

Artículo original

## Herramienta metodológica para el análisis integral de cambios histopatológicos en páncreas y riñones de ratas diabéticas

Methodological tool for the integral analysis of histopathological changes in pancreas and kidneys of diabetic rats

Penélope Daumy Zayas<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0009-0002-9480-8643>

Sandra Rodríguez Salgueiro<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3341-128X>

Laura M. Cabrera Hernández<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5205-1465>

Ambar Oyarzábal Yera<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3014-5457>

Lucía González Núñez<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0948-1114>

Juan F Infante Bourzac<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6369-8608>

Vivian Molina Cuevas<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0706-5547>

<sup>1</sup> Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Escuela Latinoamericana de Medicina (ELAM), La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [penydz96@gmail.com](mailto:penydz96@gmail.com)

## RESUMEN

**Introducción:** Los estudios histopatológicos en modelos experimentales de diabetes generalmente se realizan mediante métodos semicuantitativos o histomorfométricos por separado, lo que no permite una interpretación integral de los resultados.

**Objetivo:** Diseñar una herramienta metodológica basada en la aplicación conjunta de métodos semicuantitativos e histomorfométricos para la evaluación histopatológica de los cambios en el páncreas y los riñones de ratas diabéticas.

**Métodos:** Se emplearon dos grupos de ratas Sprague-Dawley machos: control sano y diabético (aloxano 120 mg/kg). Después de 15 días, se extrajeron y procesaron el páncreas y los riñones de todos los animales para el estudio histopatológico. El método semicuantitativo se aplicó en secciones teñidas con Hematoxilina y Eosina (HE), mientras que para el método histomorfométrico se utilizó la tinción especial Aldehído Fuschina de Gomori (AFG) en páncreas y la tinción HE en riñón.

**Resultados:** La aplicación de métodos semicuantitativos evidenció un aumento significativo de los grados de insulitis (páncreas) y de daño glomerular e intersticial (riñón) en los animales diabéticos. Mediante los métodos histomorfométricos se demostró la disminución significativa del área de los islotes de Langerhans y de la densidad de células  $\beta$  (identificadas mediante la tinción especial AFG) en el páncreas y del diámetro y área glomerulares en el riñón, del grupo diabético.

**Conclusiones:** La aplicación conjunta de métodos semicuantitativos e histomorfométricos permitió caracterizar de manera integral los cambios histopatológicos en páncreas y riñones de ratas diabéticas, lo que garantiza, en nuestras condiciones experimentales, el empleo de esta herramienta metodológica en otros modelos similares.

**Palabras clave:** Diabetes; métodos semicuantitativos; métodos histomorfométricos; páncreas; riñones; ratas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Histopathological studies in experimental models of diabetes are usually performed using separate semiquantitative or histomorphometric methods, which preclude an integrated interpretation of the results.

**Objective:** To design a methodological tool based on the combined application of semiquantitative and histomorphometric methods for the histopathological evaluation of changes in the pancreas and kidneys of diabetic rats.

**Methods:** Two groups of male Sprague-Dawley rats were used: a healthy control and a diabetic group (alloxan 120 mg/kg). After 15 days, the pancreas and kidneys from all animals were removed and processed for histopathological examination. The semiquantitative method was applied to sections stained with Hematoxylin and Eosin (HE), while the histomorphometric method used the special Gomori's Aldehyde Fuchsin (AFG) stain in the pancreas and the HE stain in the kidney.

**Results:** The application of semiquantitative methods showed a significant increase in the grade of insulitis (pancreas) and glomerular and interstitial damage (kidney) in diabetic animals. By means of histomorphometric methods, a significant decrease in the area of islets of Langerhans and the density of  $\beta$  cells (identified by the special stain AFG) in the pancreas, and the glomerular diameter and area in the kidney, was demonstrated in the diabetic group.

**Conclusions:** The combined application of semiquantitative and histomorphometric methods allowed for the integrally characterization of the histopathological changes in the pancreas and kidneys of diabetic rats, which guarantees the use of this methodological tool in other similar models under our experimental conditions.

**Keywords:** Diabetes; semiquantitative methods; histomorphometric methods; pancreas; kidneys; rats.

Recibido: 23/07/2025

Aprobado: 29/04/2026

## Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica de alta incidencia a nivel mundial, con una prevalencia del 10,5 % en la población adulta, y en Cuba es una de las principales causas de muerte. Entre las complicaciones más frecuentes de la DM se encuentra la nefropatía diabética. <sup>(1,2)</sup>

La fisiopatología de la DM y sus complicaciones no está completamente dilucidada, por lo que realizar estudios preclínicos que incluyan la evaluación histopatológica del páncreas y de otros órganos afectados constituye una herramienta útil para comprenderla. Por otra parte, estos estudios permiten evaluar nuevas estrategias terapéuticas eficaces y seguras. <sup>(3)</sup> La factibilidad de estos modelos experimentales se basa en la similitud fisiológica e histológica entre el páncreas y los riñones de roedores y humanos. <sup>(4,5)</sup> No obstante, una limitación de estos estudios es que el análisis histopatológico semicuantitativo o histomorfométrico se realiza de manera independiente. <sup>(6-8)</sup> En este sentido, para lograr un análisis más preciso y robusto, resulta necesario aplicar metodologías que integren ambos enfoques.

Teniendo en cuenta los antecedentes planteados, este trabajo tiene como objetivo diseñar una herramienta metodológica basada en la aplicación conjunta de métodos semicuantitativos e histomorfométricos para la evaluación histopatológica de los cambios en el páncreas y los riñones de ratas diabéticas.

## Métodos

### **Diseño experimental**

El trabajo se desarrolló con dos grupos experimentales de 8 ratas cada uno (Sprague-Dawley machos): un grupo diabético y un grupo sano. En el primero, la diabetes se indujo mediante la administración intraperitoneal de aloxano (120 mg/kg), disuelto en cloruro de sodio al 0,9 %, mientras que el grupo control sano solo recibió dicho vehículo por la misma vía. Transcurridas 72 h, a todos los animales se les extrajo sangre por el plexo retroorbitario y se cuantificó la concentración de glucosa. Los animales del grupo diabético cuyos valores de glucosa se encontraban dentro del rango del grupo control sano se excluyeron del estudio.

Los animales de ambos grupos se mantuvieron en sus jaulas bajo la observación del médico veterinario durante 15 días. Al término de este tiempo, se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de tiopental sódico (30 mg/kg de peso), y se procedió a la extracción de las muestras de páncreas y riñones para el estudio histopatológico.

### **Procesamiento histológico**

Para la evaluación histopatológica, el páncreas se procesó de forma íntegra y los riñones en secciones sagitales a través del hilio. Las muestras se fijaron en formaldehído neutro al 4 %, se deshidrataron en etanol a concentraciones ascendentes (70-100 %), se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina. Seguidamente, se realizaron cortes de 3  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótomo de rotación Sakura y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). Además, se preparó una lámina de páncreas por animal con la tinción especial de aldehído fuchsino de Gomori (AFG) para identificar las células  $\beta$  en los islotes de Langerhans (IL).<sup>(9)</sup>

Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico Zeiss Primo Star. Las micrografías para los análisis histomorfométricos se obtuvieron a una magnificación de 64 $\times$  utilizando una cámara Canon 1000 D acoplada al microscopio.

Para las mediciones se utilizó el programa de morfometría computarizada Image J versión 1.39U.<sup>(10)</sup>

## **Estudio histopatológico del páncreas**

### **Método semicuantitativo**

El puntaje de insulitis se determinó en las secciones de páncreas teñidas con HE, al analizar la sumatoria del puntaje morfológico (0 para IL de forma redondeada y 1 para IL alargados o amorfos) y el puntaje de infiltración inflamatoria [escala de 0-3, en donde 0- sin infiltración, 1- infiltración periinsular, 2- infiltración intrainsular leve (de 1-5 leucocitos por IL), 3- infiltración intrainsular severa (más de 5 leucocitos por IL)] en diez IL por animal.<sup>(11)</sup>

### **Método histomorfométrico**

El área total de los IL y la densidad de células  $\beta$  se cuantificaron en secciones de páncreas teñidas con AFG a partir de micrografías de 10 IL.

- Área de los islotes de Langerhans

Se midió el área total bordeando el contorno de los IL, mediante el uso de la herramienta polígono del programa de morfometría utilizado.

- Densidad de células  $\beta$

Se contaron las células  $\beta$  (teñidas de violeta intenso) y se dividió el número de células entre el área del IL.

## **Estudio histopatológico de los riñones**

### **Método semicuantitativo**

En secciones de riñón teñidas con HE, se determinaron los puntajes de daño a nivel glomerular, tubular e intersticial, tras evaluar cinco campos escogidos al azar de la zona cortical, incluyendo ambos polos y la región media del riñón.

- Daño glomerular

Se empleó una escala de 0-2, según la cual: 0- normal; 1- presencia de adherencias del ovilleo glomerular a la cápsula de Bowman, infiltración inflamatoria intra- y periglomerular leve y/o aumento del mesangio (matriz y/o número de células); 2- retracción del ovilleo glomerular con aumento del espacio de Bowman y/o engrosamiento de la membrana basal glomerular.

- Daño tubular

Se usó una escala (0-4) para evaluar el grado de degeneración del epitelio, donde: 0- normal; 1- vacuolización, picnosis nuclear y/o detritus en la luz tubular; 2- desaparición de núcleos y/o denudación de la membrana basal tubular; 3- descamación celular; 4- adelgazamiento del epitelio tubular.

- Daño intersticial

Se evaluó mediante una escala de 0-3, según la presencia e intensidad del infiltrado inflamatorio, donde: 0- ausencia de células inflamatorias, 1- infiltración inflamatoria leve (de 1-5 leucocitos por campo), 2- infiltración inflamatoria moderada (de 5-20 leucocitos por campo), 3- infiltración inflamatoria severa (más de 20 leucocitos por campo).

### **Método histomorfométrico**

Se calculó el área y el diámetro glomerulares como se describe a continuación:

- Área glomerular

De cada animal se analizaron diez micrografías de glomérulo en las cuales era visible al menos uno de los dos polos (urinario o vascular). Se delineó el contorno de los glomérulos a partir de la capa parietal de la cápsula de Bowman, mediante la herramienta polígono del programa de morfometría utilizado.

- Diámetro glomerular

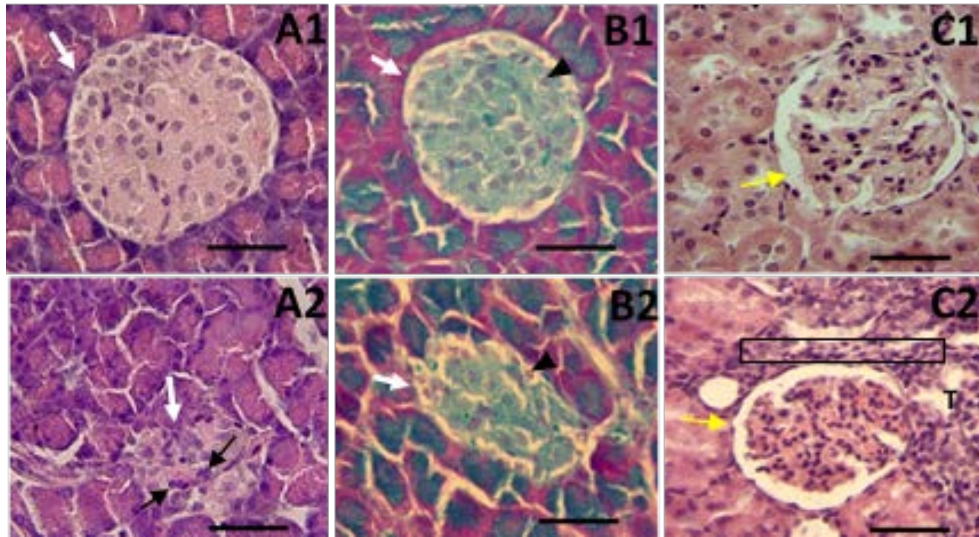
En las micrografías de cinco glomérulos de las diez anteriores, en las que eran visibles ambos polos, se trazó una línea de un polo a otro y se consideró el diámetro glomerular como la distancia más larga perpendicular a dicha línea. <sup>(12)</sup>

## Resultados

En el grupo control sano se observó, en las secciones de páncreas teñidas con HE, predominio de IL redondeados u ovalados, con escasas células inflamatorias alrededor de estos o en su interior, a diferencia de los animales diabéticos, en los que se apreciaron cambios en los IL, caracterizados por su forma alargada o irregular, con infiltración marcada de células inflamatorias (Fig. 1 A1 y A2). La evaluación mediante el método semicuantitativo mostró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) del grado de insulinitis en los animales diabéticos (Tabla 1).

Por otra parte, en los IL de los controles sanos se observaron abundantes células  $\beta$ , identificadas mediante la tinción AFG, por presentar núcleos teñidos de violeta con bordes definidos y forma redondeada, en comparación con los animales diabéticos, donde la población celular fue escasa (Fig. 1 B1, B2). El análisis mediante el método histomorfométrico evidenció una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) del área de los IL y la densidad de células  $\beta$  en el páncreas de las ratas diabéticas (Tabla 1).

En las secciones de riñón de los controles sanos se observó conservación de las estructuras del parénquima renal (Fig. 1 C1). Los riñones de los animales diabéticos presentaron zonas de daño a nivel glomerular, tubular e intersticial. En los glomérulos se observaron adherencias del ovillo glomerular a la cápsula de Bowman, presencia de infiltrado inflamatorio intra y periglomerular discreto, aumento en número de las células mesangiales, retracción del ovillo glomerular con dilatación del espacio de Bowman y, en algunos casos, engrosamiento de la membrana basal glomerular. La degeneración tubular se caracterizó por la pérdida de núcleos y adelgazamiento del epitelio tubular. También se observó un aumento de la infiltración de células inflamatorias en el intersticio localizado entre los túbulos (Fig. 1 C2).



**Fig. 1.** Secciones histológicas del páncreas (A, B) y de los riñones (C) de ratas. 1- Grupo control sano, 2- Grupo diabético. A, C) Tinción de hematoxilina y eosina (HE). B) Tinción de Aldehído-Fuschina de Gomori (AFG). Flechas blancas: islotes de Langerhans, cabezas de flechas: células  $\beta$ , flechas negras: leucocitos, flechas amarillas: glomérulos, rectángulo: leucocitos en el intersticio. Barras: 50  $\mu$ m.

**Tabla 1.** Estudio histopatológico de páncreas de ratas diabéticas y sanas

Grupos experimentales	Método semicuantitativo	Método histomorfométrico	
	Insulitis (gh)	Área de los islotes de Langerhans ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	Densidad de células $\beta$ (células/ $\mu$ m <sup>2</sup> )
Control Sano	1,25 $\pm$ 0,13	10885,00 $\pm$ 756,00	3753,00 $\pm$ 285,20
Diabético	2,54 $\pm$ 0,27***	5643,00 $\pm$ 350,20***	2440,00 $\pm$ 190,50***

gh: grado histopatológico. Datos como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM), \*\*\*p<0,001 (prueba de la U de Mann Whitney).

**Tabla 2.** Estudio histopatológico de riñones de ratas diabéticas y sanas

Grupos experimentales	Método semicuantitativo			Método histomorfométrico	
	Daño glomerular (gh)	Daño tubular (gh)	Daño intersticial (gh)	Diámetro glomerular ( $\mu\text{m}$ )	Área glomerular ( $\mu\text{m}^2$ )
Control Sano	0,23 $\pm$ 0,13	0,83 $\pm$ 0,10	0,23 $\pm$ 0,08	192,5 $\pm$ 6,32	18108 $\pm$ 774,20
Diabético	1,38 $\pm$ 0,13**	2,95 $\pm$ 0,23***	1,21 $\pm$ 0,09***	169,5 $\pm$ 6,26*	15116 $\pm$ 682,90*

gh: grado histopatológico. Datos como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM),

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (prueba de la U de Mann Whitney).

## Discusión

El desarrollo y la progresión de la DM se acompañan de alteraciones histopatológicas en el páncreas y en los riñones. Por tales motivos, la profundización en el conocimiento y la mejor caracterización de esta enfermedad resultan de vital importancia, como etapa necesaria, en la búsqueda de nuevos candidatos farmacológicos (preventivos o terapéuticos) para tratarla. En este sentido, el desarrollo de estudios preclínicos basados en modelos experimentales que simulan o mimetizan la patología resulta imprescindible para el avance de estos conocimientos y su aplicación.

Los daños histopatológicos observados en páncreas y riñones de los animales diabéticos se corresponden con hallazgos previos de otros autores en condiciones experimentales similares; lo que valida los resultados en este modelo.<sup>(6,13-14)</sup> En este sentido, en los animales diabéticos, los IL presentaron un aumento del grado de insulitis, así como una disminución de su área y de la densidad de células  $\beta$ . En el riñón, se observaron lesiones a nivel glomerular y tubular e infiltración intersticial, además de la disminución significativa del diámetro y el área glomerular.

Los resultados de este estudio corroboran la utilidad de los métodos semicuantitativos en secciones de páncreas y riñón teñidas con HE. Sin embargo,

estos métodos dependen de la apreciación del observador, por lo que resulta útil emplear métodos histomorfométricos, que permiten cuantificar las estructuras afectadas y, por consiguiente, complementan el análisis histopatológico. <sup>(15)</sup> Así, con el fin de identificar las células  $\beta$  entre los diferentes tipos celulares propios del IL, se utilizó la tinción especial AFG en secciones de páncreas, lo que permitió calcular la densidad de células  $\beta$  en función del área de los IL.

Estos resultados demuestran que mediante la aplicación de las tinciones HE y AFG, así como de métodos semicuantitativos e histomorfométricos, es posible realizar análisis histopatológicos específicos, objetivos y reproducibles.

## Conclusiones

La aplicación conjunta de métodos semicuantitativos e histomorfométricos permitió caracterizar de manera integral los cambios histopatológicos en el páncreas y los riñones de ratas diabéticas, lo que garantiza, en nuestras condiciones experimentales, el empleo de esta herramienta metodológica en otros modelos similares.

## Referencias bibliograficas

1. Patil SR, Chavan AB, Patel AM, Chavan PD, Bhopale JV. A Review on Diabetes Mellitus, its Types, Pathophysiology, Epidemiology and its Global Burden. J Res App Sci 2023;2:73-9. DOI: <https://doi.org/10.55544/jrasb.2.4.9>
2. Anuario Estadístico de Salud 2023, Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros médicos y Estadísticas de salud. La Habana, 2024. Disponible en: <https://temas.sld.cu/estadisticassalud/publicaciones-2/anuario-estadistico-de-salud/>

3. Khalaf SJ, Aljader GH, Sarhat ER, Sarhat TR, Abass KS. Antidiabetic effect of aqueous extract of *Medicago sativa* with enhanced histopathology of pancreas in alloxan induced diabetic rats. *PJMHS* 2021;15(2):492-6.
4. Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic  $\beta$ -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16:349-62. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>
5. Talukdar A, Basumatary M. Rodent models to study type 1 and type 2 diabetes induced human diabetic nephropathy. *Molecular Biology Reports* 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08621-z>
6. Naik A, Adeyemi SB, Vyas B, Krishnamurthy R. Effect of co-administration of metformin and extracts of *Costus pictus* D. leaves on alloxan-induced diabetes in rats. *J Tradit Complement Med* 2021;12:269-80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.08.007>
7. Sofyanita EN, Yuniarti AR. Effectiveness of white guava leaves (*Psidium guajava* var. *Pyrifera* L.) in repair proximal tubule damage and glomerulus diameter in hyperglycemic mice. *ITEGAM-JETIA* 2023;9(41):41-5. DOI: <https://doi.org/10.5935/jetia.v9i41.863>
8. Metawea MR, Abdelrazek HM, El-Hak HNG, Moghazee MM, Marie OM. Comparative effects of curcumin versus nano-curcumin on histological, immunohistochemical expression, histomorphometric, and biochemical changes to pancreatic beta cells and lipid profile of streptozocin induced diabetes in male Sprague–Dawley rats. *Environ Sci Poll Res* 2023;30(22):62067-79. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26260-6>
9. Gomori GL. Aldehyde-Fuchsin- A new stain for elastic fibers. *Am J Pathol* 1950;20:665-6. DOI: [https://doi.org/10.1093/ajcp/20.7\\_ts.665](https://doi.org/10.1093/ajcp/20.7_ts.665)

10. National Institutes of Health USA. Image J. 1.39U. Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/>
11. Citro A, Valle A, Cantarelli E, Mercalli A, Pellegrini S, Liberati D, Daffonchio L, Kastsiuchenka O, Ruffini PA, Battaglia M, Allegretti M, Piemonti L. CXCR1/2 inhibition blocks and reverses type 1 diabetes in mice. *Diabetes* 2015;64:1329-40. DOI: <https://doi.org/10.2337/db14-0443>
12. Maeda M, Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Taniguchi K, Nishinakagawa H. Renal lesions in spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the nonobese diabetic mouse: acute phase of diabetes. *Vet Pathol* 2003;40:187-5. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.40-2-187>
13. Gamde SM, Ugwah-Oguejiofor CJ, Garba A, Avwioro GO, Moronkeji A, Jimoh AA. Histologic and Biochemical Effect of *Balanite aegyptiaca* Fruit Extract on Alloxan-Induced Diabetes in Wistar Rats. *Ethiopian J Health Sci* 2023;33:441-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ejhs.v33i3.7>
14. Ozor CC, Anioba, FO, Ozoemena CL. Protective Effect of Methanolic Extract of *Vernonia amygdalina* (Bitter-Leaf) on Alloxan-Induced Pancreatic Toxicity in Adult Wistar Rats. *Asian J Res Rep Endocrinol* 2023;6:68-6.
15. Mandarim-de-Lacerda, C. A., Del sol, M. Tips for studies with quantitative morphology (morphometry and stereology). *Int. J. Morphol.*, 2017;35(4):1482-94.

### **Contribución de autoría**

Penélope Daumy Zayas: Conceptualización, Curación de datos, Investigación, Metodología, Análisis formal, Redacción-borrador original.

Sandra Rodríguez Salgueiro: Conceptualización, Curación de datos, Investigación, Análisis formal, Metodología, Supervisión, Redacción-borrador original.

Laura M. Cabrera Hernández: Curación de datos, Investigación.

Ambar Oyarzábal Yera: Conceptualización, Análisis formal, Investigación, Supervisión, Revisión del manuscrito.

Lucía González Núñez: Conceptualización, Curación de datos, Análisis formal, Investigación, Metodología, Supervisión, Redacción-borrador original.

Juan F Infante Bourzac: Conceptualización, Curación de datos, Análisis formal, Investigación, Metodología, Supervisión, Revisión del manuscrito.

Vivian Molina Cuevas: Supervisión, Revisión del manuscrito.