

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS “VICTORIA DE GIRÓN”
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

BENEFICIOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON α -TOCOFEROL
EN RATAS DIABÉTICAS Y SU DESCENDENCIA

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas

Dra. Tammy Fernández Romero

La Habana

2015

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS “VICTORIA DE GIRÓN”
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

BENEFICIOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON α -TOCOFEROL
EN RATAS DIABÉTICAS Y SU DESCENDENCIA

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas

Autora: Dra. Tammy Fernández Romero

Tutora: Dra.C. Sonia Clapés Hernández

La Habana

2015

AGRADECIMIENTOS

A todos los que me han permitido avanzar en el camino al que nos alienta el presidente de la Federación Internacional de diabetes cuando dice

“La diabetes se encuentra a niveles de crisis. No podemos permitirnos retrasar la acción aún más; la miseria y el sufrimiento humanos que causa la diabetes son inaceptables e insostenibles”

Profesor Jean Claude

En especial a Sonia Clapés, mi tutora, por su empeño día a día en mi formación como investigadora y como mejor persona.

Agradecer además a

Gipsis Suárez, Liduvina Rodríguez, Tania Castro, Amaya Blanco, Carlos M. González, Rolando A. Hernández y Estervina Abreu, del departamento de Bioquímica del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón” (ICBP).
Nínive Núñez, Laymit Alonso, Miriam León y María C. Morales, del departamento de Embriología del ICBP.

Giselle Fernández, Irene Rodríguez y Aleida Herrera, del departamento de Histología del ICBP.

Oscar Uriarte, Alfredo Perera, Yelina Gorrita y Nedelia García, residentes que colaboraron durante la realización de sus tesis de especialidad.

Víctor M. Rodríguez, Carlos A. Purón, Alexei Cabrera, Heberto A. Domínguez, Maylín Soca y personal técnico de cirugía experimental del ICBP.

Marta Herrera y Esteban Egaña, del departamento de postgrado del ICBP.

Trabajadores del Bioterio del ICBP.

Tatiana Acosta, María de los Ángeles Rodríguez y otros trabajadores del laboratorio clínico del Centro Nacional de Genética Médica.

Lucía González del Instituto de Nefrología y Sandra Rodríguez del laboratorio de microscopía electrónica del Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

DEDICATORIA

A mis hijas, mi esposo y mi madre,
por concederme el tiempo que dejé de dedicarles,

a mis suegros,
por su apoyo incondicional,

y a mi padre,
por lo que hubiese significado para él este momento

SÍNTESIS

Por la vinculación del estrés oxidativo con la embriopatía diabética varios estudios experimentales han evaluado suplementos antioxidantes sin un beneficio concluyente. En este trabajo se evaluaron efectos de un suplemento de α -tocoferol en complicaciones de la diabetes en ratas preñadas y su descendencia.

Se utilizaron ratas Wistar hembras que se hicieron diabéticas por administración de estreptozotocina intraperitoneal (65 mg/kg). Durante la gestación dos grupos recibieron 150 mg/kg/día de acetato de α -tocoferol y dos el vehículo (NaCl 0,9 %), por sonda esofágica, hasta los días 11,5 o 20 para estudiar las etapas embrionaria y fetal respectivamente. Se emplearon ratas sanas preñadas como controles.

En las ratas diabéticas con α -tocoferol disminuyeron los daños en la corteza renal, las malformaciones, retrasos y pérdidas embrionarias, así como las muertes fetales y las alteraciones de las placentas. Los embriones presentaron menores niveles de proteínas y lípidos oxidados, mientras los fetos y ratas de 20 días de gestación sin camadas alteradas mostraron incremento del antioxidante glutatión reducido en el hígado sin cambios en otros marcadores de estrés oxidativo. No se observó citotoxicidad ni genotoxicidad en la médula ósea de las ratas u otro efecto perjudicial.

Con este trabajo se aporta todo un sistema experimental para estudios de diabetes y preñez en ratas. Se proporcionan evidencias de que los suplementos de α -tocoferol pueden ser útiles para atenuar la embriopatía y la nefropatía en ratas diabéticas y de que estos efectos pudieran deberse a otros mecanismos además de la acción antioxidante de esta vitamina.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
Problema práctico.....	3
Preguntas científicas.....	3
Objetivos.....	4
Diseño general del estudio.....	4
Novedad.....	6
Aporte.....	6
1. MARCO TEÓRICO	8
1.1 Estrés oxidativo y diabetes mellitus.....	10
1.1.1 Especies reactivas del oxígeno y antioxidantes.....	10
1.1.2 Estructura, metabolismo y función de la vitamina E.....	12
1.1.3 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.....	15
1.1.4 Mecanismos del daño tisular inducido por la hiperglicemia.....	18
1.1.4.1 Rutas metabólicas incrementadas por el flujo de metabolitos desde la vía glucolítica.....	19
1.1.4.2 Epigenética y memoria hiperglicémica.....	24
1.2 Estrés oxidativo y efectos de la diabetes materna sobre el producto de la gestación.....	25
1.3 Antecedentes.....	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1 Tipo de investigación.....	35
2.2 Consideraciones éticas.....	35
2.3 Diseño general del estudio.....	36
2.4 Animales y condiciones ambientales.....	37
2.5 Inducción de la diabetes.....	37
2.6 Inducción de la preñez.....	37
2.7 Criterios de exclusión.....	38

2.8 Procedimiento durante la gestación.....	38
2.9 Eutanasia y recogida de muestras.....	39
2.10 Variables analizadas.....	42
2.11 Procesamiento de muestras.....	50
2.12 Control de los sesgos del diseño.....	54
2.13 Control de la calidad del análisis de las variables.....	55
2.14 Procesamiento estadístico.....	55
3. RESULTADOS	56
3.1 Etapa embrionaria.....	57
3.1.1 Ratas madres.....	57
3.1.2 Camadas.....	59
3.2 Etapa fetal.....	64
3.2.1 Ratas madres.....	64
3.2.2 Camadas.....	71
3.2.3 Placentas.....	75
3.3 Resumen de los principales resultados.....	76
4. DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	95
RECOMENDACIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	97
ANEXO	116

ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

AGE: productos finales de glicosilación avanzada

ADNox: ADN oxidado

CVe: grupo control con vehículo

CEe: grupo control con α -tocoferol

DVe: grupo diabéticas con vehículo

DEe grupo diabéticas con α -tocoferol

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

MDA: malonildialdehído

NN: nitratos y nitritos

NAD⁺: nicotinadeninucleótido oxidado

NADPH: nicotinadeninucleótido fosfato reducido

NF- κ B: factor de transcripción nuclear κ B

PKC: proteína quinasa C

PARP-1: poli ADP-ribosa polimerasa 1

PAOP: productos avanzados de oxidación de proteínas

RAGE: receptores para productos finales de glicosilación avanzada (AGE)

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

INTRODUCCIÓN

Al nivel mundial la diabetes mellitus se encuentra entre las 10 primeras causas de discapacidad y por ella mueren cada año 4,6 millones de personas, una muerte cada siete segundos¹. Cuba no escapa de este problema, con un aumento notable del número de enfermos en los últimos años y una tasa de defunciones de 19,8 por cada 100 000 habitantes, manteniéndose entre las primeras causas de mortalidad².

En la mujer diabética, además de las complicaciones comunes a todos los pacientes diabéticos³, se producen alteraciones en la reproducción y la gestación⁴⁻⁷; se ha observado una elevada incidencia de abortos espontáneos, disfunción placentaria, morbimortalidad materna y neonatal, así como de malformaciones congénitas y trastornos metabólicos y cardiovasculares que se manifiestan en la vida postnatal en la descendencia⁴⁻⁷.

Aún no están totalmente esclarecidos los mecanismos de las complicaciones de la gestación vinculadas a la diabetes, pero se sabe que existe una asociación con el ambiente intrauterino pro-oxidante y pro-inflamatorio que se produce como consecuencia de los trastornos metabólicos⁶⁻¹¹. La situación que se genera causa cambios en eventos de señalización cruciales durante determinados períodos del desarrollo prenatal, alteraciones en la expresión de genes relacionados con la morfogénesis y daño estructural del material genético^{6,11}.

Aunque los cuidados pre-concepcionales son la base de un embarazo exitoso¹², en la mujer diabética es difícil lograr un control metabólico estable⁵. Encontrar métodos para prevenir algunos de los daños producidos por la diabetes contribuiría a mejorar

la salud de la madre y su descendencia. Por tal motivo, diferentes modelos experimentales de diabetes y preñez han evaluado los efectos de la administración de antioxidantes, tanto *in vitro*^{13,14} como *in vivo*¹⁵⁻²², observándose disminución de la dismorfogénesis embrionaria y fetal. Sin embargo, no siempre el beneficio de los suplementos antioxidantes es sin riesgos, por lo que se hace necesario continuar investigando sus efectos en la prevención de las complicaciones de la diabetes²³.

Entre los suplementos antioxidantes más evaluados se encuentra el α -tocoferol, que constituye la forma de vitamina E más abundante en el organismo. Su acción antioxidante más reconocida se centra en interferir la reacción en cadena de la peroxidación de los lípidos de membrana²⁴, además de que se ha propuesto como un regulador de la expresión de genes y la señalización celular²⁵.

A pesar de que se han observado beneficiosos con el uso de suplementos de vitamina E en estudios experimentales de diabetes y preñez los resultados no son concluyentes¹⁵⁻²². En algunas investigaciones se han producido alteraciones en embriones de ratas no diabéticas^{19,26} e incremento de las reabsorciones¹⁷. En las investigaciones clínicas se han observado efectos favorables en la reducción del estrés oxidativo²⁷⁻³¹, en la función endotelial³⁰⁻³² y placentaria³³, pero no se ha demostrado un beneficio claro sobre las complicaciones cardiovasculares³⁴⁻³⁸ y el control metabólico de los pacientes²⁷⁻²⁹.

Los efectos negativos de los suplementos de vitamina E pudieran relacionarse con el uso de altas dosis, los tiempos prolongados de los tratamientos, así como con diferencias genéticas que pudieran hacer beneficiosa su utilización en unos individuos y no en otros^{35,39}. Los resultados contradictorios en los estudios de

reproducción se han observado cuando la administración del suplemento se inicia en etapas avanzadas de la gestación⁴⁰, mientras que se han producido beneficiosos cuando se comienza en el periodo peri-concepcional^{41,42}.

Problema práctico

La diabetes materna se asocia con una elevada incidencia de anomalías del desarrollo embrionario, fetal y placentario⁴⁻⁷; el riesgo de malformaciones congénitas se incrementa entre tres y cinco veces⁴³, constituyendo la causa principal de mortalidad perinatal⁴⁴.

En Cuba los defectos congénitos de la morfogénesis, entre los que se incluyen las malformaciones, se encuentran entre las primeras causas de muerte en los primeros años de vida, siendo la primera en menores de un año². Si a esto se suma que la prevalencia de diabetes en mujeres en edad fértil es alta², se puede afirmar que se está en presencia de un importante problema de salud materno-infantil.

Preguntas científicas

- ¿Disminuirán las malformaciones y otros trastornos del desarrollo en embriones y fetos de ratas diabéticas con un suplemento de α -tocoferol?
- ¿La administración de un suplemento de α -tocoferol a ratas diabéticas preñadas tendrá efectos favorables en el desarrollo de la placenta?
- ¿La administración de un suplemento de α -tocoferol a ratas diabéticas preñadas influirá en el estado metabólico y las complicaciones de la diabetes?
- ¿La administración de un suplemento de α -tocoferol tendrá efectos beneficiosos en ratas diabéticas y su descendencia asociados a su función antioxidante?

Objetivos

- 1- Evaluar la influencia de un suplemento de α -tocoferol en el estado metabólico, la estructura del tejido renal y la integridad cromosómica de ratas diabéticas preñadas.
- 2- Evaluar la influencia de la administración de α -tocoferol a ratas diabéticas preñadas en el desarrollo de embriones y fetos.
- 3- Evaluar la influencia de un suplemento de α -tocoferol en el desarrollo de la placenta de ratas diabéticas.
- 4- Evaluar la influencia de un suplemento de α -tocoferol en la capacidad antioxidante y el daño oxidativo a biomoléculas de ratas diabéticas preñadas y su descendencia.

Diseño general del estudio: se realizó una investigación longitudinal prospectiva, explicativa y con diseño experimental. En la misma se reprodujo un modelo de diabetes mellitus tipo 1, mediante la administración intraperitoneal de estreptozotocina (65 mg/kg) a ratas Wistar hembras, fértiles y vírgenes⁴⁵. Cuando las ratas se hicieron diabéticas (glicemia > 11 mM)⁴⁶ fueron apareadas con machos sanos de la misma cepa.

El primer día de la gestación se designó como día 0⁴⁷ y se formaron cuatro grupos de estudio: dos recibieron 150 mg/kg/día de acetato de α -tocoferol y dos el vehículo (NaCl 0,9 %), mediante sonda esofágica y en las primeras horas de la mañana. Esta dosis se escogió ya que en otras investigaciones, entre las que se incluye un estudio

de dosis, ha producido disminución de las reabsorciones y malformaciones en embriones de ratas diabéticas¹⁵⁻¹⁷.

A uno de los grupos de ratas que recibieron el α -tocoferol y a uno de los que recibieron el vehículo se les realizó la eutanasia el día 11,5 de la gestación^{15,48} y a los otros dos grupos el día 20⁴⁷, para estudiar las etapas embrionaria y fetal respectivamente. En el día 11,5 ya se ha producido el cierre del tubo neural en los embriones por lo que pueden identificarse malformaciones relacionadas con esta estructura^{15,48}. El día 20 es uno de los últimos de la gestación en las ratas y la extracción de los cuernos uterinos por cesárea es esencial para analizar variables como reabsorciones y muertes fetales⁴⁷.

Como controles se emplearon ratas sanas preñadas: un grupo con α -tocoferol y otro con vehículo hasta el día 11,5 de la gestación, y otro grupo que no recibió ninguna de estas sustancias hasta el día 20 de la gestación.

En todas las ratas se determinaron variables de química sanguínea, la ganancia de peso durante la gestación y marcadores de estrés oxidativo en sangre y homogeneizado de hígado. En las ratas de 20 días de gestación también se evaluaron variables del hemograma, citogenéticas en médula ósea y de la estructura histológica de la corteza renal. Se analizaron las implantaciones, la estructura de los embriones, fetos y placentas, así como las concentraciones de marcadores de estrés oxidativo en homogeneizado de embriones e hígados fetales.

Novedad

1. Con esta investigación se desarrolla por primera vez en Cuba un sistema experimental para el estudio de ratas diabéticas gestadas y las consecuencias de la diabetes materna sobre la descendencia.
2. Por primera vez se evalúan en una misma investigación los efectos de un suplemento de α -tocoferol en ratas diabéticas preñadas, sus placentas, embriones y fetos, con estudios morfológicos, bioquímicos y citogenéticos.
3. Se propone y justifica una nueva clasificación de los embriones de ratas de 11,5 días de gestación, en normales, malformados y retrasados. La novedad consiste en considerar a los embriones con apariencia normal pero que presentan apertura del neuroporo posterior del tubo neural como un grupo independiente de los embriones normales y malformados, clasificándolos como retrasados.
4. Por primera vez se describen las alteraciones en la corteza renal de ratas Wistar con diabetes inducida por estreptozotocina y preñadas, evidenciadas por microscopía óptica y electrónica de transmisión. También se aportan evidencias del efecto protector de un suplemento de α -tocoferol sobre esta estructura.

Aporte

Esta investigación ha permitido contar con un sistema experimental para estudios de diabetes y preñez en ratas de utilidad para evaluar estrategias encaminadas a mejorar la salud de la madre diabética y su descendencia. Se aportan elementos de las características histológicas de la corteza renal de ratas Wistar con diabetes inducida por estreptozotocina y preñadas que pueden ser empleados para estudios

de la nefropatía diabética en este modelo experimental. Se proporcionan evidencias de que los suplementos de α -tocoferol pueden ser útiles para atenuar la embriopatía y la nefropatía en ratas diabéticas y de que estos efectos pudieran deberse a otros mecanismos además de la acción antioxidante de esta vitamina.

1. MARCO TEÓRICO

1. MARCO TEÓRICO

La diabetes mellitus es un síndrome metabólico complejo, caracterizado por alteraciones en el metabolismo de los glúcidos, lípidos y proteínas, como consecuencia de una deficiencia de la secreción de insulina, de su acción o de ambas⁴⁹. Su origen es multifactorial y entre sus causas se encuentran distintos factores genéticos, ambientales, inmunológicos y virales⁴⁹.

Las formas más comunes de diabetes son las llamadas tipo 1 y tipo 2. En la diabetes tipo 1 se produce la muerte de las células β del páncreas por necrosis secundaria a una respuesta autoinmune, con la consecuente deficiencia en la producción de insulina. La diabetes tipo 2 es la más frecuente (90 % - 95 % de los casos) y se caracteriza por alteraciones de la respuesta a la insulina, aunque la capacidad de secreción de las células β pancreáticas disminuye con el tiempo⁴⁹.

Existen otros tipos de diabetes producidas por defectos genéticos que afectan el funcionamiento de las células β o la acción de la insulina, así como causadas por algunas endocrinopatías, alteraciones del páncreas exocrino, el efecto de algunas drogas, ciertas infecciones virales, defectos autoinmunes y varios síndromes genéticos⁴⁹. Otro grupo corresponde a la diabetes gestacional, que se presenta a partir de la semana 24 de la gestación y afecta del 7 % al 14 % de las embarazadas (dependiendo de la población estudiada y de las pruebas diagnósticas empleadas)⁴⁹.

Las complicaciones a largo plazo de la diabetes incluyen daños en la retina, en los glomérulos renales, en los nervios periféricos, así como enfermedades asociadas con aterosclerosis acelerada, especialmente manifiesta en las arterias que irrigan el

corazón, el cerebro y las extremidades inferiores³. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos se afecta, disminuyendo el desarrollo de circulación colateral cuando se producen isquemias, como las cardíacas, y en las úlceras resistentes de los pies³. En la actualidad la diabetes, a pesar de los tratamientos existentes, constituye un riesgo para la salud de las madres y sus hijos⁵⁰.

1.1 Estrés oxidativo y diabetes mellitus

El estrés oxidativo participa en cualquier tipo de diabetes, tanto en su génesis como en sus complicaciones. En la diabetes tipo 1 las especies reactivas del oxígeno participan en la disfunción de las células β del páncreas iniciada por reacciones autoinmunes y citocinas inflamatorias⁵¹. En la diabetes tipo 2 la hiperglicemia e hiperlipemia crónicas incrementan la producción de especies reactivas del oxígeno, lo cual provoca activación de la apoptosis de las células β pancreáticas, alteración de la síntesis de la insulina⁵² y resistencia periférica a esta hormona⁵³. Las complicaciones de la diabetes son causadas por la exposición prolongada a altos niveles de glucosa, a lo cual contribuyen factores genéticos de susceptibilidad individual y factores aceleradores, como la hipertensión y la dislipidemia³.

1.1.1 Especies reactivas del oxígeno y antioxidantes

Las moléculas derivadas del oxígeno con alto potencial oxidante, conocidas como especies reactivas del oxígeno, pueden ser radicales libres o no. Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón desapareado en su orbital externo, tienen la capacidad de existir de forma independiente y son altamente reactivas. Las especies

no radicálicas son también agentes oxidantes y pueden ser convertidos fácilmente en radicales⁵⁴.

Entre las principales especies reactivas del oxígeno se destacan: el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidroxilo ($\cdot OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico ($NO\cdot$) y los peróxidos orgánicos ($ROOH$)⁵⁴. Estas sustancias tienen importantes funciones, como la activación de neutrófilos durante la inflamación e infección, así como la participación como moléculas señales en procesos celulares de proliferación, diferenciación y apoptosis⁵⁵.

Por otra parte, el organismo dispone de antioxidantes que son sustancias que a bajas concentraciones con relación a un sustrato oxidable disminuyen significativamente o previenen su oxidación⁵⁶. El sistema antioxidante enzimático comprende las enzimas que tienen como sustratos las especies reactivas que se forman en la secuencia de reducciones por las que atraviesa el oxígeno⁵⁷. El sistema antioxidante no enzimático está formado por numerosos compuestos de bajo peso molecular, entre los que se encuentran el glutatión reducido (GSH), las vitaminas E, C y A, la bilirrubina y el ácido úrico⁵⁵.

La familia de las superóxido dismutasas está compuesta por un conjunto de metaloenzimas con amplia distribución en el organismo, que catalizan la dismutación del superóxido formando peróxido de hidrógeno y oxígeno⁵⁷. La enzima catalasa está involucrada en la destrucción del peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo celular⁵⁷. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno o lipoperóxidos utilizando como agente reductor al GSH, el cual es regenerado por acción de la glutatión reductasa⁵⁷.

El GSH constituye el principal antioxidante endógeno no enzimático y en su acción es oxidado (GSSG), por lo que su concentración o la relación GSH/GSSG pueden ser empleadas como marcadores de estrés oxidativo^{58,59}. Además de ser utilizado por la glutatión peroxidasa, el GSH es importante para la recuperación de las vitaminas C y E luego de participar en la eliminación de radicales libres, así como en procesos celulares de diferenciación, proliferación y apoptosis⁶⁰.

Las vitaminas antioxidantes constituyen un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas. Entre ellas se encuentra la vitamina E, que es el antioxidante soluble en lípidos más importante²⁵.

1.1.2 Estructura, metabolismo y función de la vitamina E

El término vitamina E agrupa un conjunto de compuestos que incluye cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Ambos tipos de moléculas están formadas por un anillo cromanol y difieren entre sí por la estructura de su cadena lateral⁶¹. A su vez, existen cuatro formas de tocoferoles y tocotrienoles identificadas como α , β , γ , y δ , que se diferencian entre sí en los sustituyentes de los carbonos cinco y siete del anillo cromanol⁶¹ (Figura 1).

El α -tocoferol es la vitamina E con mayor actividad biológica, ya que el organismo la retiene de manera selectiva; esto hace que la mayoría de las investigaciones se dirijan hacia esta forma y no hacia otras⁶¹. Los mecanismos implicados en la preferencia por el α -tocoferol dependen del destino de las diferentes tipos de vitamina E una vez que llegan al hígado luego de su ingestión con la dieta; el α -

tocoferol es liberado hacia el plasma, mientras que las otras formas son degradadas⁶².

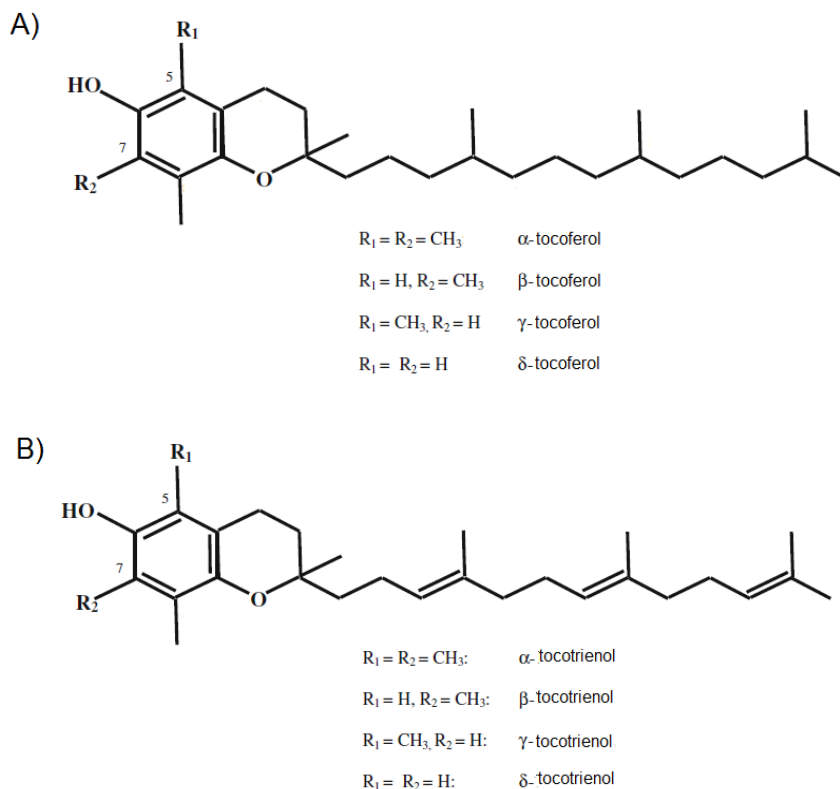


Figura 1. Estructura de los componentes de la familia vitamina E (modificado de: Kono N. 2015)⁶¹.

A) Estructura de los tocoferoles; B) Estructura de los tocotrienoles.

Nótese como los tocoferoles y tocotrienoles tienen el mismo anillo cromanol pero difieren en la estructura de la cadena lateral. Las formas de cada uno de estos compuestos difieren en los sustituyentes de los carbonos 5 y 7, representados como R1 y R2 respectivamente.

La absorción de la vitamina E ingerida con los alimentos ocurre en el intestino delgado y es favorecida por el consumo de grasas. Es liberada de los enterocitos formando parte de los quilomicrones, aunque una pequeña cantidad puede formar parte de lipoproteínas de alta densidad (HDL) pequeñas. Ambos tipos de lipoproteínas viajan por la linfa hacia la circulación sanguínea sistémica. La vitamina E no absorbida por el intestino es eliminada en las heces fecales⁶¹.

Los quilomicrones disminuyen su contenido de triacilgliceroles en los tejidos muscular y adiposo, por acción de la lipasa de lipoproteínas, luego de lo cual son incorporados al hígado por receptores específicos. La proteína transferidora de α -tocoferol se une al α -tocoferol liberado al citoplasma de los hepatocitos y lo re-empaca en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)⁶¹.

Las VLDL en la circulación disminuyen su contenido de triacilgliceroles de forma similar a los quilomicrones, convirtiéndose en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y luego en lipoproteínas de baja densidad (LDL). La endocitosis mediada por receptor de las LDL permite la incorporación del α -tocoferol a los tejidos periféricos, donde queda formando parte de las membranas celulares⁶¹.

Las HDL pequeñas que transportan vitamina E desde los enterocitos pueden incorporarla directamente a los tejidos periféricos o transferirla hacia las VLDL y LDL en el plasma⁶¹.

La vitamina E que no queda unida a la proteína transferidora de α -tocoferol en el hígado (tanto el exceso de α -tocoferol como las otras formas de vitamina E) es excretada en la bilis o sometida a un rápido catabolismo, que implica hidroxilación por el citocromo P450, β -oxidación, conjugación y excreción urinaria. Parte de esta vitamina también es eliminada por la piel⁶¹.

La actividad antioxidante de la vitamina E sobre los lípidos se debe al carácter reductor del grupo hidroxilo ubicado en la posición seis del anillo cromanol⁶³ (Figura 1). Es capaz de reaccionar con un radical peroxilo y reducirlo a hidroperóxido, interrumpiendo así la propagación del proceso oxidativo en las membranas biológicas. El radical que se genera puede combinarse con otro radical peroxilo y

reducirlo, transformándose en un compuesto más estable, por lo que cada molécula de vitamina E puede neutralizar dos moléculas de radical peroxilo⁶³.

El radical α -tocoferoxilo puede ser reducido nuevamente a α -tocoferol por antioxidantes hidrosolubles como la vitamina C y el GSH⁶⁴. Sin embargo, los radicales originados a partir de otras formas de vitamina E son más reactivos y pueden formar productos de adición en posiciones no metiladas del anillo cromanol, que son potencialmente citotóxicos⁶⁴.

En los últimos años se ha propuesto que la vitamina E también puede actuar como un regulador de la expresión de genes y la señalización celular a diferentes niveles²⁵. Se ha observado que estimula la transcripción de genes que codifican proteínas que participan en el control del ciclo celular (ciclina D, ciclina E y p27) y reprime genes cuyos productos están involucrados en la respuesta inflamatoria⁶⁵. Además, es capaz de disminuir la actividad de la proteína quinasa C (PKC), la proliferación del músculo liso vascular⁶⁶ y la expresión del receptor CD36 de LDL oxidadas en los macrófagos⁶⁷, inhibiendo así la formación de la placa de ateroma.

1.1.3 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

Cuando se produce un desequilibrio entre la producción de las especies reactivas del oxígeno y la actividad de los sistemas de defensa antioxidante aparece la condición conocida como estrés oxidativo⁵⁶. Frente a un estrés oxidativo las células o el organismo pueden comenzar por adaptarse a la situación por regulación de los sistemas antioxidantes que poseen. Si esta respuesta no es suficiente se produce el daño a biomoléculas importantes como los lípidos, las proteínas, los glúcidos y el

ADN; en estas condiciones las células pueden recuperarse completamente por reparación o sustitución de las moléculas dañadas, sobrevivir con persistencia del daño oxidativo, o morir por apoptosis o necrosis, especialmente cuando el daño es en el ADN⁵⁶.

El daño oxidativo a los lípidos se produce fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, por un proceso que se conoce como peroxidación lipídica. El proceso progresa por un mecanismo radicalico en cadena, en el cual el daño se propaga de un ácido graso peroxidado a otro vecino⁵⁰. La peroxidación lipídica de las membranas celulares afecta su permeabilidad y puede conducir a la muerte de la célula⁶⁸.

De las reacciones de peroxidación lipídica derivan una gran variedad de productos con efectos citotóxicos, entre los que se encuentran aldehídos, como el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal, hidrocarburos de cadena corta, como el etano y el pentano, y los isoprostanos⁶⁹. Estos compuestos pueden ser empleados como marcadores de daño oxidativo a lípidos por diferentes técnicas^{54,70}.

La oxidación de las proteínas se produce principalmente por acción del radical hidroxilo; como consecuencia se incrementa su catabolismo, se daña su estructura primaria y se producen entrecruzamientos y fragmentaciones, todo lo cual puede interferir con sus funciones biológicas⁵⁴. Otra modificación oxidativa importante es la nitración de residuos de tirosina de proteínas reguladoras, que puede conducir a alteraciones en la transducción de señales y en el funcionamiento celular⁵⁴.

Algunos aminoácidos, como la lisina, la arginina y la prolina, al oxidarse dan lugar a grupos carbonilos que son compuestos estables y se emplean como marcadores de

daño oxidativo a proteínas⁵⁵. Otros marcadores son los productos avanzados de oxidación de proteínas que se forman por la acción de oxidantes clorados, especialmente el ácido hipocloroso y las cloraminas producidas por mieloperoxidasas en neutrófilos activados^{71,72}.

El ADN es muy sensible a la oxidación por el radical hidroxilo, radicales formados durante la peroxidación lipídica y productos no radicálicos pero altamente reactivos como los compuestos carbonílicos^{73,74}. Las alteraciones que se pueden producir comprenden la modificación o pérdida de bases nitrogenadas, el daño a la desoxirribosa y la rotura de bandas. Sus consecuencias incluyen la aparición de mutaciones, la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores tumorales y la formación de uniones cruzadas ADN-ADN o ADN-proteínas⁷⁵.

El ADN mitocondrial es particularmente vulnerable al ataque por especies reactivas del oxígeno, dada su proximidad al sitio de generación de superóxido, la falta de protección por histonas y los escasos mecanismos de reparación que existen en este organelo. Entre las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial se encuentran enzimas de la cadena transportadora de electrones, por lo que las mutaciones pueden conducir a una inadecuada producción de energía y al riesgo de escape de electrones, incrementando el estrés oxidativo original⁵⁵.

Es importante destacar que el daño oxidativo a los lípidos, las proteínas y el ADN está muy interrelacionado⁷⁶. Los productos generados en la oxidación de los lípidos son capaces de reaccionar rápidamente con las proteínas y el ADN, causando alteraciones en sus funciones⁵⁴; las alteraciones en las proteínas que intervienen en

la reparación del ADN contribuyen a la acumulación de daños en el material genético⁷⁷.

1.1.4 Mecanismos del daño tisular inducido por la hiperglicemia

En el paciente diabético la hiperglicemia provoca un incremento mantenido de la concentración y utilización de la glucosa en el interior de las células donde la entrada de este metabolito no depende de la insulina³. Como consecuencia parte de los electrones que llegan a la coenzima Q en la cadena transportadora de electrones son donados uno a uno directamente al oxígeno. Se produce entonces un incremento en la formación de superóxido que no puede ser contrarrestado por los sistemas de defensa antioxidantes y se genera estrés oxidativo³.

En situaciones de estrés oxidativo se inhibe una importante enzima de la vía glucolítica: la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El mecanismo propuesto sugiere que las especies reactivas del oxígeno provocan la rotura de hebras del ADN, lo cual constituye una señal que activa a la enzima poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1). PARP-1 forma polímeros de ADP-ribosa unidos a proteínas, entre las que se encuentra la GAPDH, inhibiendo su actividad. Además, como la ADP-ribosa que utiliza PARP-1 proviene del nicotinadeninucleótido oxidado (NAD^+), el incremento de la actividad de esta enzima disminuye la de otras que utilizan este compuesto, como la GAPDH⁷⁸. La inhibición de la GAPDH conduce a la acumulación de metabolitos de la vía glucolítica que incrementan otras rutas metabólicas (Figura 2), con lo cual se agudiza la situación de estrés oxidativo y se crea un círculo vicioso que perpetúa el daño^{3,79}.

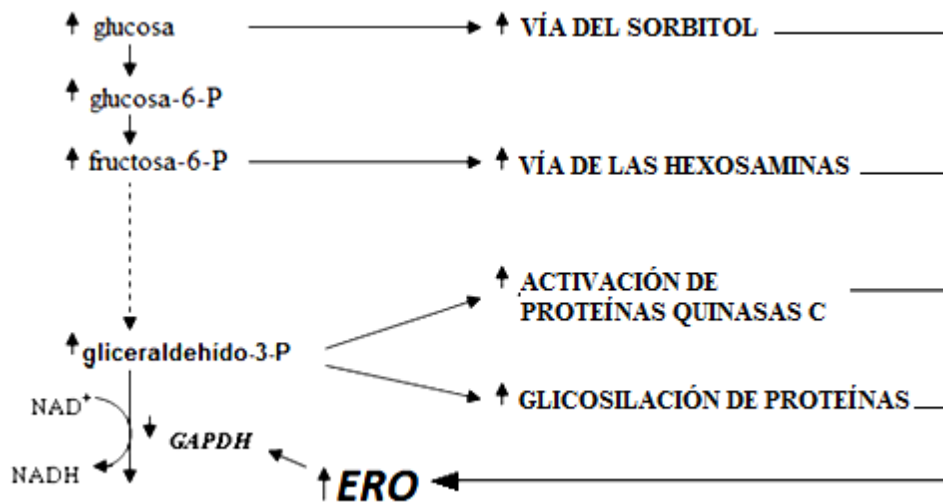


Figura 2. Rutas metabólicas que median el daño tisular en la hiperglicemia (modificado de: Brownlee M. 2005)⁷⁹.

La sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ERO) daña al ADN, con lo cual se estimula la actividad de la enzima poli ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) que utiliza al nicotinadenindinucleótido oxidado (NAD^+) como sustrato. La consecuente disminución de la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) incrementa el flujo de metabolitos desde la vía glucolítica hacia otras rutas que median el daño tisular. La flecha discontinua indica una serie de reacciones hasta la formación del gliceraldehído-3-P.

1.1.4.1 Rutas metabólicas incrementadas por el flujo de metabolitos desde la vía glucolítica

a) Vía del poliol

La vía del poliol se basa en una familia de enzimas aldo-ceto-reductasas que utilizan como sustratos varios compuestos carbonilos y los reducen a sus alcoholes respectivos en presencia de nicotinadenindinucleótido fosfato reducido (NADPH)^{3,79}.

Una de estas enzimas es la aldosa reductasa que reduce la glucosa a sorbitol, el cual es luego oxidado a fructosa por la enzima sorbitol deshidrogenasa, que utiliza al NAD^+ como cofactor^{3,79} (Figura 3). Por tanto, el incremento de la actividad de la aldosa reductasa conduce a una disminución de la disponibilidad de NADPH ,

importante regulador del estado redox de la célula al ser el cofactor de la glutatión reductasa en la regeneración del GSH⁷⁵.

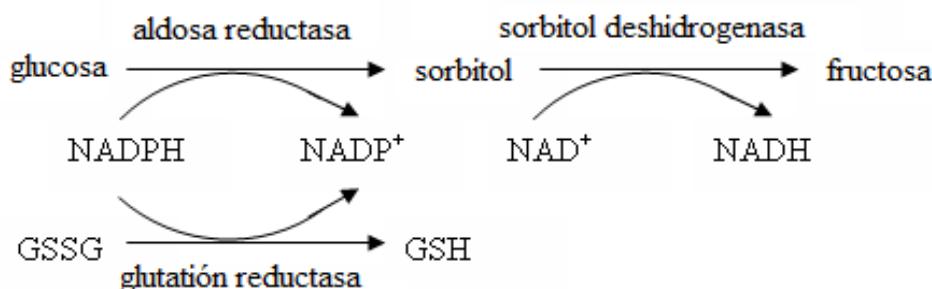


Figura 3. Incremento de la vía del poliol en la hiperglicemia (modificado de: Brownlee M. 2005)⁷⁹.

La hiperglicemia incrementa el flujo a través de la vía del sorbitol y como consecuencia disminuye la disponibilidad del nicotinadeninucleótido fosfato reducido (NADPH) necesario para la regeneración del glutatión reducido (GSH) a partir del glutatión oxidado (GSSG).

La aldosa reductasa se encuentra en los nervios, la retina, el cristalino, los glomérulos y las células vasculares, sitios afectados con frecuencia por la diabetes. En estos lugares la incorporación de glucosa a las células es mediada por transportadores no dependientes de insulina, por lo que el incremento de la glucosa intracelular en situaciones de hiperglicemia estimula la actividad de la enzima⁷⁵.

En las células vasculares de los pacientes diabéticos la glucosa no parece ser el sustrato de la aldosa reductasa, ya que la Km de la enzima para este compuesto es mayor que las concentraciones que se alcanzan en el interior de las células endoteliales; metabolitos intermediarios de la vía glucolítica para los cuales la aldosa reductasa tiene una mayor afinidad, como el gliceraldehído-3-fosfato, parecen ser mejores sustratos³.

b) Formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGE)

La hiperglicemia sostenida incrementa la autooxidación de la glucosa produciendo alfa-oxoaldehídos muy reactivos⁷⁹. Además, estimula la glicosilación no enzimática de proteínas, por la unión de la glucosa o de los productos de su oxidación a grupos amino, formando bases de Schiff; estas luego se reordenan generando los productos tempranos de glicosilación, llamados también productos de Amadori, que posteriormente se transforman en AGE⁷⁹.

La producción de AGE puede dañar a la célula por tres mecanismos generales: 1) alteraciones de la función de proteínas intracelulares modificadas; 2) interacción anormal de componentes de la matriz extracelular modificados con otros componentes y receptores que son expresados en la superficie de las células, con lo cual pueden afectarse vías de señalización celular; 3) unión de proteínas plasmáticas modificadas a receptores para AGE (RAGE) en los macrófagos, las células endoteliales y el músculo liso vascular³.

c) Expresión de RAGE y sus ligandos activadores

Estudios recientes indican que en los pacientes diabéticos los AGE a las concentraciones encontradas en el suero no deben ser los ligandos fundamentales de RAGE. Se han identificado otras proteínas que se incrementan en la hiperglicemia y que activan a RAGE a bajas concentraciones, incluyendo varios miembros del grupo de alta movilidad B1 (HMG B1) y del grupo S100 de unión al calcio. Estos ligandos promueven la inflamación crónica que participa en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes⁸⁰.

La sobreproducción de especies reactivas del oxígeno en la hiperglicemia incrementa la unión de los factores de transcripción NF- κ B (factor de transcripción nuclear κ B) y AP-1 (proteína activadora 1) a los promotores de los genes de RAGE y de ligandos activadores de estos receptores, incrementándose su expresión⁸⁰.

d) Vía de las hexosaminas

Como consecuencia de la inhibición de la glucólisis a nivel de la GAPDH y de la formación de fructosa por la vía del sorbitol, se incrementa la producción de fructosa-6-fosfato que estimula la vía de las hexosaminas³. Esta vía aumenta las concentraciones de glucosamina-6-fosfato que luego es transformada en UDP-N-acetil glucosamina, la cual constituye un sustrato para la glicosilación de proteínas⁸¹. La glucosamina-6-fosfato es también un inhibidor competitivo de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y por tanto del ciclo de las pentosas, lo cual provoca un descenso en la producción de NADPH con las consecuencias ya mencionadas para las defensas antioxidantes⁸² (Figura 4).

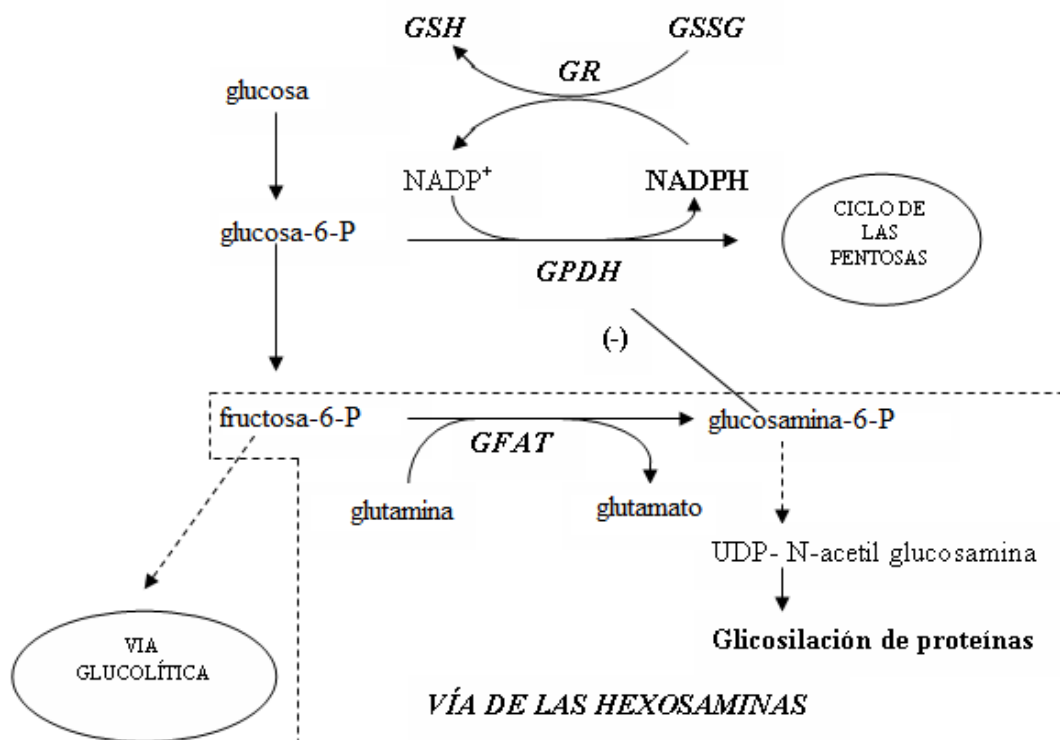


Figura 4. Incremento de la vía de las hexosaminas en la hiperglicemia

(modificado de: Horal M, et al. 2004)⁸².

GFAT: glutamina: fructosa-6-fosfato amido transferasa, GPDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, GR: glutatión reductasa.

e) Activación de isoformas de las PKC dependientes de diacilglicerol

PKC es una familia de serín/treonín-quinasas ampliamente distribuidas en el organismo⁸³. La acumulación de gliceraldehído-3-fosfato incrementa las concentraciones de fosfodihidroxiacetona, favoreciendo la producción de diacilglicerol y la actividad de isoformas de PKC⁸³; existen evidencias que sugieren que esta actividad puede ser incrementada también por la interacción AGE-RAGE⁸³. La actividad incrementada de la PKC influye en la expresión de genes, disminuyendo productos necesarios para el funcionamiento normal e incrementando otros que son

perjudiciales. Entre los productos génicos que se incrementan se encuentran: 1) la tirosín fosfatasa SHP-1 (fosfatasa-1 que contiene dominio SH2), que desencadena una ruta que conduce al aumento de la apoptosis de células vasculares y retinopatía diabética⁸⁴; 2) el TGF- β_1 (factor de crecimiento transformante β_1), la fibronectina y el colágeno tipo IV en células mesangiales glomerulares, que provocan la acumulación de proteínas de la matriz microvascular⁸⁵. La sobreactividad de la PKC disminuye la expresión de la eNOS (óxido nítrico sintetasa endotelial), con la consecuente disminución de la producción de óxido nítrico⁸⁶, e incrementa la del VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular)⁸⁷, todo lo cual afecta el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y la angiogénesis.

1.1.4.2 Epigenética y memoria hiperglicémica

Se ha observado que el daño tisular en la diabetes es progresivo aún después de controlada la glicemia, lo cual se conoce como “memoria hiperglicémica”³. Este fenómeno puede explicarse en parte por cambios epigenéticos persistentes causados por la sobreproducción mitocondrial de superóxido inducida por la hiperglicemia³.

Estudios recientes han mostrado que la exposición transitoria de las células endoteliales vasculares a elevadas concentraciones de glucosa induce cambios en la metilación de los residuos de lisina 4⁸⁸ y 9⁸⁹ de la histona H3 (H3K4 y H3K9 respectivamente). Como consecuencia se producen cambios en la arquitectura de la cromatina que conducen a un incremento de la expresión del gen de la subunidad p65 del NF- κ B y de genes proinflamatorios dependientes de p65. Estos cambios

persisten al menos seis días después de normalizada la concentración de glucosa en cultivos celulares y por meses después de normalizada la glicemia en ratones diabéticos⁸⁸. Los cambios epigenéticos inducidos por la hiperglicemia y el aumento de la expresión de p65 se relacionan con el incremento de la producción mitocondrial de superóxido^{88,89}.

Los efectos epigenéticos de la hiperglicemia y el fenómeno de la memoria hiperglicémica tienen varias implicaciones clínicas: 1) los episodios de hiperglicemia transitoria pudieran ser un factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones, con independencia de los niveles de HbA_{1c} (hemoglobina glicosilada) y 2) si se lograra una cura para la diabetes pudiera no prevenirse el desarrollo de complicaciones asociadas a este síndrome. De aquí la importancia del estricto control metabólico y la necesidad de nuevas terapias que reviertan la memoria hiperglicémica³.

1.2 Estrés oxidativo y efectos de la diabetes materna sobre el producto de la gestación

Las alteraciones en el producto de la gestación de la mujer diabética dependen tanto del tipo de diabetes como del grado de control metabólico antes y durante el embarazo¹². En la diabetes pre-gestacional existe una mayor incidencia de abortos espontáneos, así como de mortalidad perinatal, retrasos del crecimiento y desarrollo y malformaciones congénitas de la descendencia¹². En la diabetes gestacional las principales complicaciones incluyen la macrosomía y el hiperinsulinismo fetal, así como la hipoglicemia, la hipoxia y la acidosis metabólica del recién nacido¹²; no está

asociada a malformaciones congénitas de la descendencia ya que aparece posterior al período de organogénesis⁹⁰.

Las malformaciones congénitas de la descendencia de madres con diabetes pre-gestacional constituyen un síndrome conocido como “embriopatía diabética”⁹¹. Aunque no parecen existir malformaciones específicas, las más frecuentes y severas incluyen: 1) defectos de cierre del tubo neural (anencefalia, encefalocele, meningomieloceles, holoprosencefalia y espina bífida); 2) alteraciones del sistema cardiovascular, en especial la transposición de grandes vasos y los defectos septales; 3) alteraciones de la región cráneo-facial, como la microsomía hemifacial, la microtia y el paladar hendido; 4) alteraciones de las estructuras caudales, como la disgenesia caudal¹².

Se sabe que la inducción de malformaciones congénitas se produce durante el período embrionario, pero en la embarazada diabética no se conocen bien los mecanismos. Al parecer existe una interacción entre factores genéticos que predisponen a los embriones a padecer estas alteraciones y teratógenos ambientales relacionados con la diabetes materna⁹⁰⁻⁹². La hiperglicemia parece ser el estímulo más importante, favoreciendo la producción de radicales libres, así como otras condiciones adversas para el desarrollo embrionario y fetal^{12,90-92}.

En condiciones normales la gestación es un estado caracterizado por un incremento estrictamente regulado de los procesos oxidativos en la madre y en el producto de la concepción⁹³. Con el establecimiento de la circulación útero-placentaria el embrión se expone a altas concentraciones de oxígeno de forma aguda y comienza a incrementar gradualmente sus defensas antioxidantes⁹³.

El estado redox regula importantes factores de transcripción que influyen en vías de señalización involucradas en procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis⁹³. La generación de especies reactivas del oxígeno es esencial para la formación del blastocisto, la diferenciación neuronal y la formación de los dedos. Sin embargo, su producción en exceso tiene efectos negativos sobre el embrión, el feto y la placenta, potencialmente capaces de afectar el curso de la morfogénesis y el mantenimiento del embarazo, como ocurre en la diabetes materna⁹³.

El embrión, el feto y la placenta presentan una elevada expresión de transportadores de glucosa, con lo cual queda garantizado que sus concentraciones intracelulares estén en equilibrio con las concentraciones séricas maternas⁹⁴. Como el embrión se desarrolla en un ambiente relativamente hipóxico, sólo un pequeño porcentaje de la glucosa es metabolizado oxidativamente y se generan pequeñas cantidades de anión superóxido⁹⁵. Sin embargo, en roedores se ha demostrado que la entrada de un exceso de glucosa a los tejidos embrionarios durante la organogénesis incrementa la producción de superóxido por las mitocondrias¹⁴, que no puede ser contrarrestado por los sistemas de defensa antioxidante aún inmaduros⁹⁶.

En la descendencia de ratas diabéticas se ha observado disminución del contenido de antioxidantes, como el GSH^{45,97,98}, el α -tocoferol y el ácido ascórbico⁹⁹, así como incremento del daño oxidativo a los lípidos y las proteínas^{20,21}. También se han encontrado alteraciones en la expresión y actividad de enzimas antioxidantes^{97,99,100}, disminución de la actividad de la GAPDH¹⁰¹, incremento de la vía de las hexosaminas⁸² y cambios en la actividad de las PKC^{8,14}. Estas evidencias sugieren

mecanismos comunes en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes, en los cuales está implicado el estrés oxidativo.

En los efectos de la diabetes materna sobre la descendencia se han vinculado otras vías importantes. En embriones de rata cultivados en presencia de altas concentraciones de glucosa se ha observado una disminución de la captación de inositol, cuya adición a los medios de cultivo⁸ o a la dieta de ratas diabéticas preñadas¹⁰² disminuye las malformaciones.

En embriones de ratas diabéticas se ha comprobado una disminución de la concentración de ácido araquidónico y un bloqueo de la dismorfogénesis al adicionar este compuesto⁹. También se ha observado disminución de la prostaglandina E2 (PGE2) e incremento de la 8-iso-prostaglandina F2 (8-iso-PGF2), ambas derivadas del ácido araquidónico pero por vías metabólicas diferentes^{9,103}. La PGE2 protege a los embriones de los daños en condiciones de hiperglicemia⁹, mientras que la 8-iso-PGF2 tiene efectos perjudiciales¹⁰³. La disminución de la formación de PGE2 puede ser producida por alteraciones en la actividad y expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) en condiciones de estrés oxidativo^{9,20}.

Estudios recientes han evidenciado profundas alteraciones en la expresión y actividad de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) a nivel embrionario, fetal y placentario, tanto en modelos experimentales de diabetes como en placentas a término de gestantes diabéticas¹⁰. Los PPAR son factores de transcripción de la superfamilia de receptores nucleares activados por ligandos, de los cuales existen tres isoformas: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ ¹⁰⁴. Estos receptores son claves en la regulación del metabolismo lipídico y de los procesos antioxidantes

y antiinflamatorios durante el desarrollo¹⁰⁴. Sus alteraciones se han vinculado con una alta incidencia de reabsorciones, defectos de cierre del tubo neural, problemas en la placentación, sobreproducción de óxido nítrico y peroxinitrito, sobreactivación de metaloproteasas de la matriz extracelular y daño tisular¹⁰.

Las vías expuestas generan un entorno intrauterino pro-oxidante y pro-inflamatorio⁷ que produce cambios en eventos de señalización, modificaciones en la expresión de genes y daños en el material genético, mecanismos que se han implicado en las alteraciones del desarrollo asociadas a la diabetes materna^{6,11}.

Otras investigaciones resaltan la influencia de las perturbaciones en períodos críticos del desarrollo en la aparición de alteraciones a lo largo de la vida, con consecuencias irreversibles, lo que se conoce como “programación”¹⁰⁵. La diabetes materna es uno de los factores de programación más importantes, pudiendo inducir tolerancia alterada a la glucosa, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares en la descendencia^{90,106}.

Cada vez existen más evidencias de la influencia de los cambios epigenéticos en el fenómeno de programación^{7,105,106}, ya que un ambiente intrauterino adverso puede modificar la expresión de genes en células pluripotenciales y totalmente diferenciadas; los efectos a largo plazo en la descendencia dependen del momento del desarrollo en el que se produzcan las alteraciones¹⁰⁵.

1.3 Antecedentes

En la prevención de los defectos del desarrollo asociados a la diabetes materna las conductas actuales no incluyen propuestas de intervención diferentes a las que se aplican para todas las gestantes; el consumo de ácido fólico es muy utilizado, unido al adecuado y riguroso control glicémico. Existen consultas de riesgo pre-concepcional, pero aún son pocas las mujeres diabéticas que utilizan ese servicio¹⁰⁷. Esta es también la situación de Cuba pues, aunque en los últimos años se ha producido un incremento progresivo, menos del 50 % de las pacientes diabéticas asisten a las consultas de riesgo reproductivo pre-concepcional¹⁰⁸. Lo anterior pudiera ser un factor que contribuya a que los defectos congénitos de la morfogénesis se encuentren entre las primeras causas de mortalidad en los primeros años de vida^{2,108}.

A pesar de que la base para la prevención de las complicaciones de la diabetes es el estricto control metabólico, se hace necesario evaluar nuevas estrategias. Limitar la producción excesiva de radicales libres durante la hiperglicemia y contrarrestar sus efectos dañinos pudieran complementar las terapias convencionales diseñadas para normalizar los niveles de glucosa en sangre^{90,109}.

Los hallazgos en modelos experimentales pudieran conducir al desarrollo de nuevos métodos para mantener el medio intrauterino metabólicamente normal, previniendo los efectos perjudiciales de la diabetes materna sobre la descendencia¹¹⁰. Estos modelos son muy utilizados cuando los estudios están dirigidos a investigaciones que no pueden ser realizadas en humanos desde el punto de vista ético, o no existen métodos alternativos que no impliquen la vida de los animales¹¹¹. Se recomienda el

uso de roedores, debido a que se requiere un bajo número de animales por su multiparidad, gestaciones de corta duración, placentación hemocorial como la humana y fácil mantenimiento¹¹¹.

La administración de antioxidantes, como superóxido dismutasa^{13,112}, N-acetilcisteína^{13,113}, éster de GSH⁴⁵, vitamina E y vitamina C⁹⁹, ha disminuido las alteraciones del desarrollo de embriones de ratas cultivados frente a altas concentraciones de glucosa. Resultados similares se han obtenido en embriones de ratas diabéticas que han recibido suplementos de ergotionina¹¹⁴, N-acetilcisteína¹¹⁵ y vitamina E, sola^{15-19,116-120} o combinada con vitamina C²¹ y ácido fólico^{20,22}. Sin embargo, a pesar de los resultados favorables no siempre el beneficio es concluyente, por lo que se sugiere continuar las investigaciones en este campo²³.

Entre los suplementos antioxidantes más empleados se encuentra la vitamina E en forma de α -tocoferol. Se sabe que durante la gestación existe una especial demanda de esta vitamina, debido al aumento de la síntesis de membranas celulares y el rápido crecimiento fetal¹²¹. Se ha reportado que su administración a la madre incrementa las concentraciones en sangre de cordón²⁶ y en el hígado de fetos de ratas¹²². Sin embargo, a pesar de los beneficios obtenidos con su empleo en estudios experimentales de embriopatía diabética¹⁵⁻²², algunas evidencias muestran efectos negativos con el uso de altas dosis^{17,19,26} y en las investigaciones clínicas sobre complicaciones de la diabetes también existen resultados contradictorios²⁷⁻³⁸.

Por otra parte, la mayoría de los estudios en los que se han empleado suplementos de vitamina E u otro antioxidante en modelos experimentales de diabetes y preñez se centran en el desarrollo embrionario y son pocos los que analizan la etapa fetal y los

efectos sobre la madre. En ninguno de los diseños se ha evaluado de conjunto a la madre, la placenta y la descendencia, tanto en la etapa embrionaria como fetal del desarrollo prenatal, con estudios morfológicos, bioquímicos y citogenéticos. Además, en las investigaciones con suplementos de vitamina E existen pocas evidencias de su efecto sobre la placenta^{123,124} y el riñón de ratas diabéticas preñadas^{125,126}.

Para obtener modelos experimentales de diabetes en ratas es muy utilizada la inducción química. Los procedimientos quirúrgicos (pancreatectomía parcial) tienen una alta mortalidad y requieren de un personal con gran experiencia, y los modelos genéticos son muy costosos¹¹¹.

El agente químico más utilizado para inducir diabetes en ratas es la estreptozotocina (2-desoxi-2(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos). Esta sustancia tiene efectos citotóxicos por la alquilación y ruptura de bandas del ADN¹²⁷, con estimulación de la enzima poli ADP ribosa polimerasa 1 y disminución intracelular de NAD^+ y ATP ¹²⁸; a este mecanismo contribuye el incremento de la producción de radicales libres¹²⁹. La fracción nitrosourea media la citotoxicidad y la fracción desoxiglucosa facilita la incorporación a las células mediante transportadores GLUT 2. Como las células β del páncreas expresan altos niveles de GLUT 2 y presentan un contenido bajo de NAD^+ , la estreptozotocina tiene efectos tóxicos relativamente selectivos sobre estas células¹²⁹, permitiendo obtener modelos experimentales de diabetes tipo 1¹¹¹.

La administración de estreptozotocina a ratas adultas tiene características que pudieran ser inconvenientes en dependencia del tipo de investigación. Por lo general conduce a una diabetes severa con niveles de glicemia superiores a los encontrados en los pacientes diabéticos y no están presentes los componentes autoinmune y

genético en su origen. Además, su administración previa a la gestación hace difícil lograr animales preñados¹¹¹. Sin embargo, es un modelo fácil de obtener, que permite estudiar el efecto de las alteraciones metabólicas de la diabetes, así como los mecanismos de las complicaciones más comunes en la gestación; por ejemplo, es recomendado para el estudio de malformaciones congénitas^{4,5,43,111}, por lo cual fue seleccionado para realizar el presente trabajo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de investigación: longitudinal prospectiva, explicativa y con diseño experimental.

2.2 Consideraciones éticas: los animales fueron obtenidos del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) de Cuba. El proyecto fue aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón”, así como por la Dirección de Ciencia y Técnica del Ministerio de Salud Pública y el Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

Los animales fueron tratados acorde con preceptos éticos establecidos¹³⁰. De forma general, se trabajó con la menor cantidad de ratas que garantizara el cumplimiento de las exigencias de este tipo de estudio. Las personas que participaron en su manipulación están plenamente capacitadas para ello y poseen una vasta experiencia en el trabajo con animales de laboratorio. Se utilizó material estéril y todos los procedimientos se realizaron de manera que se garantizara el menor sufrimiento para el animal. El método de eutanasia por desangrado bajo anestesia general empleado es un procedimiento que da como resultado una rápida inconsciencia, seguida de paro cardio-respiratorio y pérdida del funcionamiento del cerebro, lo que supone mínimo dolor y sufrimiento para el animal.

2.3 Diseño general del estudio: en la Figura 5 se muestran los pasos generales del diseño experimental. Por su factibilidad se realizó primero el estudio de la etapa fetal del desarrollo y luego de la embrionaria, abarcando en cada caso todas las épocas del año.

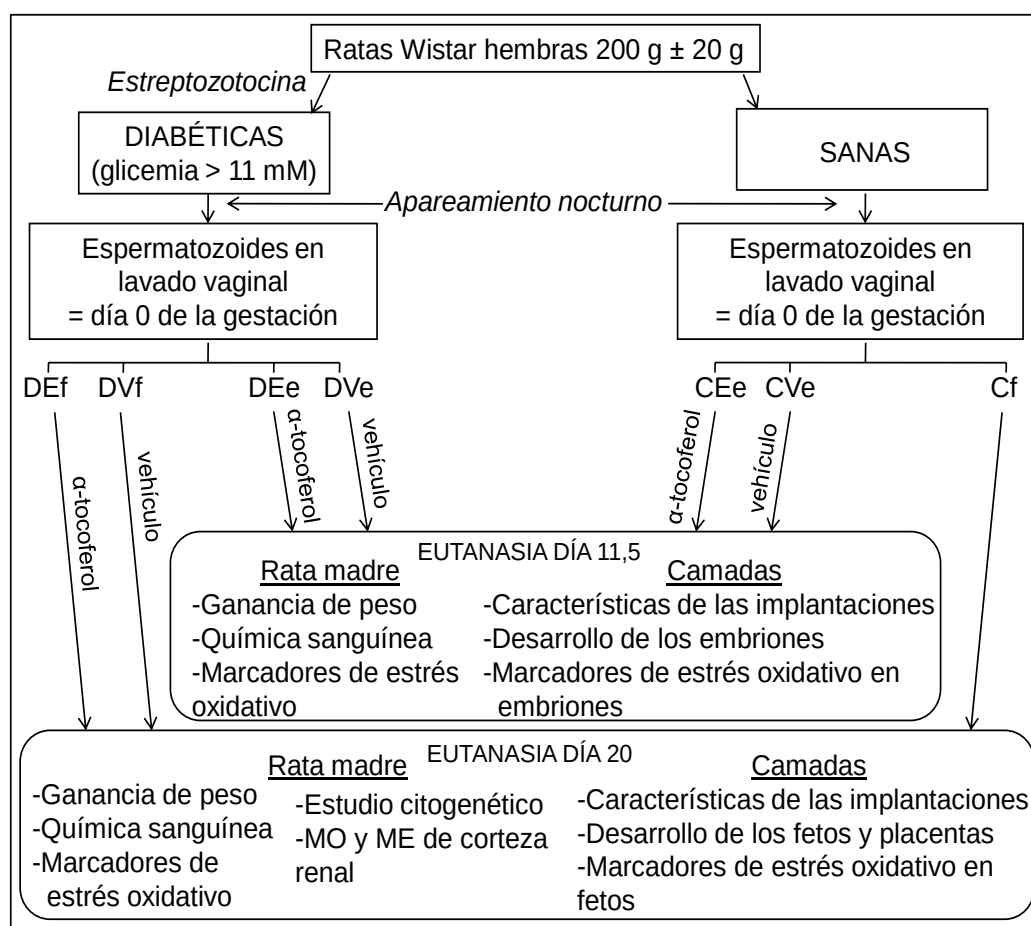


Figura 5. Diseño general del estudio

DVe: diabéticas con vehículo de etapa embrionaria; DEe: diabéticas con α -tocoferol de etapa embrionaria; CVe: controles con vehículo de etapa embrionaria; CEe: controles con α -tocoferol de etapa embrionaria; DVf: diabéticas con vehículo de etapa fetal; DEe: diabéticas con α -tocoferol de etapa fetal; Cf: controles de etapa fetal; MO: microscopía óptica; ME: microscopía electrónica de transmisión.

2.4 Animales y condiciones ambientales

Se emplearon ratas Wistar hembras, fértiles y vírgenes, con peso inicial de 200 g $\pm$ 20 g, y machos sanos fértiles de la misma cepa. Los animales se mantuvieron en cajas independientes, con ciclos constantes de luz y oscuridad, temperatura de 20 °C - 24 °C, libre acceso a agua corriente y alimentación con pienso granulado a libre demanda⁴⁶ (pienso habitual producido y suministrado por el CENPALAB).

2.5 Inducción de la diabetes

Después de una semana de adaptación al medio⁴⁶, a un grupo de ratas hembras se les aplicó una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (Applichem) 65 mg/kg en 200 μ L de *buffer* citrato de sodio 0,1 M pH 4,7⁴⁵. A los siete días se diagnosticó la diabetes en sangre extraída de la cola (glucómetro Bayer), por niveles de glicemia superiores a 11 mM⁴⁶.

2.6 Inducción de la preñez

Las ratas diabéticas y ratas sanas empleadas como controles fueron apareadas durante la noche con machos sanos de la misma cepa, en las fases pro-estro y estro del ciclo estral⁴⁷. Durante los días de apareamiento, las ratas diabéticas que presentaron niveles de glicemia superiores a 500 mg/dl (28 mM) recibieron insulina lenta (Insulard HM) por vía subcutánea 2 UI – 4 UI por día para evitar una hiperglicemia que interfiriera con la fertilidad¹⁵. La mañana en que se confirmó la cópula por la presencia de espermatozoides en el lavado vaginal se consideró el día 0 de la gestación⁴⁷.

2.7 Criterios de exclusión

- a) Ratas que no se preñaron a los 21 días de iniciado el apareamiento. Este criterio respondió al hecho de que a partir de la segunda semana de instaurada la diabetes en las ratas comienza a disminuir la fertilidad de forma irreversible¹³¹.
- b) Ratas que no presentaron sacos gestacionales el día de la eutanasia.

2.8 Procedimiento durante la gestación

El día 0 de la gestación se suspendió el tratamiento con insulina en las ratas diabéticas que lo requirieron¹⁵ y se formaron los grupos de estudio (Tabla 1). En la etapa fetal se empleó un grupo control de ratas sanas a las cuales no se les administró ningún preparado, pero en la etapa embrionaria se decidió utilizar un grupo control con α -tocoferol y otro con vehículo para evaluar el efecto de estos procedimientos sobre los animales.

La vitamina E empleada es un preparado granulado de acetato de α -tocoferol al 50% con óxido de silicio (Empresa de medicamentos sólidos de la industria química farmacéutica MEDSOL), que se administró en dosis única diaria de 150 mg/kg. Esta dosis se escogió ya que en otras investigaciones, entre las que se incluye un estudio de dosis, ha producido disminución de las reabsorciones y malformaciones en embriones de ratas diabéticas¹⁵⁻¹⁷. Como vehículo se utilizó 1 ml de NaCl 0,9 %. El α -tocoferol y el vehículo se administraron por vía oral mediante sonda esofágica¹⁵.

A todas las ratas se les determinó la glicemia en sangre de la cola (glucómetro Bayer) y el peso (balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01 g) los días cero, seis, 11 y 20 de la gestación, según el grupo de estudio.

Tabla 1. Características generales de los grupos de ratas preñadas diabéticas y controles para estudio de las etapas embrionaria y fetal del desarrollo

Etapas de la gestación analizada	Grupos	Estado de salud de las ratas	Preparado administrado	Día de la eutanasia	# Ratas incluidas
Embrionaria	DVe	diabéticas	vehículo	11,5	15
	DEe	diabéticas	α -tocoferol	11,5	15
	CVe	sanas	vehículo	11,5	15
	CEe	sanas	α -tocoferol	11,5	15
Fetal	DVf	diabéticas	vehículo	20	20
	DEf	diabéticas	α -tocoferol	20	20
	Cf	sanas	-	20	10

DVe: diabéticas con vehículo de etapa embrionaria; DEe: diabéticas con α -tocoferol de etapa embrionaria; CVe: controles con vehículo de etapa embrionaria; CEe: controles con α -tocoferol de etapa embrionaria; DVf: diabéticas con vehículo de etapa fetal; DEe: diabéticas con α -tocoferol de etapa fetal; Cf: controles de etapa fetal.

2.9 Eutanasia y recogida de muestras

La eutanasia se realizó por desangrado (punción de la vena cava inferior) bajo anestesia¹³² (tiopental sódico 50 mg/kg intraperitoneal) el día 11,5 de la gestación en los grupos para el estudio de la etapa embrionaria^{15,48} y el día 20 en los grupos para el estudio de la etapa fetal⁴⁷. En el día 11,5 ya se ha producido el cierre total del tubo neural en los embriones y pueden identificarse malformaciones relacionadas con esta estructura^{15,48}. El día 20 corresponde con los días finales de la gestación en los animales utilizados y la extracción de los cuernos uterinos por cesárea es esencial para analizar variables como reabsorciones y muertes fetales⁴⁷.

La sangre de las ratas madres se colectó en tubos de centrifuga con EDTA (ácido etilendiamíntetracético) al 5,6 % 1 mg/ml, para realizar determinaciones bioquímicas¹⁵. De todas las ratas madres se almacenó un fragmento de hígado a -80 °C (500 mg) para determinaciones bioquímicas.

De las ratas madres de la etapa fetal se extrajo también médula ósea del fémur derecho para estudio citogenético, mediante lavado del canal medular con 1 ml de suero fetal bovino inactivado (1 h a 57 °C) aplicado con una jeringuilla¹³³. El riñón derecho se seccionó mediante un corte sagital a través del hilo y un fragmento de la corteza se fijó en formol neutro al 10 % (en *buffer* NaH_2PO_4 0,03 M- Na_2HPO_4 0,05 M pH 7) para su análisis por microscopía óptica; otro fragmento se colocó en un frasco con glutaraldehído al 2,5 % y tetróxido de osmio al 2 % en *buffer* fosfato 50 mM pH 7,2 - 7,4 para su estudio por microscopía electrónica de transmisión¹³⁴.

En cada rata madre se realizó la disección de los cuernos uterinos que se colocaron en una placa Petri (100 mm) a temperatura ambiente. Con ayuda de tijeras, pinzas y bajo estereoscopio (JP Selecta), se eliminó el tejido periuterino, la pared del útero se abrió en toda su longitud y se retiraron cuidadosamente todas las membranas. Cada embrión o feto con su placenta se colocó de forma independiente en una placa Petri con NaCl 0,9 % para su estudio morfológico inmediato^{15,47} (Figura 6).

Se tomaron cuatro embriones normales y cuatro malformados por cada rata de etapa embrionaria, así como los hígados de dos fetos normales y dos malformados por cada rata de etapa fetal (los embriones y fetos malformados se tomaron cuando aparecieron en la camada); estas muestras fueron almacenadas a -80 °C en tubos

eppendorf independientes hasta su procesamiento para determinaciones bioquímicas.

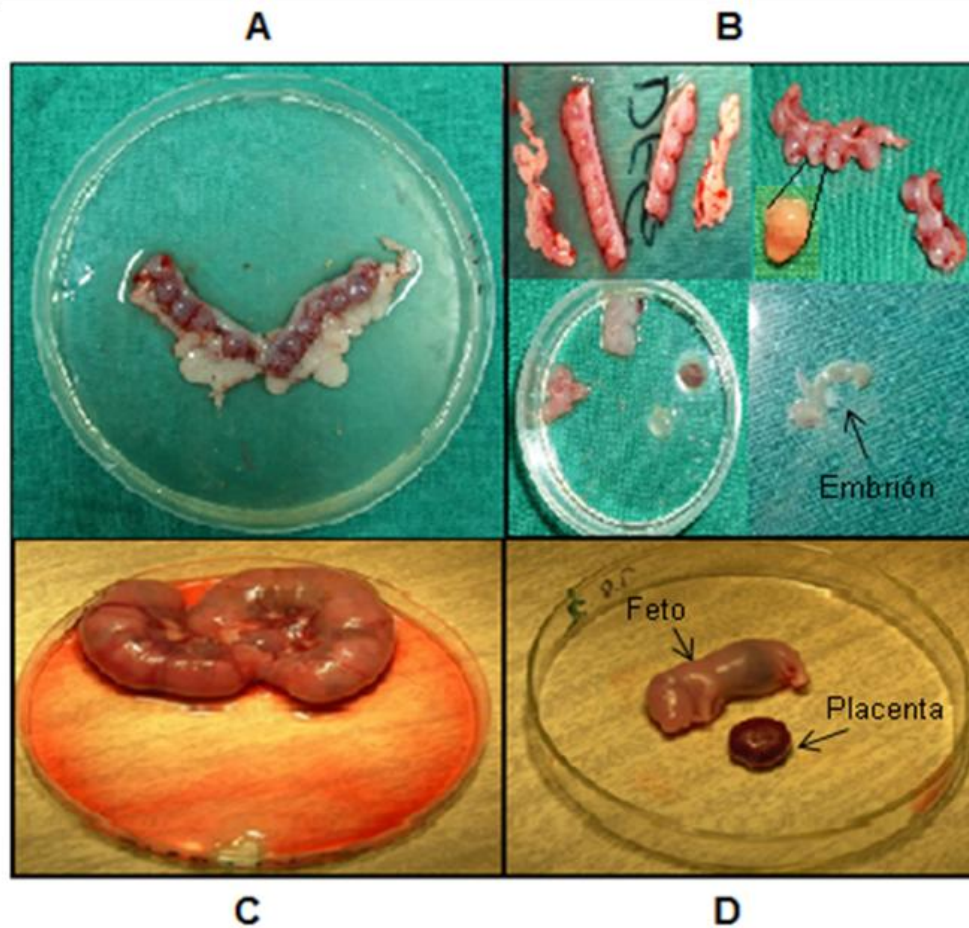


Figura 6. Imágenes obtenidas durante el proceso de extracción de embriones, fetos y placentas de ratas

A: cuernos uterinos a los 11,5 días de gestación; B: diferentes pasos de la disección hasta la obtención del embrión; C: cuernos uterinos a los 20 días de gestación; D: feto de 20 días con su placenta. Fotos tomadas con cámara digital (Canon).

2.10 Variables analizadas

Objetivo 1

Evaluar el efecto de un suplemento de α -tocoferol sobre el estado metabólico, la estructura del tejido renal y la integridad cromosómica de ratas diabéticas preñadas.

a) Variables analizadas en todas las ratas madres

1. Ganancia de peso durante la gestación (g): diferencia entre el peso inicial (día 0 de la gestación) y el peso final (día de la eutanasia), mediante balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01 g.
2. Indicadores de estado metabólico en plasma (mediante juegos comerciales HELFA Diagnósticos, QUIMEFA Epb. Carlos J. Finlay): glicemia (mM), colesterol (mM), triacilgliceroles (mM), proteínas totales (g/l), albúmina (g/l), creatinina (μ M), ácido úrico (μ M).

b) Otras variables analizadas en las ratas madres de la etapa fetal

1. Hemograma (mediante analizador hematológico Sysmex KX-21N, La Roche): hemoglobina (g/l), hematocrito y leucocitos ($\times 10^9$ /l).
 2. Citogenéticas en médula ósea: se realizó el ensayo de micronúcleos^{133,135} en 10 muestras de cada grupo de ratas diabéticas (DVf y DEf) y cinco del grupo control (Cf).
- Índice de citotoxicidad: eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos, en un total de 200 eritrocitos¹³³.

- Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados: se calcula el índice de genotoxicidad como eritrocitos policromáticos micronucleados/2000 eritrocitos policromáticos, y el resultado se expresa en porcentaje^{133,135}.
3. Estructura de la corteza renal: de cada grupo se escogieron cinco ratas para el análisis por microscopía óptica y tres de estas para el estudio por microscopía electrónica de transmisión.
- Análisis cualitativo por microscopía óptica: volumen glomerular, características del mesangio, capilares glomerulares, podocitos, paredes arteriolares, capilares peritubulares, luz de los túbulos renales y aspecto de sus células epiteliales.
 - Análisis cuantitativo por microscopía óptica
 - Volumen corpuscular (μm^3): se determinó el área de los corpúsculos renales cortados transversalmente (60-100 por rata), delineando el contorno de cada uno con ayuda del programa morfométrico Image J¹³⁶ (Figura 7), y se aplicó la fórmula de Weibel y Gómez¹³⁷ $V = \text{Area}^{1,5} \times 1,38/1,01$ (1,38: coeficiente de forma; 1,01: coeficiente de distribución de talla).
 - Daño tubular: se evaluaron los túbulos proximales cortados transversalmente (aproximadamente 40 túbulos por rata). Se determinó el daño tubular teniendo en cuenta la presencia de: dilatación tubular, vacuolización intracitoplasmática, atrofia celular (presencia de núcleos apoptóticos, denudación de la membrana basal y descamación celular en la luz tubular), así como engrosamiento de las membranas basales. Se consideró cero la ausencia de alteraciones y uno la presencia de alguna de ellas.

- Análisis cualitativo por microscopía electrónica de transmisión: características de la membrana basal glomerular (grosor y estructura trilaminar), de los podocitos (citoesqueleto, organelos y prolongaciones) y de los túbulos contorneados proximales (células epiteliales y ribete en cepillo).

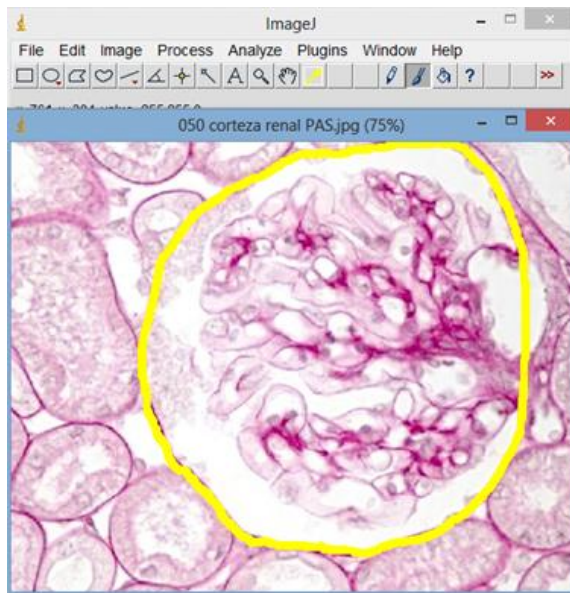


Figura 7. Pantalla del programa Image J mostrando la delineación del área de un corpúsculo renal de rata. Tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) y aumento 400 X

Objetivo 2

Evaluar el efecto de la administración de α -tocoferol a ratas diabéticas preñadas sobre el desarrollo de embriones y fetos.

a) Variables analizadas en las camadas de la etapa embrionaria

El estudio general de la camada y el análisis de los embriones se realizaron por observación bajo estereoscopio (JP Selecta) a 20 x y 40 x, y microscopio óptico (Partec) a 100 X (en la Figura 8 se muestran algunas imágenes obtenidas durante el análisis de las variables).

1. Estudio general de la camada

- Número de implantaciones: total de sacos gestacionales⁴⁸.
- Número de reabsorciones: total de sacos gestacionales sin embrión⁴⁸ o con un tejido desorganizado en su interior.
- Número de embriones⁴⁸.

2. Estudio de los embriones

- Talla (mm): longitud coronilla-rabadilla⁴⁸, colocando al embrión sobre un papel milimetrado.
- Número de somitas: indicador de diferenciación⁴⁸.
- Clasificación
 - Normal: se observa el tubo neural cerrado, las vesículas cerebrales, ópticas y óticas, los esbozos de las extremidades anteriores y el embrión totalmente plegado^{15,48} (Figura 8 C). Este día corresponde con inicios de la semana cinco del desarrollo en humanos⁹².
 - Retrasado: embrión de aspecto normal pero con apertura del poro posterior del tubo neural. Este criterio se basó en que el poro posterior del tubo neural se cierra poco tiempo después que el anterior, por lo que su apertura en este momento puede representar un retraso del desarrollo y no una malformación⁴⁸.
 - Malformado: embrión que no cumplió con la morfología esperada para este momento del desarrollo^{15,48}.
- Contenido de proteínas¹³⁸ y ADN¹³⁹ en homogeneizado de embriones.

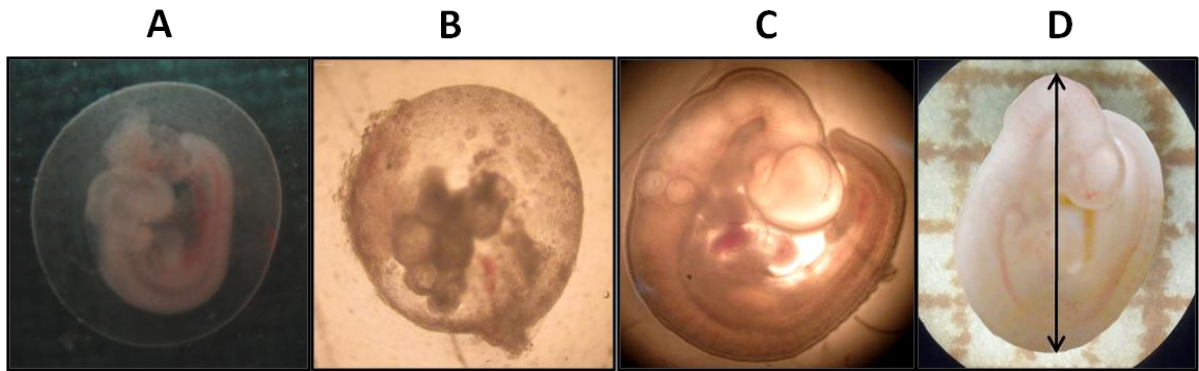


Figura 8. Imágenes obtenidas durante el análisis de las implantaciones de ratas de 11,5 días de gestación

A: embrión dentro del amnios; B: reabsorción; C: embrión normal; D: técnica de medición de la longitud coronilla-rabadilla del embrión.

Fotos tomadas con cámara digital (Canon), en B y C acoplada a microscopio óptico (Partec) a 100 x y en D acoplada a estereoscopio (JP Selecta) a 40 x.

b) Variables analizadas en las camadas de la etapa fetal

El estudio general de la camada y el análisis de los fetos se realizaron mediante inspección a simple vista y bajo estereoscopio (JP Selecta) a 20 x (en la Figura 9 se muestran algunas imágenes obtenidas durante el análisis de las variables).

1. Estudio general de la camada

- Número de implantaciones: total de sacos gestacionales⁴⁷.
- Número de reabsorciones: total de sacos gestacionales sin feto o con un tejido desorganizado en su interior⁴⁷.
- Número de fetos vivos: total de fetos con movimientos espontáneos o ante estímulos táctiles⁴⁷.
- Número de fetos muertos: total de fetos sin movimientos espontáneos o ante estímulos táctiles⁴⁷.

2. Estudio de los fetos vivos

- Peso (g)⁴⁷, mediante balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01 g.
- Talla (mm): longitud coronilla-extremo de la cola, colocando al animal extendido sobre un papel milimetrado¹⁴⁰.
- Diámetro craneano anteroposterior (DAP) (mm): longitud desde la cresta supranasal hasta el borde superior del agujero occipital, medida con un pie de rey¹⁴⁰.
- Diámetro biparietal (DBP) (mm): longitud entre los bordes superiores de las orejas, medida con un pie de rey¹⁴⁰.
- Distancia entre los ángulos externos de los ojos (DO) (mm): longitud entre los ángulos externos de los ojos, medida con un pie de rey.
- Distancia poro nasal-pabellón auricular (mm): longitud desde el poro nasal hasta el borde superior de la oreja derecha (DPP-d) e izquierda (DPP-i), medidas con un pie de rey.
- Clasificación: se determinó si la morfología coincidía con la esperada en esta fase del desarrollo⁴⁷, en cuyo caso se clasificaron como normales. Los fetos que no cumplieron con la morfología esperada se consideraron malformados.

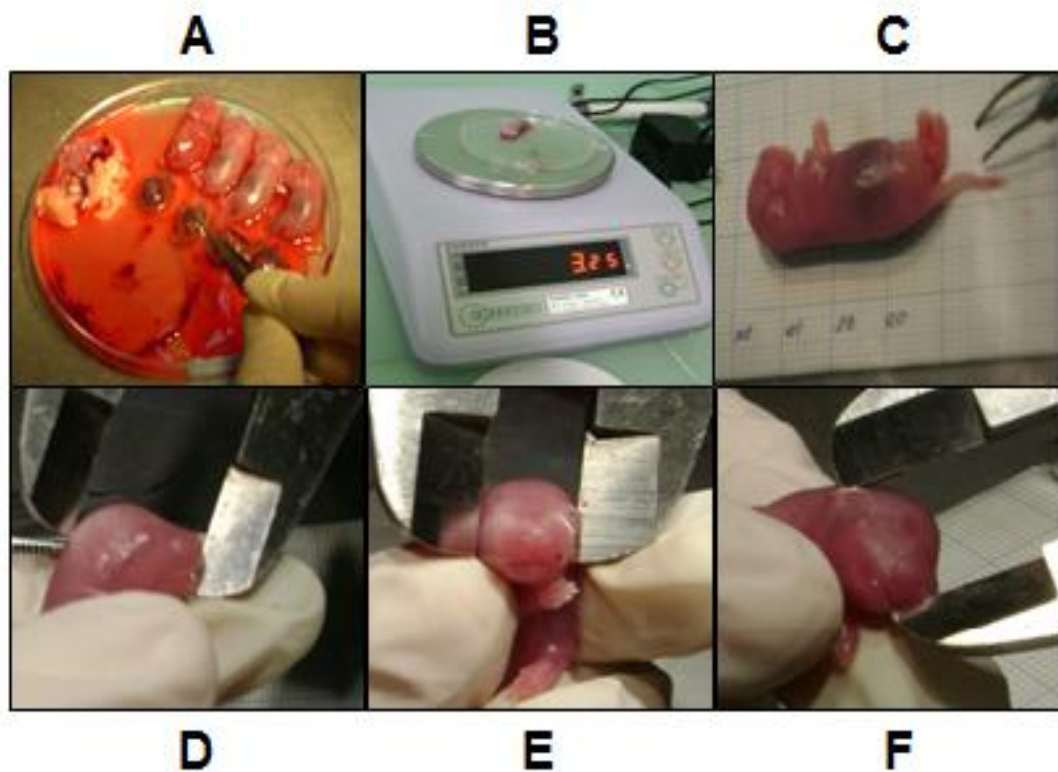


Figura 9. Imágenes obtenidas durante el análisis de los fetos de ratas de 20 días de gestación

A: apariencia de fetos vivos y muertos (primer feto a la izquierda); B: medición del peso; C: medición de la talla; D-F mediciones cráneo-faciales. Fotos tomadas con cámara digital (Canon).

Objetivo 3

Analizar el efecto de un suplemento de α -tocoferol sobre el desarrollo de la placenta de ratas diabéticas.

Variables analizadas en las placentas¹⁴¹

1. Peso (g), mediante balanza digital Gibertini con sensibilidad 0,01 g.
2. Índice peso placenta/peso fetal (g).

Objetivo 4

Evaluar el efecto de un suplemento de α -tocoferol sobre la capacidad antioxidante y el daño oxidativo a biomoléculas de ratas diabéticas preñadas y su descendencia.

Variables analizadas

1. Concentración de marcadores de estrés oxidativo en las ratas madres: los marcadores analizados y las muestras empleadas se resumen en la Tabla 2. En las ratas de etapa embrionaria se utilizaron linfocitos aislados, ya que estas células pueden reflejar daños que se producen a nivel sistémico¹⁴², por lo que son útiles para determinar algunos marcadores de estrés oxidativo de importancia intracelular; el procedimiento se pudo realizar en esta etapa por la disponibilidad de reactivos.
2. Concentración de marcadores de estrés oxidativo en embriones y fetos: MDA (malonildialdehído), PAOP (productos avanzados de oxidación de proteínas) y GSH (glutación reducido) en homogeneizados de embriones e hígados fetales.

Tabla 2. Marcadores de estrés oxidativo analizados en muestras obtenidas el día de la eutanasia de ratas preñadas diabéticas y controles

Marcador de estrés oxidativo	Muestras de ratas de la etapa embrionaria	Muestras de ratas de la etapa fetal
MDA (malonildialdehído)	linfocitos	plasma e hígado
PAOP (productos avanzados de oxidación de proteínas)	plasma	plasma e hígado
GSH (glutación reducido)	linfocitos	plasma e hígado
NN (nitratos y nitritos)	plasma	-
ADNox (ADN oxidado)	hígado	-

En las ratas de la etapa embrionaria se pudo determinar las concentraciones de nitratos y nitritos (NN) y el daño oxidativo al ADN (ADNox) por la disponibilidad de reactivos, a diferencia de la etapa fetal. El ADNox se determinó en hígado teniendo en cuenta que el volumen de ADN necesario no pudo ser obtenido de los linfocitos aislados.

2.11 Procesamiento de muestras

- *Obtención de plasma de las ratas madres*: la sangre se centrifugó (centrífuga Eppendorf) a 3000 rpm por 15 min a temperatura de 4 °C. El plasma se almacenó en alícuotas en tubos eppendorf a -20 °C con 5 µl/ml del antioxidante BHT (butilato de hidroxitolueno AppliChem 200 mM en etanol absoluto) para evitar la oxidación de los compuestos durante el periodo de almacenamiento.

- *Aislamiento de linfocitos de sangre de las ratas madres*¹⁴³: en un tubo de centrífuga con 1 ml de Histopaque-1077 (SIGMA) se agregaron 2 ml de sangre total, de forma lenta para evitar la mezcla de ambos líquidos. Se centrifugó (centrífuga Eppendorf) a 1200 rpm por 30 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se pasó a otro tubo de centrífuga. Se repitió la centrifugación por 20 min, se desechó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 1,5 ml de *buffer* Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 0,1 M con EDTA 0,1 mM pH 7,8 y fue almacenado a -80 °C en tubos eppendorf hasta su procesamiento.

- *Médula ósea de ratas madres para el ensayo de micronúcleos*: los micronúcleos se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular. Reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por errores en la replicación y posterior división del ADN. Pueden representar fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros¹³³.

El ensayo de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea se basa en que los eritroblastos expulsan el núcleo al transformarse en eritrocitos policromáticos, por lo que si se formaron micronúcleos estos permanecen en el citoplasma y pueden ser observados mediante un microscopio óptico¹³³.

En el procedimiento se centrifugaron las muestras frescas de médula ósea (centrífuga Eppendorf) a 1000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 1 ml de suero fetal bovino inactivado (1 h a 57 °C). Por cada caso se prepararon dos frotis que se secaron al aire por 24 h¹³⁵. La fijación y tinción de las estructuras celulares se realizó durante 1,5 min con May-Greunwald al 0,1 % en metanol y por 15 min con Giemsa al 5 % en agua corriente¹³³. El análisis se realizó con un microscopio óptico (Partec) a 1000 X¹³⁵.

-Corteza renal de ratas madres para estudio por microscopía óptica: el fragmento de la corteza renal ya fijado se incluyó en parafina y se realizaron cortes de 3 µm - 4 µm de grosor, que se tiñeron con hematoxilina-eosina para el análisis cualitativo y ácido periódico de Schiff (PAS) para el análisis cuantitativo¹³⁷. El estudio se realizó con microscopio óptico Olympus BH2 a 100 x y 400 x e imágenes tomadas con microscopio digital Nikon Coolscope.

-Corteza renal de ratas madres para estudio por microscopía electrónica de transmisión: el fragmento de la corteza renal ya fijado se deshidrató con acetona a diferentes concentraciones (desde 10 % hasta 100 %) y se incluyó en bloques de resina Spurr¹³⁴. Se realizaron cortes semifinos de 1 µm de grosor (con ultramicrotomo Leica Ultracut R), que se tiñeron con azul de Stevenel¹⁴⁴ para la localización de los glomérulos. Otros cortes finos de 50 nm - 60 nm de grosor (con cuchillas de vidrio) se montaron en rejillas de cobre con un solo orificio con membrana de soporte de colodión y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. El análisis se realizó con microscopio JEOL 1010, JEOL, Peabody, MA con cámara digital acoplada.

- *Homogeneizado de hígado de ratas madres y fetos*: la muestra de hígado se descongeló y homogeneizó, con el recipiente de homogeneización introducido en hielo (100 mg/600 µl de *buffer* Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 0,1 M con EDTA 0,1 mM pH 7,8)¹¹², mediante homogeneizador eléctrico (HEIDOLPH) a 3000 rpm por 1,5 min. Con este procedimiento se garantizó la ruptura de más del 90 % de las células, confirmado por visualización de un frotis en un microscopio de campo invertido (Carl Zeiss). El homogeneizado se centrifugó (centrífuga Eppendorf) a 4 °C y 4 400 rpm durante 20 min y el sobrenadante se almacenó a -80 °C en tubos eppendorf hasta su procesamiento para determinaciones bioquímicas.

-*Homogeneizado de embriones*: se trabajo con mezclas de homogeneizados de embriones^{22,113}, teniendo en cuenta el volumen de muestra necesario para realizar las determinaciones. Por cada grupo de ratas diabéticas (DVe y DEe) se prepararon cuatro muestras de homogeneizado de cinco embriones cada una, quedando de la siguiente forma:

- 1- Embriones malformados
- 2- Embriones retrasados
- 3- Embriones normales de camadas con malformados o retrasados
- 4- Embriones normales de camadas sin malformados ni retrasados

De cada grupo control (CVe y CEe) se preparó una muestra de cinco embriones normales.

Para realizar los homogeneizados los embriones se descongelaron colocando los tubos eppendorf en hielo. El tejido se disgregó en 500 µl/embrión de *buffer* Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 0,1 M con EDTA 0,1 mM pH 7,8, con ayuda de pipetas y puntas

eppendorf¹¹², y se colocaron los tubos en baño de ultrasonido con agua helada por cinco segundos^{112,145} (40 kHz, 150 W).

Para las determinaciones bioquímicas se mezclaron los homogeneizados correspondientes a cada muestra y se prepararon alícuotas que se almacenaron a temperatura de -80 °C en tubos eppendorf hasta su procesamiento.

-Extracción de ADN de homogeneizado de hígado y embriones: se aplicaron los principios del método de Bunce¹³⁹. De forma resumida, por cada 1 ml de homogeneizado se agregaron 135 µl de NaCl 6 M y 400 µl de *buffer* Tris-HCl 1 M pH 8,2 con EDTA 0,5 M pH 8,0 y SDS (dodecil-sulfato de sodio) al 10 %, para provocar la lisis de las membranas celulares. Se añadieron 300 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 para precipitar las proteínas y se centrifugó (centrífuga Eppendorf) a 3000 rpm por 15 min. Al sobrenadante se le agregó etanol absoluto para precipitar el ADN, el cual fue lavado en dos ocasiones con etanol al 70 % antes de secar y re-suspender con Tris-HCl 50 mM pH 8,2. Las muestras se almacenaron a -80 °C en tubos eppendorf hasta su procesamiento.

-Determinación de marcadores de estrés oxidativo: mediante técnicas espectrofotométricas (espectrofotómetro PG Instruments T60U)

- MDA (malonildialdehído), como indicador de daño oxidativo a lípidos: se determinó por un método⁷⁰ basado en la reacción de dos moléculas de N-metil-2-fenil indol con una molécula de MDA, a 45 °C en medio ácido. Como producto se obtiene un cromóforo estable que absorbe a 586 nm. La curva patrón se construye utilizando tetrametoxipropano.

- PAOP (productos avanzados de oxidación de proteínas), como indicador de daño oxidativo a proteínas: se determinó mediante una técnica⁷² en la que se sigue la transformación de los iones yoduro del yoduro de potasio a yodo diatómico a 340 nm en condiciones ácidas. La concentración se expresa como equivalentes de cloramina T (patrón).
- GSH (glutatión reducido), como indicador de capacidad antioxidante: se determinó por el método de Beutler⁵⁹, en el cual el GSH reacciona con el colorante 5,5 ditiobis-2-ácido nitrobenzoico y se genera un compuesto coloreado que absorbe a 412 nm. La concentración se calcula por medio de una curva patrón de GSH.
- NN: se cuantificó a 540 nm la concentración de nitratos convertidos en nitritos por acción de la enzima nitrato reductasa¹⁴⁶.
- ADNox: se cuantificó el MDA generado como consecuencia de la oxidación de la 2-desoxirribosa. Este producto reacciona a 90 °C con el ácido tiobarbitúrico formando un producto de adición cromogénico con un máximo de absorbancia a 532 nm¹⁴⁷.

2.12 Control de los sesgos del diseño: se aplicó un muestreo aleatorio simple para la selección de las ratas que formaron cada grupo, así como de las que se escogieron para el estudio histológico de la corteza renal y el citogenético de la médula ósea. De igual forma se procedió para la selección de los embriones y fetos que se emplearon para las determinaciones bioquímicas.

2.13 Control de la calidad del análisis de las variables: todas las determinaciones bioquímicas se realizaron por duplicado. El análisis de las láminas del estudio citogenético de la médula ósea se efectuó por dos observadores y se promediaron los resultados. El estudio general de las camadas, el análisis morfológico de los embriones, fetos vivos y placentas, así como el examen histológico de la corteza renal se efectuó por personal entrenado.

2.14 Procesamiento estadístico: los datos obtenidos de las determinaciones bioquímicas de los embriones se analizaron mediante estadística descriptiva, teniendo en cuenta el pequeño número de muestras. El resto de los resultados se procesaron mediante estadística inferencial, con pruebas no paramétricas para la comparación entre los grupos ya que las variables no siguieron una distribución normal en el análisis con la prueba Kolmogorov Smirnov.

El análisis del resto de las variables se realizó mediante el programa GRAPH PAD PRISM 5.0. Para las comparaciones entre los grupos se emplearon las pruebas Kruskal-Wallis, comparaciones múltiples de Dunn y la prueba de porcentajes de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas con valores de p menores que 0,05.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Etapa embrionaria

3.1.1 Ratas madres

Las ratas diabéticas de 11,5 días de gestación, con y sin suplemento de α -tocoferol, presentaron una ganancia de peso inferior y niveles de glicemia superiores a los controles, con diferencias significativas. Las ratas diabéticas sin suplemento también mostraron niveles de creatinina en plasma significativamente superiores al resto de los grupos (Tabla 3). Otras variables de química sanguínea no mostraron diferencias significativas entre los grupos del estudio (Anexo).

Tabla 3. Ganancia de peso y variables de química sanguínea alteradas de ratas de 11,5 días de gestación

Grupos	Ganancia de peso (gramos)	Glicemia (mM)	Creatinina (μM)
CVe	45,0	7,0	41,0
CEe	44,0	6,1	41,0
DVe	29,0 *	25,5 *	53,0 *
DEe	37,0 *	22,3 *	47,0 ‡

Se muestra el valor de la mediana de las variables ya que no siguieron una distribución normal.

CVe: control con vehículo; CEe: control con α -tocoferol; DVe: diabéticas con vehículo; DEe: diabéticas con α -tocoferol.

* $p < 0,05$ contra los controles ‡ $p < 0,05$ contra DVe (pruebas Kruskal-Wallis y Dunn).

Todas las ratas diabéticas de esta etapa, con independencia de si recibieron o no el suplemento de α -tocoferol, presentaron implantaciones con alguna alteración, ya sea reabsorciones, embriones malformados o embriones retrasados. Sin embargo, el 27

% de las ratas diabéticas con el suplemento (4/15) no presentó embriones malformados ni retrasados y sus reabsorciones fueron similares a las observadas en los controles ($p < 0,05$). En el grupo de ratas diabéticas sin el suplemento también hubo animales que no presentaron embriones alterados (5/15), pero sus reabsorciones fueron significativamente superiores a las del resto de los grupos ($p < 0,05$); incluso en tres de estas ratas todas las implantaciones se reabsorbieron, lo cual no ocurrió en ninguno de los casos del grupo suplementado.

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de marcadores de estrés oxidativo entre los grupos de ratas de esta etapa (Tabla 4).

Tabla 4. Marcadores de estrés oxidativo de ratas de 11,5 días de gestación

Grupos	Plasma		Linfocitos		Hígado
	PAOP (μM)	NN (μM)	MDA (nM)	GSH (mM)	ADNox (nmol MDA/mg AND)
CVe	0,72	185,0	7,8	0,11	8,8
CEe	0,54	158,4	6,4	0,09	9,7
DVe	0,58	206,6	10,3	0,11	7,1
DEe	0,52	160,9	7,5	0,09	5,8

Se presenta el valor de la mediana de las variables ya que no siguieron una distribución normal.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos al comparar estos marcadores. CVe: control con vehículo; CEe: control con α -tocoferol; DVe: diabética con vehículo; DEe: diabética con α -tocoferol. PAOP: productos avanzados de oxidación de proteínas; NN: nitratos y nitritos; MDA: malonildialdehído; GSH: glutatión reducido; ADNox: ADN oxidado.

3.1.2 Camadas

En el grupo de ratas diabéticas que no recibieron el α -tocoferol se observó un incremento significativo de las reabsorciones, de los embriones malformados, así como de los embriones con retraso del desarrollo, al comparar con los controles (Tabla 5). En las ratas diabéticas que recibieron el suplemento las reabsorciones disminuyeron significativamente con respecto al grupo no suplementado, siendo similares a las encontradas en los controles. Aunque los porcentajes de embriones malformados y retrasados fueron significativamente mayores que en los controles, también se redujeron significativamente con respecto al grupo no suplementado (Tabla 5).

Tabla 5. Características generales de las camadas de ratas estudiadas en la etapa embrionaria

Grupos	Implantaciones n (promedio por rata)	Reabsorciones n (%)	Embriones n (%)	Embriones retrasados n (%)	Embriones malformados n (%)
CVe	178 (12)	37 (20,8)	141 (79,2)	7 (3,9)	1 (0,6)
CEe	162 (11)	32 (19,8)	130 (80,2)	3 (1,9)	1 (0,6)
DVe	159 (11)	71 (44,7) *	88 (55,3) *	37 (23,3) *	15 (9,4) *
DEe	167 (11)	33 (19,8) ‡	134 (80,2) ‡	18 (10,8) * ‡	9 (5,4) * ‡
Total	666	173	493	65	26

Los porcentajes (%) fueron calculados con respecto al número de implantaciones del grupo. Grupos de ratas de 11,5 días de gestación: CVe control con vehículo; CEe control con α -tocoferol; DVe diabéticas con vehículo; DEe diabéticas con α -tocoferol.

* $p < 0,05$ contra los controles, ‡ $p < 0,05$ contra DVe (prueba Fisher).

La mayor parte de las malformaciones encontradas en los embriones de las ratas diabéticas se relacionaron con defectos de cierre del tubo neural. En el grupo que no recibió el suplemento se observaron embriones con defectos de rotación y poca delimitación de los somitas (Tabla 6, Figura 10).

Tabla 6. Descripción de las malformaciones y número de embriones afectados de las camadas de ratas diabéticas y controles

Descripción de malformaciones	Ratas controles	Ratas diabéticas
-Apertura posterior amplia del tubo neural.	1	10
-Apertura posterior amplia del tubo neural y microcefalia.		7
-Apertura anterior y posterior amplia del tubo neural con microcefalia.		3
-Apertura anterior, posterior amplia y dorsal del tubo neural, microcefalia, mal-rotación y poca delimitación de los somitas.		4*
-Microcefalia	1	

* Defectos que sólo se presentaron en embriones de ratas diabéticas que no recibieron α -tocoferol.

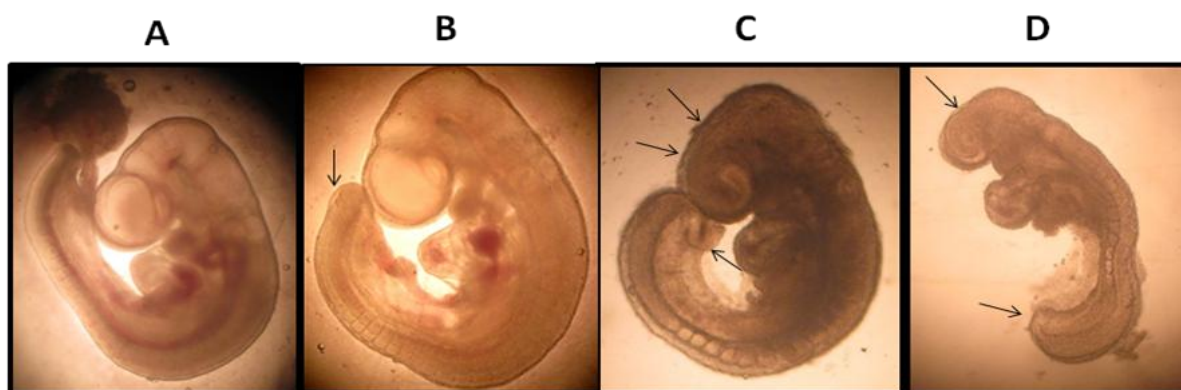


Figura 10. Imágenes de embriones de ratas de 11,5 días de gestación

A: embrión normal con su placenta; B: embrión retrasado, con apertura del poro posterior del tubo neural; C: embrión malformado, con apertura posterior amplia del tubo neural y microcefalia; D-E: embriones severamente malformados, con apertura posterior amplia del tubo neural, microcefalia, defectos de rotación y regiones con poca delimitación de los somitas. Las flechas indican los defectos mencionados. Fotos tomadas con cámara digital (Canon) acoplada a microscopio óptico (Partec) a 40 x (A) y 100 x (B, C, D).

Tanto el número de somitas como los indicadores de crecimiento de los embriones fueron inferiores en los descendientes de las ratas diabéticas al compararlos con los controles, sin diferencias con el uso del suplemento (Tabla 7). En todos los grupos los valores de estas variables fueron menores en los embriones malformados, mayores en los normales e intermedios en los retrasados ($p < 0,05$).

Tabla 7. Variables de crecimiento y desarrollo de embriones de ratas de 11,5 días de gestación

Grupos	Embriones analizados	Número de somitas	Talla mm	Proteínas ⁺ µg	ADN ⁺ µg
CVe	136	26	3,4	315	212
CEe	124	27	3,5	260	207
DVe	84	24 *	3,0 *	116	114
DEe	128	24 *	3,1 *	113	143

Se muestra el número de embriones analizados, la mediana del número de somitas y la talla (variables sin distribución normal), así como el contenido de proteínas y ADN en homogeneizado de embriones.

CVe: control con vehículo; CEe: control con α -tocoferol; DVe: diabéticas con vehículo; DEe: diabéticas con α -tocoferol.

* Estadística descriptiva.

* $p < 0,05$ contra los controles (pruebas Kruskal-Wallis y Dunn).

El análisis de los marcadores de estrés oxidativo mostró concentraciones superiores de MDA/proteínas en los embriones de las ratas diabéticas, con independencia de si recibieron o no el suplemento, al comparar con los controles (Figura 11). Las concentraciones de MDA/ADN y PAOP/proteínas fueron mayores en los embriones de las ratas diabéticas sin suplemento, mientras que en los de las ratas diabéticas que recibieron la vitamina se comportaron de forma similar a los controles (Figura 11). Las concentraciones de GSH no fueron detectables.

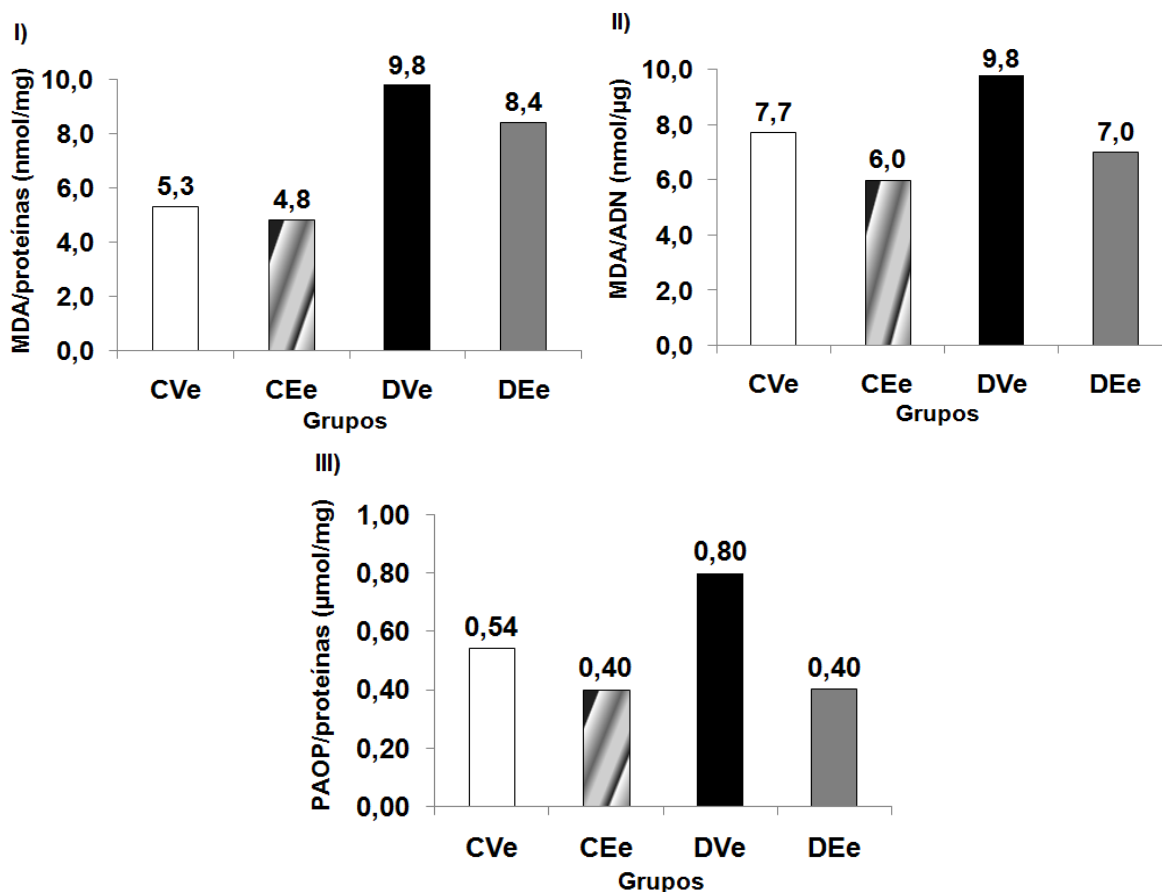


Figura 11. Concentración de marcadores de estrés oxidativo en homogeneizado de embriones de ratas de 11,5 días de gestación. Estadística descriptiva

CVe: control con vehículo; CEe: control con α -tocoferol; DVe: diabéticas con vehículo; DEe: diabéticas con α -tocoferol.

I): nmol de MDA (malonildialdehído) por mg de proteínas; II): nmol de MDA por μ g de ADN;

III): μ mol de PAOP (productos avanzados de oxidación de proteínas) por mg de proteínas.

En cada grupo de ratas diabéticas se compararon también los marcadores de daño oxidativo a biomoléculas de los embriones agrupados según la presencia o no de alteraciones en sus camadas. Las concentraciones mayores se observaron en los embriones malformados, retrasados y normales de las mismas camadas, mientras que los de camadas sin alteraciones mostraron niveles similares a los controles (Figura 12).

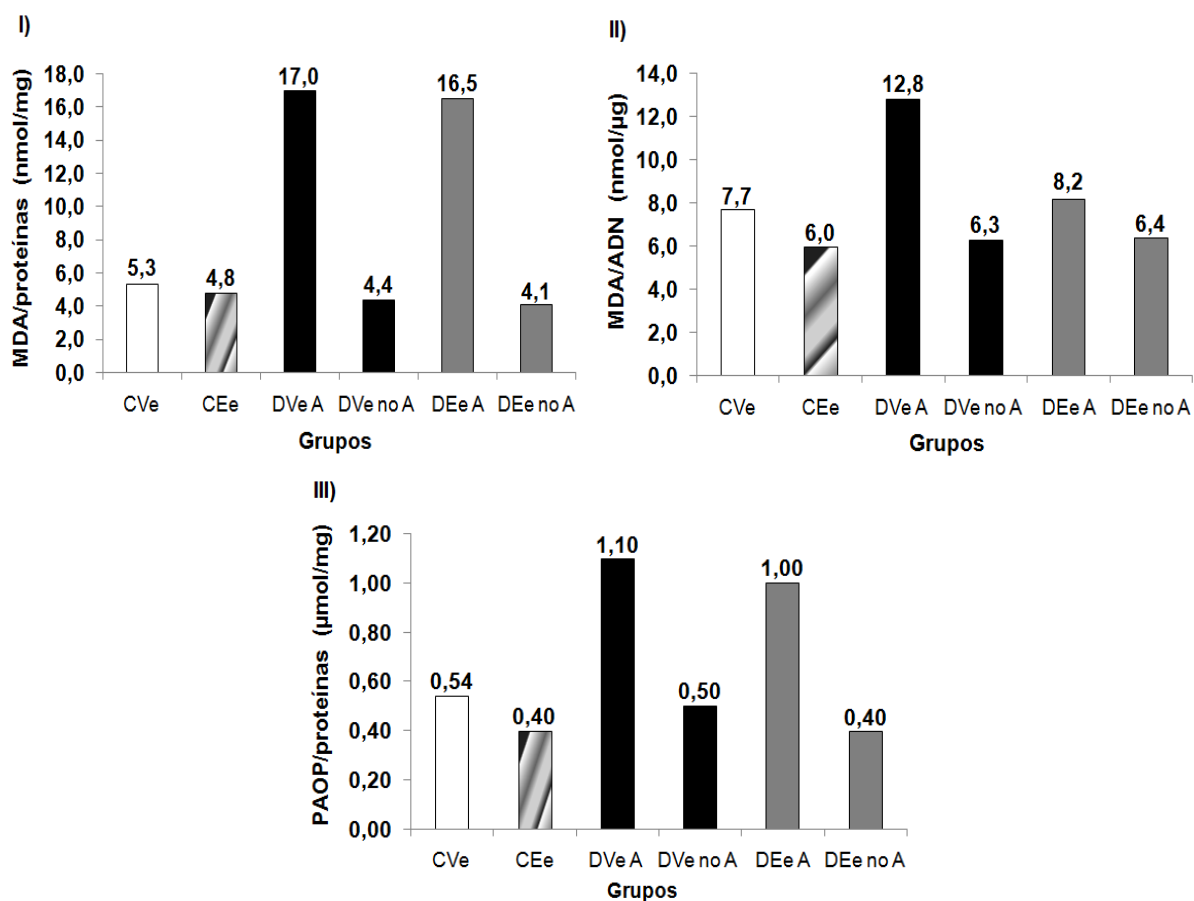


Figura 12. Concentración de marcadores de estrés oxidativo en homogeneizado de embriones de ratas diabéticas, con y sin alteraciones en sus camadas, y de controles. Estadística descriptiva

CVe: control con vehículo; CEe: control con α -tocoferol; DVe: diabéticas con vehículo; DEe: diabéticas con α -tocoferol; A: embriones malformados, retrasados y normales de las mismas camadas; no A: embriones de camadas sin alteraciones.

I): nmol de MDA (malonildialdehído) por mg de proteínas; II): nmol de MDA por μ g de ADN;

III): μ mol de PAOP (productos avanzados de oxidación de proteínas) por mg de proteínas.

3.2 Etapa fetal

3.2.1 Ratas madres

Al comparar las ratas diabéticas con los controles se observó una ganancia de peso significativamente inferior, así como niveles de glicemia y colesterol significativamente superiores, sin diferencias con el uso del suplemento de α -tocoferol (Tabla 8). El resto de las variables de química sanguínea no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Anexo), al igual que las variables del hemograma (hemoglobina, hematocrito y leucocitos).

Tabla 8. Ganancia de peso y variables de química sanguínea alteradas de ratas de 20 días de gestación

Grupos	Ganancia de peso (gramos)	Glicemia (mM)	Colesterol (mM)
Cf	105,0	5,7	1,9
DVf	92,8 *	18,4 *	3,0 *
Def	82,4 *	23,5 *	3,8 *

Se muestra el valor de la mediana de las variables ya que no siguieron una distribución normal. Cf: control; DVf: diabéticas con vehículo; DEf: diabéticas con α -tocoferol.

* $p < 0,05$ contra el control (pruebas Kruskal-Wallis y Dunn).

Al comparar los grupos de ratas del estudio de la etapa embrionaria con los del estudio de la etapa fetal (DVe vs DVf, DEe vs DEf, CVe vs Cf, CEe vs Cf) se observó que los últimos presentaron menores niveles de glicemia y mayores de colesterol, triacilgliceroles, ácido úrico y creatinina en el plasma ($p < 0,05$).

Todas las ratas diabéticas de esta etapa que no recibieron el α -tocoferol presentaron fetos malformados, fallecidos o reabsorciones, mientras que en el grupo que recibió el suplemento hubo un 20 % de ratas (4/20 ratas) cuyas implantaciones no

exhibieron ninguna alteración; estas últimas mostraron concentraciones de GSH en hígado significativamente superiores al resto de las ratas diabéticas (Figura 13). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de otros marcadores de estrés oxidativo entre los grupos (Tabla 9).

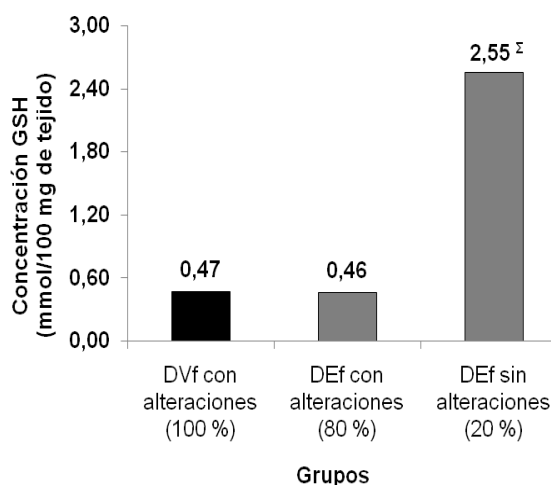


Figura 13. Concentración de glutatión reducido en el hígado de ratas diabéticas de 20 días de gestación

Grupos formados según la presencia o no alteraciones en sus implantaciones (fetos malformados, fallecidos o reabsorciones). DDef: diabéticas con α -tocoferol; DVf diabéticas con vehículo. GSH: glutatión reducido.

Nótese que en el grupo DVf todas las ratas presentaron implantaciones alteradas (100 %), mientras que en el DDef hubo ratas que no presentaron alteraciones (20 %).

^z $p < 0,05$ contra el resto de los grupos (pruebas Kruskal-Wallis y Dunn).

Tabla 9. Marcadores de estrés oxidativo de ratas de 20 días de gestación

Grupos	Plasma			Hígado		
	PAOP (μ M)	MDA (nM)	GSH (mM)	PAOP (μ mol/100 mg de tejido)	MDA (nmol/100 mg de tejido)	GSH (mmol/100 mg de tejido)
Cf	1,0	17,1	0,60	0,66	3,0	0,33
DVf	0,7	20,4	0,50	0,54	7,0	0,28
DDef	0,6	19,7	0,54	0,6	3,5	0,30

Se muestra el valor de la mediana de las variables ya que no siguieron una distribución normal.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos al comparar estos marcadores. Cf: control; DVf: diabética con vehículo; DDef: diabética con α -tocoferol. PAOP: productos avanzados de oxidación de proteínas; MDA: malonildialdehído; GSH: glutatión reducido.

Los resultados del ensayo de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de la médula ósea de ratas mostraron un índice de citotoxicidad similar en todos los grupos. Sin embargo, la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados fue significativamente superior en las ratas diabéticas al comparar con los controles y el suplemento de α -tocoferol no modificó estos resultados (Figuras 14 y 15).

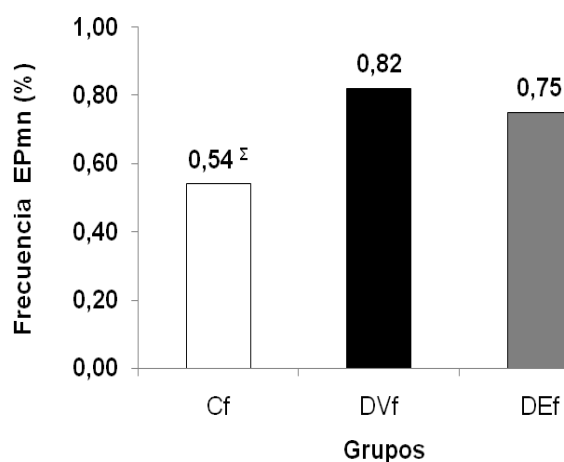


Figura 14. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados en la médula ósea de ratas de 20 días de gestación

EPmn: eritrocitos policromáticos micronucleados en 2000 eritrocitos policromáticos; Cf: control; DVf: diabéticas con vehículo; DEf: diabéticas con α -tocoferol.

^z $p < 0,05$ contra el resto de los grupos (pruebas Kruskal-Wallis y Dunn).

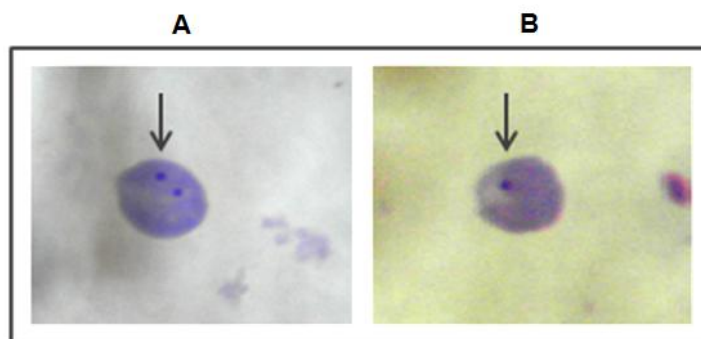


Figura 15. Fotomicrográficas de eritrocitos policromáticos micronucleados de la médula ósea de ratas

Tinción May-Greunwald y Giemsa. Las flechas indican la presencia de micronúcleos en el citoplasma, dos en A y uno en B. Fotos tomadas con cámara digital (Canon) acoplada a microscopio óptico (Partec).

El análisis cualitativo de la corteza renal por microscopía óptica mostró que las ratas diabéticas que no recibieron el α -tocoferol presentaron varias alteraciones estructurales (Figura 16 III y IV) al compararlas con los controles (Figura 16 I y II). En particular, se observó dilatación de los capilares peritubulares y túbulos atróficos en zonas extensas, alternando con zonas sin alteraciones. El daño tubular difuso se caracterizó por dilatación de las luces, aplanamiento del epitelio (Figura 16 III) y denudación. Los glomérulos presentaron aumento de tamaño por incremento difuso del mesangio a expensas de matriz y células, así como obliteración de los capilares (Figura 16 IV). Además, se observó engrosamiento de la pared de las arteriolas (Figura 16 IV) y los podocitos impresionaron hipertróficos. El grupo de ratas diabéticas que recibieron la vitamina presentó menor incidencia de estas alteraciones (Figura 16 V y VI).

Para una mejor caracterización de los cambios observados por microscopía óptica en la corteza renal de las ratas, se realizó un análisis cuantitativo del volumen de los corpúsculos renales y del daño tubular en los diferentes grupos. Las ratas diabéticas que no recibieron el suplemento presentaron aumento del volumen corpuscular y un 70 % de túbulos proximales dañados, lo cual fue significativamente superior al comparar con el resto de los grupos. Las ratas diabéticas que recibieron el α -tocoferol mostraron volúmenes corpusculares similares a los observados en los controles y sólo un 36 % de túbulos proximales dañados (Figura 17).

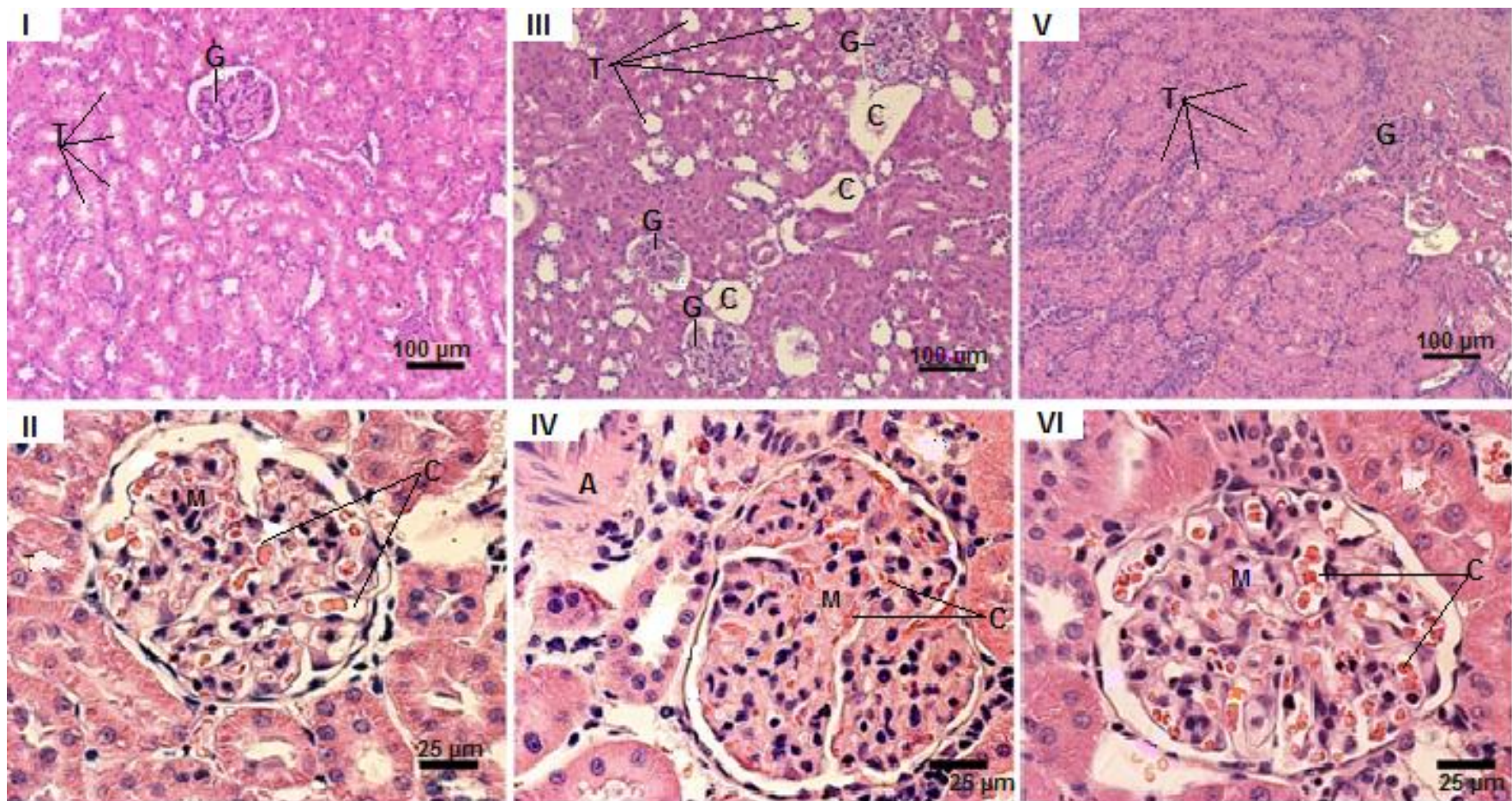


Figura 16. Imágenes obtenidas por microscopía óptica representativas de la corteza renal de ratas de 20 días de gestación. Tinción Hematoxilina-Eosina

G-glomérulo, T-túbulo, M-mesangio, C-luz capilar, A-pared arteriolar. I y II muestran la estructura normal en glomérulos, túbulos e intersticio de la corteza renal de ratas control. En III y IV se observa la estructura en ratas diabéticas sin suplemento, con dilatación y aplanamiento del epitelio de los túbulos renales, dilatación de los capilares intersticiales (III), glomérulos aumentados de volumen, con incremento del mesangio y obliteración de la luz de los capilares, así como engrosamiento de la pared arteriolar (IV). V y VI muestran la estructura de la corteza renal de ratas diabéticas que recibieron α -tocoferol, similar a la observada en I y II (control).

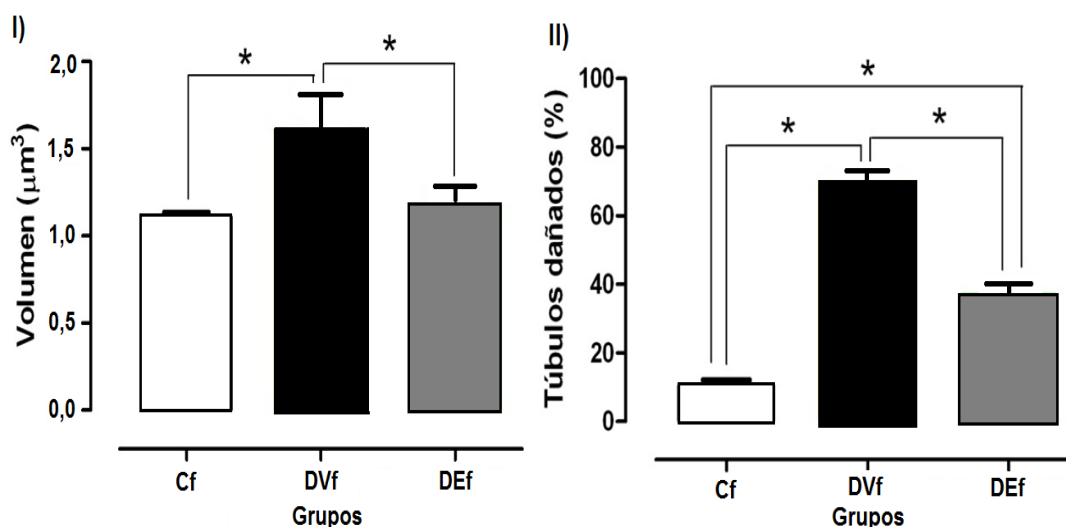


Figura 17. Evaluación cuantitativa del volumen corpuscular y del daño tubular en la corteza renal de ratas de 20 días de gestación
 I): volumen corpuscular * $p < 0,05$ (prueba Kruskal Wallis y Dunn).
 II): % de túbulos dañados * $p < 0,05$ (prueba Fisher).
 Cf: control; DVf: diabéticas con vehículo; DEf: diabéticas con α -tocoferol.

El estudio por microscopía electrónica también reveló varias alteraciones en la corteza renal de las ratas diabéticas que no recibieron la vitamina (Figura 18 IV, V y VI) al compararlas con los controles (Figura 18 I, II y III). Se observó engrosamiento irregular discontinuo de la membrana basal glomerular (Figura 18 IV), podocitos con los pedicelos fusionados en extensas zonas formando estructuras aplanadas y el citoplasma con alteraciones de la citoarquitectura y gran cantidad de vacuolas (Figura 18 IV y V); los túbulos proximales presentaron disociación y pérdida de microvellosidades, así como células epiteliales con disociación de los organelos y gran cantidad de vacuolas (Figura 18 VI). En el grupo de ratas diabéticas que recibieron el suplemento predominó la estructura normal de la membrana basal glomerular (Figura 18 VII), de los podocitos, con escasa fusión de los pedicelos (Figura 18 VIII), así como de los túbulos contorneados proximales (Figura 18 IX).

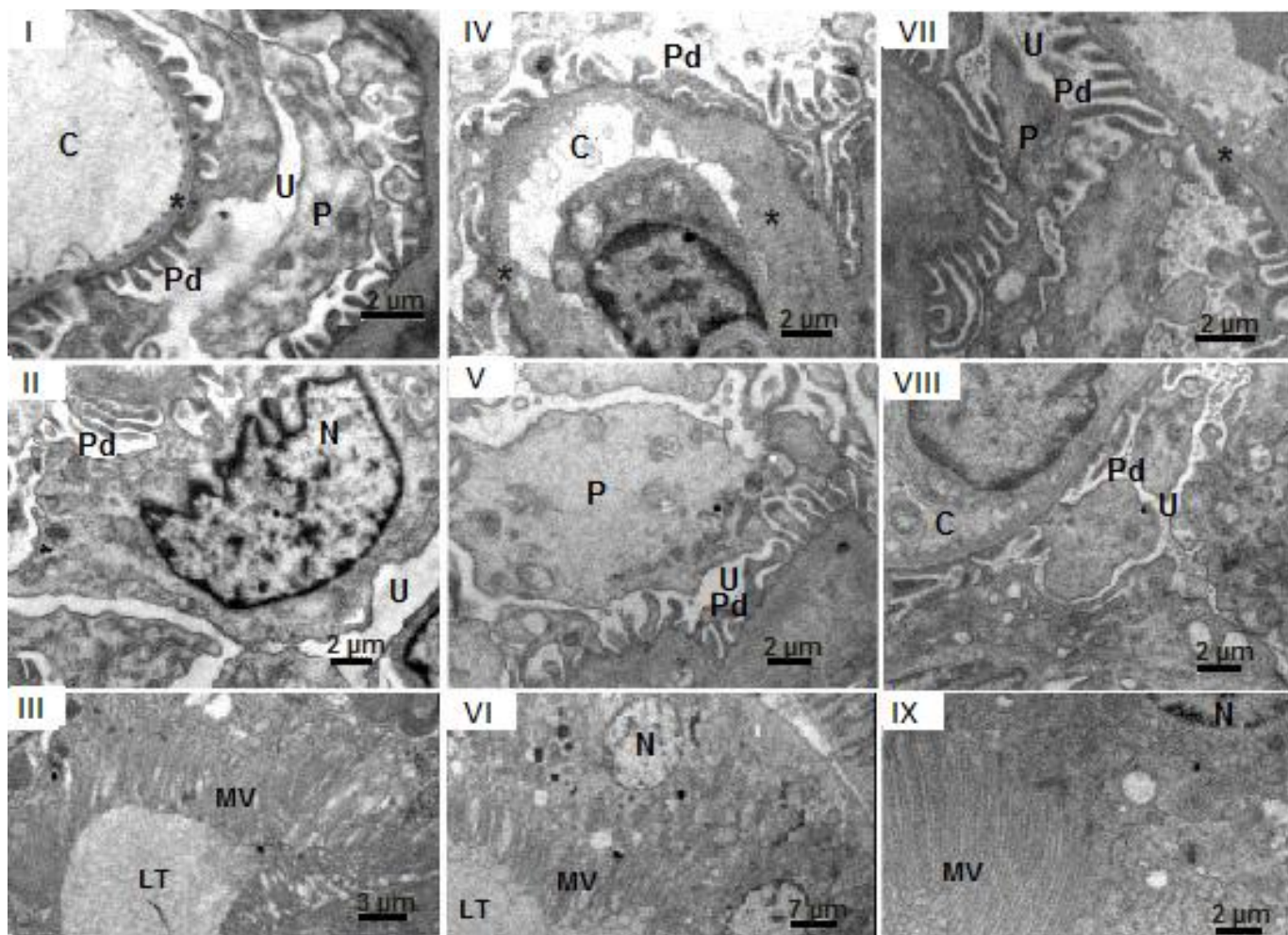


Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión representativas de la corteza renal de ratas de 20 días de gestación

*-membrana basal glomerular, P-podocitos, Pd-pedicelos, U-espacio urinario, C-luz capilar, N-núcleo, LT-luz tubular, MV-microvellosidades.

I, II y III muestran la estructura normal en ratas control. En IV, V y VI se observan alteraciones en ratas diabéticas sin suplemento, con engrosamiento irregular discontinuo de la membrana basal glomerular (IV), pedicelos fusionados formando estructuras aplanadas (IV y V) y células epiteliales tubulares ricas en vacuolas, así como con disociación y pérdida de microvellosidades (VI). VII, VIII y IX muestran la estructura en ratas diabéticas que recibieron α -tocoferol, donde se observa escasa fusión de los pedicelos (VIII) y el resto de las estructuras de aspecto normal.

3.2.2 Camadas

En el grupo de ratas diabéticas sin suplemento se observó un incremento significativo de las reabsorciones, muertes fetales y de los fetos vivos malformados, al comparar con el control. En el grupo de ratas diabéticas que recibió el α -tocoferol el porcentaje de fetos vivos malformados fue similar al del grupo no suplementado, pero las reabsorciones y muertes fetales se redujeron significativamente a niveles similares a los encontrados en el grupo control (Tabla 10).

Tabla 10. Características generales de las camadas de ratas estudiadas en la etapa fetal

Grupos	Implantaciones n (promedio por rata)	Reabsorciones y fetos muertos n (%)	Fetos vivos n (%)	Fetos vivos malformados n (%)
Cf	119 (12)	7 (5,9)	112 (94,1)	3 (2,5)
DVf	219 (11)	25 (11,4) *	194 (88,6) *	13 (5,9) *
DEf	208 (10)	9 (4,3) †	199 (95,7) †	16 (7,7) *
Total	546	41	505	32

Los porcentajes (%) fueron calculados con respecto al número de implantaciones del grupo. Grupos de ratas de 20 días de gestación: Cf control; DVf diabéticas con vehículo; DEf diabéticas con α -tocoferol.

* p < 0,05 contra el control, † p < 0,05 contra DVf (prueba Fisher).

En los fetos de ratas diabéticas, con y sin suplemento, se encontraron diferentes tipos de malformaciones y varios casos con defectos múltiples. Las regiones afectadas con mayor frecuencia fueron la cardiovascular y la cráneo-facial (Tablas 11, 12 y Figura 19).

Tabla 11. Tipos de malformaciones en fetos de ratas diabéticas, según el sistema o región afectada

Sistema o región afectada	Tipo de malformación
Cardiovasculares	.Tronco arterioso común .Hipoplasia del tronco pulmonar .Estenosis pulmonar .Transposición de grandes vasos
Cráneo- faciales	.Labio leporino .Micrognatia .Paladar hendido .Microtia derecha .Hendidura facial oblicua .Acránea .Implantación baja de oreja izquierda
Digestivas	.Gastrosquisis .Páncreas anular .Onfalocele .Rotación inadecuada
Esqueléticas	.Acortamiento del miembro anterior unilateral .Miembro anterior izquierdo en pinza de langosta .Agenesia de la cola
Urogenitales	.Ectopia renal derecha y bilateral .Rotación inadecuada del .Duplicación incompleta de uréter riñón izquierdo derecho .Hipoplasia gonadal bilateral .Hipoplasia renal derecha .Agenesia testicular derecha
Respiratorias	.Hipoplasia del pulmón izquierdo
Endocrinas	.Agenesia suprarrenal unilateral

Tabla 12. Número de fetos malformados de ratas diabéticas y controles, según el sistema o región del cuerpo afectada

Sistema o región con malformaciones	Ratas controles	Ratas diabéticas
Cardiovasculares	1	6
Cráneo-Faciales	1	7
Digestivas	1	3
Esqueléticas	0	3
Urogenitales	0	2
Endocrinas	0	1
Respiratorias	0	1
Defectos múltiples*	0	6

*En los fetos con defectos múltiples predominaron las malformaciones cardiovasculares y cráneo-faciales.

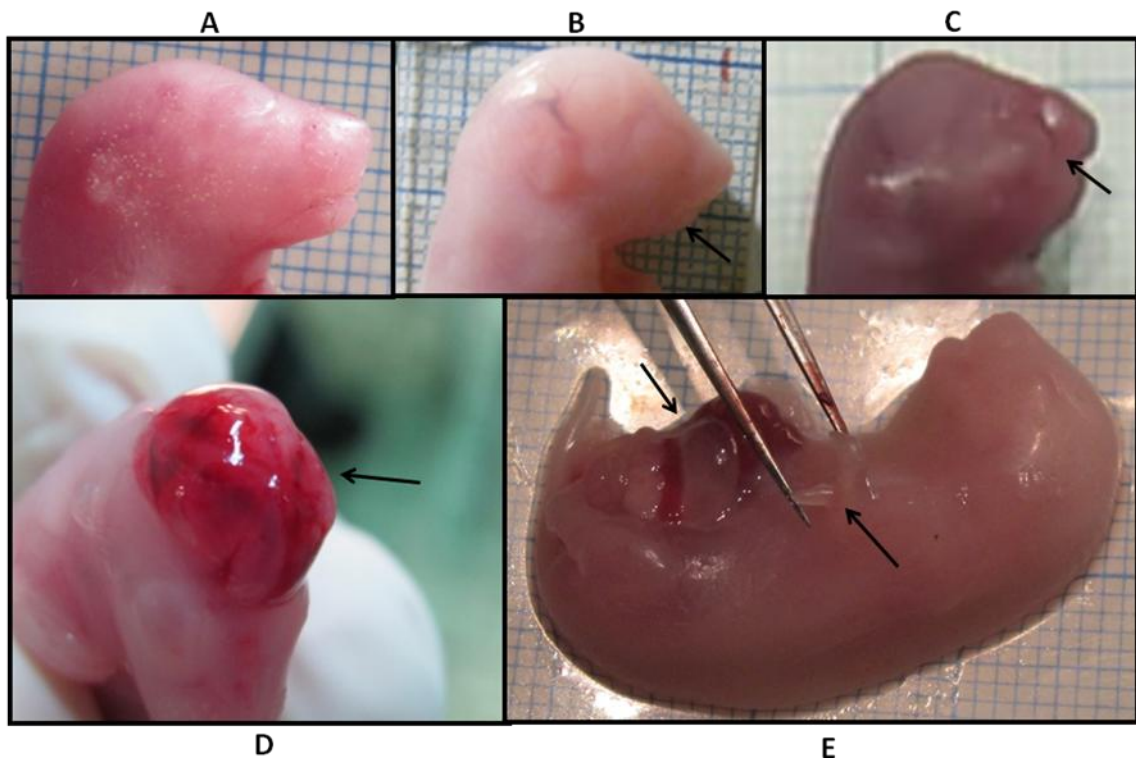


Figura 19. Imágenes de fetos normales y malformados de ratas diabéticas

A: feto normal; B: feto con micrognatia; C: feto con hendidura facial oblicua; D: feto con acránea; E: feto con gastrosquisis y pata en pinza de langosta. Las flechas indican las malformaciones mencionadas.

Los valores de la mayoría de las variables del análisis morfométrico de los fetos vivos fueron significativamente inferiores en los descendientes de las ratas diabéticas, con y sin suplemento, al comparar con los controles (Tabla 13). La talla y el diámetro craneano biparietal de los fetos de las ratas diabéticas que recibieron el α -tocoferol fueron significativamente mayores que en los fetos de las ratas diabéticas que no recibieron la vitamina. No se observaron diferencias significativas en otras variables morfométricas con el uso del suplemento (Tabla 13).

Tabla 13. Variables morfométricas de fetos de ratas de 20 días de gestación

Grupo	# Fetos vivos analizados	Peso g	Talla mm	DBP mm	DAP mm	DO mm	DPPI mm	DPPD mm
Cf	112	3,7	51,0	9,0	13,0	7,5	13,0	13,0
DVf	172	3,3 *	47,0 *	8,0 *	13,0	7,0	12,0 *	12,0 *
DEf	186	3,2 *	48,0 * [#]	9,0 [#]	13,0	7,5	12,0 *	12,0 *

Se muestra el total de fetos vivos analizados y los valores de la mediana de las variables morfométricas ya que no siguieron una distribución normal.

Cf: control; DVf: diabéticas con vehículo; DEf: diabéticas con α -tocoferol. DBP: diámetro craneano biparietal; DAP: diámetro craneano antero-posterior; DO: distancia entre los ángulos externos de los ojos; DPPI y DPPD: distancia poro nasal-pabellón auricular izquierda y derecha respectivamente.

* p < 0,05 contra el control, [#] p < 0,05 contra DVf (pruebas Kruskal-Wallis y Dunn).

Las concentraciones de GSH en el hígado de los fetos de las ratas diabéticas que recibieron el α -tocoferol fueron significativamente superiores a los del grupo sin suplemento y similares al control (Figura 20). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de MDA y PAOP entre los grupos (Tabla 14).

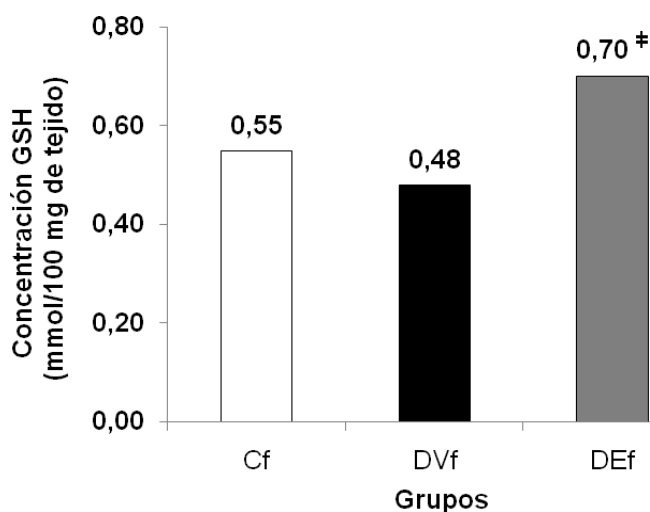


Figura 20. Concentración de glutatión reducido en el hígado de fetos de ratas de 20 días de gestación

GSH: glutatión reducido; Cf: control; DVf: diabéticas con vehículo; DEf: diabéticas con α -tocoferol. ^{*} p < 0,05 contra DVf (pruebas Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn).

Tabla 14. Concentración de productos avanzados de oxidación de proteínas y malonildialdehído en el hígado de fetos de ratas de 20 días de gestación

Grupos	PAOP ($\mu\text{mol}/100 \text{ mg}$ de tejido)	MDA ($\text{nmol}/100 \text{ mg}$ de tejido)
Cf	0,96	3,5
DVf	0,78	6,3
Def	0,60	7,1

Se muestra el valor de la mediana de las variables ya que no siguieron una distribución normal.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos al comparar estos marcadores.

Cf: control; DVf: diabética con vehículo; DEf: diabética con α -tocoferol. PAOP: productos avanzados de oxidación de proteínas; MDA: malonildialdehído.

3.2.3 Placentas

Las ratas diabéticas que no recibieron el suplemento presentaron mayor peso de las placentas y de su relación con el peso de los fetos, con diferencias significativas al comparar con el grupo control. En el grupo de ratas diabéticas que recibieron el α -tocoferol los valores de estas variables fueron significativamente menores que en el grupo sin suplemento y similares a los observados en el control (Figura 21).

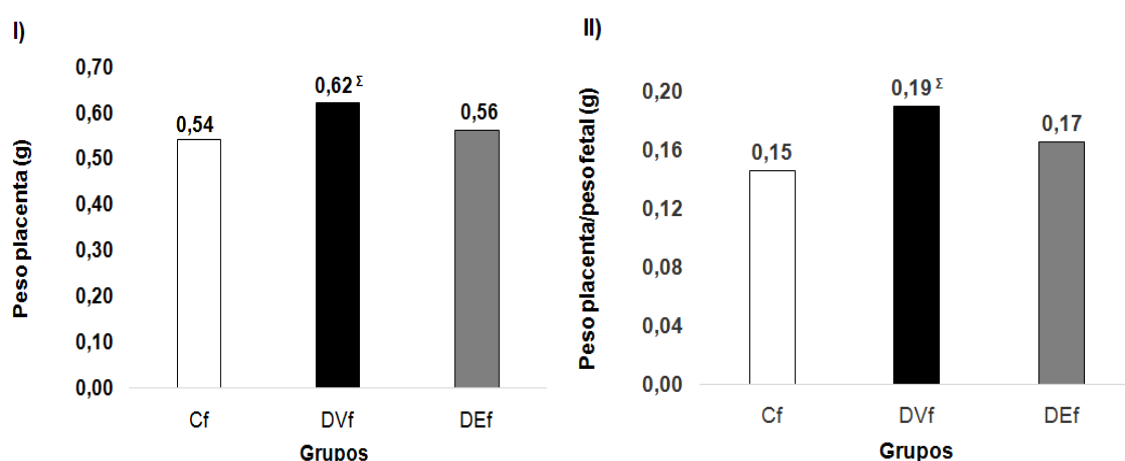


Figura 21. Peso de placentas de ratas de 20 días de gestación y relación con el peso fetal I): peso de las placentas; II): relación entre el peso de las placentas y el peso fetal.

Cf: control; DVf: diabéticas con vehículo; DEf: diabéticas con α -tocoferol.

^Σ $p < 0,05$ contra el resto de los grupos (pruebas Kruskal-Wallis y Dunn).

3.3 Resumen de los principales resultados

Al comparar los grupos de ratas madres se observó:

- Incremento significativo de la concentración de creatinina en el plasma de las ratas diabéticas que no recibieron el suplemento y niveles similares al control en las ratas diabéticas con suplemento.
- Alteraciones de la estructura de la corteza renal, con incremento del volumen de los corpúsculos renales y del porcentaje de túbulos proximales dañados en las ratas diabéticas que no recibieron el suplemento, con una disminución significativa de la incidencia estas alteraciones en las ratas diabéticas con suplemento.
- El 100 % de las ratas diabéticas sin suplemento mostraron alguna alteración en sus camadas, mientras que el 23 % de las ratas diabéticas que recibieron el suplemento no presentaron ninguna alteración.
- Las concentraciones de marcadores de daño oxidativo a biomoléculas no mostraron diferencias significativas entre los grupos, mientras que la concentración del antioxidante glutatión reducido se incrementó significativamente en las ratas diabéticas que recibieron el suplemento.
- El índice de citotoxicidad y la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados de la médula ósea no mostraron diferencias significativas con el uso del suplemento.

Al comparar las camadas y placentas entre los grupos se observó:

- Incremento significativo del porcentaje de reabsorciones, muertes fetales, malformaciones embrionarias y embriones con retraso del desarrollo en las ratas

diabéticas sin suplemento, con una disminución significativa en las ratas diabéticas con suplemento.

- Incremento del peso de las placentas y de su relación con el peso fetal en las ratas diabéticas sin suplemento, con una disminución significativa en las ratas diabéticas con suplemento
- Concentraciones de marcadores de daño oxidativo a biomoléculas en los embriones significativamente menores y del antioxidante glutatión reducido en los fetos significativamente mayores con el uso del suplemento.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

Las ratas utilizadas en el estudio no presentaron alteraciones del estado de salud que se evidenciaran por modificaciones de las variables hematológicas analizadas y que pudieran interferir con los resultados, como la anemia o la sepsis. El incremento significativo de los niveles de colesterol, triacilgliceroles, ácido úrico y creatinina en sangre, junto a la disminución de la glicemia, en todos los grupos de la etapa fetal (20 días de gestación) con respecto a la embrionaria (11.5 días de gestación), puede ser explicado por cambios metabólicos propios de la gestación^{148,149}. Sin embargo, la presencia de hiperglicemia severa, hipercolesterolemia y poca ganancia de peso en las ratas que recibieron la estreptozotocina, concuerda con la diabetes descompensada que se produce en este modelo experimental^{5,15,46,110}.

Se sabe que el déficit de insulina produce un incremento de las concentraciones de triacilgliceroles en sangre, así como una disminución de la síntesis de proteínas e incremento de su catabolismo⁴⁶. Sin embargo, las ratas diabéticas no mostraron modificaciones en las concentraciones de triacilgliceroles, proteínas totales y albúmina en el plasma. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores^{15,46} y pudieran deberse a que el tiempo de evolución de la diabetes no fuera suficiente para que se manifestaran estos cambios metabólicos.

Está reportado que en las mitocondrias del hígado de ratas con diabetes moderada se ha observado un incremento del ácido úrico y de su precursor directo xantina, que disminuyen a niveles normales en la diabetes severa; esto sugiere un incremento en el catabolismo de las purinas que pudiera contribuir a las defensas antioxidantes,

pero que se afecta a medida que progresa la disfunción mitocondrial¹⁵⁰. Lo anterior pudiera explicar lo observado en el presente estudio, en el cual las ratas presentaron una diabetes severa sin modificación en las concentraciones de ácido úrico.

La administración de vitamina E no ha mostrado un beneficio claro en el control metabólico en humanos²⁷⁻²⁹. Tampoco se han observado efectos sobre los niveles de glucosa, triacilglicérol y colesterol en sangre de ratas diabéticas^{15,151}, coincidiendo con lo encontrado en el presente estudio.

La ausencia de efectos del α -tocoferol en el control metabólico de la diabetes pudiera deberse a que la actividad de los suplementos antioxidantes se vincula a la eliminación de especies oxidadas más reactivas que sus propios productos de oxidación, por lo que pudieran tener poco efecto sobre las causas del estrés oxidativo¹⁵². Sin embargo, algunos autores han reportado una disminución de la glicemia con suplementos de α -tocoferol^{27,153}, relacionada con la hipótesis de que esta vitamina interactúa con proteínas intrínsecas de membranas, como los transportadores de glucosa, modificando su funcionamiento¹⁵⁴.

La nefropatía es la complicación más seria de la diabetes y la causa más común de enfermedad renal terminal. Las alteraciones incluyen engrosamiento de la membrana basal glomerular, incremento del mesangio y glomeruloesclerosis¹⁵⁵. Estas alteraciones afectan la filtración glomerular, contribuyendo a la pérdida de la función renal y a la progresión hacia la enfermedad renal terminal¹⁵⁶.

En las ratas diabéticas que no recibieron el suplemento se produjo un incremento significativo de las concentraciones de creatinina en sangre en la etapa embrionaria y una alta incidencia de lesiones glomerulares, tubulares e intersticiales en la corteza

renal al final de la gestación. El incremento del mesangio de los glomérulos renales se ha asociado con acumulación de proteínas¹³⁷ y explica la obliteración de los capilares glomerulares, que puede haber contribuido al daño tubular e intersticial. El aumento del volumen de los glomérulos y el daño tubular difuso que se observó en el análisis cualitativo fueron confirmados con el estudio morfométrico, por el incremento significativo del volumen de los corpúsculos renales y del porcentaje de túbulos proximales dañados. Lo anterior evidencia que este modelo experimental pudiera ser considerado en futuros estudios de nefropatía diabética.

Varios mecanismos bioquímicos han sido propuestos en el desarrollo de la nefropatía diabética, siendo la hiperglicemia uno de los factores más importantes³. Las alteraciones en el tejido renal incluyen cambios metabólicos que provocan estrés oxidativo y la activación de vías pro-inflamatorias que median el daño tisular³. Por esta razón, encontrar métodos que contrarresten las alteraciones de la homeostasis redox y de la exposición a citocinas pro-inflamatorias en la diabetes es fundamental para la prevención de las complicaciones, siendo los antioxidantes candidatos terapéuticos considerados en otras investigaciones.

En estudios con suplementos de vitamina E en humanos¹⁵⁷ y ratas diabéticas no preñadas^{151,158-162} se ha reducido la microalbuminuria, la proteinuria, así como la respuesta inflamatoria y el daño oxidativo a biomoléculas en el tejido renal. Sin embargo, existen pocas investigaciones de los efectos de estos suplementos sobre el riñón de ratas diabéticas preñadas, pero en ellas se han producido efectos favorables en la función renal y disminución del daño glomerular^{125,126}.

El presente estudio aporta evidencias por microscopía óptica y electrónica de que la administración de α -tocoferol durante la gestación de ratas diabéticas condujo a la normalización del volumen de los glomérulos y disminuyó el daño tubular, así como de otras estructuras de la corteza renal. La descripción de las características de la estructura de la corteza renal en el modelo utilizado y el efecto protector del suplemento de α -tocoferol constituyen aportes del presente trabajo.

En este modelo está demostrado que los efectos teratogénicos dependen de la hiperglicemia materna y no de la estreptozotocina; esta sustancia se elimina de la circulación en las 24 h posteriores a su administración, por lo que no tiene efectos sobre la descendencia cuando se administra antes de la gestación⁴⁸.

En las camadas de ratas diabéticas sin suplemento se incrementaron las reabsorciones, muertes fetales y malformaciones congénitas; los embriones presentaron menor talla, número de somitas y contenido de proteínas y ADN, mientras los fetos y placentas mostraron alteraciones en el crecimiento. Resultados similares se han obtenido en otros estudios^{5,15,18-22,163-165}, y evidencian los efectos negativos de la diabetes sobre la gestación.

Las malformaciones congénitas que se presentaron con mayor frecuencia en los descendientes de las ratas diabéticas coinciden con lo reportado previamente¹². En los embriones predominaron los defectos de cierre del tubo neural y en los fetos los defectos septales cardíacos y cráneo-faciales. El análisis de estas dos etapas del desarrollo en un mismo estudio permite suponer que los defectos de cierre del tubo neural observados en los embriones pudieran ser tan severos que impidieron su supervivencia, por lo que no aparecieron con igual frecuencia en los fetos.

Las complicaciones presentes en la descendencia de las ratas diabéticas pueden explicarse por los daños que se producen desde la etapa pre-gestacional. En modelos animales existen evidencias de que la exposición del ovocito pre-ovulatorio al ambiente diabético puede influir en la expresión de genes involucrados en la organogénesis adecuada, tanto del embrión como de la placenta, antes de que estos genes puedan ser inducidos⁹⁰. La apoptosis de un número limitado de células del blastocisto puede producir retardo del crecimiento, pero la eliminación de una masa celular mayor pudiera conducir a fallos en la implantación o pérdida de embriones completos⁹⁰. El menor crecimiento de los fetos puede ser explicado por colapso de las células β del páncreas fetal con la consecuente hipoinsulinemia¹⁶⁶, y por alteraciones en la placenta, como se analiza más adelante.

Para explicar las malformaciones que se presentaron con mayor frecuencia hay que considerar que en la formación del tubo neural, así como de las estructuras cardiovasculares y faciales afectadas, participa una población celular importante: las células de las crestas neurales. Estas células se forman en los extremos de los pliegues neurales e intervienen en el cierre adecuado del tubo neural y posteriormente migran y proliferan formando los tabiques cardiacos y estructuras de la cara y el cráneo⁹⁰.

Estudios experimentales realizados con inducción de hiperglicemia y estrés oxidativo en ratas han evidenciado alteraciones en la expresión de genes importantes para la viabilidad, migración y diferenciación de las células de las crestas neurales. Se ha observado disminución de la expresión de genes de proteínas relacionadas con la actividad antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y Nfr2) y

antiapoptótica (Bcl2), así como de otras importantes en la morfogénesis (Pax 3, Pax 6 y componentes de la vía Wnt)¹⁶⁷.

Un mecanismo bioquímico que vincula al gen PAX 3 en la teratogénesis diabética considera que las altas concentraciones de glucosa que llegan al embrión durante la organogénesis incrementan la producción de superóxido por las mitocondrias¹⁴. Este efecto no puede ser contrarrestado por los sistemas de defensa antioxidante inmaduros, produciéndose estrés oxidativo⁹⁶. En esta situación se estimula la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) que, de alguna forma aun no esclarecida, inhibe la expresión de PAX 3¹⁶⁸.

La inhibición de PAX 3 incrementa la actividad de p53, ya que p53 es marcada con ubiquitina y degradada en presencia de Pax 3¹⁶⁹. Lo anterior conduce a un incremento de la apoptosis de las células de las crestas neurales, que impide el cierre adecuado del tubo neural y la migración de las células hacia las regiones donde originan otras estructuras^{168,169}. Se ha observado que estos efectos son evitados con el uso de suplementos antioxidantes¹⁶⁴.

Por otra parte, estudios recientes han evidenciado que el estrés oxidativo inducido por la hiperglicemia también estimula la actividad de la metiltransferasa 3b del ADN, con lo cual se incrementa la metilación del promotor de PAX 3 y disminuye la expresión del gen¹⁷⁰. Lo anterior muestra la influencia del estrés oxidativo en modificaciones epigenéticas relacionadas con la inducción de malformaciones congénitas asociadas a la diabetes materna.

Otros mecanismos relacionan el estado pro-inflamatorio y pro-oxidante crónico que caracteriza a la diabetes con la producción de sustancias que pueden tener actividad

clastogénica en el embrión y provocar malformaciones^{16,171}. En este sentido, se ha observado un incremento del daño oxidativo al ADN en embriones de ratas diabéticas, que disminuye con suplementos antioxidantes¹⁶. Además, se ha demostrado que en embriones cultivados frente a altas concentraciones de glucosa se incrementa la frecuencia de mutaciones y que esto se correlaciona con el desarrollo de malformaciones y retardo del crecimiento¹⁷¹.

Un aspecto importante es que en los estudios realizados en modelos experimentales de diabetes y preñez, la apertura del poro posterior del tubo neural es considerada en unos casos como una malformación y en otros como un retraso del desarrollo, clasificando a los embriones como malformados o normales, respectivamente. Sin embargo, como el poro posterior del tubo neural se cierra poco tiempo después que el anterior, su apertura en este momento del desarrollo pudiera considerarse un retraso en embriones con apariencia completamente normal⁴⁸. Su talla y número de somitas superiores a los embriones malformados pero inferiores a los normales de su grupo, apoyan la clasificación que se propone en el presente trabajo, en la que se considera a los embriones como normales, malformados o retrasados. El mayor número de embriones retrasados en el grupo de ratas diabéticas reafirma los efectos dañinos de la diabetes materna sobre la descendencia.

La administración del α -tocoferol a las ratas diabéticas no favoreció el crecimiento de sus embriones, y sus fetos, aunque presentaron incremento significativo de la talla y del diámetro craneano biparietal, no mostraron cambios en el peso y otras variables de morfometría cráneo-facial. Sin embargo, los resultados coinciden con estudios en los que este suplemento se ha asociado a disminución de las reabsorciones y

muertes fetales, así como de las malformaciones y retrasos del desarrollo de los embriones de ratas diabéticas^{15-22,164}. Además, aunque no se observó disminución de las malformaciones en los fetos, se ha demostrado que estas son la causa principal de las reabsorciones y muertes fetales^{44,141}, las cuales sí disminuyeron significativamente con el α -tocoferol. Lo anterior aporta evidencias de que los suplementos de α -tocoferol pueden ser útiles para prevenir en parte la embriopatía diabética en ratas.

Por otra parte, la morfogénesis y el desarrollo requieren de un conjunto de procesos coordinados, no sólo del embrión y el feto, sino también de la placenta. La proliferación y diferenciación de las células del trofoblasto, así como su invasión adecuada, son esenciales para la implantación del embrión, la placentación y el mantenimiento del embarazo¹⁷².

Las fases básicas de diferenciación y desarrollo de la placenta son comunes entre las especies que tienen placentación hemocorial, como los roedores y los humanos. En roedores la placentación comienza con la proliferación de las células del trofoblasto hasta formar el laberinto, el espongiotrofoblasto y el compartimento de células gigantes, estructuras que constituyen la interface fetal con la decidua materna¹⁷³.

El ambiente intrauterino que se genera como consecuencia de la diabetes materna produce trastornos metabólicos, hemodinámicos y de la función de transporte de la placenta que afectan el aporte de nutrientes al embrión y al feto, alterando su crecimiento y desarrollo^{100,123,124}. En placentas de mujeres diabéticas se han observado alteraciones en la angiogénesis¹⁷⁴ y múltiples cambios circulatorios,

degenerativos, proliferativos e inflamatorios¹⁷⁵. En placentas de ratas diabéticas los cambios morfológicos incluyen: incremento del peso del órgano¹⁷⁶⁻¹⁷⁹, engrosamiento de la membrana interhemática¹⁸⁰, acumulación de células ricas en glucógeno¹⁷⁸ y células gigantes con vacuolización y desorganización espacial¹⁷⁷.

Los efectos de la diabetes materna sobre el flujo sanguíneo placentario sugieren que el feto se desarrolla en condiciones de hipoxia y malnutrición¹⁴¹. El incremento observado en el peso de la placenta se ha relacionado con la formación de una mayor área de intercambio materno-fetal para el aporte de oxígeno y nutrientes al feto¹⁴¹. La acumulación de células ricas en glucógeno¹⁷⁸ y el engrosamiento de la membrana interhemática¹⁷⁹ son otros factores que pueden contribuir al mayor peso placentario. Sin embargo, el incremento del índice peso placenta/peso fetal, como se evidencia en este estudio, indica falta de capacidad del órgano para garantizar el crecimiento y desarrollo adecuado del feto¹⁴¹.

Existen pocos reportes del efecto de suplementos de vitamina E sobre la placenta de ratas diabética, pero se ha observado disminución del estrés oxidativo^{123,124} y cambios favorables en la interface materno-fetal¹²⁶. El presente estudio muestra que la administración de α -tocoferol previno el incremento del peso del órgano y favoreció su relación con el peso de los fetos; esto sugiere un beneficio en la morfogénesis de la placenta que pudiera haber favorecido el desarrollo de la descendencia, así como la disminución de las reabsorciones y las muertes fetales.

Se sabe que la proteína transferidora de α -tocoferol hepática es quien regula las concentraciones plasmáticas de esta vitamina, pero también se expresa en el útero y es esencial para la implantación y el posterior estatus en el feto. Su deficiencia afecta

el desarrollo del laberinto de placentas de ratas, por lo que esta zona parece ser la más susceptible al estrés oxidativo¹⁸¹.

También se ha observado un efecto favorable del α -tocoferol en la angiogénesis y la vasculogénesis de la placenta, posiblemente relacionado con estimulación de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)¹⁸⁰. Todos estos factores pudieran explicar no sólo el papel esencial de la vitamina E en la reproducción de las ratas, sino también los efectos favorables observados en el desarrollo de la placenta de las ratas diabéticas y en su descendencia.

Los efectos del ambiente materno sobre la expresión de genes y la apoptosis en el producto de la concepción también pudieran explicar la disminución de la fertilidad asociada a la diabetes⁹⁰, que no fue observada en este estudio dado la similitud en el número de implantaciones de las ratas diabéticas y controles. Este resultado pudiera deberse a que la fertilidad comienza a disminuir de forma irreversible a partir de la segunda semana de diagnosticada la diabetes en las ratas¹³¹, y sólo se incluyeron en el estudio las que se preñaron en las primeras tres semanas de apareamiento.

Otro aspecto a destacar es que dada la gran cantidad de reabsorciones en las ratas diabéticas de 11,5 días de gestación que no recibieron el suplemento era de esperar un mayor número de reabsorciones o muertes fetales que las observadas en las ratas diabéticas de 20 días de gestación. Una posible explicación pudiera estar relacionada con que en el estudio de la etapa fetal (20 días de gestación) se excluyó un número elevado de ratas diabéticas sin suplemento por no presentar sacos gestacionales al término de la gestación (20/40), superior al de ratas con el suplemento (11/31) y controles (3/13).

La ausencia de sacos gestacionales no significa que no hubo preñez en ratas donde se confirmó la cópula durante las fases de pro-estro y estro del ciclo estral, ya que estos animales pudieran haber perdido sus embriones antes o poco tiempo después de la implantación. Lo anterior pudo haberse confirmado mediante el análisis de los cuernos uterinos por el método de Salewski y el conteo de cuerpos lúteos gravídicos⁴⁷, métodos que no fueron aplicados en el presente estudio por no disponer de los reactivos y habilidades necesarias para su realización.

En el método de Salewski se realiza una tinción de los cuernos uterinos que permite identificar los sitios de implantación en ausencia de sacos gestacionales. Los cuerpos lúteos gravídicos coinciden con los óvulos fecundados, por lo que la diferencia entre su número y el número de sitios de implantación permite determinar el porcentaje de pérdidas pre-implantación⁴⁷.

La vitamina E es un potente antioxidante que ha mostrado reducir el daño oxidativo en la diabetes, tanto en cultivos celulares como en modelos animales y en humanos. Como esta vitamina actúa disminuyendo la propagación en cadena de la peroxidación lipídica de las membranas, se examinan sus efectos sobre las concentraciones de productos de oxidación de los lípidos, mediante la determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) o de productos específicos como el MDA y los F2-isoprostanos. También se analizan los productos de oxidación de proteínas, ya que la vitamina E disminuye la glicosilación de estas biomoléculas al disminuir la oxidación de los lípidos²⁴.

En la diabetes también se ha observado daño oxidativo al material genético¹⁸²⁻¹⁸⁵.

Sin embargo, a diferencia del efecto sobre la oxidación de lípidos y proteínas,

existen pocos datos que sustenten el papel de los suplementos de vitamina E en la reducción del daño oxidativo al ADN²⁴.

En el presente estudio se observó una mayor concentración de MDA y PAOP en los embriones de las ratas diabéticas, lo cual concuerda con estudios previos en embriones y fetos^{19-21,91,186}. Los mayores niveles se presentaron en los embriones malformados, retrasados y normales de las mismas camadas, mientras que en los de camadas sin alteraciones fueron similares a los encontrados en los controles. Los menores niveles en los embriones de las ratas que recibieron el suplemento pudieran sugerir un efecto antioxidante favorable del α -tocoferol.

Por otra parte, se ha reportado una disminución de las concentraciones del antioxidante GSH asociada a la diabetes^{97,98,182,186-189} y un incremento con el empleo de la vitamina E¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. En el presente estudio no se pudieron determinar las concentraciones de GSH de los embriones porque se encontraron muy bajas en las muestras para ser detectadas por la técnica empleada. Sin embargo, las concentraciones de este compuesto fueron mayores en los hígados de fetos de ratas diabéticas que recibieron el α -tocoferol.

Otros resultados mostraron que todas las ratas diabéticas sin suplemento presentaron implantaciones afectadas, a diferencia de las que recibieron el α -tocoferol. En estas últimas, el 27% (4/15) de las de 11,5 días de gestación y el 20% (4/20) de las de 20 días sólo presentaron embriones o fetos normales y el porcentaje de reabsorciones fue similar al observado en los controles. A esto se suma que las ratas de 20 días de gestación que recibieron el suplemento y no presentaron alteraciones en su descendencia mostraron concentraciones de GSH en el hígado

superiores al resto de las ratas diabéticas; esto último pudiera sugerir diferencias individuales en respuesta al α -tocoferol y un beneficio del control del estado redox de la madre para el desarrollo adecuado de su descendencia.

Investigaciones recientes indican que los suplementos de vitamina E pueden disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares en el subgrupo de pacientes diabéticos portadores del genotipo Hp 2-2 de la haptoglobina (Hp), con respecto a los portadores de los otros genotipos (Hp 1-1 y Hp 1-2)^{35,39}. La Hp es una proteína del plasma que se une a la hemoglobina (Hb) extracorpúscular y reduce su capacidad para mediar el daño oxidativo por el hierro del grupo hemo, al ser reconocidos los complejos Hb-Hp por los receptores CD136 de monocitos/macrófagos y retirados rápidamente de la circulación^{35,39}. El genotipo Hp 2-2 produce menor capacidad antioxidante que los otros, ya que los complejos Hb-Hp 2-2 permanecen en circulación más tiempo, por menor unión a CD136, con lo cual se favorece la interacción con las HDL, su oxidación y la aterosclerosis^{35,39}.

Los resultados de este estudio que relacionan el consumo de α -tocoferol con un incremento en las concentraciones de GSH concuerdan con evidencias previas de que esta vitamina no sólo actúa como antioxidante primario sino que también influye en el sistema de defensa antioxidante endógeno¹⁸⁸. El α -tocoferol pudiera incrementar las concentraciones de GSH al disminuir su utilización en la eliminación de peróxidos lipídicos y por favorecer su producción por las enzimas γ -glutamylcisteína sintetasa y glutatión reductasa, al protegerlas de la glicosilación en situaciones de hiperglicemia¹⁸⁸.

A pesar del incremento de las concentraciones de GSH en los fetos y ratas diabéticas que recibieron el suplemento, no se constataron modificaciones en otros marcadores de estrés oxidativo en estos grupos. Los resultados sugieren que los efectos favorables observados con el uso del α -tocoferol en embriones, fetos, placentas y el riñón de las ratas diabéticas pueden deberse a otros mecanismos de acción de esta vitamina además de su efecto antioxidante, lo cual requiere futuras investigaciones.

En otros estudios se han observado efectos del α -tocoferol que no se explican sólo por su capacidad antioxidante, como la disminución de los niveles de moléculas de adhesión solubles y la inhibición de la proliferación del músculo liso vascular, de la adhesión de monocitos a células endoteliales, de la liberación por los monocitos de citocinas pro-inflamatorias (IL-1: interleucina-1, IL-6: interleucina-6 y TNF- α : factor de necrosis tumoral α), así como de la adhesión y agregación plaquetaria^{65-67,190}. Además, el α -tocoferol se ha visto implicado en la regulación de la transducción de señales y la expresión de genes en diferentes vías celulares, a través de su interacción con enzimas como: PKC y PKB, proteína fosfatasa 2A, diacilglicerol quinasa, fosfolipasa A2, ciclooxigenasa 2 y 5-lipoxinasa^{65-67,190}.

En las ratas diabéticas se comprobó un incremento de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea. El incremento en la frecuencia de micronúcleos ha sido reportado previamente en modelos experimentales de diabetes¹⁹¹ y recientemente en embarazadas diabéticas y sus hijos¹⁹². Lo anterior aporta evidencias de que la diabetes afecta la integridad cromosómica, pudiendo ser

este uno de los factores que contribuya a la mayor incidencia de malformaciones congénitas en la descendencia.

Aunque los micronúcleos no son consecuencia específica de daño oxidativo al ADN, su incremento en pacientes diabéticos se ha relacionado con este tipo de daño; se ha observado una correlación positiva entre su frecuencia y los niveles de hemoglobina glicosilada^{193,194}, el daño oxidativo al ADN medido por el ensayo cometa^{185,194} y la formación de 8-hidroxi-guanosina¹⁹⁵.

La administración de α -tocoferol a las ratas diabéticas no modificó el índice de citotoxicidad ni la frecuencia de micronúcleos, similar a lo reportado en pacientes diabéticos¹⁹⁶. Este resultado muestra que el suplemento empleado no disminuyó el daño cromosómico provocado por la diabetes pero tampoco tuvo efectos genotóxicos ni citotóxicos en los animales.

Otro aspecto a señalar es que no se observaron diferencias con el uso del suplemento entre las ratas controles en ninguna de las variables analizadas en el estudio. Lo anterior pudiera corresponderse a que en los individuos saludables la protección antioxidante es suficiente⁶⁴, por lo que los suplementos de α -tocoferol serían beneficiosos sólo en enfermedades crónicas con una protección antioxidante inadecuada¹⁵¹.

Como puede apreciarse, son varios los efectos favorables del suplemento de α -tocoferol, tanto en las ratas diabéticas como en sus embriones, fetos y placentas. Sin embargo, como sucede en casi todos los estudios de este tipo, el empleo de α -tocoferol parece ser beneficioso pero no suficiente para prevenir completamente los daños provocados por la diabetes materna.

Por otra parte, es importante considerar que aunque el α -tocoferol es la forma de vitamina E más utilizada como suplemento, los otros miembros de esta familia poseen similar actividad antioxidante y otras potentes propiedades que han sido poco investigadas; de hecho, el término vitamina E es por lo general utilizado como sinónimo de α -tocoferol. Sin embargo, existen evidencias que indican que las formas de vitamina E no son redundantes con respecto a sus funciones biológicas¹⁹⁷.

Las formas γ -tocopherol, α -tocotrienol y δ -tocotrienol han emergido como moléculas con funciones claramente distintas a las del α -tocoferol. El γ -tocopherol ha mostrado propiedades anti-inflamatorias, antineoplásicas y natriuréticas superiores a las del α -tocoferol¹⁹⁷. Por su parte, los tocotrienoles poseen una potente actividad neuroprotectora, anticancerosa e hipocolesterolémica, que no siempre es exhibida por el α -tocoferol; por ejemplo, a concentraciones nanomolares el α -tocotrienol previene la neurodegeneración, no así el α -tocoferol¹⁹⁷.

Lo anterior evidencia la necesidad de continuar desarrollando estudios que permitan analizar la influencia de diferentes factores que pudieran ser determinantes en los efectos de los suplementos de vitamina E u otras estrategias de intervención para prevenir las complicaciones de la diabetes. Con este trabajo se ha logrado desarrollar todo un sistema experimental que ha permitido evaluar aspectos de la embriopatía diabética y de otras complicaciones de la diabetes en ratas y que constituye una plataforma para futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

1. La administración del suplemento de α -tocoferol a ratas diabéticas preñadas tuvo efectos favorables sobre el desarrollo de la descendencia durante el periodo prenatal.
2. Los beneficios del suplemento de α -tocoferol sobre el producto de la concepción de ratas diabéticas se asociaron a efectos favorables en el desarrollo de la placenta.
3. El suplemento de α -tocoferol protegió al riñón de las ratas de los daños provocados por la diabetes.
4. El suplemento de α -tocoferol no modificó el estado metabólico de las ratas diabéticas.
5. El suplemento de α -tocoferol no produjo genotoxicidad ni citotoxicidad en las ratas u otro efecto perjudicial sobre estas y su descendencia. Ello establece pautas para posibles intervenciones terapéuticas con adecuado margen de seguridad.
6. Los efectos favorables del suplemento de α -tocoferol en ratas diabéticas y su descendencia pudieran deberse a mecanismos diferentes a la acción antioxidante de esta vitamina, lo cual requiere futuros estudios.
7. Aunque la administración de α -tocoferol a ratas diabéticas preñadas ejerció efecto protector a diferentes niveles en la plataforma experimental utilizada, no previno totalmente las complicaciones de la gestación asociadas a la diabetes.

RECOMENDACIONES

1. Emplear el sistema experimental desarrollado en esta investigación en el estudio de los mecanismos implicados en la embriopatía y otras complicaciones de la diabetes, así como en la evaluación de estrategias para mejorar la salud de la madre diabética y su descendencia. Sería conveniente incluir el conteo de cuerpos lúteos gravídicos y la tinción de los cuernos uterinos en ausencia de sacos gestacionales por el método de Salewski, para confirmar las pérdidas pre y pos-implantación, como se analiza en la discusión de los resultados.
2. Explorar otros posibles mecanismos del α -tocoferol diferentes a su acción antioxidante, que pudieran explicar los efectos favorables de su uso como suplemento en la embriopatía y la nefropatía diabética en ratas, como la acción sobre citocinas proinflamatorias.
3. Evaluar la influencia en ratas diabéticas de suplementos de otras formas de vitamina E, como los tocotrienoles.
4. Profundizar en la influencia de la diabetes pregestacional y las estrategias terapéuticas sobre la placenta, con estudios histológicos (cualitativos y morfométricos) y bioquímicos.
5. Evaluar los efectos de la diabetes pregestacional y estrategias terapéuticas sobre el crecimiento y desarrollo postnatal de la descendencia de ratas diabéticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *Cell*. 2012; 148 (6): 1160-71.
2. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario estadístico de salud 2014. En: <http://www.sld.cu>
3. Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ Res*. 2010; 107 (9): 1058-70.
4. Clapés S, Fernández T, Suárez G. Oxidative stress and birth defects in infants of women with pregestational diabetes. *MEDICC Review* 2013; 15 (1): 37-40.
5. Salazar M, Reyes E, Revilla MC, Villavicencio L, Reyes A, Sánchez C. Importance of Maternal Diabetes on the Chronological Deregulation of the Intrauterine Development: An Experimental Study in Rat. *J Diabetes Res*. 2015; 2015: 354265.
6. Eriksson UJ, Wentzel P. Diabetic embryopathy. *Developmental Toxicology*. Humana Press. 2012; 425-36.
7. Eberle C, Ament C. Diabetic and metabolic programming: mechanisms altering the intrauterine milieu. *ISRN Pediatr*. 2012; 2012: 975685.
8. Wentzel P, Wentzel CR, Gäreskog MB, Eriksson UJ. Induction of embryonic dysmorphogenesis by high glucose concentration, disturbed inositol metabolism, and inhibited protein kinase C activity. *Teratology*. 2001; 63 (5): 193-201.
9. Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ. Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered PGE2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. *Diabetes*. 1999; 48 (4): 813-20.
10. Jawerbaum A, Capobianco E. Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: Implications in maternal diabetes. *Placenta*. 2011; 32 (25): S212-7.
11. Loeken MR. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc Gynecol Invest*. 2006; 13 (1): 2-10.

12. Castori M. Diabetic Embryopathy: A Developmental Perspective from Fertilization to Adulthood. *Mol Syndromol* 2013; 4 (1-2): 74-86.
13. Wentzel P, Thunberg L, Eriksson UJ. Teratogenic effects of diabetic serum is prevented by supplementation of superoxide dismutase and N- acetylcysteine in rat embryo culture. *Diabetologia*. 1997; 40 (1): 7-14.
14. Gäreskog M, Wentzel P. N-acetylcysteine and alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid alter protein kinase C (PKC)-delta and PKC-zeta and diminish dysmorphogenesis in rat embryos cultured with high glucose in vitro. *J Endocrinol*. 2007; 192 (1): 207-14.
15. Viana M, Herrera E, Bonet B. Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention with vitamin E. *Diabetologia*. 1996; 39 (9): 1041-46.
16. Viana M, Auroma OI, Herrera E, Bonet B. Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29 (11): 1115-21.
17. Viana M, Castro M, Barbas C, Herrera E, Bonet B. Effect of different doses of vitamin E on the incidence of malformations in pregnant diabetic rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2003; 47 (1): 6-10.
18. Simán C M, Gittenberg-De AC, Wisse B, Eriksson UJ. Malformations in offspring of diabetic rats: Morphometric analysis of neural crest-derived organs and effects of maternal vitamin E treatment. *Teratology*. 2000; 61 (5): 355-67.
19. Cederberg J, Eriksson UJ. Antioxidative treatment of pregnant diabetic rats diminishes embryonic dysmorphogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. (Part A)* 2005; 73 (7): 498-505.
20. Wentzel P, Eriksson UJ. A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E2 in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Defects Research A Clin Mol Teratol*. 2005; 73 (7): 506-11.
21. Cederberg J, Simán CM, Eriksson UJ. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr Res*. 2001; 49 (6): 755-62.

22. Gäreskog M, Eriksson UJ, Wentzel P. Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats. *Birth Defects Research A Clin Mol Teratol.* 2006; 76 (6): 483-90.
23. Zhao Z, Reece EA. New concepts in diabetes embryopathy. *Clin Lab Med.* 2013; 33 (2): 207-33.
24. Pazdro RJ. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mech Ageing Dev.* 2010; 131(4): 276-86.
25. Hajiani M, Razi F, Golestani A, Frouzandeh M, Owji AA, Khaghani S, et al. Time and dose-dependent differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase enzymatic activity and mRNA level by vitamin E in rat blood cells. *Redox Rep.* 2012; 17 (3): 101-7.
26. Chen CS, Wells PG. Enhanced tumorigenesis in p53 knockout mice exposed in uterus to high-dose vitamin E. *Carcinogenesis.* 2006; 27 (7): 1358-68.
27. Jain AB, Jain VA. Vitamin E, its beneficial role in diabetes mellitus (DM) and its complications. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2012 ; 6 (10): 1624-8.
28. Ward NC, Wu JHY, Clarke MW, Puddey IB, Burke Valerie, Croft Kevin D, et al. The effect of vitamin E on blood pressure in individuals with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens.* 2007; 25 (1): 227-34.
29. Park S, Choi SB. Effects of alpha tocoferol supplementation and continuous subcutaneous insulin infusion on oxidative stress in Korean patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75 (4): 728-33.
30. Skyrme-Jones RA, O'Brien RC, Barry KL, Meredith IT. Vitamin E supplementation improves endothelial function in type 1 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36 (1): 94-102.
31. Paolisso G. Chronic vitamin E administration improves brachial reactivity and increases intracellular magnesium concentration in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85 (1): 109-15.
32. Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative

- stress and inflammation in subjects with metabolic síndrome. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44 (6): 1203-08.
33. Chappell LC, Seed PT, Kelly FJ, Briley A, Hunt BJ, Charnock-Jones DS, et al. Vitamin E and C supplementation in women at risk of pre-eclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187 (3): 777-84.
 34. Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, et al. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005; 294 (1): 56-65.
 35. Farid N, Inbal D, Nakhoul N, Evgeny F, Miller-Lotan R, Levy AP, et al. Vitamin E and diabetic nephropathy in mice model and humans. *World J Nephrol*. 2013; 2 (4): 111-124.
 36. Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians Health Study II randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 300 (18): 2123-33.
 37. The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high risk patients. *N Engl J Med*. 2000; 342 (3): 154-60.
 38. The HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer. A randomized controlled trial. *JAMA*. 2005; 293 (11): 1338-47.
 39. Goldenstein H, Levy NS, Lipener YT, Levy AP. Patient selection and vitamin E treatment in diabetes mellitus. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2013; 11 (3): 319-26.
 40. Poston L, Igosheva N, Mistry HD, Seed PT, Shennan AH, Rana S, et al. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *Am J Clin Nutr*. 2011; 94 (Suppl 6): 1980S-5S.

41. Roberts JM, Myatt L, Spong CY, Thom EA, Hauth JC, Leveno KJ, et al. Vitamins C and E to prevent complications of pregnancy-associated hypertension. *N Engl J Med*. 2010; 362 (14): 1282-91.
42. Bodnar LM, Tang G, Ness RB, Harger G, Roberts JM. Periconceptional multivitamin use reduces the risk of preeclampsia. *Am J Epidemiol* 2006; 164 (5): 470-7.
43. Damasceno DC, Netto AO, Iessi L, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, et al. Streptozotocin-Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 819065.
44. Gizzo S, Patrelli TS, Rossanese M, Noventa M, Berretta R, Di Gangi S, et al. An update on diabetic women obstetrical outcomes linked to preconception and pregnancy glycemic profile: a systematic literature review. *The Scientific World Journal*. 2013; 2013: 254901.
45. Sakamaki H, Akazawa S, Ishibashi M, Izumino K, Takino H, Yamasaki H, et al. Significance of glutathione- dependent antioxidant system in diabetes- induced embryonic malformations. *Diabetes*. 1999; 48 (5): 1138-44.
46. Damasceno DC, Tadeu G, Paranhos IM, Cunha MV. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci*. 2002; 72 (3): 235-44.
47. Damasceno DC, Kempinas WG, Tadeu GT, Consoni M, Cunha MV, Paumgarten FJ. Anomalias congênitas: estudos experimentais. Belo Horizonte: Coopmed; 2008.
48. Sivan E, Lee YK, Wu YK, Reece EA. Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology*. 1997; 56 (6): 343-49.
49. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37 (Suppl 1): S81-90.
50. Malpica E, Pérez M, García K. Diabetes mellitus y embarazo. Revisión Bibliográfica. *Rev Méd Electr*. 2008; 30 (6)
51. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, Hebrok M, Herold KC, Accili D, et al. How does type 1 diabetes develop? The notion of homicide or β -cell suicide revisited. *Diabetes*. 2011; 60 (5): 1370-79.

52. Kaneto H, Matsuoka T. Involvement of oxidative stress in suppression of insulin biosynthesis under diabetic conditions. *Int J Mol Sci.* 2012; 13 (10): 13680-90.
53. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative Stress and the Etiology of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(5): 993-9.
54. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011; 25 (3): 287-99.
55. Zhang Y, Du Y, Le W, Wang K, Kieffer N, Zhang J. Redox control of the survival of healthy and diseased cells. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15 (11): 2867-908.
56. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142 (2): 231-55.
57. Limon-Pacheco J, Gonshebat ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 2009; 674 (1): 137-47.
58. Xiong Y, Uys JD, Tew KD, Townsend DM. S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15 (1): 233-70.
59. Beutler E. Improved assay of the enzymes of glutathione synthesis. *Clin Chim Acta.* 1986; 158 (1): 115-23.
60. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009; 390 (3): 191-214.
61. Kono N, Arai H. Intracellular Transport of Fat-Soluble Vitamins A and E. *Traffic.* 2015; 16 (1): 19-34.
62. Traber MG. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J Lipid Res.* 2013; 54 (9): 2295-2306.
63. Benítez DE. Vitaminas y oxidoreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2006; 25 (2)
64. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43 (1): 4-15.

65. Azzi A, Zingg J. Vitamin E. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2005; 33 (3): 184-7.
66. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991; 266 (10): 6188-94.
67. Ricciarelli R, Zingg J, Azzi A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation*. 2000; 102 (1): 82-7.
68. Mari M, Colell A, Morales A, von Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12 (11):1295-331.
69. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47 (5): 469-84.
70. Esterbauer H, Cheeseman K H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 407-21.
71. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015; 5 (1): 194-222.
72. Kalousavá M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with Diabetes Mellitus. *Physiol Res*. 2002; 51 (6): 597-604.
73. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*. 2005; 120 (4): 483-95.
74. Smith JA, Park S, Krause JS, Banik NL. Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochem Int*. 2013; 62 (5): 764-75.
75. Ramasamy R, Goldberg IJ. Aldose reductase and cardiovascular deceases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circ Res*. 2010; 106 (9): 1449-58.

76. Mondal NK, Sorensen E, Hiivala N, Feller E, Griffith B, Wu ZJ. Oxidative stress, DNA damage and repair in heart failure patients after implantation of continuous flow left ventricular assist devices. *Int J Med Sci.* 2013; 10 (7): 883-93.
77. Sireesha k, Sailaja P. Oxidative stress and diabetes: an overview. *Asian J Pharm Clin Res.* 2015; 8 (1): 15-19.
78. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest.* 2003; 112 (7): 1049-57.
79. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes.* 2005; 54 (6): 1615-25.
80. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes,* 2010; 59 (1): 249-55.
81. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldbirg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 (22): 12222-6.
82. Horal M, Zhang Z, Stanton R, Virkamäki A, Loeken MR. Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: involvement in diabetic teratogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004; 70 (8): 519-27.
83. Geraldles P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res.* 2010; 106 (8): 1319-31.
84. Geraldles P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leiges M, Marette A, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med.* 2009; 15 (11): 1298-306.

85. Pugliese G, Pricci F, Pugliese F, Mene P, Lenti L, Andreani D, et al. Mechanisms of glucose-enhanced extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells. *Diabetes*. 1994; 43 (3): 478-90.
86. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation*. 2000; 101 (6): 676-81.
87. Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes*. 1997; 46 (9): 1497-1503.
88. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008; 205 (10): 2409-17.
89. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, Balcerczyk A, George P, Baker EK, et al. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that co-exist on the lysine tail. *Diabetes*. 2009; 58 (5): 1229-36.
90. Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Kermit R. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Research (part c)* 2015; 105 (1): 53-72.
91. Li R, Chase M, Jung SK, Smith P, Loeken MR. Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 289 (4): E591-9.
92. Ejdesjö A, Wentzel P, Eriksson UJ. Influence of maternal metabolism and parental genetics on fetal maldevelopment in diabetic rat pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 302 (10): E1198-209.

93. Dennerly PA. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2007; 81 (3): 155-62.
94. Lager S, Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. *Journal of Pregnancy*. 2012; 2012: 179827.
95. García D, García R. Avances en la patogénesis de la embriopatía diabética. *Rev Med Chil*. 2009; 137 (12): 1627-35.
96. Zangen S W, Ryu S, Ornoy A. Alterations in the expression of antioxidant genes and the levels of transcription factor NF-Kappa B in relation to diabetic embryopathy in the Cohen diabetic rat model. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2006; 76 (2): 107-14.
97. Trocino RA, Akazawa S, Ishibashi M, Matsumoto K, Matsuo H, Yamamoto H, et al. Significance of glutathione depletion and oxidative stress in early embryogenesis in glucose-induced rat embryo culture. *Diabetes*. 1995; 44 (8): 992-8.
98. Menegola E. Broccia ML, Prati M, Ricolfi R, Giavani E. Glutathione status in diabetes induced enbryopathies. *Biol Neonate*. 1996; 69 (5): 293-7.
99. Ornoy A, Zaken V, Kohen R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes- induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology*. 1999; 60 (6): 376- 86.
100. Zabihi S, Wentzel P, Eriksson UJ. Altered uterine perfusion is involved in fetal outcome of diabetic rats. *Placenta*. 2008; 29 (5): 413-21.
101. Wentzel P, Ejdesjö A, Eriksson UJ. Maternal diabetes in vivo and high glucose in vitro diminish GAPDH activity in rat embryos. *Diabetes*. 2003; 52 (5): 1222-8.
102. Khandelwal M, Reece EA, Wu YK, Boreinstein M. Dietary myo- inositol therapy in hyperglycemia- induced embryopathy. *Teratology*. 1998; 57 (2): 79-84.
103. Jawerbaum A, González ET, Sinner D, Pustovrh C, White V, Gimeno MA. Diminished PGE2 content enhanced PGE2 release and defects in 3H-PGE2 transport in embryos from overtly diabetic rats. *Reprod Fertil Dev*. 2000; 12 (4): 141-7.

104. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature*. 2008; 454 (7203): 470-7.
105. Shenderov BA, Midtvedt T. Epigenomic programing: a future way to health? *Microb Ecol Health Dis*. 2014; 25: 20145.
106. El Hajj N, Schneider E, Lehnen H, Haaf T. Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment. *Reproduction*. 2014; 148 (6): R111–R120.
107. Ringholm L, Mathiesen ER, Kelstrup L, Damm P. Managing type 1 diabetes mellitus in pregnancy-from planning to breastfeeding. *Nat Rev Endocrinol*. 2012; 8 (11): 659-67.
108. Cruz J, Márquez A, Lang J, Valdés L. Care for Pregnant Diabetics in Cuba: Achievements and Challenges. *MEDICC Review*. 2013; 15 (3): 38-41.
109. Naudi A, Jove M, Ayala V, Cassanye A, Serrano J, Gonzalo H, et al. Celular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. *Exp Diabetes Res*. 2012; 2012: 696215.
110. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr*. 2009; 1 (21): 1-7.
111. Jawerbaum A, White V. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocrine Reviews*. 2010; 31 (5): 680-701.
112. Eriksson UJ, Borg LA. Diabetes and embryonic malformation. Role of substrate-induced free oxygen radical production for dysmorphogenesis in culture rat embryos. *Diabetes*. 1993; 42 (3): 411-9.
113. Wentzel P, Eriksson UJ. 8-Iso-PGF (2alfa) administration generates dysmorphogenesis and increases lipid peroxidation in rat embryos in vitro. *Teratology*. 2002; 66 (4): 164-8.
114. Guijarro MV, Indart A, Aruoma OI, Viana M, Bonet B. Effects of ergothioneine on diabetic embryopathy in pregnant rats. *Food Chem Toxicol*. 2002; 40 (12): 1751-5.

115. Moazzen H, Lu X, Ma NL, Velenosi TJ, Urquhart BL, Wisse LJ, Wisse LJ, et al. N-acetylcysteine prevents congenital heart defects induced by pregestational diabetes. *Cardiovascular Diabetology*. 2014, 13 (46): 1-13.
116. Sivan E, Reece EA, Wu YK, Homko CJ, Polansky M, Borenstein M. Dietary vitamin E prophylaxis and diabetic embryopathy: morphologic and biochemical analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 175 (4): 793-9.
117. Reece EA, Wu YK. Prevention of diabetic embryopathy in offspring of diabetic rats with use of a cocktail of deficient substrates and an antioxidant. *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 176 (4): 790-8.
118. Simán CM, Eriksson UJ. Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes*. 1997; 46 (6): 1416-61.
119. Yang X, Borg LA, Simán CM, Eriksson UJ. Maternal antioxidant treatments prevent diabetes- induced alterations of mitochondrial morphology in rat embryos. *Anat Rec*. 1998; 251 (3): 303-15.
120. Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Zarzycki W, Kinalska I. Antioxidant therapy and streptozotocin- induced diabetes in pregnant rats. *Acta Diabetol*. 1999; 36 (3): 113-7.
121. Chertow B. Advances in diabetes for the millennium: vitamins and oxidant stress in diabetes and its complications. *Med Gen Med*. 2004; 6 (Suppl 3): 25-31.
122. Golestani A, Rastegar R, Shariftabrizi A, Khaghani S, Payabvash SM, Salmasi AH, et al. Paradoxical dose- and time dependent regulation of superoxide dismutase and antioxidant capacity by Vit E in rat. *Clin Chim Acta*. 2006; 365 (1): 153-9.
123. White V, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Capobianco E, González E. Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Reprod Fertil Dev*. 2002; 14 (2): 117-23.
124. Nash P, Olovsson M, Eriksson UJ. Placental dysfunction in Suramin-treated rats: impact of maternal diabetes and effects of antioxidative treatment. *J Soc Gynecol Investig*. 2005; 12 (3): 174-84.
125. Simşek M, Nazıroğlu M, Erdinç A. Moderate exercise with a dietary vitamin C and E combination protects against streptozotocin-induced oxidative damage

- to the kidney and lens in pregnant rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005; 113 (1): 53-9.
126. Nash P, Eriksson UJ. Suramin-restricted blood volume in the placenta of normal and diabetic rats is normalized by vitamin E treatment. *Placenta*. 2007; 28 (5): 505-15.
 127. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 1994; 43 (11): 1326-33.
 128. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol*. 1990; 127 (1): 161-5.
 129. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36 (Pt 3): 343-7.
 130. Institute for Laboratory Animal Resources. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: National Academy Press, 1996.
 131. Kim NN, Stankovic M, Cushman TT, Goldstein I, Munarriz R, Traish AM. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal, hemodynamics, morphology and biochemical markers. *BMC Physiol*. 2006; 6 (4): 1-9.
 132. American Association for Laboratory Animal Science. Laboratory mouse handbook. Crestwyn Hills Drive: Memphis; 2006.
 133. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 2000; 455 (1): 155-66.
 134. Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res*. 1969; 26 (1): 31-43.
 135. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel*. 2009; 25 (3): 22-38.
 136. Rasband W. Image J: A public domain Java image processing program. National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

137. Sung JK, Koh JH, Lee MY, Kim BH, Nam SM, Kim JH, et al. Aldose reductase inhibitor ameliorates renal vascular endothelial growth factor expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J.* 2010; 51 (3): 385-91.
138. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the foling phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193 (1): 265-75.
139. Bunce M. PCR-SSP typing. En: Bidewell JI, Navarrete C. *Histocompatibility testing.* Cap 5. England: Imperial College Press; 2000. Pág. 149-86.
140. Tomé O, Cruz Y, Alfonso C, Selva S, Cruz MA. Estudio somatométrico de crías de rata con crecimiento intrauterino retardado desde el nacimiento hasta el destete. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2006; 25 (4)
141. Consonni M, Damasceno DC, De Grava W, Capelli AC, Volpato GT, Dallaqua B, et al. Effect of oral supplementation of the linoleic and gammalinolenic acids on the diabetic pregnant rats. *Braz Arch Biol Technol.* 2012; 55 (5): 695-703.
142. Turkez H, Aydın E, Geyikoglu F, Cetin D. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene in vitro. *Cytotechnology.* 2015; 67 (3): 409-18.
143. Boyum A. Islation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Sacand J Clin Lab Invest.* 1968; Suppl 97: 77-89.
144. Del Cerro M, Cogen J, Del Cerro C. Stevenel Blue, an excellent stain for optical microscopical study of plastic embedded tissue. *Microsc Acta.* 1980; 83 (2): 117-21.
145. Wentzel P, Gäreskog M, Eriksson UJ. Folic acid supplementation diminishes diabetes and glucose induced dysmorphogenesis in rat embryos in vivo and in vitro. *Diabetes.* 2005; 54 (2): 546-53.
146. Hisakazu M. Determination of nitrate in biological fluids using nitrate reductase in a flow system. *J Health Sci.* 2001; 47 (1): 65-7.
147. Gutteridge JM. Free-radical damage to lipids, aminoacids, carbohydrates and nucleic acids determined by thiobarbituric acid reactivity. *Int J Biochem.* 1982; 14 (7): 649-53.
148. Neboh EE, Emeh JK, Aniebue UU, Ikekpeazu EJ, Maduka IC, Ezeugwu FO. Relationship between lipid and lipoprotein metabolism in trimesters of

- pregnancy in Nigerian women: Is pregnancy a risk factor? *J Nat Sci Biol Med.* 2012; 3 (1): 32-7.
149. Mankuta D, Elami-Suzin M, Elhayani A, Vinker S. Research lipid profile in consecutive pregnancies. *Lipids in Health and Disease.* 2010; 9 (58): 1-4.
 150. Kriskal BS, Vigneau- Callahan, KE, Moskowitz, AJ, Matson WR. Purine catabolism: links to mitochondrial respiration and antioxidant defenses? *Arch Biochem Biophys.* 1999; 370 (1): 22- 33.
 151. Haidara MA, Mikhailidis DP, Rateb MA, Ahmed ZA, Yassin HZ, Ibrahim IM, et al. Evaluation of the effect of oxidative stress and vitamin E supplementation on renal function in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2009; 23 (2): 130-6.
 152. Nell S, Bahtz R, Bossecke A, Kipp A, Landes N, Bumke-Vogt C, et al. PCR-verified microarray analysis and functional in vitro studies indicate a role of alpha-tocopherol in vesicular transport. *Free Radic Res.* 2007; 41 (8): 930-42.
 153. Eriksson UJ, Cederberg J, Wentzel P. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers. Animal and human studies. *Endocrinol Metab Dis.* 2003; 4 (1): 79-93.
 154. Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51 (5): 1000-13.
 155. Zafar M, Naeem-ul-Hassan Naqvi S; Ahmed M, Kaimkhani ZA. Altered kidney morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int J Morphol.* 2009; 27 (3): 783-90.
 156. The DCCT/EDIC Research Group. Intensive Diabetes Therapy and Glomerular Filtration Rate in Type 1 Diabetes. *N Engl J Med.* 2011; 2011 (365): 2366-76.
 157. Farvid MS, Jalali M, Siassi F, Hosseini M. Comparison of the effects of vitamins and/or mineral supplementation on glomerular and tubular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005; 28 (10): 2458-64.
 158. Montero A, Munger KA, Khan RZ, Valdivielso JM, Morrow JD, Guasch A, et al. F2-isoprostanes mediate high glucose-induced TGF- β synthesis and

- glomerular proteinuria in experimental type I diabetes. *Kidney Int.* 2000; 58 (5): 1963-72.
159. Koya D, Hayashi K, Kitada M, Kashiwagi A, Kikkawa R, Haneda M. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14 (Suppl 3): S250-3.
 160. Qian P, Cheng S, Guo J, Niu Y. Effects of vitamin E and vitamin C on nonenzymatic glycation and peroxidation in experimental diabetic rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2000; 29 (4): 226-8.
 161. Jacheć W, Tomasik A, Tarnawski R, Chwalińska E. Evidence of oxidative stress in the renal cortex of diabetic rats: favorable effect of vitamin E. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002; 62 (1): 81-8.
 162. Park NY, Park SK, Lim Y. Long-term dietary antioxidant cocktail supplementation effectively reduces renal inflammation in diabetic mice. *Br J Nutr.* 2011; 106 (10): 1514-21.
 163. Phillips JK, Vance AM, Raj RS, Mandalá M, Linder EA, Gokina NI. Impact of experimental diabetes on the maternal uterine vascular remodeling during rat pregnancy. *Reprod Sci.* 2012; 19 (3): 322-31.
 164. Sinzato YK, Volpato GT, Iessi IL, Bueno A, Calderon Ide M, Rudge MV, et al. Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 108163.
 165. Morgan SC, Relaix F, Sandell LL, Loeken MR. Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82 (6): 453-63.
 166. Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38 (5): 894-903.
 167. Wentzel P, Eriksson UJ. Altered gene expression in rat cranial neural crest cells exposed to a teratogenic glucose concentration in vitro: paradoxical downregulation of antioxidative defense genes. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2011; 92 (5): 487-97.

168. Wu Y, Viana M, Thirumangalathu S, Loeken MR. AMP-activated protein kinase mediates effects of oxidative stress on embryo gene expression in a mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetologia*. 2012; 55 (1): 245-54.
169. Wang XD, Morgan SC, Loeken MR. Pax 3 stimulates p53 ubiquitination and degradation independent of transcription. *PLoS one*. 2011; 6 (12): e29379.
170. Wei D, Loeken MR. Increased DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b)-mediated CpG island methylation stimulated by oxidative stress inhibits expression of a gene required for neural tube and neural crest development in diabetic pregnancy. *Diabetes*. 2014; 63 (10): 3512-22.
171. Lee AT, Reis D, Eriksson UJ. Hyperglycemia-induced embryonic dysmorphogenesis correlates with genomic DNA mutation frequency in vitro and in vivo. *Diabetes*. 1999; 48 (2): 371-6.
172. Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, Weimann A, Petersen M, Andersen JT, et al. Urinary markers of nucleic acid oxidation and long-term mortality of newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2011; 34 (12): 2594-6.
173. Cross JC. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2000; 11 (2): 105-13.
174. Jirkovská M, Kučera T, Kaláb J, Jadrníček M, Niedobová V, Janáček J, et al. The branching pattern of villous capillaries and structural changes of placental terminal villi in type 1 diabetes mellitus. *Placenta*. 2012; 33 (5): 343-51.
175. Rudge MV, Lima CP, Damasceno DC, Sinzato YK, Napoli G, Rudge CV, et al. Histopathological placental lesions in mild gestational hyperglycemic and diabetic women. *Diabetol Metab Syndr*. 2011; 3 (1): 1-6.
176. Korgun ET, Acar N, Sati L, Kipmen-Korgun D, Ozen A, Unek G, et al. Expression of glucocorticoid receptor and glucose transporter-1 during placental development in the diabetic rat. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011; 49 (2): 325-34.
177. Giachini FR, Carriel V, Capelo LP, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB, et al. Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. *J Anat*. 2008; 212 (1): 31-41.

178. Padmanabhan R, Shafiullah M. Intrauterine growth retardation in experimental diabetes: possible role of the placenta. *Arch Physiol Biochem*. 2001; 109 (3): 260-71.
179. Calderon IMP, Rudge MVC, Brasil MAM, Henry MACA. Diabete e gravidez experimental em ratas I. Indução do diabete, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cir Bras*. 1992; 7(4): 142-6.
180. Zingg JM, Meydani M, Azzi A. α -Tocopheryl phosphate -an activated form of vitamin E important for angiogenesis and vasculogenesis?. *Biofactors*. 2012; 38 (1): 24-33.
181. Jishage K, Tachibe T, Ito T, Shibata N, Suzuki S, Mori T, et al. Vitamin E is essential for mouse placentation but not for embryonic development itself. *Biology of Reproduction*. 2005; 73 (5): 983-7.
182. Fernández T, Clapés S, Suárez G, Casanueva K, Armas D, Tormo MC, et al. Marcadores de estrés oxidativo en embarazadas diabéticas. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2010; 29 (4)
183. Goodarzi MT, Navidi AA, Rezaei M, Babahmadi-Rezaei H. Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes. *J Clin Lab Anal*. 2010; 24 (2): 72-6.
184. Qiu C, Hevner K, Abetew D, Enquobahrie DA, Williams MA. Oxidative DNA damage in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus: a pilot study. *Clin Biochem*. 2011; 44 (10): 804-8.
185. Palazzo RP, Bagatini PB, Schefer PB, de Andrade FM, Maluf SW. Genomic instability in patients with type 2 diabetes mellitus on hemodialysis. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012; 34 (1): 31-5.
186. Ryu S, Kohen R, Samuni A, Ornoy A. Nitroxide radicals protect cultured rat embryos and yolk sacs from diabetic-induced damage. *Birth Defects Research (Part A)*. 2007; 79 (8): 604-11.
187. Gezginci-Oktayoglu S, Basaraner H, Yanardag R, Bolkent S. The effects of combined treatment of antioxidants on the liver injury in STZ diabetic rats. *Dig Dis Sci*. 2009; 54 (3): 538-46.

188. Jain SK, McVie R, Smith T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of Type 1 diabetic children. *Diabetes Care*. 2000; 23 (9): 1389-94.
189. Hamblin M, Smith HM, Hill MF. Dietary Supplementation With Vitamin E Ameliorates Cardiac Failure in Type I Diabetic Cardiomyopathy by Suppressing Myocardial Generation of 8-*iso*-Prostaglandin F₂ α and Oxidized Glutathione. *J Card Fail*. 2007; 13 (10): 884-92.
190. Zingg JM, Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr Med Chem*. 2004; 11 (9): 1113-33.
191. Zúñiga GM, Batista CM, Gómez BC, Ramos ML, Zamora AL, Muñoz T, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients not in an animal model. *Mutat Res*. 2007; 634 (1): 126-34.
192. Witczaka M, Ferenc T, Gulczyńska E, Nowakowska D, Łopaczyńska D, Wilczyński J. Elevated frequencies of micronuclei in pregnant women with type 1 diabetes mellitus and in their newborns. *Mutat Res*. 2014; 763: 12-7.
193. Shettigar SK, Shailaja C, Kulkarni RK. Elevated micronuclei frequency in type 2 diabetes with high glycosylated hemoglobin. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012; 95: 246- 50.
194. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, Picano E. The association of micronuclei frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis*. 2011; 26 (1): 77-83.
195. Lazalde BP, Zamora AL, Macías M, Velázquez C, Zúñiga GM. DNA and oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Archives of Medical Research*. 2012; 43 (6): 476-81.
196. Fenech M, Dreosti I, Aitken C. Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*. 1997; 18 (2): 359-64.
197. Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Sci*. 2006; 78 (18): 2088-98.

ANEXO

Tabla 1. Variables de química sanguínea sin alteraciones de ratas de 11,5 días de gestación

Grupos	Proteínas (g/l)	Albúmina (g/l)	Ácido úrico (μ M)	Triacilgliceroles (mM)	Colesterol (mM)
CVe	56,0	33,0	60,0	0,9	1,0
CEe	55,0	35,0	64,0	1,0	1,0
DVe	53,0	29,0	83,0	0,9	1,3
DEe	56,0	30,0	71,0	1,0	1,3

Se presenta el valor de la mediana de las variables ya que no siguieron una distribución normal.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos al comparar estas variables.

CVe: control con vehículo; CEe: control con α -tocoferol; DVe: diabética con vehículo; DEe: diabética con α -tocoferol.

Tabla 2. Variables de química sanguínea sin alteraciones de ratas de 20 días de gestación

Grupos	Proteínas (g/l)	Albúmina (g/l)	Ácido úrico (μ M)	Triacilgliceroles (mM)	Creatinina (μ M)
Cf	56,0	33,0	174,0	2,7	59,5
DVf	56,0	34,0	199,5	2,3	66,5
DEf	60,0	35,0	204,0	2,0	61,0

Se muestra el valor de la mediana de las variables ya que no siguieron una distribución normal.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos al comparar estas variables.

Cf: control; DVf: diabética con vehículo; DEf: diabética con α -tocoferol.