue de 5 semanas.

vi. *Análisis de datos:*

Los datos fueron almacenados en una hoja de cálculo en Microsoft Excel 2020, donde se registraron ítems como valores de HbA1c previa inducción y glucosa en ayunas, durante el tiempo de experimentación. Se utilizaron figuras y tablas para la representación de datos obtenidos.

Los resultados fueron comparados mediante el uso de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, con ayuda del programa estadístico SPSS v. 25.0. Se consideraron intervalos de confianza del 95% y un valor $p < 0,05$ para establecer significancia estadística.

vii. *Aspectos éticos:*

El estudio se desarrolló teniendo en cuenta los principios éticos del uso de animales en la experimentación y enseñanza, detallados en la Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en Investigación Biomédica, y en Perú, bajo la Ley N°30407 “Ley de Protección y Bienestar animal”, la cual defiende y garantiza

la protección y el bienestar de los animales sin distinción de especie, así como la conservación de la biodiversidad.

Así mismo, el proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Santo Toribio de Mogrovejo con resolución N° 519-2019-USAT-FMED, y el Comité de Ética de Investigación en animales de laboratorio del Hospital Regional de Lambayeque (evidencia adjunta en Anexo 4).

En este proyecto, los animales fueron preservados de cualquier daño, dolor y sufrimiento innecesario antes, durante y después del periodo de estudio. Asimismo, fueron expuestos al dolor mínimo para alcanzar los objetivos de la investigación. De igual manera, la duración de la experimentación fue lo más corta posible. Además, se utilizaron solo el número necesario de animales para demostrar o rechazar las hipótesis expuestas en el trabajo. Finalmente, para evitar las consecuencias post-inducción a diabetes mellitus, los animales fueron sacrificados al culminar el estudio.

IV. Resultados

La ejecución experimental se desarrolló durante febrero y marzo del 2020. Inicialmente, se obtuvieron valores de HbA1c correspondientes a las ratas del grupo control y experimental. Ambos grupos presentan valores dentro del rango normal ya establecido, indicando estar aptas para la experimentación (tabla 1).

Tabla 1. Niveles de HbA1c en grupo control y experimental, previa inducción en animales de experimentación

Grupos de investigación	Grupo Control						Grupo Experimental					
	ID	1	2	3	4	5	Promedio total	6	7	8	9	10
HbA1c Antes de la inducción (%)	4.7	5.3	5.1	4.8	4.8	4.9 ± 0.25	5.3	5.1	4.9	4.7	5	5 ± 0.22

Niveles HbA1c antes de la inducción a diabetes en el grupo control y grupo experimental

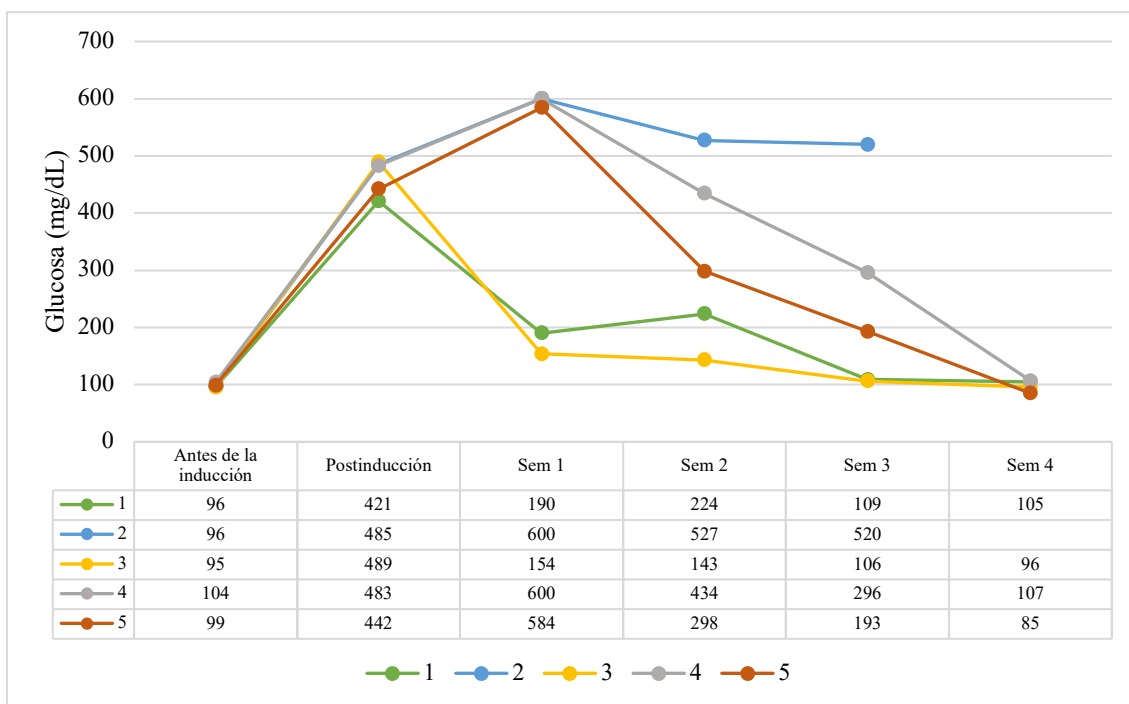
Fuente: Datos de la investigación, elaboración propia.

Asimismo, se dosificaron los niveles de glucosa basal en ayunas para ambos grupos, observándose, en el grupo control y experimental, valores glicémicos normales antes de la inducción con aloxano al 5% por vía intraperitoneal. Tras 48 horas post-inducción y durante la primera semana de tratamiento, todas las ratas en ambos grupos presentaron hiperglucemia. Igualmente, en la segunda semana, la totalidad del grupo control presentó hiperglucemia, sin embargo, en el grupo experimental una de cinco (1/5) ratas logró corregir sus niveles de glucosa alcanzando parámetros normales. Durante la tercera semana, una rata del grupo control murió, por ello se decidió obtener su nivel de glucemia por muestra intracardiaca. Así se evidenció, en el grupo control, tres de cinco (3/5) especímenes con hiperglucemia, mientras que,

en el grupo experimental tres de cinco (3/5) presentaron normoglicemia. Finalmente, en la cuarta semana, todos los especímenes del grupo control alcanzaron valores glucémicos normales, en contraste con en el grupo experimental, donde aún una de cinco (1/5) ratas presentó hiperglucemia.

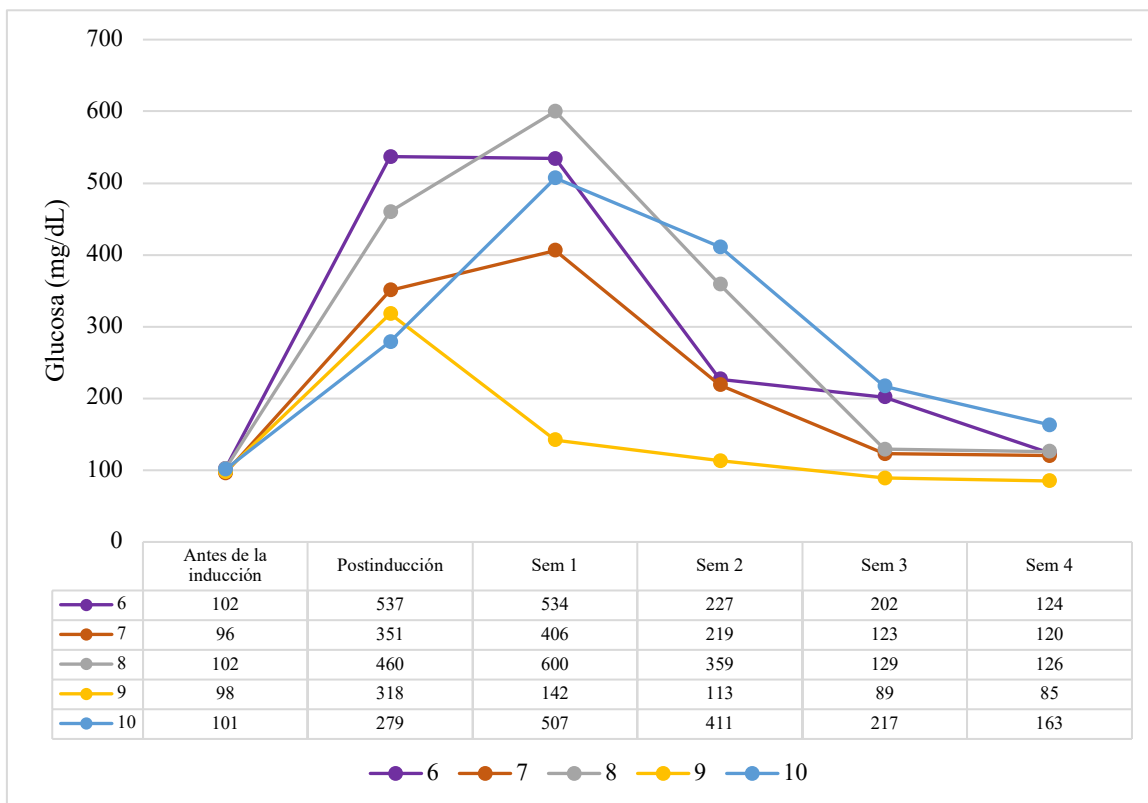
A lo largo de las cuatro semanas de experimentación, los niveles glucémicos sufrieron variabilidades tanto en el grupo control como grupo experimental. Dichos valores se pueden visualizar en el Figura 1 y 2, respectivamente.

Figura 1. Variación de la glucosa en el grupo control antes y después de la inducción a diabetes en animales de experimentación



Fuente: Datos de la investigación, elaboración propia

Figura 2. Variación de la glucosa en el grupo experimental antes y después de la inducción a diabetes en animales de experimentación

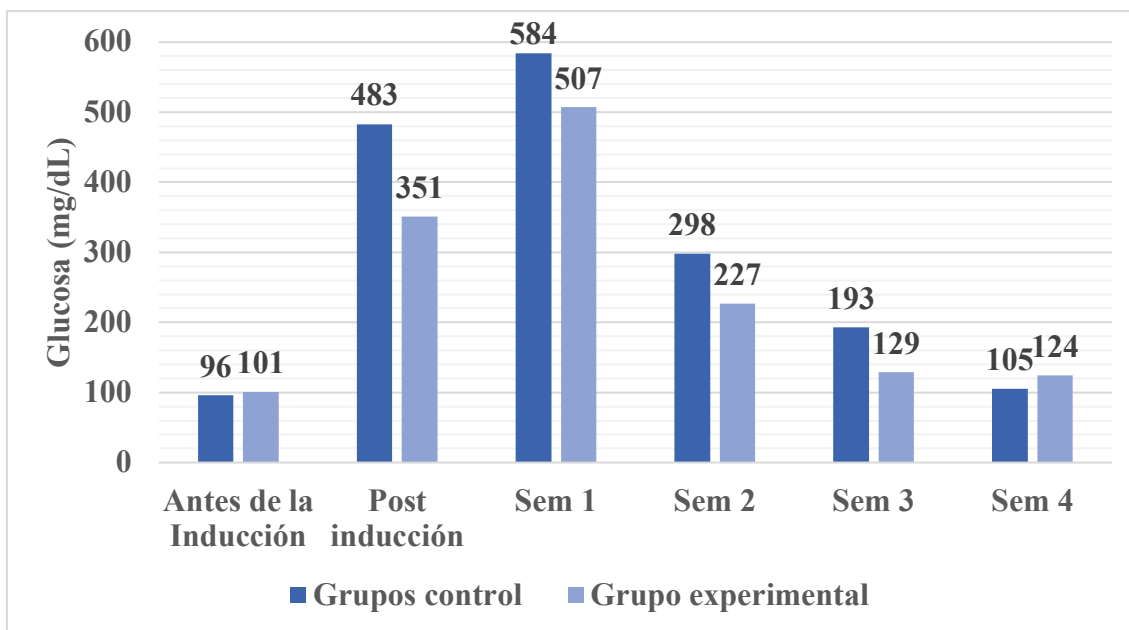


Fuente: Datos de la investigación, elaboración propia

De esta manera, se puede evidenciar que, antes de la inducción a diabetes, se inició con valores glucémicos normales, sin embargo, durante la post - inducción, dichos niveles aumentaron hasta alcanzar glucemias más altas, las cuales fueron registradas durante la semana 1, para luego disminuir hasta alcanzar los valores glicémicos más bajos durante toda la fase de tratamiento, en la semana 4 (Figura 3). Sin embargo, tras la pérdida de un espécimen, se decidió finalizar el estudio hasta la semana 3 para lograr una comparación más real entre ambos grupos.

Para comprobar una posible hipervitaminosis D, se realizó el dosaje de calcio sérico total, donde se obtuvieron valores dentro de los parámetros normales, antes y después del tratamiento para ambos grupos (tabla 2).

Figura 3. Variación de las medianas de los niveles de glucosa entre el grupo control y grupo experimental, antes y después de la inducción a diabetes en animales de experimentación



La disminución de los niveles de glucosa no es significativa al comparar el grupo control y el grupo experimental.

Fuente: Datos de la investigación, elaboración propia.

Tabla 2. Niveles de calcio sérico total en grupo control y experimental, en animales de experimentación

ID	GRUPO CONTROL					Promedio total	GRUPO EXPERIMENTAL					Promedio total
	1	2	3	4	5		6	7	8	9	10	
Antes de la inducción (mmol/L)	2.53	2.39	2.37	2.19	2.71	2.42 ± 0.19	2.55	2.61	2.49	2.46	2.76	2.57 ± 0.12
Después de la inducción (mmol/L)	2.87	2.56	2.91	2.83	2.99	2.83 ± 0.16	2.76	2.97	2.81	2.88	2.91	2.87 ± 0.08

Fuente: Datos de la investigación, elaboración propia

Finalmente, tras aplicar una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, los resultados obtenidos se catalogaron como no normales. Por tanto, al comparar el grupo control versus el grupo experimental, la prueba de hipótesis utilizada fue la U de Mann-Whitney, donde se observa que la suplementación con vitamina D como coadyuvante a la metformina no disminuye significativamente los niveles de glucosa en ratas inducidas a diabetes, debido a que el P valor (Sig. bilateral) es mayor de 0.05, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Prueba de hipótesis para para las variables: Suplementación con vitamina D y control glucémico en ratas diabéticas

GRUPOS	GRUPO CONTROL	GRUPO EXPERIMENTAL	N	SIG. (BILATERAL)
GLUCOSA PRE INDUCCIÓN (mg/dL)	96	101	10	1
GLUCOSA POSTINDUCCIÓN N (mg/dL)	483	351	10	1
GLUCOSA SEMANA 1 (mg/dL)	584	507	10	1
GLUCOSA SEMANA 2 (mg/dL)	298	227	10	0.317
GLUCOSA SEMANA 3 (mg/dL)	193	129	10	0.549

Resultados estadísticos de suplementación con vitamina D y la glucemia en ratas inducidas a diabetes. Indica significancia en el nivel 0,05 (bilateral).

Fuente: Datos de la investigación, elaboración propia

V. Discusión

Algunas investigaciones, como Aatsinki et al en 2019, indican que la deficiencia de vitamina D se asocia con una disminución de la liberación de insulina, resistencia a la misma y consecuente DM tipo 2 (45). Así mismo, se mencionaron mecanismos de acción tales como estimular la secreción de insulina, mediante un flujo intracelular de calcio sobre las células β , además de mejorar la sensibilidad de insulina sobre sus células diana e inducir a la translocación de GLUT4 y captación de glucosa en los miotubos (19,46).

Se inició evaluando los niveles de HbA1c antes de la inducción a DM, tanto en ratas del grupo control como del grupo experimental (tabla 1), los valores se ubicaron dentro del rango normal, indicando que los especímenes estuvieron aptos para la inducción con aloxano a diabetes mellitus, gracias a que esta prueba es recomendada para el diagnóstico de diabetes y prediabetes por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y Unwin et al en 2017 (47,48).

Tras una inducción exitosa con aloxano al 5%, se logró catalogarlas como diabéticas, lo cual también fue reportado por Vélchez H. et al., quienes demostraron haber incrementado los valores glucémicos haciendo uso de la misma dosis, tiempo de espera y valor glicémico referencial (40,49).

Durante el tratamiento, los valores de glucosa en ayunas empezaron a fluctuar, logrando disminuir en ambos grupos, pero finalmente alcanzando parámetros glicémicos similares (Gráfico 1 y 2). Asimismo, se observaron niveles de calcio sérico total dentro de los rangos normales (tabla 2), para evaluar el riesgo de incurrir en hipervitaminosis D.

Finalmente, se demostró que los valores glucémicos del grupo experimental no disminuyeron significativamente en comparación con el grupo control. Sin embargo, otros estudios reportan resultados diferentes, como se mencionaron anteriormente (13–15).

Esta disimilitud entre resultados puede corresponder, en primer lugar, a la edad de la rata y su capacidad para regenerar células pancreáticas β . Bequer L. et al, señalan que existe regeneración celular pancreática en condiciones de hiperglucemia, mediante tres mecanismos: a partir de células madre (neogénesis), conversión de un tipo celular a otro diferente (transdiferenciación) y la replicación de células β restantes (proliferación) (50). Dicha capacidad se correlaciona con la edad, puesto que una rata adulta presenta un índice de regeneración $< 3\%$ por día, el cual continúa disminuyendo con la edad (51). Por ende, una rata de 12 semanas de edad presentará una capacidad mayor de regeneración de células páncreaticas, lo que influiría en la variabilidad de los valores glicémicos.

Otro factor, que influiría en la diferencia de resultados, es la cepa de la rata y su relación con el método de inducción a diabetes experimental. Islam Sh y Wilsom R. argumentan que el modelo ideal para simular la DM tipo 2 debe presentar los dos mecanismos fisiopatológicos principales, tales son la resistencia a la insulina y daño sobre las células β pancreáticas. El primer mecanismo puede lograrse mediante una dieta rica en grasa, que debe iniciarse por los menos a las 6 semanas de edad y mantenerlo durante 16 semanas más, para ser considerado efectivo (52). Sin embargo, esa resistencia puede ser innata dependiendo de la cepa a inducir. Zhu M. et al indican que la cepa Long-Evans es considerada un modelo genético susceptible a presentar DM espontánea, ya que desarrolla resistencia a la insulina similar a la humana (53). Por otra parte, el segundo mecanismo se consigue administrando el diabetógeno farmacológico, según la dosis recomendada.

Ambos mecanismos fueron tomados en cuenta en este estudio para obtener un modelo experimental coherente con la fisiopatología de esta enfermedad.

Cabe mencionar que, otro estudio cuya muestra cumple criterios similares, sugiere resultados parecidos al presente trabajo (16).

Por otro lado, en investigaciones aplicadas en humanos, se evidencia amplia contradictoria sobre el efecto de esta vitamina a largo plazo (11).

Se debe tener en cuenta que, en el presente estudio, se identificaron limitaciones como el pequeño tamaño de la muestra, debido a que el número de especímenes obtenidos por camada no es muy amplio, al tener que cumplir los criterios de inclusión y exclusión propuestos. De igual manera, el uso del glucómetro Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics®, incita a incurrir en un sesgo de instrumento, considerando que este presenta un margen de error del $\pm 15\%$ (según las especificaciones del fabricante).

Finalmente, los resultados de esta investigación permiten comprobar que la vitamina D, como coadyuvante a la metformina, estadísticamente no disminuye los niveles de

glucosa post - inducción a diabetes mellitus en ratas inducidas con aloxano. Con estos resultados, se rechaza la hipótesis planteada: la suplementación con Vitamina D como coadyuvante disminuye el control glucémico en ratas Long-Evans, con normovitaminosis D, inducidas a diabetes mellitus.

VI. Conclusiones

- La suplementación con vitamina D, como coadyuvante a la metformina, no disminuye significativamente los niveles de glucosa post-inducción a diabetes mellitus en ratas, con normovitaminosis D, inducidas con aloxano.

VII. Recomendaciones

- Elaborar estudios cuyo tamaño de muestra sea mayor, y el muestreo sea de tipo probabilístico para mejorar el nivel de representatividad de la muestra.
- Realizar investigaciones en las cuales el método de dosaje de glucosa sea laboratorial, para así mejorar la exactitud del resultado.
- Realizar estudios experimentales con otros antidiabéticos orales, en combinación con vitamina D.
- Elaborar investigaciones que permitan definir la dosis terapéutica y la vía de administración adecuada de vitamina D para el control glicémico, y así evitar la toxicidad y mejorar su efectividad.
- Realizar experimentos que establezcan el posible uso de la vitamina D, no sólo con un fin terapéutico, sino profiláctico, o incluso aplicarla en las diferentes etapas de la historia natural de esta patología.
- Realizar investigaciones en animales con deficiencia de vitamina D para evaluar la influencia de este factor sobre el tratamiento para el control glicémico.

VIII. Referencias

1. Verhulst MJL, Loos BG, Gerdes VEA, Teeuw WJ. Evaluating All Potential Oral Complications of Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol* [Internet]. 18 de febrero de 2019 [citado 14 de agosto de 2020];10. doi: 10.3389/fendo.2019.00056
2. Raghavan S, Vassy JL, Ho Y, Song RJ, Gagnon DR, Cho K, et al. Diabetes Mellitus–Related All-Cause and Cardiovascular Mortality in a National Cohort of Adults. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis* [Internet]. 19 de febrero de 2019 [citado 14 de agosto de 2020];8(4). doi: 10.1161/JAHA.118.011295
3. Silva DAS, Naghavi M, Duncan BB, Schmidt MI, de Souza M de FM, Malta DC. Physical inactivity as risk factor for mortality by diabetes mellitus in Brazil in 1990, 2006, and 2016. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. diciembre de 2019;11(1):23. doi:10.1186/s13098-019-0419-9.
4. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes atlas*. 9th ed. Brussels: International Diabetes Federation, Executive Office [Internet]. 2019. 180 p.
5. Erkus E, Aktas G, Kocak MZ, Duman TT, Atak BM, Savli H. Diabetic regulation of subjects with type 2 diabetes mellitus is associated with serum vitamin D levels. *Rev Assoc Médica Bras* [Internet]. enero de 2019;65(1):51-5. doi: 10.1590/1806-9282.65.1.51
6. Fagundes GE, Macan TP, Rohr P, Damiani AP, Da Rocha FR, Pereira M, et al. Vitamin D3 as adjuvant in the treatment of type 2 diabetes mellitus: modulation of genomic and biochemical instability. *Mutagenesis* [Internet]. 29 de 2019;34(2):135-45. doi: 10.1093/mutage/gez001.
7. Wu C, Qiu S, Zhu X, Li L. Vitamin D supplementation and glycemic control in type 2 diabetes patients: A systematic review and meta-analysis. *Metabolism* [Internet]. agosto de 2017;73:67-76. doi: 10.1016/j.metabol.2017.05.006
8. Li X, Liu Y, Zheng Y, Wang P, Zhang Y. The Effect of Vitamin D Supplementation on Glycemic Control in Type 2 Diabetes Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* [Internet]. 19 de marzo de 2018 [citado 14 de agosto de 2020];10(3). doi: 10.3390/nu10030375
9. Mirhosseini N, Vatanparast H, Mazidi M, Kimball SM. The Effect of Improved Serum 25-Hydroxyvitamin D Status on Glycemic Control in Diabetic Patients: A Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1 de septiembre de 2017;102(9):3097-110. doi: 10.1210/jc.2017-01024.
10. Elkassaby S, Harrison LC, Mazzitelli N, Wentworth JM, Colman PG, Spelman T, et al. A randomised controlled trial of high dose vitamin D in recent-onset type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. diciembre de 2014;106(3):576-82. doi: 10.1016/j.diabres.2014.08.030
11. Hu Z, Chen J, Sun X, Wang L, Wang A. Efficacy of vitamin D supplementation on glycemic control in type 2 diabetes patients: A meta-analysis of interventional studies. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. abril de 2019;98(14):e14970. doi: 10.1097/MD.00000000000014970
12. Lee CJ, Iyer G, Liu Y, Kalyani RR, Bamba N, Ligon CB, et al. The effect of vitamin D supplementation on glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. *J Diabetes Complications* [Internet]. julio de 2017;31(7):1115-26. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2017.04.019.
13. Wafaa M. Abdel-Rehim, Rasha A. El-Tahan, Mennatullah A. El-Tarawy, Rowaida R. Shehata, Maher A. Kamel. The possible antidiabetic effects of vitamin D receptors agonist in rat model of type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* [Internet]. junio de 2018;450(1-2):105-12. doi: 10.1007/s11010-018-3377-x

14. Derakhshanian H, Javanbakht MH, Zarei M, Djalali E, Djalali M. Vitamin D increases IGF-I and insulin levels in experimental diabetic rats. *Growth Horm IGF Res* [Internet]. octubre de 2017; 36:57-9. doi: 10.1016/j.ghir.2017.09.002.
15. Adriazola Jokada MA, Arroyo Acevedo JL, Chavez Rimache L, Chacon Uscamaita P, Ruiz Ramirez E. Efecto del ergocalciferol (vitamina D2) y el colecalciferol (vitamina D3) sobre el control de la glicemia en ratas. *Rev Peru Med Integrativa* [Internet]. 19 de diciembre de 2017;2(3):798.
16. Akagawa M, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Ono Y, Yuasa Y, Nagahata I, et al. Effects of activated vitamin D, alfalcidol, and low-intensity aerobic exercise on osteopenia and muscle atrophy in type 2 diabetes mellitus model rats. Bader M, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 17 de octubre de 2018;13(10):e0204857. doi: 10.1371/journal.pone.0204857.
17. Conget I. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 1 de mayo de 2002;55(5):528-38.
18. Zuluaga Espinosa NA, Alfaro Velásquez JM, Balthazar González V, Jimenez Blanco KE, Campuzano Maya G. Vitamina D: nuevos paradigmas [Internet]. 2011;17(5-6):36.
19. Neelankal John A, Jiang FX. An overview of type 2 diabetes and importance of vitamin D3-vitamin D receptor interaction in pancreatic β -cells. *J Diabetes Complications* [Internet]. abril de 2018;32(4):429-43. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2017.12.002
20. Akhavan A, Noroozi Z, Shafiei AA, Haghghat A, Jahanshahi GR, Mousavi SB. The effect of vitamin D supplementation on bone formation around titanium implants in diabetic rats. *Dent Res J* [Internet]. 2012;9(5):582-7. doi: 10.4103/1735-3327.104877
21. Rodríguez MH, Gallego AS. Tratado de nutrición. Ediciones Díaz de Santos; 1999. 1502 p.
22. Sánchez A, Puché R, Zeni S, Oliveri B, Galich AM, Maffei L, et al. Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea (Parte I). *REEMO* [Internet]. 1 de noviembre de 2002;11(6):201-17.
23. Fleet JC. The Role of Vitamin D in the Endocrinology Controlling Calcium Homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 15 de septiembre de 2017;453:36-45. doi: 10.1016/j.mce.2017.04.008.
24. Santos RKF, Brandão-Lima PN, Tete RMDD, Freire ARS, Pires LV. Vitamin D ratio and glycaemic control in individuals with type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2018;34(3). doi: 10.1002/dmrr.2969.
25. Definición: tratamiento coadyuvante [Internet]. [citado 14 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.radiologyinfo.org/sp/glossary/glossary1.cfm?gid=399>
26. Fonseca PJ, Arnillas QP. TRATAMIENTO COADYUVANTE ANALGÉSICO. [diapositiva]. España: Sociedad Española de Oncología Médica; 2012. 13 diapositivas.
27. Morales Rodriguez A. Factores asociados al control glucémico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [Internet]. [Xalapa, Veracruz]: Universidad Veracruzana; 2007. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/29814/AlbertoMoralesRodriguez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
28. Ceballos Atienza R, Gómez Jiménez FJ. Diabetes mellitus: Concepto, clasificación y diagnóstico. En: *Novedades en diabetes: Atención integral y tratamiento*. 4.a ed. Formación Alcalá; 2006. p. 366.
29. Plataforma Gaditana de Defensa Animal. Animales más usado en experimentación




- [Internet]. PLAGDA. 2013 [citado 15 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://plagda.wordpress.com/tag/long-evans/>
30. Biblioteca virtual en salud. Diabetes Mellitus, Experimental. En: DeCS Server [Internet]. [citado 15 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>
 31. Lahbib A, Ghodbane S, Maâroufi K, Louchami K, Sener A, Sakly M, et al. Vitamin D Supplementation Ameliorates Hypoinsulinemia and Hyperglycemia in Static Magnetic Field–Exposed Rat. *Arch Environ Occup Health* [Internet]. 4 de mayo de 2015;70(3):142-6. doi: 10.1080/19338244.2013.828675.
 32. Fuentes Paredes F de M, Mendoza Yanavilca RA, Rosales Fernández AL, Cisneros Tarmeño RA. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2008: 57.
 33. The World Medical Association. Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica [Internet]. 2020 [citado 15 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-la-amm-sobre-el-uso-de-animales-en-la-investigacion-biomedica/>
 34. Diario Oficial del Bicentenario: El peruano. Ley N° 30407: Ley de protección y bienestar animal [Internet]. 2016 [citado 15 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/ley-de-proteccion-y-bienestar-animal-ley-n-30407-1331474-1/>
 35. Vílchez Cáceda H, Flores López O. Efecto sobre la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en ratas albinas alimentadas a dosis repetidas (28 días) con miel de abeja en etanol. *Horiz Méd Lima* [Internet]. 31 de diciembre de 2018;18(4):61-9. doi: 10.24265/horizmed.2018.v18n4.09
 36. Daín A. Efecto sinérgico de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) y ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) sobre parámetros metabólicos, inflamatorios y de oxidación celular en el desarrollo de diabetes espontánea de un modelo experimental. [Argentina]: Universidad Nacional de Córdoba; 2015.
 37. León Goñi AC, Diuris B, Amelia P, Ronda M, González B, Arteaga M, et al. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. *Revista Electrónica de Veterinaria* [Internet]. 2011;12(11):10.
 38. Lee G, Goosens KA. Sampling Blood from the Lateral Tail Vein of the Rat. *J Vis Exp* [Internet]. 18 de mayo de 2015;(99):52766. doi: 10.3791/52766
 39. Abraham EC, Bransome ED, Huff TA, Cope ND, Wilson JB, Huisman THJ. Determination of the Glycosylated Hemoglobins (Hb A_{1c}) with a New Microcolumn Procedure [Internet]. 1978;27(9):7. doi: 10.2337/diab.27.9.931. doi: 10.2337/diab.27.9.931.
 40. Vílchez C. H, Pineda P. M, Villanueva B. L. Actividad hipoglucemiante de los extractos de *Smallanthus sonchifolius* “yacón” y *Vitis vinifera* “uva” en ratas con diabetes inducida por aloxano. *Arnaldoa* [Internet]. 31 de agosto de 2018 [citado 15 de agosto de 2020];25(2). Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/view/880>
 41. Justil C, Angulo H. P, Justil G. H, Arroyo A. J. Evaluación de la Actividad Hipoglicemiante del Extracto Acuoso de *Abuta grandifolia* (Mart.) en Ratas con Diabetes Inducida por Aloxano. *Rev Investig Vet Perú* [Internet]. 3 de junio de 2015;26(2):206.
 42. Linden MA, Fletcher JA, Morris EM, Meers GM, Kearney ML, Crissey JM, et al. Combining metformin and aerobic exercise training in the treatment of type 2 diabetes and NAFLD in OLETF rats. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* [Internet]. 1

- de febrero de 2014;306(3):E300-10. doi: 10.1152/ajpendo.00427.2013.
43. Saeed Balamash K, Mohammed Alkreathy H, Hamed Al Gahdali E, Omer Khoja S, Ahmad A. Comparative Biochemical and Histopathological Studies on the Efficacy of Metformin and Virgin Olive Oil against Streptozotocin-Induced Diabetes in Sprague-Dawley Rats. *J Diabetes Res* [Internet]. 18 de noviembre de 2018;2018:1-10. doi: 10.1155/2018/4692197
 44. Mahmoud Elseweidy M, Sarhan Amin R, Hussein Attia H, Abdo Ali M. Vitamin D3 intake as regulator of insulin degrading enzyme and insulin receptor phosphorylation in diabetic rats. *Biomed Pharmacother* [Internet]. enero de 2017;85:155-9. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.116.
 45. Aatsinki SM, Elkhwanky MS, Kummu O, Karpale M, Buler M, Viitala P, et al. Fasting-Induced Transcription Factors Repress Vitamin D Bioactivation, a Mechanism for Vitamin D Deficiency in Diabetes. *Diabetes* [Internet]. mayo de 2019;68(5):918-31. doi: 10.2337/db18-1050
 46. Manna P, Achari AE, Jain SK. 1,25(OH)₂-vitamin D₃ upregulates glucose uptake mediated by SIRT1/IRS1/GLUT4 signaling cascade in C2C12 myotubes. *Mol Cell Biochem* [Internet]. julio de 2018;444(1-2):103-8. doi: 10.1007/s11010-017-3235-2
 47. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2020. *Diabetes Care* [Internet]. enero de 2020;38(1):29. doi: 10.2337/cd20-as01
 48. Unwin N, Howitt C, Rose AM, Samuels TA, Hennis AJ, Hambleton IR. Prevalence and phenotype of diabetes and prediabetes using fasting glucose vs HbA_{1c} in a Caribbean population. *J Glob Health* [Internet]. diciembre de 2017;7(2):020407. doi: 10.7189/jogh.07.020407.
 49. Ramos Rodríguez HG, Domingo Méndez J. Diabetes mellitus experimental. *Cienc Vet*. 1994;31.
 50. 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* [Internet]. 23 de mayo de 2016;36(2):230. doi: 10.7705/issn.0120-4157
 51. Swenne I. Effects of Aging on the Regenerative Capacity of the Pancreatic B-Cell of the Rat. *Diabetes* [Internet]. 1983;32:6. doi: 10.2337/diab.32.1.14
 52. Islam MdS, Wilson RD. Experimentally Induced Rodent Models of Type 2 Diabetes. En: Joost HG, Al-Hasani H, Schürmann A, editores. *Animal Models in Diabetes Research* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [citado 16 de agosto de 2020]. p. 161-74. doi: 10.1007/978-1-62703-068-7_10.
 53. Zhu M, Noma Y, Shima K, Mizuno A, Sano T. Poor Capacity for Proliferation of Pancreatic β -Cells in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty Rat: A Model of Spontaneous NIDDM. *Diabetes* [Internet]. 1 de julio de 1996;45(7):941-6. doi: 10.2337/diab.45.7.941

IX. Anexos


ANEXO N° 1: EXÁMENES LABORATORIALES

Los exámenes laboratoriales mostrados a continuación, muestran valores referenciales correspondientes al humano. Por ello, tener en cuenta los datos considerados en la sección 3 “Material y métodos”, donde se mencionan los valores referenciales correspondientes a esta especie animal.

				
ASEGURADORA : _____		EDAD: 24 semanas		
FECHA : 08/03/2020		N° ORDEN: 92723		
PACIENTE : RATA N° 1		MEDICO: Particular		
EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	4.7	%	
				No diabético: Menor de 6.0 (normal) DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.53	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.87	mmol/L	2.2 - 2.7
				 LABORATORIO CLINICO "PREVENTIVA" Mbgf. A. Vides Huerecci Flores C.B.D. 1861
Av. El Progreso y Prolongación Augusto B. Leguía Mz "J" Lote 6 - 2Do Piso. Botica Mi Farma - Esquina De Emergencia Del Hospital Regional De Lambayeque  Contactos: 952263476				



ASEGURADORA	: _____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92724
PACIENTE	: RATA N° 2	MEDICO:	Particular

EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	5.3	%	
				No diabético DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.39	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.56	mmol/L	2.2 - 2.7


LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"
 Mg. A. Vidal Hueraqui Flores
 C.B.P. 1861

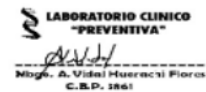
ASEGURADORA	: _____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92725
PACIENTE	: RATA N° 3	MEDICO:	Particular

EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	5.1	%	
				No diabético DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.37	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.91	mmol/L	2.2 - 2.7


LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"

 Nilda A. Vidal Hueracsi Flores
 C.B.P. 1861


ASEGURADORA :	_____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92726
PACIENTE	: RATA N° 4	MEDICO:	Particular

EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	4.8	%	
				No diabético Menor de 6.0 (normal) DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.19	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.83	mmol/L	2.2 - 2.7


LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"
[Signature]
 Mg. A. Vidal Hueraqui Flores
 C.B.P. 1861



ASEGURADORA	: _____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92727
PACIENTE	: RATA N° 5	MEDICO:	Particular

EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	4.8	%	
				No diabético DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.71	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.99	mmol/L	2.2 - 2.7


LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"
 Mg. A. Vidal Hueraqui Flores
 C.B.P. 1861

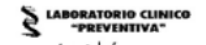
ASEGURADORA :	_____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92728
PACIENTE	: RATA N° 6	MEDICO:	Particular

EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	5.3	%	
				No diabético Menor de 6.0 (normal) DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.55	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.76	mmol/L	2.2 - 2.7


LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"

 Mg. A. Vidal Hueraqui Flores
 C.B.P. 1861

ASEGURADORA	: _____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92729
PACIENTE	: RATA N° 7	MEDICO:	Particular

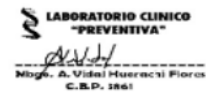
EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	5.1	%	
				No diabético: Menor de 6.0 (normal) DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.61	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.97	mmol/L	2.2 - 2.7


LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"

 Mg. A. Vidal Hueraqui Flores
 C.B.P. 1861



ASEGURADORA :	_____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92730
PACIENTE	: RATA N° 8	MEDICO:	Particular

EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	4.9	%	
				No diabético Menor de 6.0 (normal) DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.49	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.81	mmol/L	2.2 - 2.7


LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"
[Signature]
 Mg. A. Vidal Hueraqui Flores
 C.B.P. 1861



ASEGURADORA :	_____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92731
PACIENTE	: RATA N° 9	MEDICO:	Particular

EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	4.7	%	
				No diabético Menor de 6.0 (normal) DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.46	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.88	mmol/L	2.2 - 2.7

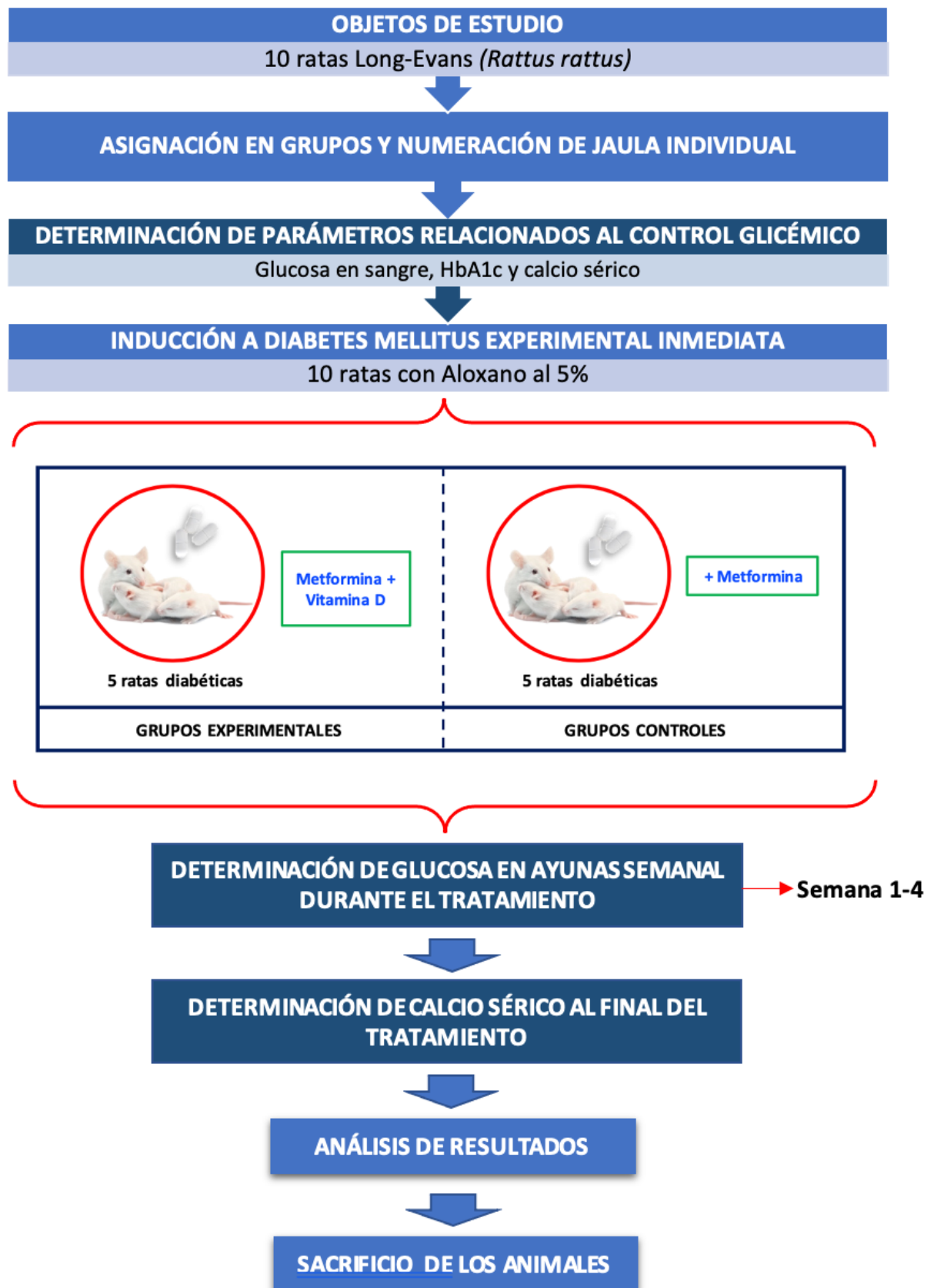

LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"

 Mg. A. Vidal Hueraqui Flores
 C.B.P. 1861

ASEGURADORA	: _____	EDAD:	24 semanas
FECHA	: 08/03/2020	N° ORDEN:	92732
PACIENTE	: RATA N° 10	MEDICO:	Particular

EXAMEN	METODO	RESULT.	UNID.	VALORES DE REFERENCIA
HEMOGLOBINA GLICOSILADA	Inmunoturbidimetrico	5.0	%	
				No diabético: Menor de 6.0 (normal) DIABETICO: Excelente: 5.0 - 6.0 Muy Bueno: 6.1 - 7.0 Bueno: 7.1 - 8.0 Regular: 8.1 - 9.0 Problemático: 9.1 - 10.0 Malo: 10.1 - 11.0 Muy Malo: 11.1 - 12.0
CALCIO SERICO PRE EXP	COLORIMETRICO	2.76	mmol/L	2.2 - 2.7
CALCIO SERICO POST EXP	COLORIMETRICO	2.91	mmol/L	2.2 - 2.7


LABORATORIO CLINICO
"PREVENTIVA"

 Mg. A. Vidal Hueraqui Flores
 C.B.P. 1861

ANEXO N° 2: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA METODOLOGÍA



Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 3: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE GLUCOSA EN AYUNAS, HB1AC Y CALCIO SÉRICO

GRUPO	ID	GLUCOSA EN AYUNAS						HBA1C	CALCIO SERICO	
		BASAL	POST INDUCCION	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	BASAL	BASAL	POST TRATAMIENTO
GRUPO CONTROL	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
GRUPO EXPERIMENTAL	6									
	7									
	8									
	9									
	10									

Fuente: Elaboración propia

**ANEXO N° 4: CONSTANCIA DE APROBACIÓN POR COMITÉ DE ÉTICA
PARA EL USO DE ANIMALES - HRL**



HOSPITAL REGIONAL LAMBAYEQUE
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL PARA EL USO DE ANIMALES



CONSTANCIA DE APROBACIÓN

El Comité de Ética Institucional Para el Uso de Animales en Investigación del Hospital Regional Lambayeque, luego de haber revisado el **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN** titulado “Efecto de la suplementación con vitamina D como coadyuvante terapéutico en el control glicémico en *Rattus rattus* con diabetes mellitus enducida”, presentado por:

- Llontop Ruiz María Lourdes.

Que habiendo cumplido con los requisitos se emite una constancia de conformidad de **APROBACIÓN** para la ejecución del mismo emitida por el Comité de CEIPUA, durante el periodo del **26 de diciembre 2019 hasta el 31 de agosto del 2020**.

Chiclayo, 27 de enero del 2020.



Dra. MARY KÁRIN AGUILAR AGUILAR
Presidente del CEIPUA

ANEXO N° 5: BOLETA DE COMPRA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

HOSP. REG. LAMB. A SUNAT 0071845104542
Via de evitamiento norte con av. el prog
RUC: 20487911586 Telef: 074-480420

BOLETA DE VENTA ELECTRONICA
N° B014-013412

Fecha: 2019-12-09 Hora: 12:32:00
Sr(ª): LLONTOPI RUIZ MARIA LOURDES
N° Historia: N° cuenta:

DESCRIPCION	CANT.	IMPORTE
REACTIVO BIOLOGICO RATTUS	32	480.00
	Sub Total	480.00
	Exonerado	00.00

TOTAL A PAGAR 480.00

Son: Cuatrocientos ochenta Soles con 00/
100 Céntimos

Caja: CAJA ADMISION 09

Cajero: BARDALES ORELLANO W

Fecha y Hora Imp: 09-12-2019 12:32:12

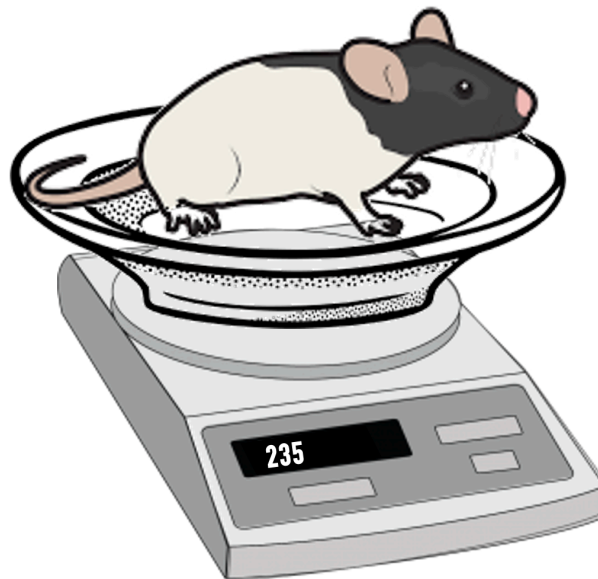
Consulte la validez del comprobante en
<http://www.sunat.gob.pe/ol-ti-itconsvali>
cpe/ConsValiCpe.htm

ANEXO N° 6: FOTOS DEL EXPERIMENTO

1. Identificación de Ratas Long-Evans (*Rattus rattus*)



2. Pesado de animales

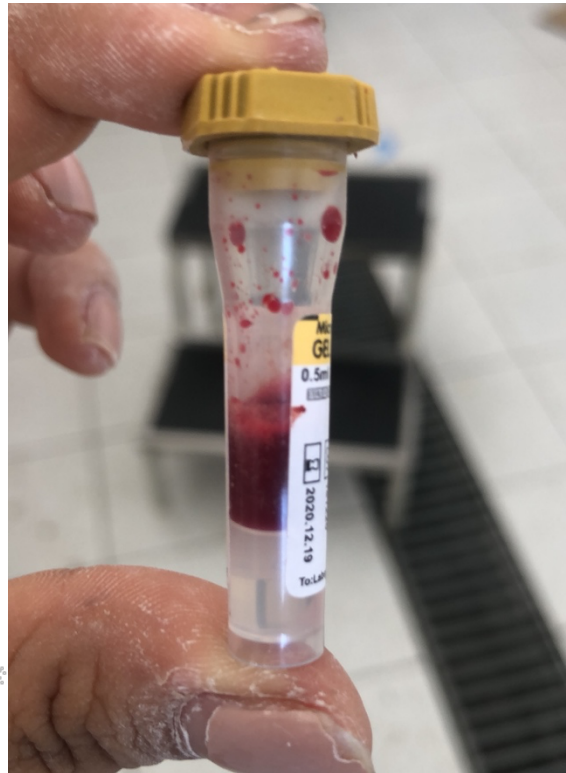
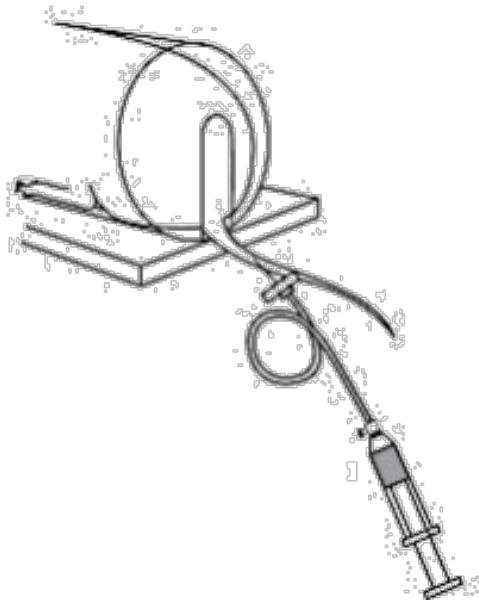


3. Alternativa a Cepo de laboratorio



4. Toma de muestra de Hemoglobina glicosilada y calcio sérico

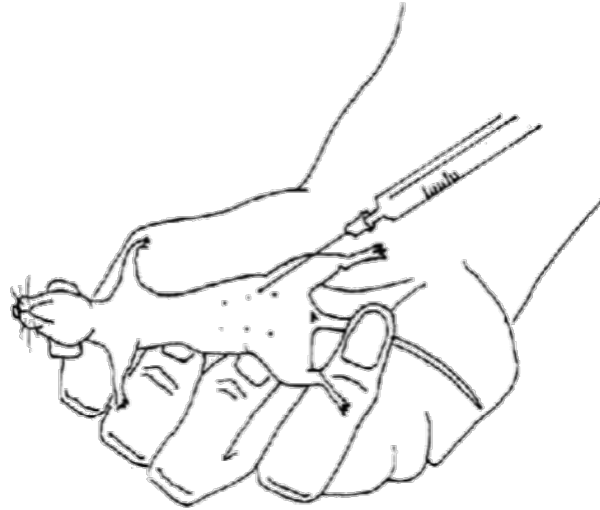




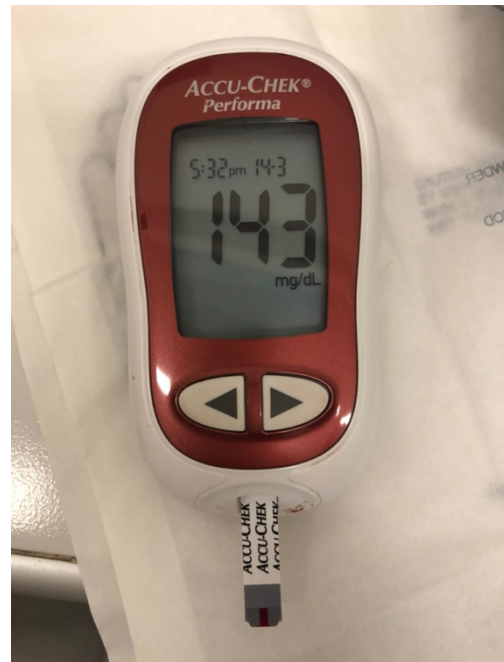
5. Toma de muestra para hemoglucotest.



6. Preparación del aloxano e inducción a Diabetes experimental



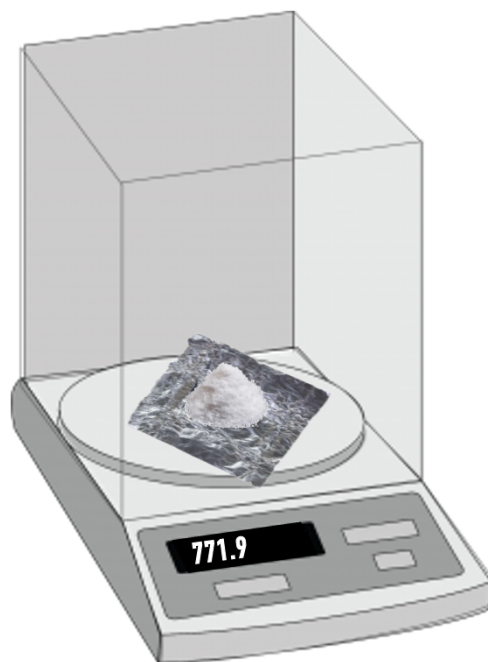
7. Comprobación y control de Diabetes experimental por hemoglucotest en ayunas (algunos ejemplos).



8. Tratamiento: Metformina y vitamina D



9. Preparación y administración del tratamiento



10. Administración del tratamiento



11. Disección y extracción de muestra intracardiaca de espécimen perdido.



12. Sacrificio de especímenes.

