

ISCM-HABANA
ICBP "VICTORIA DE GIRÓN"

**TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA
SALUD**

**ESTRÉS OXIDATIVO Y FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN LA GESTACIÓN
DIABÉTICA**

Autor: Ing. Sonia Clapés Hernández

Ciudad de la Habana
2007

ISCM-HABANA
ICBP “VICTORIA DE GIRÓN”

**TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA
SALUD**

**ESTRÉS OXIDATIVO Y FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN LA GESTACIÓN
DIABÉTICA**

Autor: Ing. Sonia Clapés Hernández

Tutor: Dr. Bartolomé Bonet Serra DC

Asesores: Dr. Lemay Valdés Amador DC
Dr. Rolando Hernández Fernández

Ciudad de la Habana
2007

DEDICATORIA

A mi hija, que representa el mayor estímulo a mi superación

A mi esposo, por su apoyo de siempre

A mis queridos alumnos de estos 20 años, que renuevan mis anhelos de
saber más para ellos.

A mis padres que tanto lamentaron no poderme llamar doctora

Al querido y recientemente fallecido profesor de la CUJAE Raúl Díaz

A mis amigas de siempre, esas que tanto representan para mí.

AGRADECIMIENTOS

Para la dirección de Girón, pero muy especialmente a las Dras Mercedes Gámez , Alina Alem y Aleida Herrera, pues su apoyo ha contribuido a la culminación de este trabajo.

Al Dr. José Carlos García por alentarme a trabajar en este tema y por lo que le debo en mi formación profesional.

Al Dr. Bartolomé Bonet de la Universidad San Pablo CEU en Madrid porque me dio más que apoyo moral y material, puso en mis manos algunas de sus propias ideas, y me dio libertad para ejecutar las mías.

A la dirección del CNGM, en especial a Aracelis por lo que me enseñó y por abrirme una puerta que nunca se cerró gracias a ella, a Anduriña y a todo ese maravilloso colectivo del departamento de citogenética del CNGM.

A mis queridos compañeros del departamento de Bioquímica por estimularme y apoyarme siempre, no sé que haría sin ese entrañable colectivo, exigente y solidario, al que se van uniendo gente joven que sin estar a la sombra, respetan la jerarquía del conocimiento. No hay que enumerarlos, todos están incluidos, pero explícitamente quiero expresar mi agradecimiento a Estervina, increíblemente presente siempre que se le necesite.

Particularmente agradecida estaré siempre de Cristina, por todo el empeño que puso en este trabajo y por tantas muestras que procesó para mí, porque junto a Beba, Olivia y Tania han representado la garantía de continuidad del trabajo y seguridad en los resultados.

A mi querido jefe y amigo Rolando, por su ejemplo de revolucionario y profesional comprometido, por confiar en mí y ser mi eterno profesor consultante.

A los médicos del servicio de diabetes y embarazo del Hospital González Coro: Lemay, Santana, Miriam, Lang y el resto del personal de esa sala por acceder a colaborar conmigo y facilitarme toda la información necesaria sobre los pacientes.

A mis compañeras del laboratorio de fisiología de la universidad San Pablo CEU, por trabajar conmigo "en equipo", por ser mis amigas y ayudarme incondicionalmente, María del Valle, Ana, Isabel, Esperanza. Sin ellas todo hubiera sido más difícil.

A la Dra. Omaidá Torres del servicio de diabetes del Hospital Julio Trigo y al resto de su equipo: Ulises, Rosario y Amalia, porque su disposición a colaborar con esta investigación no ha flaqueado nunca.

Inestimable la ayuda que recibí de los especialistas en bioestadística Esteban Egaña y Jorge Bacallao, fue una suerte contar con su cooperación.

A los compañeros que formaron parte del colectivo de CIBIOMED durante los primeros años, porque entre tanto entusiasmo y cooperación surgió la idea de este trabajo. Le debo las gracias a Félix, Lourdes, Elio, Maité, Anamarys, por ayudarme con los reactivos y procesar algunas muestras.

A todos los residentes que han trabajado conmigo mano a mano mientras trabajaba en esta tesis: Daisy, Anay, Damaris, Karel, Liet.

A mis compañeros de carrera, que donde quiera que están siempre me tienden la mano, pero muy especialmente a Jorge Luis Vega del centro de Biotecnología y Doris Pérez directora de MEDSOL.

ABREVIATURAS

¹O₂: Singulete del oxígeno

AA: Ácido Araquidónico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AGE: Productos Finales de la Glicosilación Avanzada

ALAD Asociación Latinoamericana de Diabetes

ATP: Trifosfato de Adenosina

CAT: Catalasa.

COX₂: Ciclooxigenasa 2

DAG Diacilglicerol

DEP: Diabéticas Embarazadas con diabetes Pregestacional

DTN: Defectos del tubo de neural

eNOS Sintasa de oxido nítrico endotelial

ERN Especies reactivas del nitrógeno

ERO: Especies Reactivas del Oxígeno.

FLA₂ Fosfolipasa A2

GAPDH Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GlcNAc N-acetilglucosamina

GP: Glutación Peroxidasa

GR: Glutación Reductasa

GSH: Glutación Reducido

H₂O₂ Peróxido de hidrógeno

HLA: Anticuerpos Linfoides Humanos

IFC: Índice de Fragilidad Cromosómica

IL-1 Interleucina 1

ILGF-1: Factor de crecimiento insulinoide 1, IGF-1

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad

MDA: Malondialdehido

MFC: malformaciones congénitas

MnSOD Superoxido Dismutasa dependiente de Manganeso.

NAC: N-Acetilcisteína

NAD⁺: Nicotín Adenín Dinucleótido Oxidado

NADH Nicotin adenin dinucleotido reducido

NADPH oxidasa: Enzima oxidasa dependiente de NADPH

NADPH: Nicotín Adenín Dinucleótido Fosfato en estado reducido

NF- κ B: Factor Nuclear κ -B

NO: Oxido Nítrico

O₂⁻ Radical superóxido

\cdot OH Radical hidroxilo

OMS Organización Mundial de la Salud

\cdot ONOO⁻ Radical Peroxinitrito

O-UDP-GlcNAc N-acetilglucosamina unida a UD P- oxígeno

PAI-1: Inhibidor-1 del activador del plasminogeno

PGE₂ Prostaglandina E₂

PIP₁: Fosfatidil-Inositol-monofosfato

PIP₂: Fosfatidil-Inositol-bisfosfato

PIP₃: Fosfatidil-Inositol-trisfosfato

PKC: Proteína Kinasa C

Ratas BB: ratas transgénicas que desarrollan diabetes de forma espontánea

RO^{\cdot} radical alcoxilo

ROO^{\cdot} Radical Peroxilo

ROOH Lipido Peroxidado o Hidroperóxido Lipídico

RRR α tocoferol: Forma más común de la vitamina E

SOD: Superóxido Dismutasa

TBARS: Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico

TGF- β 1 Factor de crecimiento transformante beta 1

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral-alfa

U: unidades de actividad enzimática

UDP-GlcNAc N-acetilglucosamina unida a Uridina Difosfato

VLDL: Lipoproteína de Muy Baja Densidad

INDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RELACION DE ABREVIATURAS	
SÍNTESIS	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÒRICO	10
2.1. Aspectos generales de la diabetes	10
2.2. Estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno y antioxidantes.	12
2.3. Diabetes mellitus y estrés oxidativo.	28
2.4. Embarazo, diabetes y estrés oxidativo	32
2.5. Malformaciones congénitas, diabetes y estrés oxidativo	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Procedimientos generales	43
3.1.1. Toma de muestra.	43
3.1.2. Características de los grupos y algunas Definiciones.	44
3.1.2.1.- Definiciones empleadas para la clasificación de la diabetes:	44
3.1.2.2. Criterios de inclusión y exclusión	45
3.1.3. Procedimientos para la determinación de las variables bioquímicas de estrés oxidativo	46
3.1.4. Procesamiento estadístico	49
3.1.5. Consideraciones éticas	49

3.2. Estudio 1. Cuantificación de indicadores de estrés oxidativo en embarazadas diabéticas en el tercer trimestre del embarazo.	50
3.3. Estudio 2. Cuantificación de niveles plasmáticos de Vitaminas A y E en embarazadas diabéticas en el tercer trimestre del embarazo.	53
3.4. Estudio 3. Cuantificación de algunos indicadores de estrés oxidativo en embarazadas con diabetes pregestacional en los tres trimestres del embarazo.	55
3.5. Experimento 4. Detección de actividad clastogénica de un extracto acuoso de aceite de girasol peroxidado con probada acción teratogénica.	56
3.5.1. Preparación de muestras de aceite y extracto acuoso	56
3.5.2. Determinaciones en el aceite y extracto acuoso de TBARS.	57
3.5.3. Cultivo de linfocitos y preparación de las láminas.	58
3.5.4. Diseño experimental de los cultivos.	58
3.5.5. Análisis y procesamiento de los cultivos de linfocitos	59
4. RESULTADOS	
4.1. Resultados del Estudio I.	60
4.2. Resultados del Estudio 2.	70
4.3. Resultados del Estudio 3.	71

4.4- Resultados del Experimento 4.	72
5. DISCUSIÓN	74
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	99
7. BIBLIOGRAFÍA	101
8. ANEXOS	130

SÍNTESIS

El estrés oxidativo es uno de los eventos moleculares que contribuye a la teratogenicidad de la diabetes. El ambiente hiperglucémico en que se encuentra el embrión genera oxidantes que dañan e inactivan biomoléculas y provocan cambios en eventos de señalización de vital importancia durante determinados períodos de desarrollo de embrionario.

Se cuantificaron antioxidantes plasmáticos, biomoléculas oxidadas y rupturas cromosómicas en gestantes diabéticas, valorando el efecto del tipo de diabetes y el tiempo de evolución de la diabetes en dichos indicadores.

Los resultados muestran que se afecta la disponibilidad de antioxidantes y que disminuye la protección que estos debían brindar a las biomoléculas en todos los trimestres de la gestación. El estudio de fragilidad cromosómica llevado a cabo con las mujeres en el tercer trimestre reveló inestabilidad cromosómica, particularmente en las embarazadas con diabetes pregestacional.

Por otra parte aldehídos solubles obtenidos de aceite sometido a estrés térmico mostraron capacidad para inducir rupturas cromosómicas en cultivos de linfocitos sanos. Sustancias de naturaleza similar, circulando en embarazadas con diabetes, pudieran ser los responsables de la fragilidad cromosómica observada.

Se demuestra que en el estado grávido diabético existe un desbalance REDOX y fragilidad cromosómica cuya implicación para el desarrollo del embrión queda aún por dilucidar.

INDICE

SÍNTESIS

1. INTRODUCCIÓN	1
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.2. Estudio 1. Cuantificación de indicadores de estrés oxidativo en embarazadas diabéticas en el tercer trimestre del embarazo.	8
3.3. Estudio 2. Cuantificación de niveles plasmáticos de Vitaminas A y E en embarazadas diabéticas en el tercer trimestre del embarazo.	9
3.4. Estudio 3. Cuantificación de algunos indicadores de estrés oxidativo en embarazadas con diabetes pregestacional en los tres trimestres del embarazo.	9
3.5. Experimento 4. Detección de actividad clastogénica de un extracto acuoso de aceite de girasol peroxidado con probada acción teratogénica.	10
3.6. Procesamiento estadístico general	11
4. RESULTADOS	12
5. DISCUSIÓN	17
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	30
8. AUTOBIBLIOGRAFÍA	43

1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo, se ha postulado como uno de los eventos moleculares que contribuye a la etiopatogenia de la diabetes y a la aparición de las complicaciones asociadas a éste síndrome. La acumulación de glucosa incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), por vía directa o indirecta, ya que garantiza el aporte de sustrato para las reacciones de glucosilación y la autoxidación de la glucosa entre otras importantes modificaciones. Por otra parte, el aumento de ácidos grasos libres que caracteriza al estado diabético¹, contribuye a la acumulación de ERO por incremento de las reacciones de beta oxidación de ácidos grasos y desajuste de la función mitocondrial. En ausencia de una adecuada respuesta compensatoria de las defensas antioxidantes celulares se establece una condición conocida como “estrés oxidativo”, que activa vías de señalización sensibles a cambios REDOX y conduce a la acumulación de productos de genes capaces de causar daño celular, por lo que participa en los mecanismos que conducen a las complicaciones de la diabetes².

La salud reproductiva en la diabetes se afecta por el estrés oxidativo. El ambiente hiperglucémico que rodea al embrión genera sustancias oxidantes como productos de las reacciones de glicosilación avanzada de proteínas y aldehídos reactivos formados en las reacciones de peroxidación lipídica, cuya capacidad para dañar la estructura de las biomoléculas conduce a la alteración de las funciones en que ellas participan². Dichas sustancias pueden además, provocar cambios en

eventos de señalización cruciales durante determinados períodos de desarrollo del embrión³.

La incidencia de malformaciones congénitas (MFC) en la descendencia de madres diabéticas es aún alta, considerando los avances del tratamiento en la diabetes, y los altos costos que de ello se deriva para los pacientes y las instituciones estatales⁴. El estudio de los factores etiológicos en la patogénesis de las MFC ha revelado alteraciones en una serie de vías que están interrelacionadas y conducen a una sobreproducción de ERO, cuyo exceso en poblaciones celulares sensibles como las embrionarias pueden causar MFC^{3,5}.

La propuesta de que las ERO desempeñan un papel específico en la inducción de la embriopatía diabética se basa en numerosos estudios^{3,5} en los que se ha probado el efecto anti-teratogénico de sustancias antioxidantes. En dichos estudios se adicionaron algunos antioxidantes no enzimáticos como el Glutatión reducido (GSH), las Vitaminas E y C, y algunas de las enzimas que participan en la defensa antioxidante celular contra las ERO⁶.

Aún no está totalmente esclarecida la participación del estrés oxidativo en las altas tasas de MFC que se producen en la gestación diabética, pero la sensibilidad del ADN al estrés oxidativo está fuera de dudas y el estrés oxidativo crónico conduce además a inestabilidad cromosómica⁷.

Las estadísticas indican que la diabetes pregestacional, con independencia de que se trate de Tipo 1 o Tipo 2, aumenta el riesgo de que la descendencia presente defectos del tubo neural u otros defectos de tipo estructural. Los genes responsables de la predisposición a la diabetes no participan en la inducción del

desarrollo anómalo, ya que la incidencia de MFC en hijos de padres diabéticos no se modifica con respecto a la de la población normal. Basado en este conocimiento se plantea que el ambiente hiperglucémico que rodea al feto es el principal responsable de la teratogenicidad^{3,5}. Los trastornos metabólicos entre los paciente con diabetes Tipo 1 y Tipo 2 presentan algunas diferencias (concentraciones de cuerpos cetónicos y de inhibidores de somatomedinas) que al parecer no influyen en la teratogenicidad. Recientes estudios han demostrado que la hiperglucemia, ya sea transitoria o episódica, es capaz de provocar represión de la expresión de genes que deben activarse durante etapas definidas de la embriogénesis, como el Pax 3 que controla a su vez la expresión del gen de la proteína p 53. El hecho de que la adición de antioxidantes al medio de cultivo o dieta, según el experimento sea *in vitro* o *in vivo* respectivamente disminuya la tasa de malformaciones, implica directamente a las especies reactivas del oxígeno en la inducción de la embriopatía diabética^{5,6}.

Algunos estudios han mostrado resultados contradictorios al examinar el estado de las reservas de antioxidantes celulares y daño oxidativo a biomoléculas en el estado diabético⁸. Esto condujo al diseño de un estudio que permitiera medir *in vivo* los niveles de daño oxidativo al ADN y la integridad cromosómica en embarazadas con diabetes mellitus que se encontraban en el tercer trimestre del embarazo. En este trimestre se produce un mayor incremento de los lípidos circulantes incluso en embarazadas sanas, por lo que hay mayor aporte de sustratos para las reacciones de peroxidación lipídica. La situación anterior está exacerbada

en el embarazo diabético, por la contribución de varias vías de adaptación metabólica en la producción de sustancias de esta naturaleza^{3,9}.

La peroxidación lipídica es el proceso oxidativo más ampliamente estudiado. Los productos que de ella se derivan manifiestan una alta reactividad química por su carácter electrofílico y porque son sustancias de bajo peso molecular, que aunque se generan fundamentalmente en la bicapa lipídica de las membranas celulares, atraviesan la misma, solubilizándose en el espacio extracelular e induciendo daño oxidativo a distancias relativamente lejanas del sitio donde se producen. Se han identificado como sustancias clastogénicas algunos aldehídos tóxicos como 4 hidroxinonenal y malondialdehído, los cuales se encuentran en la circulación sistémica de individuos que padecen enfermedades que se caracterizan por estados pro inflamatorios. Estas enfermedades, entre las que se encuentran el síndrome de Bloom, la colitis ulcerativa y el SIDA, cursan con inestabilidad cromosómica⁷.

La diabetes es un síndrome donde se ha comprobado que coexisten los estados pro inflamatorio y pro oxidante crónico^{1,3,5}, por lo que sustancias de esta naturaleza pueden producir daño al ADN, evidente en la etapa de la metafase del ciclo celular.

En este trabajo se propone comprobar la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS GENERAL

Como consecuencia de alteraciones en el metabolismo de la glucosa, las embarazadas con diabetes mellitus presentan indicadores de desbalance redox. Esta situación provoca daños al ADN que se pueden evidenciar tanto en condiciones *in vitro*

como *in vivo*, con lo cual se proporciona fundamento para explicar el incremento de malformaciones congénitas en las embarazadas diabéticas.

Los objetivos han sido clasificados en generales y específicos

OBJETIVOS GENERALES

1. Comprobar que el embarazo en la mujer con diabetes compromete la capacidad de los antioxidantes plasmáticos para proteger del daño oxidativo a las biomoléculas más importantes.

2. Evaluar la estabilidad cromosómica de linfocitos en cultivos que han sido expuestos a especies reactivas del oxígeno *in vivo* e *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la diabetes mellitus durante el embarazo, sobre la capacidad antioxidante y el daño oxidativo a biomoléculas en sangre de embarazadas en el tercer trimestre de la gestación, con diagnóstico de diabetes mellitus gestacional y pregestacional (Tipo 1 y Tipo 2).

2. Comprobar si la capacidad antioxidante plasmática y las concentraciones de biomoléculas oxidadas se modifica con el curso del embarazo en las mujeres grávidas con diagnóstico de diabetes mellitus Tipo 1 o Tipo 2.

3. Identificar el efecto de la diabetes mellitus durante el embarazo, sobre la estabilidad cromosómica de células en cultivo.

4. Evaluar el efecto de productos de la peroxidación lipídica, sobre la integridad cromosómica de linfocitos de donantes sanos en cultivo.

5. Evaluar la influencia del tipo de diabetes en los indicadores de estrés oxidativo bajo estudio.

6. Evaluar la influencia del tiempo de evolución de la diabetes sobre los indicadores de estrés oxidativo que se ensayan en este trabajo.

Para darle respuesta a los objetivos se elaboró una metodología de trabajo en la que se diseñaron 4 estudios fundamentales:

Estudio 1. Cuantificación de indicadores de estrés oxidativo y evaluación de estabilidad cromosómica en embarazadas con diabetes en el tercer trimestre del embarazo.

Estudio 2. Cuantificación de concentraciones plasmáticas de Vitaminas A y E en embarazadas diabéticas en el tercer trimestre del embarazo.

Estudio 3. Cuantificación de algunos indicadores de estrés oxidativo en embarazadas con diabetes pregestacional en los tres trimestres del embarazo.

Experimento 4. Detección de actividad clastogénica de un extracto acuoso de aceite comestible peroxidado con probada acción teratogénica.

Las tareas diseñadas para realizar las evaluaciones correspondientes incluyeron la aplicación de técnicas espectrofotométricas (para evaluar la actividad de enzimas antioxidantes como Superóxido Dismutasa y Catalasa, concentración de Glutación reducido, Malondialdehído y grupos carbonilo), de Biología Molecular (daño oxidativo al ADN), técnica cromatográfica (HPLC para determinar concentraciones de Vitaminas A y E) y Citogenética (conteo de rupturas cromosómicas).

APORTES DE ESTE TRABAJO

La temática que aborda este trabajo ha sido objeto de numerosas investigaciones en las últimas dos décadas, pero el enfoque del papel de los productos de las reacciones oxidativas, en particular de las reacciones de peroxidación lipídica en la estabilidad cromosómica marca la diferencia con anteriores reportes sobre el tema. El conjunto de los resultados que se exponen en el documento constituyen una **novedad científica** por ser la primera caracterización de indicadores de estrés oxidativo y fragilidad cromosómica en embarazadas diabéticas, siendo esto un aporte al conocimiento de la temática del estrés oxidativo vinculado con la diabetes. Es éste un tema de una gran vigencia que apunta hacia las implicaciones que esto pudiera tener para el desarrollo de la embriopatía diabética.

APORTE DESDE EL PUNTO DE VISTA ECONÓMICO Y SOCIAL

Una adecuada salud reproductiva en diabetes es uno de los propósitos de las organizaciones internacionales de salud, y forma parte de las políticas de salud pública de muchos países. En Cuba se destinan cuantiosos recursos para garantizar una mejoría en la calidad de vida de las personas discapacitadas, y las malformaciones congénitas en hijos de las madres diabéticas son muchas veces incapacitantes para una vida social más activa. La tasa de malformados y muertes al nacimiento también se incrementa con el producto de la concepción de las mujeres con diabetes. El hecho de que pequeñas concentraciones de aldehídos tóxicos hayan podido demostrar efectos negativos sobre la integridad cromosómica alerta a los especialistas sobre la necesidad de utilizar terapias más individualizadas que combinen, además de fármacos antioxidantes, hábitos higiénico alimenticios más

estrictos para garantizar la salud de la mujer diabética previo al embarazo y así una menor tasa de malformaciones congénitas en hijos de madres diabéticas.

El documento consta de 144 páginas, divididas en 8 capítulos correspondientes a Introducción, Marco Teórico, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones y recomendaciones, Bibliografía y Anexos respectivamente. Se presentan en el texto 16 tablas y 11 figuras. Una de las tablas y 7 de las figuras se incluyen entre los XII Anexos que se presentan en el capítulo 8. La bibliografía consta de 232 citas, el 55 % de las cuales fueron publicadas en el último lustro.

Durante el desarrollo de la investigación que se presenta en este documento se han elaborado dos Trabajos de Terminación de Residencia en la especialidad médica de Bioquímica, cuya tutora fué la autora de este trabajo. Los resultados parciales se han publicado en tres revistas, una de ellas de carácter internacional de gran impacto (*Food and Chemical Toxicology*), una cubana y otra Boliviana y se han presentado en 6 congresos de carácter nacional e internacional. Una parte de estos resultados se presentó en el VII Congreso de Química Clínica de México, donde obtuvo el primer lugar en el concurso de investigación “Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla”, auspiciado por la confederación nacional mexicana de químicos clínicos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aspectos generales de la diabetes:

La Diabetes Mellitus es un síndrome heterogéneo producido por disminución de los efectos biológicos de la insulina o ausencia de secreción, que se traduce en una alteración del metabolismo de los glúcidos, los lípidos y las proteínas. La enfermedad se caracteriza fundamentalmente por una hiperglucemia o intolerancia a los glúcidos¹.

El origen de la diabetes es multifactorial, entre sus causas se han citado distintos factores genéticos, ambientales, inmunológicos y virales. Las vasculopatías que involucran a grandes y pequeños vasos son las más frecuente de las complicaciones crónicas, las cuales pueden llegar a ser invalidantes e incompatibles con la vida¹⁰.

En Cuba este síndrome constituye una de las principales causas de muerte por enfermedades no trasmisibles. Se observa un lento ascenso en el número de fallecidos por año desde el 2001, luego de la caída que este indicador experimentó en el último lustro de la década del 90¹¹.

Tabla1. Tasa de Muertes por diabetes por cada 100,000 habitantes*

Año	1990	1993	1995	2001	2003	2004	2005	2006
tasa	21,5	21.3	22.9	13.9	15.1	16.5	18.0	18.2

*Anuario Estadístico MINSAP 2006

La Diabetes Tipo 1 es una enfermedad autoinmune en la cual el cuerpo ataca las células beta del páncreas. Su debut se atribuye a dos grupos de factores de riesgo: hereditario y promovido por desencadenantes externos como dieta o infecciones. Alrededor de 18 regiones del genoma se han vinculado con

el riesgo de adquirir diabetes Tipo1, el cual contiene los genes HLA que codifican para las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MCH) que participan en la respuesta inmune. La diabetes Mellitus Tipo 1 es la que más frecuentemente aparece en los niños y adolescentes¹. Por lo general, antes de que aparezcan los signos clínicos más característicos, se elevan los títulos de anticuerpos anti-islotos pancreáticos (ICA), anti-insulina (AAI), contra la descarboxilasa del ácido glutámico (AGAD) y contra la porción intracelular de la proteína tirosina fosfatasa (AIA2)¹².

La diabetes Tipo 2 es la que se reconoce como la del adulto, aunque cada vez se está observando más en jóvenes y su incidencia se incrementa en niños. La enfermedad se presenta con una resistencia a los efectos de la hormona o un defecto en su secreción, además de incremento de la producción de glucosa por el hígado. Los llamados factores ambientales como la ingestión de alimentos y la relativa sistematicidad en la práctica de ejercicios influyen, junto a los factores genéticos, en la aparición de los signos característicos del síndrome. Los genes involucrados están aún poco conocidos. Hasta la fecha, los estudios de asociaciones entre las partes del genoma y el riesgo de desarrollar la diabetes ha permitido identificar sólo dos genes como causantes de la enfermedad; ellos son el gen CAPN10 de la calpaína y el del factor nuclear hepático 4 alfa (HNF4A)¹. Entre los genes que se postulan como contribuyentes al riesgo genético están el SUR (gen del receptor de sulfonil urea), el GCGR (del receptor del glucagón), el de la enzima glucoquinasa (GCK) y el del transportador Glut (2SLC2A2).

Otra forma de diabetes -la diabetes gestacional- compromete en muchos casos el buen desarrollo de la gestación. La principal complicación consiste en el tamaño fetal o macrosomía fetal, y la hipoglucemia del recién nacido^{1,8,10}. Los trastornos en el metabolismo de los glúcidos se producen generalmente en etapas posteriores a la embriogénesis por lo que los hijos de mujeres con DMG no se afectan por embriopatías diabéticas^{3,9}.

A pesar del gran avance que ha experimentado el tratamiento de este síndrome, aún la reproducción es un riesgo para las mujeres que padecen diabetes mellitus en cualquiera de sus variantes. Las estadísticas de algunos países del llamado primer mundo permiten reconocer, que nacen entre 2 y 4 veces más niños malformados de mujeres que padecen de diabetes pregestacional que de embarazadas que no la padecen⁵. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en el Hospital Gineco-obstétrico Ramón González Coro de la capital reflejan que en 2 740 nacimientos continuos de Madres con Diabetes entre los años 1973-2002 hubo 151 malformaciones, lo que representa un 5,5%. Si se subdivide en grupos con diabetes antes del embarazo y diabetes gestacional, el índice de malformados es de 8,7 contra 3,4 % respectivamente⁹.

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO.

Varios autores han estudiado la implicación del estrés oxidativo en diversos síndromes y enfermedades, entre ellas se encuentra el cáncer, la aterosclerosis, estados de isquemia reperusión, lesiones inflamatorias, articulares, renales, diabetes mellitus y pre-eclampsia¹³⁻¹⁶.

En las últimas dos décadas ha crecido el interés en la temática que relaciona el estrés oxidativo y la diabetes. Entre 1970 y 1975 se habían publicado 500 trabajos. En la última década el número se ha incrementado a más de 10,000 publicaciones¹⁷.

El término “estrés oxidativo” se ha enunciado por diferentes autores; entre las más importantes definiciones está la de Sies y Halliwell^{15,16} en la que se considera al estrés oxidativo como “la medida de la prevalencia de radicales libres del oxígeno en un sistema biológico”¹⁶. Las causas que conducen al estrés oxidativo pueden originarse en la disminución de las concentraciones de antioxidantes relativas o en el aumento en la producción de especies reactivas^{15,17}.

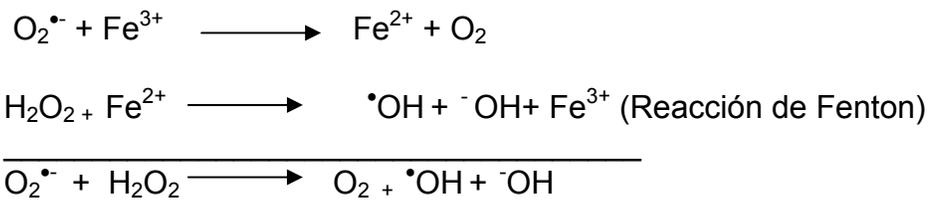
2.2.1. Especies reactivas del oxígeno:

Las formas reducidas del oxígeno y otras sustancias derivadas de ellas son las llamadas ERO, las cuales poseen una alta reactividad química que le confiere la distribución electrónica molecular¹⁸. En condiciones fisiológicas entre el 2 y el 5% del oxígeno que entra en la cadena respiratoria se reduce de forma univalente para dar lugar a la formación del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Éste se reduce para formar ión peróxido, el cual se protona para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y por reducciones sucesivas se forman: radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) y H_2O respectivamente. Otras ERO son el radical alcoxilo (RO^{\bullet}), peroxilo (ROO^{\bullet}) y el singulete de oxígeno^{12,13,18}.

Las reacciones en las que estas sustancias participan pueden conducir a la oxidación de biomoléculas como Lípidos, Proteínas y ADN y otras moléculas

como carbohidratos cuyos productos de oxidación pueden activar señales intra e intercelulares dando lugar a eventos como apoptosis y adhesión molecular¹⁹. También se generan especies altamente reactivas en el metabolismo oxidativo del nitrógeno: óxido nítrico (NO^{*}) y el anión peroxinitrito (OONO^{*})²⁰.

El radical superóxido se forma a partir de enzimas como las Oxidasas dependiente de NADPH y NADH y la Xantina Oxidasa. El H₂O₂ se forma fundamentalmente por la dismutación del radical superóxido en presencia o no de la enzima Superóxido Dismutasa. La gran capacidad que el H₂O₂ posee para dañar las biomoléculas se debe a su participación en la reacción de Fenton, donde que reacciona con iones metálicos de la serie redox como el par Fe^{+2/+3} para formar el radical hidroxilo (^{*}OH) y agua (H₂O)^{18,21}. El proceso global entre O₂^{*} y H₂O₂ se conoce con el nombre de Reacción de Haber-Weiss¹⁵.



Para evitar el daño celular debido a estos procesos, la mayoría de los sistemas biológicos han desarrollado una combinación de antioxidantes capaces de convertir las ERO en derivados no reactivos. La distribución de antioxidantes en los diferentes compartimentos celulares representa una eficiente estrategia para la regulación del estatus REDOX celular^{16,17} (Anexo I).

Halliwell y Gutteridge en 1999 definieron que la categoría de antioxidante se le puede atribuir a una sustancia que, presente a concentraciones bajas comparadas con las de un sustrato oxidable, previene o retrasa

significativamente la oxidación de dicho sustrato¹⁵. La fisiología de los tejidos y órganos depende del equilibrio entre mecanismos bioquímicos y biofísicos, factores y agentes internos y externos que regulándose entre sí mantienen la homeostasis y el estado de salud del organismo en su conjunto. De ahí se deduce que cualquier situación que afecte este balance puede acarrear consecuencias letales para la célula y a la larga para el organismo entero^{20,21}.

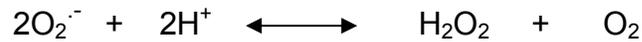
Los radicales libres generados en condiciones fisiológicas son controlados por mecanismos protectores estrictos que fueron perfeccionándose a lo largo del desarrollo filogenético y la aparición de la vida aeróbica^{20,22-24} y cuya localización garantiza el máximo de eficacia en el proceso dextoxificador.

2.2.2. Antioxidantes de mayor relevancia. Breve descripción.

Superóxido Dismutasas (SOD)

Las SOD (EC 1.15.1.1) son enzimas con una masa molecular entre 32 y 130 kDa. Existe una amplia distribución de estas enzimas en las células de los organismos aéreos. En eucariontes existen tres tipos de SOD de diferente localización, las cuales contribuyen a la eliminación del radical superóxido. Las enzimas intracelulares son: a) la dependiente de cobre y zinc, (CuZn-SOD), descubierta por Irwing Fridovich y Joe McCord en 1968, de localización citosólica y con una masa molecular de 32 Kda; b) la dependiente de manganeso (Mn-SOD), de localización mitocondrial¹⁹ y con masa de 40 KDa. La enzima extracelular (EC-SOD) es la de mayor peso molecular y fue descubierta en 1982 por Marklund²⁵.

Las SOD catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , en la reacción siguiente:



Como el radical anión superóxido es producido por las células endoteliales y fagocíticas, se ha sugerido que la SOD tiene propiedades antiinflamatorias. El resultado de ensayos terapéuticos con SOD en afecciones como osteoartritis, inflamación periarticular, cistitis por radiación y cistitis intersticial han sido prometedores. En estos ejemplos la SOD se ha inyectado directamente en la lesión inflamatoria²⁴⁻²⁶.

Catalasa (CAT)

La CAT (EC 1.11.1.6) es una enzima de alto peso molecular (con una masa de 240 kDa) que se localiza principalmente en los peroxisomas y cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno^{18,26-29}.

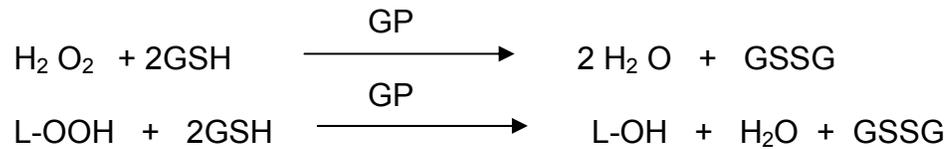


Es una proteína tetramérica, donde cada una sus cuatro subunidades idénticas posee un grupo prostético protoporfirina IX, con un contenido de hierro de 0,09%. Posee una alta capacidad catalítica, más efectiva a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Glutación peroxidasa

La GP (EC 1.11.1.19) está ampliamente distribuida en diferentes tejidos de los mamíferos. Es una enzima dependiente de selenio con un átomo del metal en cada uno de las cuatro sub-unidades idénticas, lo que es esencial en

su capacidad de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o de lipoperóxidos (LOOH) por medio del uso del glutatión reducido:



Existen varias formas de GP dependientes de selenio; entre las más importantes se encuentran:

- Una forma intracelular (GP-c)
- Una forma plasmática (GP-p)
- Una forma con actividad específica para los fosfolipoperóxidos que

por lo general está asociada a la membrana (GP-ph)

Se ha demostrado que el selenio se encuentra fuertemente unido a un residuo de cisteína en el centro activo de la enzima y es esencial para la actividad catalítica²⁸⁻³⁰.

Un número apreciable de tejidos animales poseen ambas enzimas, sin embargo se observa que a concentraciones bajas de H_2O_2 , la actividad que predomina es la de glutatión peroxidasa, siendo efectiva la catalasa cuando la concentración de H_2O_2 , es alta; es decir en condiciones de estrés oxidativo^{29,30}.

Glutatión reductasa (GR):

La relación GSH/GSSG se mantiene alta en la célula, debido a la presencia de sistemas enzimáticos que catalizan la reducción del glutatión oxidado¹⁶.

La glutatión Reductasa (GR, EC 1.6.4.2) es una enzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del dipéptido, glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), el cual puede ser utilizado por GP para la reducción del H_2O_2 que como ya ha sido señalado, es un compuesto de potencial toxicidad para el organismo. La vía de las pentosas fosfato suministra el $NADPH + H^+$ necesario para la reacción³⁰.



La GR está presente en diferentes tejidos, células y líquidos biológicos del organismo humano, se encuentra en el citoplasma, en las mitocondrias y en el plasma sanguíneo.

La enzima presenta en su centro activo, una molécula de FAD y un puente disulfuro entre dos residuos de cisteínas de ambas subunidades que participan en el mecanismo catalítico, la reacción requiere de la reducción del FAD del sitio activo por el NADPH en estado reducido²⁹.

El glutatión reducido (GSH)

El glutatión (γ -glutamil cisteinil glicina), es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, principalmente relacionadas con la protección antioxidante de las células²⁰. Su acción antioxidante se debe al grupo sulfidrilo del residuo de cisteína, por lo que es capaz de ejercer su papel protector sólo cuando se presenta en su forma reducida (GSH). La forma oxidada del glutatión se origina cuando dos moléculas de GSH se oxidan (por presencia de agentes oxidantes o por autooxidación) cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí, dando lugar a la forma

oxidada (GSSG)^{31,32}. La enzima GR que se encarga de regenerar el GSSG a su forma reducida se encuentra predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria^{29,33}.

Un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, lo cual aumenta el cociente GSSG/GSH^{22,27}. En condiciones fisiológicas, la concentración de GSH es de dos a tres órdenes de magnitud mayores que la de GSSG³².

El GSH es el tiol no proteínico más abundante en las células de mamíferos y constituye el principal antioxidante endógeno de carácter no enzimático. Literalmente no podemos sobrevivir sin este antioxidante, una deficiencia de GSH puede causar hemólisis y estrés oxidativo¹⁵. En pacientes diabéticos se ha comprobado que existe mayor fragilidad de los eritrocitos, probablemente debido a la disminución de este antioxidante. El GSH es esencial en el metabolismo intermediario, para la desintoxicación de diferentes sustancias (como por ejemplo el acetaminofén), y para el correcto funcionamiento de otros antioxidantes importantes como las vitaminas C y E, además es el antioxidante más activo en la regulación del sistema inmune^{31,32}. Puede reaccionar directamente con los radicales libres sin necesidad de intervención enzimática, o bien por medio de la GP²⁸.

Vitaminas antioxidantes

Las vitaminas C y E actúan de forma conjunta como eliminadores de radicales¹⁸. La vitamina C actúa fundamentalmente en el medio extracelular por

su carácter hidrosoluble. Por otra parte, la vitamina E penetra a la célula debido a su naturaleza hidrofóbica y por ello puede actuar tanto en el medio extracelular como en el intracelular. Actúa concertadamente con el ácido ascórbico en plasma mientras que en las membranas lo hace con la coenzima Q₁₀.³⁴

Los carotenoides (α y β carotenos, licopeno, etc.) y la vitamina A presentan actividad antioxidante bien documentada *in vitro* y evidenciada en modelos animales³⁵.

La vitamina E, dado su carácter lipofílico, constituye el principal antioxidante de los lípidos y forma parte de prácticamente todas las estructuras lipídicas del organismo como las membranas celulares y las lipoproteínas plasmáticas, especialmente las LDL³⁶. De este modo, los ácidos grasos son protegidos del ataque de los radicales libres y por lo tanto, de su posible oxidación.

La vitamina E engloba ocho formas naturales derivadas todas del 6-cromanol, de las cuales cuatro de ellas tienen forma de tocoferol (α , β , γ y δ) y las otras cuatro de tocotrienoles. Todas tienen distinta actividad biológica, siendo el α -tocoferol el de mayor actividad biológica y la forma de la vitamina E más abundante en la naturaleza³⁶.

Su actividad antioxidante se debe al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol. Al poseer un potencial de reducción muy bajo, el α -tocoferol es capaz de reaccionar con los radicales peroxilo y reducirlos a hidroperóxidos, evitando así que estos radicales reaccionen con otros ácidos grasos e impidiendo la propagación del proceso oxidativo¹⁷. Al reaccionar con

dicho radical, el α -tocoferol se convierte en radical tocoferilo, que por reacciones posteriores forma un compuesto más estable. De esta manera cada molécula de tocoferol puede neutralizar dos moléculas de radical peroxilo^{35,36}.

La Vitamina A es una sustancia liposoluble que se encuentra en forma de éster como retinol palmitato. Sus carotenoides precursores se degradan en las células intestinales a retinaldehidos y luego se reducen a retinol, el cual es re-esterificado y se almacena en hígado como palmitato de retinol. Cuando la vitamina es liberada del hígado, lo hace unida a la proteína de unión al retinol, que por sus siglas en inglés se conoce como RBP (retinol binding protein).

La vitamina A participa en la regulación de vías metabólicas, expresión genética, crecimiento y diferenciación celular. Los retinoides se enlazan a dominios ricos en cisteínas de PKC alfa, y sirven como activador REDOX de la misma. Como regulador de la diferenciación celular su función es muy importante para reponer las células que mueren a consecuencia del daño oxidativo³⁶.

2.2.3- Daño oxidativo a biomoléculas

Incluso en condiciones de normal funcionamiento del organismo, se acumulan proteínas modificadas como consecuencia de la inevitable formación de ERO^{23,24}. Las proteínas modificadas que se acumulan dentro y fuera de la célula experimentan alteraciones significativas en sus funciones por lo que deben de ser sustituidas por la maquinaria de síntesis proteínica celular. En esta función intervienen las enzimas proteolíticas, cuya acción evita la acumulación de las proteínas dañadas. Las proteínas glicosiladas, las cuales han sido

modificadas covalentemente son más resistentes a la degradación por lo que son más susceptibles a la oxidación³⁷.

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, principalmente por el radical hidroxilo. Los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína tienen mayor predisposición a ser oxidados³⁸.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo. También contribuyen a la acumulación de carbonilo las reacciones secundarias de ciertas cadenas laterales con productos de la peroxidación de lípidos y con azúcares reductores. Los derivados con grupos carbonilo pueden también incrementarse a expensas de la ruptura oxidativa del esqueleto peptídico. Como los grupos carbonilos constituyen productos fundamentales de las reacciones oxidativas mediadas por ERO, el contenido en carbonilos de las proteínas se emplea como un indicador de daño oxidativo a las mismas³⁸⁻⁴⁰.

Otra modificación oxidativa de gran importancia es la nitración por peroxinitrito de residuos de tirosina de las proteínas reguladoras, lo cual puede conducir a un mal funcionamiento permanente de las cascadas controladoras de los procesos de transducción de señales y reguladoras de las funciones celulares⁴⁰.

El *daño oxidativo al ADN* y otros constituyentes del aparato genético se producen cuando la molécula reacciona de forma directa con radicales como el hidroxilo y otros que se forman durante la peroxidación lipídica. Los productos

no radicálicos muy reactivos como los compuestos carbonílicos también producen este tipo de reacción^{18,24,30}.

Más concretamente, el daño estructural al ADN por radicales libres puede ocurrir de dos modos principales: i) Reacción con los residuos desoxirribosa. ii) Reacción de adición a las bases del ADN.

El radical anión superóxido y el peróxido de hidrógeno no reaccionan directamente con el ADN, ellos dan lugar a la formación de radicales hidroxilo en presencia de iones metálicos de la serie de transición. Estos últimos son capaces de atacar las desoxirribosas, (purinas y pirimidinas), generando numerosos productos. La modificación oxidativa más frecuente suele ocurrir a nivel de la guanósina, dando lugar a la 8-hidroxi-2'-deoxiguanósina (8-oxodG). Su importancia reside en su poder mutagénico, ya que durante la replicación producirá transversiones Guanina-Timina. Además se han identificado otros veinte productos de oxidación.

La concentración del nucleósido 8-oxodG se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN y puede cuantificarse por espectrometría de masas, o por HPLC con detección electroquímica^{15,18,24}.

Muchos de estos productos de oxidación del ADN encontrados *in vitro*, también aparecen en el ADN de tejidos animales tras el tratamiento con sustancias que estimulan la generación de radicales libres o como causa del envejecimiento celular³⁷. Según estudios efectuados por muchos investigadores, el daño oxidativo al ADN y la mutagénesis son dos causas importantes de cáncer⁴¹.

Por otra parte, debemos destacar que el daño oxidativo asociado a proteínas y al ADN no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras del ADN puede aumentar la acumulación de daño oxidativo al mismo, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando moléculas de ADN dañado se reparan de manera incorrecta, tienen lugar mutaciones. Así pues, las lesiones oxidativas al ADN parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades crónicas que aparecen en la adultez como diabetes⁴¹

El daño oxidativo al ADN ha sido observado en un gran número de líneas celulares procedentes de mamíferos, e incluye roturas de doble y simple cadena, cambio de bases, daño oxidativo, e incluso aberraciones en los cromosomas⁴².

La mayor parte del daño oxidativo al ADN se resuelve con el sistema de escisión de bases (BER) ya que las ERO generan principalmente lesiones no voluminosas que son reparadas con este sistema. Las enzimas clave en el mecanismo de BER son las ADN Glicosilasas, las cuales generan sitios abásicos al eliminar bases dañadas y desapareadas rompiendo el enlace N-Glicosídico entre la base anormal y el azúcar⁴³. Al menos en el caso del ADN nuclear, se cree que el hierro y el peróxido de hidrógeno juegan un papel importante en el daño oxidativo: Si el peróxido de hidrógeno llega al núcleo y reacciona con el hierro en estado ferroso, genera el radical hidroxilo (Reacción

de Fenton), que ataca en ese mismo lugar a la desoxirribosa o la base, produciendo tanto roturas de la hebra como modificaciones en las bases. Un hecho muy importante que debemos resaltar es que el ADN mitocondrial está expuesto a un mayor daño oxidativo que el nuclear. El genoma mitocondrial presenta ciertos rasgos que lo hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: Carece de histonas que protejan el ADN, el sistema de reparación no es tan eficiente como en el caso del nuclear, además de encontrarse muy cerca de la cadena de transporte de electrones, uno de los sistemas principales de producción de especies activadas de oxígeno⁴⁴.

Quizás la más estudiada de las reacciones en las que participan las especies reactivas es aquella que experimentan los lípidos, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados. Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), el alcóxilo ($\text{RO}\cdot$) y el alquílico ($\text{R}\cdot$). La reacción comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico^{15,16}.

Esta reacción se produce principalmente por ataque a los carbonos contiguos a dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados, arrancando un hidrógeno por una ruptura homolítica y produciendo un radical que se estabiliza por resonancia con el doble enlace. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $\text{ROO}\cdot$.

Los radicales peróxido pueden reaccionar a su vez con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, se forma un radical alquílico

(R'-CH•) y un peróxido lipídico (R-OOH), con lo que se propaga la reacción en cadena producida por radicales libres. Por su naturaleza ésta es una reacción potencialmente dañina, pues un solo radical es capaz de desencadenar una serie de eventos que conducen a la producción de un gran número de especies reactivas de carácter electrofílico que potencialmente tienen mayor facilidad para unirse con el ADN, como los aldehídos tóxicos (malondialdehído y 4-hidroxinonenal)¹⁵. Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, por lo que causan mutaciones en el ADN, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas⁴⁵. Se sabe que esos productos de degradación pueden difundir lejos de su lugar de producción y causar edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. El malondialdehído (MDA), a su vez, puede reaccionar con lípidos y proteínas durante la peroxidación lipídica para formar productos fluorescentes insolubles que se acumulan en el interior de los lisosomas como la lipofucsina⁴⁶. ésta sustancia es un reconocido marcador morfológico de envejecimiento que también se acumula en los tejidos de pacientes diabéticos⁴⁷.

Existen varias técnicas experimentales que permiten monitorear la formación de productos de la peroxidación lipídica: Detección de hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano en los gases que se exhalan de la respiración, detección de sustancias reactivas al Ácido Tiobarbitúrico como los aldehídos MDA y 4-hidroxinonenal (4-HNE), detección de dienos conjugados entre otras^{15,18,22}.

2.2.4. Reactividad de los productos derivados de la peroxidación lipídica con biomoléculas. Toxicidad en el organismo:

La alta reactividad química frente a moléculas como ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos de los productos de la peroxidación lipídica se explica por el carácter electrofílico del carbono beta en aldehídos con dobles enlaces como los alquenes, el cual es muy positivo y por ende reacciona con los grupos químicos con carga negativa de moléculas de ADN, proteínas, carbohidratos y otros lípidos⁵⁰.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la ingestión de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados sometidos a estrés térmico puede dar lugar a la inducción, desarrollo y progresión de determinadas patologías, entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares⁴⁹, aterosclerosis⁵⁰ e hipertensión⁵¹. La implicación de estos productos en procesos tóxicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, se explica por la capacidad de estos productos de la degradación oxidativa de lípidos de reaccionar con la Apo B de las LDL, con el ADN y el GSH entre otras⁵²⁻⁵⁴. Además producen más radicales libres que pueden alterar la distribución de los fosfátidos de glicerina de membrana, provocando cambios en la fluidez de la misma y perturbaciones de las señales celulares⁵⁵⁻⁵⁷. Éste pudiera ser el probable mecanismo que explique por qué aquellas dietas que contienen aceites calentados a elevadas temperaturas son más teratogénicas que las que contienen aceites sin calentar⁵⁸⁻⁵⁹.

Los aldehídos pueden inhibir la actividad de varias proteínas como la bomba de sodio y potasio dependiente de ATP⁶⁰, la anhidrasa carbónica⁶¹, la α_1 -

proteínasa⁶², la Glutación peroxidasa^{63,64} y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)⁶⁵. La inhibición de la G6PDH por los aldehídos que llegan a tejidos embrionarios adquiere gran relevancia en la inducción de efectos teratogénicos, ya que es crucial en la protección del embrión frente al estrés oxidativo⁶⁵.

Las hebras del ADN pueden reaccionar con hidroperóxidos y radicales lipídicos, propiciando el ataque directo de radicales más pequeños y otros aldehídos con posterioridad⁶⁶. La modificación de una bases interfiere con el reconocimiento por su complementaria, situación que altera la replicación e induce efectos genotóxicos que incluso podrían dar lugar a mutaciones⁶⁷ si no son reparadas correctamente^{20,39,43}. Este daño genotóxico de aldehídos, ha sido demostrado *in vitro* sobre una gran variedad de células como hepatocitos, células de músculo liso vascular humano⁶⁸, células tumorales y linfocitos^{69,70}. Dicho daño se describió como consecuencia de la inducción de roturas de hebras e intercambio de cromátidas hermanas, y de un incremento en la formación de micro núcleos y roturas cromosómicas, inducidas como consecuencia de la incubación de estas células con aldehídos⁷¹. Especialmente relevante resulta la inactivación de enzimas de replicación y reparación del ADN, que provoca roturas de cromátidas debido a un error en estos procesos^{7,72,73}.

Algunos aldehídos producto de las reacciones de peroxidación lipídica han sido incluidos dentro de los denominados factores clastogénicos⁷⁴. Ellos son un grupo heterogéneo de sustancias, liberadas por las células en respuesta a situaciones de estrés oxidativo. Se caracterizan por producir roturas cromosómicas y han sido aislados en determinados estudios *in vitro* y en plasma

de pacientes con enfermedades asociadas a estrés oxidativo⁷⁵. Así, el 4-HNE ha sido encontrado en la fracción de suero de estos pacientes con actividad clastogénica y en el medio de cultivo de células sometidas a estrés térmico. Posteriormente, una vez aislado, ha inducido roturas sobre cultivos de células sanas, poniendo de manifiesto su efecto clastogénico sobre el material genético^{76,77}.

2.3. Diabetes Mellitus y Estrés Oxidativo:

Los pacientes que padecen diabetes mellitus presentan indicadores bioquímicos que evidencian una situación de estrés oxidativo^{2,78-80}. Disminuyen las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes como la A y E⁸¹, se incrementa la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS del inglés *Tio Barbituric Acid Reactive Substances*), se incrementa la susceptibilidad de las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL del inglés *low density lipoprotein*) a la oxidación^{82,83}, disminuye la capacidad antioxidante total del plasma y se daña el material genético^{13,18,84}.

Los mecanismos que contribuyen al mayor estrés oxidativo en Diabetes Mellitus incluyen también cambios en la obtención de energía por la célula, en los niveles de mediadores inflamatorios etc^{85,86}.

La hiperglucemia sostenida es un factor decisivo en el incremento del estrés oxidativo en los pacientes diabéticos^{59,78,87}, y es también la causa fundamental de los efectos dañinos en la micro y macro vasculatura de las personas que padecen el síndrome⁸⁸⁻⁹⁰.

La teoría que explica cómo se producen estos daños descansa en la propuesta de que cuatro vías fundamentales experimentan modificaciones que tributan al daño⁷⁸. Las reacciones o vías que se modifican son: *La vía del poliol*^{78,91}, *las reacciones de glicosilación con la consiguiente acumulación de Productos Finales de Glicosilación Avanzada* (AGE por las siglas en inglés *Advanced Glicosilation End Product*)^{59,89,92}, *la activación de isoformas de la PKC*⁹³ *y la vía de la hexosamina*^{78,94,95}. Todas ellas tienen en común que conducen a un incremento en la producción de radical superóxido por la cadena de transporte electrónico mitocondrial⁷⁸.

La Vía del Poliol se exagera en condiciones de hiperglucemia y tiene como enzima que controla la velocidad del paso más lento a la Aldosa Reductasa. Esta enzima tiene baja afinidad por la glucosa, a la cual convierte en sorbitol, usando NADPH como cofactor. El sorbitol es luego oxidado a fructosa por una reacción acoplada a reducción de NAD⁺/NADH y catalizada por la enzima sorbitol deshidrogenasa, produciéndose incremento de la relación NADH/NAD⁺, lo cual compromete el balance REDOX y energético en la célula, ya que condiciona un estado de pseudo hipoxia^{59,78}.

El aporte fundamental que esta vía hace al daño por hiperglucemia consiste en que compite por el uso de NADPH que es requerido por reacciones como la regeneración de GSH a partir de GSSG, lo cual es crítico en condiciones de hiperglucemia y pudiera exagerar la condición de estrés oxidativo que se ha establecido⁷⁸.

El *incremento en la formación de AGE* se debe a que, el aumento de las concentraciones intracelulares de glucosa aumenta la probabilidad su oxidación a productos dicarbonilos muy reactivos como el glioxal y metilglioxal y produce además H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$.

Los productos dicarbonilo se unen a los grupos amino de las proteínas intracelulares y extracelulares para dar AGE (Figura 2, Anexo II). Los diversos daños que produce la acumulación intracelular de AGE se pueden resumir en los siguientes planteamientos: a) las proteínas alteradas por AGE modifican su función, b) los componentes de la matriz extracelular modificados por AGE interactúan de manera anormal con otros componentes de la matriz produciendo reacciones cruzadas. c) las proteínas extracelulares modificadas por AGE son captadas por receptores que reconocen dicha modificación (RAGE) e inducen la síntesis de citoquinas como Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF alfa), Factor de Crecimiento Tipo Insulina (ILGF-I), e Interleuquina-1 (IL-1). Esta última induce el estallido respiratorio de las células fagocíticas incrementando la producción de ERO por la acción, entre otras, de enzimas dependientes de NADPH asociadas a membrana^{59,78}. Los RAGE en las células endoteliales parecen mediar la hiperpermeabilidad de la pared capilar que se ha asociado con diabetes, pues el bloqueo de estos receptores en un modelo animal ha disminuido los síntomas vasculares que caracterizan a esta patología⁶¹. Asimismo, los RAGE participan en la transducción de señales por medio de la generación de ERO, las que activan los factores de transcripción NF-kB y p21⁷⁸.

La familia de *la enzima PKC* comprende al menos 11 isoformas, siendo 9 de ellas activadas por el compuesto Diacilglicerol (DAG)⁹³. Un aumento intracelular de glucosa induce incremento de este segundo mensajero que a su vez activa fundamentalmente las isoformas beta y delta de la enzima¹. La hiperglucemia promueve de forma indirecta una *activación de la PKC* por la vía de la sobreproducción de ERO, disminución de la síntesis de NO[•] e inducción de factores de crecimiento como el TGF-alfa y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células de músculo liso. Recientes evidencias han vinculado estas alteraciones con la sobre expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)⁹⁶, con el incremento de la activación del NF-kB y con la regulación y estimulación de varias oxidasas dependientes de NADPH asociadas a membrana⁹⁶ en modelos de diabetes.

El *Incremento del flujo de glucosa en la vía de la hexosamina* se produce por aumento de la concentración intracelular de glucosa, que activa la vía que transforma en hexosamina la fructosa, por la enzima Glutamina: fructosa 6 fosfato amido transferasa (GFAT)^{94,95}. La acumulación de glucosamina inactiva la enzima G6PDH, por lo que disminuye el aporte de NADPH a la célula⁷⁸ (Figura 3, Anexo III)

2.4. Embarazo, Diabetes y Estrés Oxidativo:

El estado grávido en condiciones de salud se ha asociado con reducción en la disponibilidad de antioxidantes y elevación de productos derivados de reacciones de peroxidación lipídica, activación de leucocitos e incremento en la concentración de ERO en el tercer trimestre de la gestación^{96,97}; coincidiendo con el período en el cual la HTG se hace más evidente.

El embarazo modifica de forma continua el metabolismo de la gestante (Tabla 2, Anexo IV) y la madre tiene que aportar nutrientes al feto a través de la placenta para su desarrollo⁹⁸⁻¹⁰⁰.

A lo anterior se añade además que productos de la Peroxidación Lipídica (PL) que se incrementan por la Hipertrigliceridemia, constituyen sustancias con actividad clastogénica y por lo tanto producen roturas cromosómicas¹⁰¹.

Además de diabetogénico, el estado grávido muestra una incrementada vasoconstricción e hiper agregabilidad, propiciado por la reacción entre el óxido Nítrico (NO[·]) y el radical anión superóxido para rendir peroxinitrito (ONOO[·]). Esta reacción que tiene una velocidad 3 veces mayor que la del radical superóxido con su enzima, produce una disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico como agente vasodilatador y antiagregante. El resultado impacta especialmente en la placenta, disminuyendo el flujo útero-placentario y placentario-fetal así como lo hace en otros tejidos, donde puede conducir a vasculopatías en las personas con diabetes¹⁰².

Durante la gestación existe una especial demanda de vitamina E, debido al incremento de los lípidos plasmáticos, permitiendo así mantener una relación vitamina E/lípidos similar a la de las mujeres no gestantes¹⁰³. El rápido crecimiento fetal y el aumento en la síntesis de membranas celulares, requiere un elevado aporte de vitamina E. De hecho, el correcto funcionamiento de los sistemas antioxidantes es fundamental para la adaptación a la vida extrauterina del recién nacido, ya que en el momento del parto, en cuestión de minutos, el feto pasa de estar expuesto a una presión parcial de oxígeno de 20 mmHg a un ambiente con

presión parcial de oxígeno alta (100 mmHg aproximadamente). Este cambio tan brusco hace que las limitadas reservas antioxidantes acumuladas durante el crecimiento fetal, sean especialmente importantes en la transición feto-neonato, ayudando a prevenir el daño que podría producir un mayor estrés oxidativo¹⁰⁴.

En general es importante considerar que tanto la diabetes como la gestación pueden producir estrés oxidativo. La coexistencia de ambas situaciones de adaptación metabólica pudiera estar relacionada con algunas de las complicaciones que aparecen durante la gestación en las mujeres con diabetes, como preeclampsia, alteraciones de la placenta y malformaciones en la descendencia⁹⁸.

Las características anatómicas y de desarrollo del embrión después de la implantación le confieren vulnerabilidad al estrés oxidativo. Las concentraciones de glucosa intracelular en el embrión se equilibran con los del suero materno debido a la expresión embrionaria temprana de los transportadores de Glucosa Glut2 (de alta Km) y Glut1, Glut3 y Glut8 (de baja Km). Por esa razón el flujo de glucosa hacia el embrión de madre diabética es 2 ó 3 veces mayor que aquel que se desarrolla en medio euglicémico. A esto se suma que en esta etapa el entorno embrionario es hipóxico, y sus sistemas de defensa antioxidante aún no se han desarrollado, por lo que es difícil encarar una agresión oxidativa. Si la glucosa materna se incrementa, y con ella los productos de su oxidación, aún un pequeño incremento de la producción de ERO podría provocar una situación de estrés oxidativo¹⁰⁵.

Se ha reportado que el contenido de Vitamina E en sangre de cordón (reflejo de la circulación fetal) debe oscilar entre una cuarta y una quinta parte de la concentración en sangre materna¹⁰⁴. Como la concentración de tocoferol en sangre

de cordón se incrementa por administración de este antioxidante a la madre durante la gestación, esto pudiera constituir una buena indicación en la prevención de MFC, lo cual ya se ha comprobado en diabetes experimental^{12,107}.

El término Embriopatía diabética se refiere a las MFC que desarrolla el embrión de la madre diabética¹⁰⁸. La diabetes materna es responsable de importantes anomalías congénitas que ocurren entre el 8 y el 12% de las embarazadas complicada con Diabetes Mellitus Pregestacional (DMP). Los métodos de detección precoz no han podido evitar que la frecuencia de MFC en gestantes diabéticas sea entre 3-4 veces mayor que en las embarazadas sanas^{108,109}. Un estudio llevado a cabo en nuestro país por el Dr. Lemay Valdes en el año 2003 reporta que en 2740 nacimientos de madres diabéticas, ocurridos entre 1973 y 2003, el porcentaje de niños con malformaciones fue de 3,4% para mujeres con diabetes gestacional, sin embargo casi tres veces más (9,3%) para mujeres con diabetes Tipo 1 o Tipo 2¹².

Las estadísticas de otras partes del mundo muestran que alteraciones fetales como las macrosomías que se presentan entre el 8 y el 14 % de los partos, alcanzan valores de 25 a 42 % en los hijos de madres diabéticas. Estudios experimentales llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* mostraron una correlación entre diabetes, retardo del crecimiento y malformaciones congénitas¹¹⁰.

Un aspecto medular a considerar en el estudio de la etiopatogenia de la embriopatía diabética es que las dismorfogénesis ocurren principalmente en las primeras 8 semanas de desarrollo del embrión^{3,105}. Varios evidencias señalan que la glucosa puede mediar efectos embriotóxicos debido a la generación de ERO^{105,111}.

Al respecto se conoce que en esas condiciones de exceso de glucosa puede alterarse la inducción de genes que controlan el desarrollo, por lo que se comprometen eventos posteriores del desarrollo morfogénico.

Los genes que predisponen a la diabetes no participan en la inducción de malformaciones, ya que los hijos de padres diabéticos presentan más predisposición genética para padecer el síndrome y no desarrollan malformaciones congénitas, las cuales sí aparecen cuando es la madre la que porta la enfermedad. Por otra parte, la ausencia de un patrón malformativo específico en la embriopatía diabética apunta más hacia la participación de factores del ambiente intrauterino materno, que desencadenan mecanismos teratogénicos en la gestación diabética. Las malformaciones más relacionadas con la embriopatía diabética son los defectos de cierre del tubo neural (DTN) y los que afectan al sistema cardiovascular; aunque se ha planteado que este síndrome afecta a todos los órganos¹¹².

La más importante alteración del embrión de madre diabética, capaz de inducir un desarrollo anómalo, es el incremento de la concentración de glucosa¹⁰⁹⁻¹¹³. El estudio de los factores etiológicos en la patogénesis de las MFC ha revelado que el incremento en la producción de ERO por exceso de glucosa es la principal causa de las MFC¹¹⁴.

Varios cambios metabólicos fundamentales se reconocen por la mayoría de los estudiosos del tema como causantes de la teratogénesis diabética:

1. Disminución del consumo de inositol en el tejido embriónico.
2. Alteraciones de la degradación del ácido araquidónico por lo que se produce menor cantidad de prostaglandinas.

3. Cambios en la actividad de la proteína quinasa C (PKC).
4. Incremento de la vía de la hexosamina.
5. Incremento de las reacciones de glicosilación que conducen a AGE.
6. Incrementada formación de ERO ¹¹²⁻¹¹⁵

El efecto de la disminución del inositol consiste en el descenso de los fosfoinositoles (PIP₁, PIP₂) y sus productos fosfátidos de glicerina esenciales en los tejidos embrionarios. La disminución de PIP₂ y DAG, estimulantes de la actividad de la PKC, trae una disminución de la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), enzima clave en el metabolismo de los fosfátidos de glicerina¹¹³. Una PLA₂ menos activa conduce a una disminución del Ácido Araquidónico libre con caída de la producción y el metabolismo de las prostaglandinas, sobre todo PGE₂ que constituye la principal prostaglandina durante la embriogénesis. La PGE₂ se sintetiza muy tempranamente en el desarrollo del embrión¹¹⁶, de ahí se deduce lo relevante de su participación en eventos iniciales de la morfogénesis^{3,113,116}. A esta prostaglandina además se le han atribuido acciones estimulantes del metabolismo de la glucosa en diferentes tejidos³.

La disminución del ácido araquidónico provoca que disminuya la concentración de PGE₂ por lo que esta es una vía que conduce a la embriopatía diabética¹¹³. Varios experimentos han confirmado que la adición de Ácido Araquidónico a las ratas diabéticas preñadas redujo el daño al tubo neural de los fetos. La adición de PGE₂ a cultivos de embriones en medios con alta concentración de glucosa también bloqueó la aparición de DTN en dichos embriones^{109,113}.

Cambios en la actividad y expresión de la PKC. El grupo de Eriksson y colaboradores en el año 2003 encontró que varias isoformas de PKC poseían modificaciones de la actividad en embriones de ratas de diez días de edad, lo que demuestra que existe asociación entre embriopatía diabética y alteraciones en la actividad de la PKC aún por dilucidar^{13,113,117,1118}.

La disminución del contenido de DAG en el embrión produce una disminución de la actividad de la PKC, pero esta situación contrarrestarse debido a otras consecuencias del estado diabético, que produce un aumento en la disponibilidad de DAG al incrementarse el flujo y acumulación de metabolitos en la vía glucolítica¹¹⁹. Este flujo incrementado de la vía glucolítica inhibe la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa¹²⁰ (GAPDH) por sobreproducción de ERO en la mitocondria produciendo entonces más DAG y por tanto estimulando la actividad de la PKC¹¹⁸, la vía de la síntesis de Hexosamina^{78,111} y la de la Aldosa reductasa, todas ellas potencialmente teratogénicas¹¹³⁻¹¹⁵.

Incremento de la vía de la hexosamina: Uno de los efectos más importantes que provoca la estimulación de la síntesis embrionaria de hexosamina, es la reducción de la actividad de la G6PDH que provoca el incremento en la concentración de glucosamina-6 fosfato, la cual es un inhibidor competitivo de la enzima^{121,122}. La G6PDH es la enzima reguladora fundamental en la vía de las pentosas y es responsable del 25% del metabolismo de la glucosa en el período de preimplantación temprana del embrión¹²³. La inhibición de la enzima conduce al descenso de NADPH, utilizado en varias de las reacciones de eliminación de ERO, y compromete seriamente el potencial reductor de los tejidos embrionarios, ya que

la recuperación del GSH por la enzima GR depende de su cofactor NADPH. Este mecanismo puede conferirle una especial vulnerabilidad a las células del embrión en etapas determinadas del desarrollo morfogénico^{123,124,125}.

El incremento en la concentración de ERO: La reserva de GSH en el embrión se desajusta por disminución en el transporte del mismo debido a daños en el saco vitelino^{3,123,124}. Contribuye a lo anterior la disminución en la actividad de la enzima G6PDH que se explica en el párrafo anterior.

Diferentes modelos experimentales han puesto de manifiesto que la administración de antioxidantes como la vitamina E, la vitamina C y el butilato de hidroxitolueno (BHT) producen una disminución en la tasa de malformaciones congénitas, incluidos los DTN^{6,107,125-127}.

El efecto teratogénico del EO está mediado por procesos genotóxicos y citotóxicos, y aunque muchas células sobreviven a la agresión oxidativa, otras son especialmente sensibles. Existen genes polimórficos que modifican la respuesta celular a la hiperglucemia por lo que la diabetes induce complicaciones que alcanzan diferentes niveles de compromiso en los diversos pacientes⁷⁸. De igual forma, existen genes modificadores que afectan la susceptibilidad de las células embrionarias a la hiperglucemia, por lo que no todos los embriones cultivados *in vitro* en altas concentraciones de glucosa desarrollan MFC^{105,113}.

Genes regulados por el factor de transcripción NF-κB son sensibles a cambios en el potencial REDOX de la célula que modifica su habilidad para regular la transcripción. Esto se ha comprobado para factores de transcripción como la proteína p 53, proteínas con motivos digitiformes de zinc y otros miembros de la

familia Pax^{105,128,129}. En estos casos se produce una falla en la inducción de genes específicos que deben ser expresados en un momento definido del desarrollo del embrión, sin que se modifiquen genes que ya han sido expresados en instancias previas del desarrollo¹³⁰. Este es el mecanismo que subyace en la disminución de la expresión del gen Pax 3 que se ha confirmado en embriones de ratas diabéticas con DTN¹¹⁸. Asociada al incremento en la velocidad de la vía de la hexosamina, se ha comprobado una inhibición del gen Pax 3 que a su vez regula la actividad de la proteína p 53 y su propia expresión. El incremento en la expresión de p53 emite señales para potenciar las vías apoptóticas dependientes de esta proteína^{125,128-130}.

La sobre producción de ERO en particular el radical ión superóxido es el elemento común y el punto en que convergen todas las vías que se postulan como responsables de las MFC asociadas al estado diabético^{78,105,126}.

2.5. Malformaciones congénitas, diabetes y estrés oxidativo

Las malformaciones congénitas afectan entre un 3 y 5% de los recién nacidos vivos. Aunque muchas son compatibles con la vida, algunas requieren de importantes intervenciones médicas después del nacimiento¹³¹. En Cuba, según el registro nacional de malformaciones congénitas (RECUMAC) la tasa de MFC al nacimiento es en la actualidad de un 1,2%¹³².

Las malformaciones más frecuentes que se han encontrado en estudios clínicos y experimentales de gestantes diabéticas son las derivadas de defectos de cierre del tubo neural^{111,112} y las del aparato cardiovascular.

Los defectos de cierre del tubo neural están relacionados con disminución en la expresión de genes que se expresan tempranamente en el embrión como el gen

Pax 3¹³⁴⁻¹³⁶. Existe consenso entre los estudiosos del tema acerca de que la hiperglucemia (HG) es una causa suficiente para producir este tipo de defecto. Con independencia del tipo de diabetes que sufre la madre antes de la gestación, la incidencia de DTN es entre 3 y 5 veces superior en mujeres con diabetes con respecto a la población embarazada sana^{105,133,135}.

Valiosos estudios en modelos experimentales de diabetes permiten conocer que la HG incluso transitoria o episódica, es capaz de inducir DTN, aumentando al menos 3 veces la tasa de malformaciones^{105,110,11,136}. Las bases moleculares de estos defectos están relacionadas con la activación de señales, algunas pro-apoptóticas, que interfieren los procesos de transcripción de genes que cumplen determinados roles en momentos cruciales del desarrollo morfológico del embrión¹³⁷. Probablemente los productos que se obtienen de la peroxidación lipídica son mediadores de estos efectos citotóxicos^{58,138-140}.

El periodo embrionario es una etapa en la que tienen lugar los procesos más críticos del desarrollo morfogénico^{3,105}, por lo que cambios estructurales en las biomoléculas que reaccionan con aldehídos reactivos pueden provocar alteraciones que repercuten en el desarrollo embrionario^{53,141,142}. De esta manera, si los aldehídos procedentes de las reacciones de peroxidación lipídica son ingeridos en la dieta, podrían llegar al embrión, reaccionar con biomoléculas, y dar lugar a malformaciones congénitas⁵⁸. Un efecto similar podría añadirse por la acumulación de compuestos de esta naturaleza, disponibles en la circulación sistémica de mujeres con diabetes previa a la gestación.

Como soporte de lo expuesto conviene destacar dos aspectos: a) los niños con DTN tienen menores concentraciones de enzimas antioxidantes como la GP¹⁴³ o la G6PDH¹⁴⁴; b) la acumulación de productos de la peroxidación lipídica se asocia con mayor incidencia de defectos del tubo neural^{137,141,145}.

La comprobación de que los productos de la peroxidación lipídica atraviesan la barrera placentaria, e inducen rupturas cromosómicas con potencial mutagénico, podría permitirnos postular a este como uno de los eventos que contribuyen a la etiopatogenia de los MFC en la gestante diabética. Ya que el estado pro inflamatorio crónico conduce al reto oxidativo que se postula en la diabetes, sería interesante explorar la repercusión que sobre la integridad cromosómica y las biomoléculas, tiene el efecto de la acumulación de ERO en un modelo humano de diabetes.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aspectos generales

3.1.1. Toma de muestra.

Las extracciones de todos los pacientes se realizaron luego de 12 horas de ayuno, en la mañana y se hicieron coincidir con aquellas que se usaron para los análisis complementarios que orientó el médico que atiende al paciente. Se extrajeron 10 mL de sangre total la cual se recolectó en tubos que contenían heparina. Aproximadamente 30 μ L de sangre total de cada paciente se emplearon para determinar daño oxidativo al ADN y otros 5 mL se enviaron al laboratorio de citogenética para la aplicación del ensayo correspondiente. El resto de la sangre (aproximadamente 5 mL) se centrifugó a 4 °C y velocidad de 2000 gravedades durante 10 min. A cada mL plasma obtenido se le adicionó 5 μ L del antioxidante Hidroxitolueno Butilado (50 mM) y se distribuyó en tubos de 1,5 mL para ser conservados a 20°C bajo cero hasta el momento de su utilización.

En el caso de las diabéticas no embarazadas del grupo control, la extracción respondió únicamente a los objetivos de la investigación, para lo cual dieron su consentimiento por escrito (Anexo V).

3.1.2- Características de los grupos y algunas definiciones:

Las pacientes que integraron el grupo identificado por las letras **DE** fueron seleccionadas dentro de las que, desde su área de salud, son remitidas al servicio de diabetes y embarazo del Hospital Ramón González Coro. El grupo identificado por **E** se seleccionó a partir de las embarazadas que asistieron al laboratorio clínico del mismo hospital para la realización de complementarios de rutina con el objetivo

de evaluar el curso de su embarazo y fue considerado el grupo control, mientras el grupo **D** lo integraron pacientes de dos centros hospitalarios: Centro de Atención al Diabético de la capital adscrito al Instituto de Endocrinología y el Hospital General docente Julio Trigo.

Se revisaron exhaustivamente las historias clínicas de cada paciente en lo relacionado a los antecedentes patológicos familiares y personales, tiempo de evolución de la diabetes, edad gestacional, así como la administración de medicamentos de cada una. En el acta de consentimiento informado se recogió el interrogatorio efectuado a las pacientes con respecto a los medicamentos que consumía, vitaminas u otros fármacos, ya que el consumo de vitaminas diferentes de las llamadas “prenatales” u otros constituyó un criterio para excluir los casos del estudio.

Las mujeres que se encuentran en el grupo *DE* se mantuvieron en régimen hospitalario en el primer y tercer trimestre (hasta el parto). Si al comenzar el segundo trimestre se encontraban bien controladas eran dadas de alta. A partir de este momento y hasta el comienzo del tercer trimestre se chequearon en consultas programadas cada dos semanas con mediciones de las variables de control metabólico. Con este régimen se logra mayor garantía de la dieta y apego al tratamiento. En el caso de no lograr un control metabólico adecuado continuaron hospitalizadas durante toda la gestación.

3.1.2.1.- Definiciones empleadas para la clasificación de la diabetes:

Esta clasificación la realizó el equipo de médicos que dirige el servicio de diabetes y embarazo del hospital Ramón González Coro. Para ello se siguieron los criterios de la OMS aceptados por la ALAD¹⁴⁶.

Diabetes gestacional (DMG): cuando la gestante presenta una prueba de tolerancia oral a la glucosa patológica durante el embarazo.

Diabetes mellitus Tipo 1: si las pacientes dependen del uso de la insulina para sobrevivir. Esta condición se considera presente cuando los síntomas clásicos de la diabetes están asociados a un incremento considerable de la concentración de glucosa y de cuerpos cetónicos en sangre y orina.

Diabetes mellitus Tipo 2: los casos que reúnen el criterio de glucemia elevada, pero que para su control no necesitan insulina sino hipoglicemiantes orales.

3.1.2.1- Criterios de inclusión

- Aceptación voluntaria de su participación mediante la firma del consentimiento informado.
- Las embarazadas que se encontraban en el tercer trimestre de la gestación hasta la semana 40.
- Poseer edad comprendida entre los 18 y 40 años.

3.1.2.2- Criterios de exclusión

- Se excluyeron a las que en el período de tres meses previo al estudio ingirieron algún medicamento diferente a los suplementos que se les

proporcionan a las embarazadas en el país o hipoglucemiantes habituales en su tratamiento.

- Haber consumido alcohol, tabaco o alguna otra droga en un período menor de dos años previo a la gestación.
- Padecer otra enfermedad crónica no asociada a la diabetes.
- Embarazadas con diagnóstico de pre eclampsia y eclampsia.

3.1.3- Procedimientos para análisis de las variables bioquímicas de estrés oxidativo:

3.1.3.1- Indicadores de defensa antioxidante:

Actividad de la Enzima S.O.D.: La actividad enzimática de la SOD se llevó a cabo por un método espectrofotométrico¹⁴⁷. La técnica se basa en la autooxidación en medio básico que experimenta el pirogalol dando como producto una sustancia que absorbe a 420 nm. Se tomaron 950 μL de solución tampón Tris-HCl 50mM a pH 8,2 y 50 μL de muestra o agua según se medía la cinética de inhibición del pirogalol para muestras o agua respectivamente. La reacción comenzó cuando se adicionaron 50 μL de una solución de Pirogalol 4×10^{-3} M. Se registró el cambio de la absorbancia a 420 nm durante 60 segundos. Se calculó el cociente de las pendientes de la curva para la muestra y el blanco, lo cual se restó a 100 para obtener el porcentaje de oxidación del sustrato. Una unidad de actividad enzimática se definió para SOD como la concentración de la misma que inhibió en un 50 % la oxidación del pirogalol.

Actividad de la Enzima CAT: En una cubeta de cuarzo se adicionaron 1,9 mL de solución tampón fosfato (60 mM, pH 7,0), 1 mL de H_2O_2 (0,06 M preparado en

solución tampón fosfato) y 100 μL de plasma. Se midió la caída de la absorbancia a 240 nm de longitud de onda de dicha solución de H_2O_2 durante 120 s ¹⁴⁸. Una unidad de actividad enzimática se corresponde con 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ de H_2O_2 transformado.

Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH): La determinación de este antioxidante se realizó por el método de Beutler¹⁴⁹. El glutatión reducido (GSH) reacciona con el compuesto 5,5 ditiobis 2 ácido nitro benzoico (DNTB) y da lugar a la formación de un compuesto coloreado que absorbe a una longitud de onda de 412 nm. La muestra de plasma (25 μL) se añadió a una solución tampón de fosfato de sodio (50 mM, pH 8) y 50 μL de una solución de 4mg mL^{-1} de DTNB en acetona. La concentración se calculó utilizando una curva patrón de GSH a concentraciones entre 1,17 y 11,7 $\text{nmol}\cdot 100\text{mL}^{-1}$.

3.1.3.2- Indicadores de daño oxidativo a biomoléculas:

Ensayo para cuantificar las concentraciones de malonildialdehído (MDA): La concentración total de MDA se determinó utilizando una técnica espectrofotométrica¹⁵⁰. La muestra se sometió a un proceso de eliminación de proteínas por hidrólisis ácida con ácido sulfúrico 0.08 N y ácido fosfotúngstico 10 %. EL MDA contenido en 200 μL de muestra reaccionó con TBA (Ácido Tiobarbitúrico) al 0,67 % a 90°C y formó un compuesto de color púrpura claro. A continuación se realizó la extracción del complejo TBA-lipoperóxidos en solvente n-butanol y se determinó la densidad óptica frente a un blanco de muestra en un espectrofotómetro a 532 nm de longitud de onda. Los cálculos se obtuvieron al extrapolar la

concentración de la muestra de una curva patrón obtenida a partir de la sustancia 1,1-3,3 tetraetoxipropano.

En el laboratorio donde se procesaron estas muestras el valor de corte para el MDA corresponde con 0,93 μM por lo que las concentraciones plasmáticas de TBARS se consideran dentro del intervalo normal siempre que se encuentren por debajo de dicho valor. Este dato se obtuvo al procesar el plasma de 87 mujeres con edades comprendidas entre 18 y 40 años donantes del banco de sangre de Marianao en el primer semestre del 2004 (datos de control del laboratorio no publicados).

Ensayo para cuantificar las concentraciones de proteínas carboniladas (indicador de oxidación de proteínas): Se empleó la técnica de Reznick y Packer^{151,152}. Cada muestra se colocó en dos tubos de ensayo que se sometieron a diferentes condiciones de reacción (A y B). Al tubo A se le añadió el colorante 2,4 dinitrofenilhidrazina disuelto en HCl 2,5 M y al tubo B HCl 2,5 M. Se incubó una hora en la oscuridad y posteriormente se precipitaron las proteínas con TCA al 20 %, seguido por una serie de lavados con mezcla de cloroformo y etanol (1:1). El precipitado obtenido se resuspendió con Cloruro de Guanidina 6 M. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 370 nm. Los resultados se expresaron relacionando la masa de los grupos carbonilo por mg de proteínas totales. Las concentraciones de proteínas totales fueron determinadas utilizando la curva patrón obtenida a partir de diferentes soluciones de albúmina bovina con

concentraciones entre 2 y 0.20 mg mL⁻¹. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 280 nm.

Para evaluar la influencia del tiempo de evolución de la diabetes sobre los marcadores de estrés oxidativo que se investigan en los estudios del 1 al 3, se dividieron los casos con diabetes pregestacional (Tipo 1 o 2) según una variable dicotómica, de acuerdo a la cual los casos pertenecen a un grupo con menos de diez años de diagnóstico de diabetes o a otro con diez años o más de evolución.

3.1.3.3. Control de calidad en el procesamiento de las muestras.

Todas las técnicas que utilizamos poseen sus procedimientos normalizados de operación (PNO), por lo que estuvieron sujetas a los controles de calidad que corresponden. Las muestras fueron analizadas por triplicado y se conservaron en hielo durante su manipulación.

3.1.4. Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico se realizó con el programa INFOSTAT y el paquete estadístico Estadística 6.1. Los datos se reportaron como valores de la media de los grupos y se informan los límites inferior y superior para un Intervalo de Confianza de 95 %.

Se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov. Para estimar las diferencias entre grupos se aplicaron pruebas no paramétricas como el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (para tres grupos) y la prueba U de Mann-Whitney para la varianza entre dos grupos.

Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de p fueron menores a 0,05.

3.1.5. Consideraciones éticas:

En esta investigación se siguieron las orientaciones de la Declaración de Helsinki del año 2000. En virtud de lo anterior se recogió el consentimiento informado de cada mujer que decidió colaborar con el estudio. Ninguna de las que se rehusaron a participar fue incluida, aunque no fuera necesario hacerle una extracción adicional a las indicadas por su médico. La planilla de consentimiento informado se entregó con tiempo para su análisis y en ella consta la explicación de los objetivos de los diferentes estudios. En ningún caso se maneja el nombre de los pacientes. El comité de ética de la investigación del centro aprobó cada proyecto que se relaciona con este trabajo.

En todos los casos las extracciones se realizaron en el lugar destinado para ello, dentro del laboratorio clínico de la institución en cuestión, por el personal capacitado y autorizado de la entidad. Se cumplieron los requisitos de limpieza, aislamiento y atención a la paciente en caso de reacciones adversas por la extracción.

3.2. Estudio 1: Cuantificación de indicadores de estrés oxidativo en embarazadas diabéticas en el tercer trimestre del embarazo.

Este es un estudio observacional-analítico en el que participaron un total de 295 mujeres las cuales se distribuyeron en tres grupos: grupo **DE** formado por 129 diabéticas embarazadas, grupo **D** integrado por 77 diabéticas no embarazadas y el grupo **E** que incluyó embarazadas sanas (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de los casos a los que se les midieron indicadores de estrés oxidativo en el Estudio 1.

Grupo (N)	DE (129)			D (77)		E (89)
	Tipo 1 (43)	Tipo 2 (9)	Gest (77)	Tipo 1 (51)	Tipo 2 (26)	
Edad (años)	31,2 (29,7 - 32,6)			32,2 (30,5 - 33,2)		28,7 (27,4 - 29,9)
Edad Gestacional [‡]	35,3 (34,9 - 35,8)					36,1 (35,4 - 36,9)
Tiempo de Evolución (años)	11,1 (9,3 - 12,9)			10,4 (8,5 - 12,2)		
Glucemia (mg·dL ⁻¹)	92,8* (85,7 - 99,9)			92,2** (89,0 - 95,4)		60,0** (58,8 - 61,1)
HbA _{1c} (%)	6,9 (6,1 - 8,7)			7,40 (6,2 - 8,6)		5,82 *** (4,4 - 7,2)

N: Número de casos

DE diabética embarazada, **D** diabética en edad fértil, **E** embarazada sana

*El valor promedio del grupo se calculó con los valores promedio de glucemia del trimestre.

** el valor corresponde al día de la extracción.

***No se determinó para este grupo, como referencia para este indicador se toma el dato obtenido en un estudio realizado por el doctor Márquez Guillén en el año 1987.

Gest. Significa gestacional.

[‡] Edad gestacional en semanas

Los paréntesis debajo de los valores de la media de cada variable en el grupo informa el límite inferior y superior de las matrices, para un intervalo de confianza del 95 %.

A todas las muestras se les determinó la actividad de enzimas antioxidantes SOD y CAT, la concentración de GSH y de proteínas carboniladas y TBARS de acuerdo a los métodos descritos en el acápite 3.1 de este capítulo.

Un subconjunto de cada grupo fue seleccionado para la determinación del índice de daño oxidativo al ADN y otro subgrupo menor para la aplicación de la técnica de aberraciones cromosómicas. La selección de los casos se realizó por muestreo aleatorio.

Evaluación del daño al ADN: ensayo cometa: El ensayo cometa es una técnica ampliamente utilizada para la determinación del daño al ADN. Consiste en

una electroforesis de células individuales que provee un método sencillo para detectar roturas de una o las dos hebras del ADN.

Para cada paciente seleccionada se prepararon dos láminas de agar al 5 %, sobre las cuales se extendieron 5 μ L de sangre periférica disuelto en agar de bajo punto de fusión (30 μ L de volumen final). La electroforesis se desarrolló en solución tampón básico a pH 10,2 con 25 voltios, un máximo de 300 miliamperes y temperatura de 4 °C durante 20 minutos, precedidos de igual tiempo de desenrollamiento del ADN^{153,154}. Posteriormente se sumergieron las láminas en solución de neutralización y se tiñeron con nitrato de plata. Para cada paciente se leyeron 100 células, a las cuales se les asignó una evaluación de acuerdo a una escala de 5 niveles en sentido creciente, partiendo de cero donde no se observa daño hasta el nivel 4 donde se observa que el contenido de ADN de la célula está muy fraccionado. A continuación se realizó una operación matemática que permite transformar el resultado semicualitativo en unidades arbitrarias que son expresadas como porcentaje de ADN en la cola del cometa. El procedimiento fue el siguiente: Se contabilizó el número de células con igual número en la escala de daño y se multiplicó por dicho número (del 0 al 4). Posteriormente se sumaron los cinco productos matemáticos obtenidos. Los valores de cada muestra deben encontrarse dentro del intervalo acotado por los números 0 y 400.

Indicador de estabilidad cromosómica: Técnica citogenética.

Cultivo de linfocitos

Para la realización del estudio de estabilidad cromosómica se empleó la técnica citogenética de microcultivo de linfocitos en sangre periférica estandarizada en el laboratorio de citogenética del Centro Nacional de Genética Médica¹⁵⁵.

Se tomó como valor índice de fragilidad (IFC) cromosómica un número de 4 rupturas o más por ser éste el mayor número de rupturas observadas en embarazadas sanas. Para designar lo que llamamos IFC también tuvimos en cuenta el número de rupturas estándar (solo de 1 %) para controles en el laboratorio, donde se han procesado miles de muestras.

Del experimento donde se aplicó la técnica citogenética al cultivo de linfocitos de los grupos DE, D y E se informó el resultado utilizando dos variables: el número de rupturas promedio del grupo y el porcentaje de casos positivos y negativos. Este último se dedujo de los casos donde el número de rupturas fue mayor o igual a 4 (IFC \geq 4). En ese caso se informó que ese sujeto fue positivo en cuanto a fragilidad cromosómica por tener el IFC \geq 4.

3.3. Estudio 2: Cuantificación de las concentraciones plasmáticas de Vitaminas A y E en embarazadas diabéticas en el tercer trimestre del embarazo:

Es un estudio transversal y descriptivo.

3.3.1- Característica de la muestra a analizar.

Se estudiaron 87 personas clasificadas en 3 grupos (Tabla 4). Los casos que aquí se incluyen en el grupo denominado como DE son diferentes a los del estudio 1, dado que se desarrollaron en distintos períodos de tiempo; las características de los casos incluidos en cada grupo se ajustan a lo planteado en el acápite 3.1.

Estas determinaciones se realizaron en el laboratorio de Fisiología de la facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas de la Universidad San Pablo CEU en Madrid. Las muestras se trasladaron al laboratorio de Fisiología de la Universidad San Pablo CEU en Madrid, donde se conservaron a 80 °C bajo cero hasta el día de su utilización.

3.3.2- Determinaciones bioquímicas que se efectuaron

- Detección de Vitaminas antioxidantes A y E: se realizó por una técnica¹⁵⁶ que identificó de forma simultánea las Vitaminas A y E mediante la separación en un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) (Anexo VI). La absorbancia de las Vitaminas A y E se monitorearon a 294 y 325 nm respectivamente.

Tabla 4. Descripción de los casos a los que se les calculó la concentración Vitaminas A y E (Estudio 2).

Grupo (N)	DE (46)			D (29)		E(12)
	Tipo 1 (7)	Tipo 2 (13)	Gestacional (26)	Tipo 1 (18)	Tipo 2 (11)	
Edad (años)	31,2 (29,8 - 32,5)			32,6 (30,2 - 34,8)		28,6 (27,2 - 29,9)
Edad Gestacional (semanas)	35,4 (33,8 - 37,0)					36,1 (35,4 - 36,9)
Tiempo de Evolución(años)	12,6 (10,8 - 14,3)			10,1 (7,4 - 12,9)		
Glucemia (mg/dL)	89,8* (87,5 - 92,0)			94,5** (87,5 - 101,5)		60,0*** (58,8 - 61,1)
HbA ₁ (%)	6,4 (6,1- 6,7)			7,4 ⁺ (6,2 - 8,6)		5,8 *** (4,4 -7,2)

DE: diabética embarazada, **D:** diabética en edad fértil, **E:** embarazada sana.

N: Número de casos

*El valor se calculó con los valores promedio de glucemia del trimestre.

** El valor corresponde al día de la extracción.

***No se determinó para este grupo, el valor corresponde al dato obtenido en un estudio efectuado con un grupo de embarazadas sanas en el año 1987 por el doctor Márquez Guillén.

Los paréntesis debajo de los valores de la media de cada variable en el grupo informa el límite inferior y superior de las matrices, para un intervalo de confianza del 95 %.

+ p<0.02 La HbA₁ de las diabéticas es mayor que la de las DE.

3.4. Estudio 3. Cuantificación de algunos indicadores de estrés oxidativo en embarazadas con diabetes pregestacional en los tres trimestres del embarazo:

3.4.1. Selección de la muestra.

Se seleccionaron 15 casos de embarazadas diabéticas que fueron estudiadas durante los tres trimestres de su embarazo (Tabla 5). Los criterios de selección de los casos y el método seguido para la obtención de la muestra se ajustan a lo especificado en el apartado 3.1 de este capítulo.

3.4.2. Períodos en los que se realizaron las extracciones de sangre:

Primer Trimestre: Semanas 8 a la 12.

Segundo Trimestre: Semana 20 a la 24.

Tercer Trimestre: Semana 32 a la 36.

Tabla 5. Características de los casos incluidos en el estudio longitudinal de marcadores de estrés oxidativo en los tres trimestres del embarazo (Estudio 3)

Trimestre	Primero	Segundo	Tercero
N	15		
Edad (años)	31,2 (29,8 - 32,5)		
Tiempo de evolución (años)	13.2 (10,8 - 14,3)		
Tipo de Diabetes (N)	Tipo 1 (13) y Tipo 2 (2)		
Edad Gestacional (semanas)	10.2 (8,6 - 11,9)	22.4 (21,1 - 23,8)	36,1 (35,4 - 36,9)
Glucemia** (mg·dL⁻¹)	108,2 (95,8 - 130,2)	95,7⁺ (89,1 - 100,3)	103,1 (81,9 - 124,3)
HbA1 (%)	8,2 (7,0 - 9,4)	6,8[*] (5,8 - 7,8)	7,9 (6,8 - 8,1)

N: Número de casos

** es el valor que corresponde al promedio del trimestre.

* $p < 0.05$ el valor de HbA₁ es menor en el segundo trimestre.

+ $p < 0,05$ el valor de glucemias promedios es más pequeño en el segundo trimestre.

Los paréntesis debajo de los valores de la media de cada variable en el grupo informa el límite inferior y superior de las matrices, para un intervalo de confianza del 95 %.

3.4.3- Determinaciones bioquímicas que se efectuaron para evaluar el Estrés Oxidativo.

La actividad de las enzimas SOD y CAT, las concentraciones de GSH y el daño oxidativo a proteínas se realizaron según los procedimientos descritos anteriormente y que aparecen detallados en los apartados 3.1.4.1 y 3.1.4.2 de Indicadores de defensa antioxidante y daño oxidativo a biomoléculas respectivamente.

3.5. Experimento 4. Detección de actividad clastogénica de un extracto acuoso de aceite de girasol peroxidado con probada acción teratogénica.

Este apartado de la Tesis se realizó en España, mientras trabajaba en el laboratorio de Fisiología de la Universidad San Pablo CEU de Madrid que dirige el tutor de esta tesis Dr. Bartolomé Bonet.

3.5.1. Preparación de muestras de aceite y extracto acuoso

El aceite que se utilizó para los experimentos fue aceite de girasol comercial.

El proceso de calentamiento del aceite se realizó siguiendo los procedimientos estándares de cocción de uso culinario. Se colocaron aproximadamente 400 mL de aceite de girasol en una sartén a la que se acopló un termómetro para realizar el control de la temperatura. El calentamiento máximo se produjo en presencia de oxígeno atmosférico durante 1 hora y la temperatura máxima alcanzada se mantuvo entre 210 y 220 °C. Se efectuaron mediciones de las concentraciones de TBARS cada 10 min. durante el calentamiento. Luego de detener el proceso, el aceite tratado se dejó en reposo hasta que su temperatura descendió por debajo de 30 °C.

Preparación del extracto acuoso: Una vez que el aceite se enfrió se separaron 200 mL para la preparación del extracto acuoso. Al aceite se le añadió un volumen equivalente de agua destilada, manteniendo la emulsión en agitación constante a 300 rpm durante 2 horas, para facilitar el paso a la fase acuosa de los productos derivados de la peroxidación lipídica solubles en agua. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm para facilitar la separación de las dos fases y por aspiración se eliminó la fase oleosa. Una vez obtenido el extracto acuoso, se concentró diez veces aproximadamente mediante un evaporador.

El aceite que no fue sometido a estrés térmico, sufrió el mismo proceso de extracción. Ambos extractos acuosos fueron guardados en microtubos de 2 mL, sellados bajo atmósfera de nitrógeno y conservados a 20 °C bajo cero.

En el momento en que se abrieron los tubos, el contenido se utilizó inmediatamente y el resto se desechó.

3.5.2. Determinaciones en el extracto acuoso de TBARS

La valoración de TBARS en el extracto acuoso se realizó según el método descrito para HPLC por Wong y colaboradores¹⁵⁷ con modificaciones (Anexo VII). La lectura del complejo formado entre los compuestos contenidos en el extracto acuoso y el TBA se realizó en un fluorímetro Hitachi (F-2000), con una longitud de onda de excitación de 532 nm y una longitud de onda de emisión de 553 nm. El resultado se expresó en $\mu\text{moles.L}^{-1}$ de MDA.

3.5.3. Cultivo de linfocitos y preparación de las láminas.

El estudio citogenético se realizó con linfocitos cultivados en medio de cultivo M-199 (Life Technologies) extraídos de voluntarios sanos. El aislamiento de

linfocitos del resto de células sanguíneas se realizó en gradiente de Ficoll (Pharmacia Biotech), método descrito por Wottawa y colaboradores¹⁵⁸ con algunas modificaciones.

La preparación de las extensiones para el estudio citogenético se realizó adaptando el protocolo descrito por Gosden para el estudio de cariotipos¹⁵⁵ (Anexo VIII).

3.5.4. Diseño experimental

Los linfocitos se incubaron con diferentes concentraciones del extracto acuoso de aceite sometido a calentamiento a altas temperaturas, cuyas concentraciones de MDA oscilaron entre $0,75 \times 10^{-4}$ y 18×10^{-4} mM (OX₁ al OX₅). En paralelo se realizaron cultivos incubados con volúmenes similares de extracto acuoso procedentes de aceite de girasol sin someter a estrés térmico (S1 a S5) y cultivos que fueron incubados con el mismo volumen de agua destilada (C1 a C5), con el fin de descartar los efectos de productos que pudiera contener el aceite, y que no dependieran del calentamiento del aceite o los posibles efectos de la adición de agua al medio de cultivo de las células (Tabla 6).

Tabla 6: Volúmenes de los diferentes extractos añadidos en los experimentos de cultivos de linfocitos que se diseñaron con diferentes concentraciones de MDA.

Experimento	Volumen de extracto OX	Volumen de extracto S	Volumen de AD
1	OX ₁ : 25µl ($0,75 \times 10^{-1}$)	S1: 25µl	C1: 25µL
2	OX ₂ : 50µl ($1,5 \times 10^{-1}$)	S2: 50µl	C2: 50µL
3	OX ₃ : 100µl (3×10^{-1})	S3: 100µl	C3: 100µL
4	OX ₄ : 300µl (9×10^{-1})	S4: 300µl	C4: 300µL
5	OX ₅ : 600µl (18×10^{-1})	S5: 600µl	C5: 600µL

OX. Extracto acuosos de aceite sometido a estrés térmico, S: Extracto acuoso de aceite sin calentar, AD: Agua Destilada.

* Representa la concentración en la solución formada por el frasco de cultivo y se expresa en Unidades µM

OX del 1 al 5 representan las diferentes concentraciones de MDA en los extractos utilizados en los cultivos de los experimentos del 1 al 5.

S del 1 al 5: cultivos incubados con volúmenes de extracto acuoso procedentes de aceite de girasol sin someter a estrés térmico.

C del 1 al 5: Cultivos incubados con el correspondiente volumen de agua destilada.

En los cultivos de linfocitos incubados con extracto acuoso procedente de aceite sin calentar (S) y agua destilada (C), se añadieron cantidades equivalentes a las empleadas con extracto acuoso procedente de aceite sometido a estrés térmico. Antes de proceder con las adiciones correspondientes, a cada frasco de cultivo se le extrajo un volumen de medio igual al que fué añadido. De esta forma se garantizó que el volumen final de cada frasco de cultivo fuera el mismo.

3.5.5. Análisis y procesamiento citogenético de cultivos de linfocitos

El estudio citogenético se realizó siguiendo el protocolo diseñado por Emerit y colaboradores en el año 1991⁷⁷ en el que se estudian como promedio 50 metafases en cada una de las condiciones experimentales. Se prepararon 7 réplicas de los cultivos que se corresponden con cada condición experimental, y se extendieron 5 o más láminas por cultivo. De esa forma se garantizó que para cada condición experimental se contara con 300 metafases como mínimo.

Se consideró rotura cromosómica cuando ésta se produjo en una o en las dos cromátidas de diferentes cromosomas. El resultado se expresó como *porcentaje de metafases con rupturas, gap* o alguna otra anomalía respecto al total de metafases leídas.

Para el análisis el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa informático SPSS 11.5 para Windows. Los resultados se expresaron como la media de los valores de cada condición experimental \pm el error estándar. En el caso del análisis de la tasa de rupturas cromosómicas la varianza se analizó con la prueba de χ^2 utilizando una tabla de contingencia de 2x2.

4. Resultados

4.1- Resultados del Estudio I. Cuantificación de indicadores de estrés oxidativo en embarazadas diabéticas en el tercer trimestre del embarazo.

4.1.1- Resultados de indicadores de capacidad antioxidante:

En el análisis de varianza se aplicaron pruebas no paramétricas ya que cuando se aplicó la prueba de normalidad se concluyó que la mayor parte de las variables medidas no siguieron un comportamiento normal.

Al comparar las matrices correspondientes a los valores de cada uno de los indicadores de capacidad antioxidante entre los distintos grupos, resultaron mayores las concentraciones de GSH en el grupo E (embarazadas sanas) y la actividad de la enzima CAT en el grupo de diabéticas no embarazadas. La actividad de la actividad de la enzima SOD muestra valores similares entre los tres grupos (DE, D, E) con $p > 0.05$ (Tabla 7).

4.1.2- Resultados de indicadores de daño oxidativo a biomoléculas:

De las variables que exploran daño oxidativo a biomoléculas, solamente el MDA muestra concentraciones similares en los tres grupos, con una probabilidad de que sean diferentes muy pequeña, $p = 0,87$. Estas concentraciones reflejaron valores mayores a los obtenidos en grupos de personas sanas utilizadas como controles en el laboratorio donde se realizaron las determinaciones ($0,93 \mu\text{M}$).

Las mujeres que integran el grupo E presentan el menor número de rupturas cromosómicas (Tabla 8), menor índice de proteínas carboniladas y los menores valores de % de ADN en la cola del cometa (Tabla 7).

Por su parte las embarazadas diabéticas mostraron similares niveles de daño oxidativo al ADN que las diabéticas en edad fértil, con niveles muy altos de daño ya que el promedio de ambos grupos es de 170,77 y 152,38 respectivamente, los cuales no difieren significativamente ($p > 0,05$) entre sí (Las Figuras 4a y 4b del Anexo IX, muestran representaciones esquemáticas y microfotografías de células a las que se les aplicó la electroforesis básica).

Se evaluó la posible correlación entre marcadores de daño a biomoléculas y tiempo de evolución de la diabetes en los grupos que incluían mujeres con diabetes Tipo 1 y 2 (DE y D). El coeficiente de correlación de Pearson aplicado a las variables correspondientes de los pacientes que cumplían con esa condición mostró un valor de 0,65 para una probabilidad mayor del 95 % ($p = 0,0013$) entre el tiempo de evolución de la enfermedad y las concentraciones de proteínas carboniladas en el grupo *DE*. El resto de las variables no mostró influencia del tiempo de evolución (Figura 5)

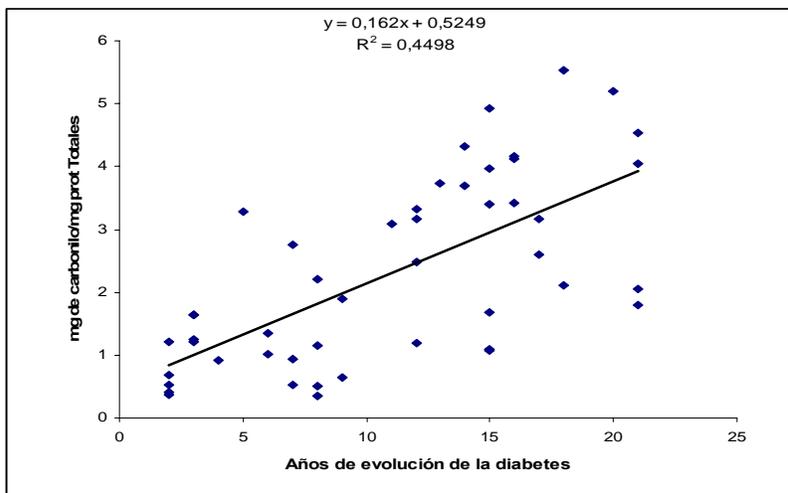


Figura 5. Correlación entre tiempo de evolución de la diabetes y concentración de proteínas carboniladas
 $p = 0,003$ y coeficiente de correlación de Pearson de 0,65

Tabla 7. Indicadores de capacidad antioxidante y daño oxidativo a biomoléculas en los tres grupos en estudio.

Variable	DE (129)	D (77)	E (89)
SOD (U·ml ⁻¹)	15,60 (13,94 - 17,26)	14,12 (12,40 - 15,84)	13,21 (12,75- 18,15)
GSH (nM)	0,59 (0,53 – 0,66)	0,56 (0,43-0,67)	0,70 * (0,62 – 0,79)
CAT (U·ml ⁻¹ · min ⁻¹)	0,09 (0,06 - 0,12)	0,12 + (0,08 - 0,16)	0,07 (0,04 - 0,10)
MDA (µM)	1,19 (1,09 - 1,30)	1,05 (0,94 - 1,15)	1,14 (1,02 - 1,27)
Proteínas carboniladas	4,36 (3,05 - 5,16)	4,93 (3,62 - 6,23)	3,02 ** (2,73 - 3,31)
% ADN Cola del cometa (unidades arbitrarias)	170,77 (152,27- 198,26) N=84	152,38 (131,28 - 173,47) N=49	127,45 *** (116,27 - 138,64) N=65

Las unidades de Proteínas carboniladas son: mg de grupos carbonilo·mg⁻¹ proteínas totales.

DE: diabética embarazada, **D:** diabética en edad fértil, **E:** embarazada sana

* p=0.0466 el grupo **E** tiene menor concentración de GSH.

+ p=0.0206 la actividad de CAT es mayor en el grupo **D**

p=0.00201 La concentración de grupos carbonilo es menor en el grupo **E

*** p=0.00087 El daño oxidativo al ADN es menor en el grupo **E**

Entre paréntesis debajo del valor medio se expresan los límites inferior y superior para un intervalo de confianza del 95 %.

4.1.3- Resultado del estudio citogenético

En el estudio citogenético se incluyó una selección de cada grupo. Luego de aplicado el análisis de varianza se destaca que en el grupo **E** se encontró el menor número de cromosomas con rupturas (Tabla 8).

Tabla 8. Resultado de la técnica citogenética. Número de rupturas encontradas en cada grupo.

DE (N=32)	D (N=25)	E (N=23)
4,13 (3,13 - 5,12)	4,72 (3,36 - 6,08)	1,17 * (0,58 – 1,77)

DE: diabética embarazada, **D:** diabética en edad fértil, **E:** embarazada sana, Entre paréntesis los límites inferior y superior del conjunto de datos para un intervalo de confianza del 95 %

* $p < 0.00001$. Las mujeres del grupo E presentan menor número de rupturas promedio. N= número de personas estudiadas.

En el grupo *DE*, 17 personas tuvieron rupturas en más de 4 metafases por lo que resultaron positivas o con Índices de fragilidad cromosómica (IFC) mayor que 4.

En el grupo *D* resultaron positivas 17 mujeres y en el grupo *E* solo 1 (Tabla 9).

Tabla 9. Total y porcentaje de casos positivos y negativos para fragilidad cromosómica en los tres grupos.

Grupos	Total	Casos +	porcentaje	Casos -	porcentaje
D	25	17	68	8	32
E	23	1	4.34*	22	95.66
DE	32	17	53.12	15	46.88

DE: diabética embarazada, **D:** diabética en edad fértil, **E:** embarazada sana

* El porcentaje de casos positivos en el grupo E es significativamente inferior ($p=0.0012$) en el grupo E con respecto al resto de los grupos (DE y D).

Caso +: individuos con Índice de Fragilidad Cromosómica (IFC) mayor o igual a 4.

Caso -: individuos con Índice de Fragilidad Cromosómica (IFC) menor que 4.

De los 32 casos del grupo *DE* incluidos en el estudio, 20 padecían de diabetes pregestacional (*DEP*) y 12 pacientes con diabetes gestacional (*DEG*) (Tabla 10).

Tabla 10. Total y porcentaje de casos positivos y negativos para fragilidad cromosómica dentro del grupo *DE*.

DEG	12	5	41.00	7	59.00
DEP	20	12	60.00*	8	40.00

DEP mujeres con diabetes pregestacional del grupo DE. **DEG** mujeres con diabetes gestacional del grupo DE

* $p=0.032$, el porcentaje de casos positivos dentro del grupo DEP es mayor

Caso +: individuos con Índice de Fragilidad Cromosómica (IFC) mayor o igual a 4.

Caso -: individuos con Índice de Fragilidad Cromosómica (IFC) menor que 4.

Al hacer el análisis del porcentaje de casos positivos dentro del grupo *DE* que pertenecían al subgrupo con diabetes pregestacional se observó que el 70,58 % de los casos incluidos resultaron positivos con $IFC > 4$ (Figura 6). Este análisis se realizó por una prueba de proporciones para muestras apareadas por categorías mutuamente excluyentes por medio del paquete MICROSTA.

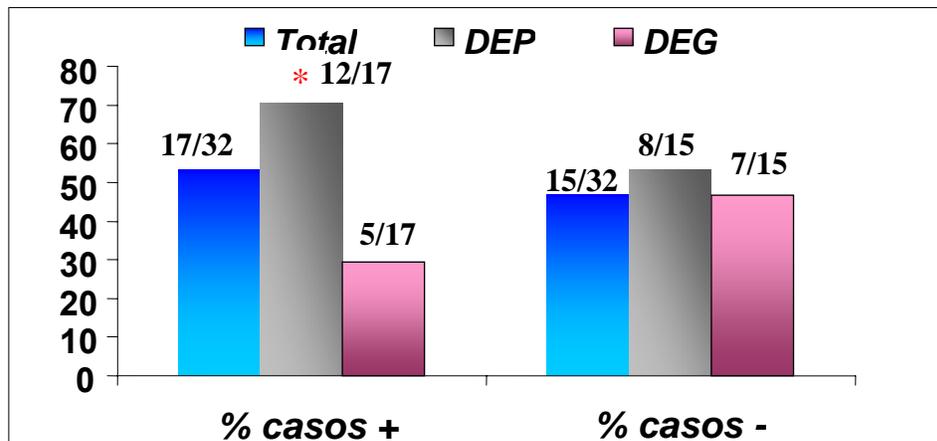


Figura 6. Análisis en porcentaje de los casos positivos y negativos dentro de la muestra del grupo DE a la que se le realizó estudio citogenético.

Nota: **DEP** mujeres con diabetes pregestacional **DEG** mujeres con diabetes gestacional. **Total**, incluye al porcentaje que representan los 17 casos positivos dentro del grupo DE del total estudiados.

Caso +: individuos con Índice de Fragilidad Cromosómica (IFC) mayor o igual a 4.

Caso -: individuos con Índice de Fragilidad Cromosómica (IFC) menor que 4.

* El porcentaje de casos positivos en el subgrupo de las DEP son mayores que en el subgrupo DEG ($p=0,0036$)

La mayor parte de las rupturas cromosómicas encontradas se localizaron en los cromosomas de los grupos A, B y C (Figura 7, Anexo X). Las rupturas encontradas son del tipo cromatídico (Figura 8, Anexo XI).

4.1.4. Resultados de la Influencia del tiempo de evolución sobre los indicadores de estrés oxidativo estudiados.

El 54 % de las mujeres con diabetes mellitus pregestacional (DPG) que integran el grupo DE, padecen de diabetes hace 10 años o más (Tabla 11). Similar distribución muestra el tiempo de evolución en el grupo D, con 51.95 % (40/77) de los casos con más de 10 años de evolución de la diabetes.

Para evaluar el efecto que un tiempo prolongado de padecimiento de la enfermedad pudiera tener sobre los indicadores de estrés oxidativo, subdividimos los casos en dos subgrupos, de acuerdo al tiempo transcurrido desde su diagnóstico (mayor o menor a diez años) hasta el momento de la toma de muestra.

Dentro de este grupo *DE* no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$ para todas las variables) entre los valores de las variables de estrés oxidativo de los casos con más o menos de 10 años de diagnosticada la diabetes. Sin embargo para el grupo *D* las variables MDA y % ADN en la cola del cometa mostraron valores significativamente mayores, (los valores de p son de 0.049 y 0,048 respectivamente) lo cual nos permite proponer que el tiempo de evolución de la enfermedad (menor o mayor que 10), ejerce un efecto adverso sobre las biomoléculas, lo cual ha quedado evidenciado por estos dos indicadores de daño a biomoléculas que se investiga en este trabajo.

Por otro lado, si comparamos las mujeres con diabetes desde hace 10 o más años del grupo *D* con aquellas del grupo *DE*, podemos observar que los valores difieren para algunas de las variables (Tabla 11). Al contrastar los valores de las variables de estrés oxidativo en los subgrupos formados por aquellos casos con

menos de 10 años de diagnóstico de la diabetes del grupos *DE* con respecto al *D*, no se observaron diferencias, puesto que los análisis de varianza reportan valores de p mayor de 0,05 en el análisis de varianza con cada marcador.

Tabla 11. Indicadores de estrés oxidativo de mujeres con diabetes Tipo 1 y 2 en los grupos **DE** y **D**, subdivididos según el tiempo de evolución.

Variable	MENOS DE 10 AÑOS		10 AÑOS O MÁS	
	Grupo DE (n=23)	Grupo D (n= 37)	Grupo DE (n= 29)	Grupo D (n= 40)
Edad Gestacional	34,4 (33,1- 35,7)		35,41 (34,55 - 36,26)	
Tiempo Evolución(años)	5,2 (4,1- 6,3)	3,9 (3,2 - 4,7)	16,21 (14,95 - 17,48)	16,9 (15,0 - 18,7)
MDA (μM)	1,22 (1,03 - 1,41)	0,94 (1,00 - 1,32)	1,28 (1,03 - 1,52)	1,16*† (0,80 - 1,08)
SOD (Uml^{-1})	15,93 (11,00- 19,96)	14,54 (12,16 - 16,91)	14,61 (11,40 - 17,82)	13,73 (11,17 - 16,30)
GSH (nM^{-1})	0,50 (0,33 – 0,67)	0,52 (0,41- 0,62)	0,51 (0,35 – 0,67)	0,60‡ (0,51 – 0,70)
Proteínas Carboniladas	3,51 (2,37- 4,64)	5,51 (2,99 - 8,02)	4,60 (2,87 - 6,33)	4,39 (3,30 - 5,49)
CAT ($\text{Uml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,11 (0,06 – 0,15)	0,16 (0,01 -0,31)	0,08 (0,04 - 0,012)	0,24++ (0,08 - 0,41)
% ADN Cola del cometa	165,13 (117,47 - 12,78)	131,27 (102,13 - 60,41)	167,61 (134,58 - 00,53)	169,57* (139,48 - 99,66)
Rupturas (Número)	3,92 (2,63 - 5,20)	3,33 (1,57 - 5,09)	4,63 (2,06 - 7,19)	5,50 (3,60- 7,40)

DE: diabética embarazada, **D:** diabética en edad fértil.

n: número de casos.

% ADN Cola del cometa: en unidades arbitrarias.

Las unidades de Proteínas carboniladas son: mg de grupos carbonilo:mg⁻¹ proteínas totales.

Edad gestacional: semanas.

Entre paréntesis los límites inferior y superior del conjunto de datos para un intervalo de confianza del 95 %

† representa diferencias entre valores de MDA para tiempo de evolución mayor o menor a 10 años dentro del grupo *D*.

‡ representa diferencias entre % ADN para tiempo de evolución diferente en del grupo *D*.

* El MDA es diferente en el grupo *D* con respecto al *DE* para tiempo de evolución mayor o igual a 10 años.

£ Los valores de GSH son diferentes entre los grupos *DE* y *D* cuando el tiempo de evolución es mayor a 10 años.

++ Los valores de la actividad de resultaron mayores en el subgrupo *D* con más de 10 años respecto al *D* con menos de 10 años.

4.1.5. Resultados del análisis de la influencia del Tipo de diabetes:

Se evaluó la influencia del tipo de diabetes en los indicadores de estrés oxidativo para cada grupo comprendido por personas con diabetes (*DE* y *D*). Para

ello se utilizó un análisis de varianza de dos vías. En el grupo *DE* se formaron 3 subgrupos (mujeres con diabetes Tipo 1, Tipo 2 y gestacional) y en el grupo *D*, comprendido solo por mujeres en edad fértil con diabetes, dos: Casos con diabetes Tipo 1 o diabetes Tipo 2. No se obtuvieron diferencias entre personas con diabetes Tipo 1 comparadas con Tipo2 en el grupo *D*. Sin embargo dentro del grupo *DE* se encontró que las concentraciones de proteínas carboniladas difieren si se agrupan las embarazadas según la etapa en que se diagnosticó sea previo al embarazo (DEP) o durante la gestación (DEG). En el grupo de mujeres con diabetes gestacional las concentraciones de GSH son mayores y las de proteínas carboniladas menores (Tabla 12).

Tabla 12. Indicadores de estrés oxidativo en el grupo **DE** divididos según el diagnóstico de la diabetes haya sido previo al embarazo (DEP) ó durante el mismo (DEG).

	DEP Tipo 1 (n=43) + Tipo 2 (n=9)	DEG (n=77)
Tiempo de Evolución años	11,24 (9,47 – 13,12)	
Edad en años	30,33 (28,42- 32,31)	31,72 (29,60 - 33,01)
Edad Gestacional semanas	34,95 (34,24 - 35,71)	35,59 (35,03 - 36,24)
MDA nM·mL⁻¹	1,25 (1,12 - 1,44)	1,15 (1,01 - 1,32)
SOD (U·ml⁻¹)	15,19 (12,75 - 17,63)	15,87 (13,58 - 18,15)
GSH (nM)	0,51 (0,39 - 0,62)	0,65 (0,57 - 0,73)
Prot. Carboniladas (mg·mg⁻¹ prot)	4,53⁺ (3,98 - 5,09)	4,11 (3,05 - 5,16)
Catalasa (U·ml⁻¹·min⁻¹)	0,09 (0,06 - 0,12)	0,09 (0,07 - 0,1)
% ADN Cola del cometa (unidades arbitrarias)	166,7 (141,06 - 192,23)	173,18 (147,37 - 198,99)
Rupturas Conteo de número	4,2 (3,06 - 5,34)	4,00 (1,87 - 6,13)

DEG: diabetes Gestacional, **DEP:** Diabetes pregestacional.

Entre paréntesis los límites inferior y superior para un intervalo de confianza del 95 %
n: número de casos.

* $p=0.027$ Las concentraciones de Proteínas carboniladas son mayores en el grupo DEP que en el DEG.

✖ $p=0.0258$ Las concentraciones de GSH son mayores en el grupo DEG que en el DEP.

En el estudio de daño oxidativo al ADN pudimos apreciar que son menores los niveles de daño en las embarazadas sanas (Tabla 7), encontrándose dentro del intervalo alcanzado en grupos formados por personas sanas .

Dentro del grupo *DE* no se apreció que el tipo de diabetes produjera alguna influencia en los niveles de daño oxidativo al ADN, ya sea analizando los tres tipos de diabetes: Tipo 1, Tipo 2 ó Gestacional ($p = 0.77$) o agrupando los casos según el diagnóstico de la diabetes sea pregestacional o gestacional ($p= 0.25$).

El tiempo de evolución de la diabetes influyó en el valor promedio que alcanzan los niveles de daño oxidativo al ADN solo en el grupo D, donde el subgrupo con menor tiempo de evolución (menos de 10 años) muestra el menor valor de daño, comparable al valor obtenido en el grupo de embarazadas sanas (Tabla 13).

Tabla 13. Influencia del tiempo de evolución de la diabetes en los valores *de % ADN Cola del cometa* para las pacientes con diagnóstico de diabetes pregestacional (Tipo 1 y Tipo 2 juntos) incluidos en los grupo DE y en el grupo D.

DE: diabética embarazada, **D:** diabética en edad fértil.

n: número de casos.

Los valores de % ADN Cola del cometa se expresan en unidades arbitrarias.

+ Los valores de % ADN en la cola del cometa del grupo *D* con más de 10 años de diabetes son mayores que en el subgrupo con menos de 10 años con $p=0.049$, y resultaron menores también que la media del grupo *DE* con similar tiempo de padecimiento de la diabetes para un valor de $p=$

0.036 (¥)

Entre paréntesis los límites inferior y superior para un intervalo de confianza del 95 %.

	DE (n=31)	D (n=49)
% ADN Cola del cometa <10 años con diabetes	165,13 (117,47– 212,78) (n=12)	131,27^{+¥} (102,13 – 160,41) (n=22)
% ADN Cola del cometa ≥10 años con diabetes	167.61 (134,68 – 00,53) (n=19)	169.57 (139,48- 199,66) (n=27)

4.2.
Resultados del
Estudio 2.

Cuantificación de las concentraciones de Vitaminas antioxidantes en un grupo de embarazadas con diabetes en el tercer trimestre del embarazo.

Este experimento se desarrolló en el laboratorio de investigaciones de Fisiología de la universidad San Pablo CEU en Madrid, España.

Al cuantificar las vitaminas A y E en mujeres embarazadas con diabetes encontramos que las concentraciones difieren significativamente de los calculados para las embarazadas sanas (Tabla 14).

Tabla 14. Concentraciones plasmáticas de Vitaminas antioxidantes en el tercer trimestre del embarazo.

Variable	DE (n= 46)	D (n=29)	E (n=15)
Vitamina A	28,22* (22,61 - 33,79)	44,94 (39,98 - 49,90)	33,01 (26,69 - 39,34)
Vitamina E	548,08+ (380,03 - 716,14)	749,54 (571,09 - 928,00)	618,43 (535,93 - 700,94)

+ $p < 0.0235$ Los valores de Vitamina E son menores en el grupo de embarazadas con diabetes con respecto a las mujeres diabéticas gestantes y a las embarazadas sanas.

* $p < 0.00001$ Los valores de Vitamina A son menores en el grupo de Embarazadas con diabetes con respecto a los otros dos grupos.

Entre paréntesis los límites inferior y superior para un intervalo de confianza del 95 %.

Las concentraciones de vitaminas se expresan en mgL^{-1} .

4.3. Resultados del Estudio 3: Cuantificación de algunos indicadores de estrés oxidativo en un grupo de embarazadas con diabetes pregestacional.

Estudio longitudinal en los tres trimestres de la gestación.

Ninguno de los indicadores que se midieron en este estudio se modificó significativamente a lo largo del embarazo, según demuestran los análisis estadísticos efectuados en los tres trimestres del embarazo para cada una de las variables estudiadas (Figura 9).

Al aplicar análisis de correlación de Pearson a los indicadores de daño oxidativo a biomoléculas contra variables que miden capacidad antioxidante no obtuvimos ningún nivel de correlación de importancia estadística.

El tiempo de evolución de la enfermedad mostró un alto nivel de correlación con respecto a los valores plasmáticos de GSH al relacionar los datos de los tres trimestres, obteniendo una $r = -0.521$ con $p = 0,006$ (Figura 10).

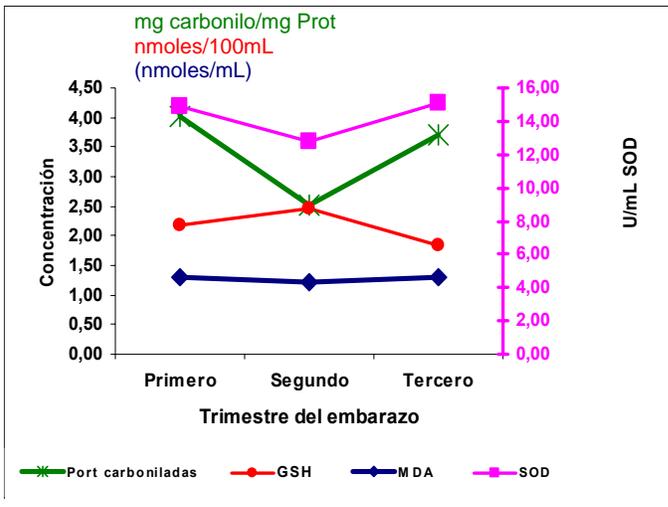


Figura 9. Tendencia de los indicadores de estrés oxidativo en los tres trimestres del embarazo.

Unidades: proteínas carboniladas: mg carbonilo/mg Proteínas totales, GSH (Glutación reducido): nmoles/100mL, MDA: mM

El análisis de varianza para cada variable mostró que no hay diferencias significativa entre trimestres para ninguna de ellas, los valores de p son 0,95, 0,91, 0,45, 0,16 para MDA, SOD, GSH y Proteínas Carboniladas respectivamente.

La escala del eje y de la izquierda se corresponde con las concentraciones de GSH, MDA y proteínas carboniladas. La escala de la derecha (rosada) corresponde a las unidades de actividad de la enzima SOD.

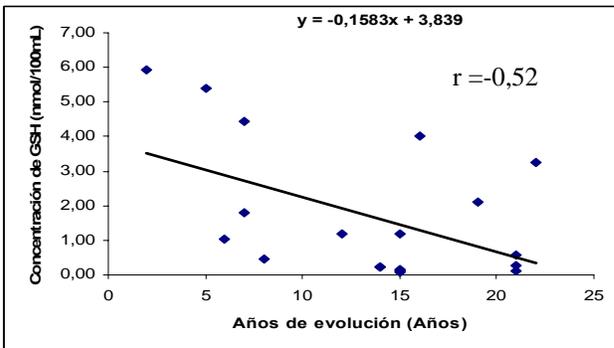


Figura 10. Curva de correlación entre concentración de GSH y tiempo de evolución de la diabetes para los tres trimestres juntos, con $p < 0,05$.

4.4- Resultados del Experimento 4. Estudio de actividad clastogénica de un extracto acuoso de aceite vegetal oxidado sobre linfocitos de donantes sanos.

El calentamiento del aceite de girasol dio lugar a un aumento en la concentración de TBARS, mostrando ya diferencias significativas respecto a los valores iniciales a los 10 minutos de haber comenzado el calentamiento, cuando la

temperatura alcanzó los 150° C. Las concentraciones de TBARS en el aceite peroxidado se estabilizaron cuando la temperatura alcanzó los 200° C.

Se decidió utilizar en el experimento de cultivos de células el aceite sometido a temperaturas de 150–200° C durante 20 minutos. Este aceite presentaba un elevado contenido de TBARS y la vitamina E había empezado a disminuir. Al separar el extracto acuoso de dicho aceite, se cuantificó el contenido de TBARS y se encontró que este era de 19.58 µM MDA. Las concentraciones de TBARS en el extracto de aceite sin calentar fueron casi indetectables: 0,09 µM de MDA.

4.4.1. Estudio citogenético en cultivos de linfocitos con extractos acuosos. Detección de actividad clastogénica.

Al evaluar la viabilidad de las células en los cinco experimentos que se describieron en el apartado 3.5.4 (capítulo de materiales y métodos) se observó que aquellos cultivos donde se adicionó extracto acuoso con concentraciones de TBARS igual o superior a 3×10^{-4} mM la viabilidad celular fue inferior al 10 % por lo que hubo que desechar los cultivos preparados con esas condiciones. Los cultivos que se prepararon en paralelo, adicionando igual volumen de extracto de aceite sin calentar, no tuvieron efecto tóxico alguno sobre los linfocitos.

Los resultados de las roturas cromosómicas se indican en valor absoluto y porcentual respecto al total de metafases estudiadas (Tabla 15) para los cultivos de los experimentos 1 y 2 (con las dos concentraciones más bajas de TBARS).

En las figuras 11.1 y 11.2, Anexo XII, se pueden observar láminas que muestran ejemplos de las metafases de los cultivos pertenecientes a los grupos C1,

C2, S1, S2, OX1 y OX2. En las metafases de estos dos últimos grupos, se muestran rupturas cromosómicas.

Tabla 15: Número y porcentaje de rupturas cromosómicas en los cultivos de células de los experimentos 1 y 2.

	Número de Metafases Observadas	Roturas cromosómicas	
		número	%
C1	357	33	9,24
C2	345	28	8,11
OX1	354	65	18,36 ⁺
OX2	355	82	23,09 ⁺
S1	311	27	8,68
S2	301	20	6,64

*: $p < 0,001$ Los cultivos de linfocitos incubados con extracto acuoso OX1 y OX2 presentan mayor número de rupturas que los incubados con igual volumen de extracto acuoso de aceite sin tratamiento térmico S1 y S2 respectivamente.

+ $p < 0,001$ representa diferencia estadísticamente significativa entre cultivos de linfocitos incubados con extracto acuoso OX1 y OX2 con respecto a los cultivos de linfocitos incubados con la misma cantidad de agua destilada C1 y C2.

5. Discusión

El embarazo en la mujer diabética constituye un alto riesgo para la salud de la madre y el feto. Con frecuencia estas mujeres sufren de abortos, partos prematuros, malformaciones en la descendencia y otras entidades que se asocian con el estrés oxidativo y la hiperglucemia¹⁰⁹⁻¹¹⁵. En numerosos estudios se ha reportado una merma de la capacidad para enfrentar el reto oxidativo a que están expuesto los pacientes diabéticos^{36,82-87,159}. No obstante algunos reportes han evidenciado contradicciones que se refieren fundamentalmente a la actividad de las enzimas antioxidantes^{82,167-170} ya que con respecto a los antioxidantes de bajo peso molecular hay consenso en cuanto a su disminución^{112,160}.

El hallazgo de que la concentración de GSH en el grupo de embarazadas sanas es más alto que aquellas con embarazo diabético o diabéticas no embarazadas, corresponde a lo esperado para este grupo. Se supone que la condición diabética está asociada con una presencia constante de reacciones oxidativas que comprometen las reservas antioxidantes celulares^{32,33,159,161,162}. En el laboratorio donde se realizaron estas determinaciones de la concentración de GSH en personas sanas, en este mismo intervalo de edades, la media del grupo (n=30) fue de 0.85 nM y los límites superior e inferior de 0,62 a 1,03 respectivamente (los datos no se muestran). En un trabajo del año 2001 se encontró que las concentraciones de GSH (evaluados por HPLC) en un grupo de 53 adultos sanos¹⁶³ fue de 0,81 nM. Los valores de la media obtenida en este trabajo para mujeres diabéticas, embarazadas o no, se encuentran por debajo de los antes mencionados para personas sanas, por lo que podemos asegurar que las reservas de este

antioxidante están disminuidas en dichos grupos. El GSH desempeña un importante papel en la defensa celular contra el estrés oxidativo, de ahí la importancia que desempeña en situaciones donde estén ocurriendo eventos oxidativos con una frecuencia relativamente alta. Al GSH le corresponde la mayor proporción entre los componentes con grupos tioles del plasma sanguíneo y cumple con importantes funciones celulares además de su acción antioxidante^{87,143,144}. La disminución en sangre supone que en el resto de los tejidos ocurre una caída de la capacidad antioxidante mediada por esta sustancia, ya que los valores de GSH en sangre reflejan el estatus en otros tejidos menos accesibles para realizar evaluaciones de este tipo¹⁸. Además, este tripéptido constituye la mayor dotación del escaso contenido antioxidante del tejido embrionario¹⁴³ y su participación en la protección del mismo en situaciones de estrés oxidativo ha sido corroborada por varios autores¹⁴⁸. En estudios experimentales relacionados con eventos teratogénicos en diabetes se ha demostrado que la suplementación con precursores y formas farmacéuticas de GSH, disminuye la tasa de malformaciones en embriones de animales diabéticos. Por su parte la adición de estas sustancias aumenta la viabilidad celular en cultivos donde el diseño del experimento incluye agresión por oxidantes¹²³.

Los resultados de otros autores coinciden con estos datos en cuanto a las concentraciones de GSH en plasma de embarazadas con diabetes^{18,163-165}. También existe concordancia en los estudios en modelos animales de diabetes donde las reabsorciones y MFC han mostrado correlación con bajas concentraciones de GSH¹⁶⁶.

Se estima que en una célula sana, sólo el 1% del contenido total de GSH debe encontrarse en la forma oxidada³³ y que las concentraciones intracelulares de GSH oscilan entre 0,5 y 1 nM de acuerdo con el tipo de célula³². Este conocimiento ha permitido sugerir que un pequeño cambio en el estado REDOX intracelular del GSH (como el que se muestra) pudiera ser una señal que se amplifique dando como respuesta cambios en la actividad de factores de transcripción. Estos pueden modificar la expresión de variados genes de respuesta al estrés, con diversas consecuencias para el funcionamiento celular^{167,168}. Al respecto se ha especulado que las concentraciones de GSH celulares pueden ser relevantes en el mantenimiento de la función mitocondrial, pues evitan la formación del poro de transición mitocondrial que se ha descrito en células incubadas en medios con altas concentraciones de glucosa^{13,21,169}.

El análisis de varianza con respecto al contenido de GSH entre los subgrupos formados por mujeres con diabetes pregestacional (DEP) o gestacional (DEG) dentro del grupo DE permitió comprobar que el contenido de este antioxidante se encuentra más reducido aún para el grupo DEP, lo cual se corresponde con lo esperado dado que las reservas deben encontrarse más agotadas entre las mujeres con diabetes pregestacional, donde las biomoléculas han sido expuestas a eventos oxidativos durante mayor tiempo¹⁷⁰.

Existe una plétora de trabajos con reportes de actividad de las enzimas antioxidantes en modelos experimentales y humanos de diabetes^{63,65,87,171-175}. Los resultados que exponemos muestran valores dentro del intervalo normal para la

actividad de SOD en los tres grupos, además de no mostrar diferencias entre ellos. Similares han sido los resultados alcanzados por otros autores^{29,175}.

Por su parte las determinaciones para la enzima catalasa en este trabajo revelan que las mujeres diabéticas no embarazadas tienen más del doble del valor alcanzado por mujeres embarazadas en los otros dos grupos. La actividad de esta enzima se ha reportado disminuida en embarazadas con diabetes gestacional¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ (que representan el 59 % del grupo DE), especialmente en el tercer trimestre. En varios trabajos con ratas diabéticas dicha actividad se ha encontrado elevada en corazón, aorta y cerebro y disminuida en eritrocitos, hepatocitos y neuronas¹⁸.

El efecto de la diabetes sobre la actividad de SOD no parece tener un patrón definido con respecto a la edad, tipo de célula, especie animal o duración de la enfermedad^{2,87}. En estudios similares al que se expone, dirigidos por la investigadora francesa Evelyn Peuchant¹⁷³, se calculó la actividad de enzimas antioxidantes en una muestra formada por 54 mujeres embarazadas, con Diabetes Mellitus Tipo 1 y con diabetes Gestacional. El estudio da cuenta de una marcada disminución de la actividad de ambas enzimas (SOD y CAT), en el plasma de las mujeres incluidas en el grupo de embarazadas con Diabetes Mellitus. Para la SOD, la disminución fue más relevante en el subgrupo de las que padecían de Diabetes Mellitus Tipo 1. La SOD es una enzima que experimenta profundos cambios en su actividad cuando se glucosila por lo que es de esperar que en medios con alta concentración de glucosa su actividad disminuya¹⁷⁸. Otro estudio del mismo año concluyó que la actividad de la SOD circulante, se encontraba baja en todos los trimestres de las embarazadas con diabetes Tipo 1 y la actividad de CAT en plasma

se incrementó en el grupo de embarazadas con diabetes Tipo 1 en el tercer trimestre de la gestación¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Como se ha dicho antes, la enzima SOD convierte O^{\bullet}_2 en H_2O_2 , el cual luego es transformado en agua por CAT en los lisosomas o por GSH peroxidasa en la mitocondria y el citosol¹⁵. La expresión del gen *sod2*, que codifica para la Mn SOD mitocondrial, está incrementado en embriones de ratas expuestos a un ambiente con alta concentración de glucosa, lo cual se corresponde con el hecho de que esta es una enzima que se activa en condiciones de estrés oxidativo. La medición que se reporta en este trabajo se realizó en plasma, donde se encuentra en mayor proporción la enzima CuZn SOD extracelular. No obstante la enzima Mn SOD, puede liberarse en pequeñas cantidades al plasma y contribuir de esa forma a la actividad total que se reportó.

Experimentos en modelos animales de diabetes muestran una actividad dispar de dicha enzima, que aumenta o disminuye con respecto a los controles sanos según el tipo de tejido evaluado¹⁸. Ya se ha dicho que los cambios en la actividad de estas enzimas pueden ser transitorios y bifásicos; a lo cual se suma el hecho de que están sujetas a procesos de glucosilación en el estado diabético, los cuales también dependen de la susceptibilidad particular de cada isoforma a dicha glicosilación. Esto es importante en el caso particular de la CuZn SOD, que puede disminuir hasta en un 60 por ciento de su actividad cuando se halla glicosilada¹⁷⁸.

La sobreexpresión de la enzima SOD se ha propuesto como uno de los principales mecanismos por los cuales la célula contrarresta el incremento de ERO. Un estudio realizado en eritrocitos de mujeres con preeclampsia aguda mostró

que la actividad de la enzima era mayor que los del grupo control^{182,183}. Datos similares fueron encontrados por el grupo de Guo¹⁷⁶ en tejido cardíaco de ratas diabéticas, en los cuales las enzimas CAT y CuZn SOD presentaban una actividad aumentada cuando se las comparaba con el control. Sin embargo, otras evidencias muestran disminuciones en la actividad enzimática¹⁸⁰.

En resumen estos resultados muestran que la actividad de la enzima SOD que aquí se reporta para los diferentes grupos no se encuentra disminuida con respecto a la referencia para casos control del laboratorio, y no se apreciaron diferencias entre los grupos incluidos en este trabajo.

En la bibliografía encontramos otros reportes de cambios en la actividad de estas enzimas antioxidantes a medida que avanza el tiempo de gestación en mujeres cuyo embarazo cursa sin complicaciones así como en aquellas con diagnóstico de diabetes gestacional¹⁸³⁻¹⁸⁴. En general se han encontrado cambios en las variables de estrés oxidativo y particularmente incrementos de las concentraciones de productos de la peroxidación lipídica.

El promedio de las concentraciones de TBARS (MDA) obtenidas para cada grupo, superan el límite superior del intervalo de confianza para grupos control en dicho laboratorio, siendo éste de 0.93 μM . Aunque puede asegurarse que los valores de TBARS obtenidos en este grupo indi

can que se encuentran elevados los productos de la peroxidación lipídica, estos no son tan altos como los obtenidos en otros grupos de personas con diabetes¹⁷⁰. Esto debe tener su fundamento en el riguroso control médico que se ejerce sobre estas pacientes, las que se encuentran hospitalizadas la mayor parte

de su gestación y en particular en el último tercio de su embarazo. Un control metabólico adecuado para la mayoría de las embarazadas con diabetes, lo cual incluye bajas concentraciones de los diferentes lípidos sanguíneos, fue informado por el equipo médico que colaboró en esta investigación.

Los análisis de varianzas entre los tres grupos mostraron que no hay diferencias entre ellos ($p > 0,05$) con respecto a las concentraciones de MDA, lo cual confirma la presencia de reacciones peroxidativas en el estado diabético, resultado que coincide con lo reportado por otros investigadores^{78,173,174,179-183}. Es notable el incremento de las reacciones de peroxidación lipídica también en el grupo de gestantes sanas, lo cual confirma lo reportado en otras experiencias^{174,175,183}. El embarazo es una situación de adaptación metabólica donde la reserva de lípidos se incrementa notablemente y en el tercer trimestre se elevan a cantidades que pudieran resultar patológicas entre mujeres no gestantes en ese grupo de edades^{100,185}. La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que se ha acuñado como uno de los principales eventos relacionados con reacciones oxidativas en situaciones de altas concentraciones de glucosa ya sea *in vivo* como *in vitro*. La medición espectrofotométrica de las concentraciones de MDA, principal indicador de peroxidación lipídica, aunque algo inespecífica, ha permitido asegurar la presencia de este tipo de eventos en humanos y en estudios experimentales de diabetes^{18,49,78,171}.

En la publicación del Dr. Djordjevic citada antes¹⁷⁴, las concentraciones de MDA se incrementaron a lo largo del embarazo no complicado en mujeres sanas. Otros marcadores de peroxidación lipídica como etano y pentano, obtenidos del

análisis de gases exhalados se encontraron elevados con respecto al grupo sano en 64 pacientes diabéticos¹⁸³. En este caso se obtuvo además una alta correlación con indicadores de actividad inflamatoria. En dicho estudio se expone que los valores de MDA medidos en plasma (con técnica similar a la que se aplica en este trabajo) oscilan entre 0,2 y 0,9 μM en el grupo de personas sanas.

También se han reportado concentraciones elevadas de 8-isoprostanos, otro marcador de peroxidación lipídica, en un grupo de mujeres con diabetes mellitus gestacional^{162-164,183}. En este mismo estudio se confirmó la acción teratogénica de esas sustancias y los altos valores del mediador inflamatorio TNF- α en las muestras evaluadas¹⁸³. El incremento de marcadores de peroxidación lipídica no puede interpretarse como un hecho aislado. Estas reacciones producen sustancias de variados pesos moleculares, estabilidad química y carácter electrofílico, que reaccionan con moléculas distantes del sitio en que se produce, por lo tanto pueden actuar como segundos mensajeros en eventos de citotoxicidad¹⁸.

Hemos detectado evidencias de daño oxidativo a proteínas en los grupos *DE* y *D*, pero no en el de embarazadas sanas. Los valores de referencia para este indicador están por debajo de 2 μM , valor similar al encontrado para el grupo *E*¹⁵².

El estrés oxidativo provoca elevación de los derivados carbonilo reactivo por varios mecanismos. Estos incluyen oxidación directa de residuos de aminoácidos, interacción de proteínas con azúcares reductores y sus productos de oxidación que abundan en la circulación de pacientes diabéticos. Los grupos carbonilo se incrementan como resultado de la oxidación de proteínas y sus concentraciones en tejidos y plasma se usan como indicadores de daño oxidativo a proteínas³⁹. Se ha

demostrado que las concentraciones están incrementadas en sangre venosa en pacientes diabetes tipo 2, donde se han llevado a efecto la mayoría de los estudios^{39,40}.

La oxidación de proteínas se infiere de los altos valores de grupos carbonilo, debido a que las reacciones oxidativas que experimentan estas macromoléculas rinden carbonilos reactivos^{14,30}. El daño que las ERO producen a las proteínas tiene gran implicación para el funcionamiento de la célula. La afectación abarca rupturas del esqueleto peptídico a las cadenas laterales de los aminoácidos, además de producir reacciones cruzadas entre ellos⁵⁶. La repercusión del daño aumenta por la abundancia de estas moléculas en los sistemas biológicos y la multiplicidad de funciones que ejecutan, pudiendo afectar funciones relacionados con actividad de enzimas, proteínas de transporte, receptores, proteínas que participan en las vías de transducción de señales, inactivación de enzimas reparadoras de daño oxidativo y pérdida de fidelidad de ADN polimerasas en la replicación del ADN¹⁸⁶.

La formación de proteínas carboniladas es el marcador más general y ampliamente utilizado de daño oxidativo a proteínas. Varios autores han considerado que los indicadores de daño oxidativo a proteínas representan más fielmente la existencia de un estado pro oxidante que otras técnicas que evalúan daño a biomoléculas por ERO¹⁸¹. La concentración incrementada de compuestos carbonilo derivados de proteína resulta un mejor marcador de estrés oxidativo que los productos de la peroxidación lipídica^{38,40,186,187}, incluso considerando el compuesto 8 iso-prostaglandina^{181,187}.

En otros estudios los pacientes diabéticos han evidenciado poseer altas concentraciones de proteínas oxidadas¹⁸⁸. Por lo tanto los resultados alcanzados en este trabajo, donde el grupo control *E* presentó las más bajas concentraciones de proteínas carboniladas, está en concordancia con lo reportado por otros autores.

Por otra parte el subgrupo de mujeres gestantes con diabetes pregestacional (DEP) mostró mayor valor de proteínas carboniladas que aquel donde la diabetes aparece en el tiempo gestacional (DEG). Las mujeres con diabetes pregestacional deben tener más modificaciones oxidativas a proteínas en respuesta al incremento que este tipo de proceso tiene en la circulación de personas con diabetes. Ya que la carbonilación de proteínas es una modificación que conduce a una mayor resistencia a la degradación proteica, es lógico que se acumulen más en estas pacientes que en aquellas que desarrollaran diabetes durante la gestación, donde el tiempo de ocurrencia de este tipo de reacción no debe ser tan prolongado.

Las especies reactivas del oxígeno producidas durante el metabolismo normal del oxígeno son una fuente endógena de daño al ADN que puede ser contrarrestado por el eficiente mecanismo de reparación en células eucariontes⁷³. Cuando la producción rebasa la capacidad antioxidante celular se producen rupturas de simples y dobles cadenas. Éstas facilitan la aparición de cortes, translocaciones, etc., como resultado de fallas de los mecanismos de reparación⁸⁶.

La reacción de radicales del oxígeno con la desoxirribosa del ADN conduce a la fragmentación del azúcar, a la pérdida de una base con parte del residuo del azúcar que aún permanece unido y al corte de la cadena⁴². Se ha propuesto que la toxicidad in vivo del O₂·- y del H₂O₂ se produce por su conversión, dependiente de

una reacción no enzimática catalizada por hierro, a una especie radical altamente reactiva, el radical $\cdot\text{OH}$ ^{12,15,18}. Alrededor de un 90 % de los daños inducidos en el ADN por el H_2O_2 da por resultados bases alteradas; asimismo puede causar roturas de simple y doble cadena. El H_2O_2 también induce aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, presumiblemente como consecuencia directa del daño oxidativo al ADN¹⁴. Se ha comprobado que las membranas celulares permiten el paso a las ERO producidas por los leucocitos y liberadas al espacio extracelular, donde pueden inducir roturas de cadenas de ADN en las células vecinas¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

Las células contienen enzimas que pueden eliminar las bases del ADN dañadas oxidativamente tales como las ADN glicosilasas. La existencia de estas enzimas, en una amplia diversidad de organismos, sugiere que el daño oxidativo es un problema con el que las células han tenido que lidiar durante la evolución^{73,190}.

El ensayo cometa posee varias modalidades en cuanto al medio que se les proporciona a las muestras en estudio y para la lectura de las láminas, además de ser sensible y específica para medir daño oxidativo al ADN^{153,154,191}. El conteo de células se realizó por el método visual tal y como se explica en materiales y métodos. La seguridad de que el daño que se observa en las células sea una consecuencia del estrés oxidativo, se fundamenta en que el ADN es una molécula resistente, y por lo tanto, si existen sitios lábiles al álcali, se debe a que las bases se han modificado oxidativamente^{153,192}. La técnica que utilizamos para la evaluación del daño oxidativo al ADN se lleva a cabo en condiciones de baja iluminación por lo que excluimos el daño por irradiación. Aunque con este ensayo se permite realizar

análisis de cinética de reparación¹⁶⁰, en este estudio sólo se determinó daño basal y podemos afirmar que éste difiere entre los tres grupos incorporados. El grupo E resultó ser el que posee los menores valores de daño oxidativo al ADN, lo cual era esperado pues en este se encuentran las gestantes control, que durante su embarazo no presentaron ninguna problema de salud.

Los datos concuerdan con nuestra hipótesis de que moléculas como el ADN deben experimentar mayor daño cuando la diabetes y el embarazo concomitan. También concuerdan con los por otros autores quienes encontraron contundentes evidencias de daño al ADN en personas con diabetes^{189-191,193}. Este daño se sustenta en la asociación de altas concentraciones de glucosa en el paciente diabético con el incremento de reacciones de tipo inflamatoria^{166,194}. Estas últimas incrementan la producción de mediadores inflamatorios y estimulan factores nucleares, los que responden a esta situación generando mayores niveles de especies reactivas del oxígeno, creándose un círculo vicioso en el que se perpetúa el daño oxidativo^{24,42,194}.

Se ha demostrado que el daño al ADN es un factor crítico que contribuye a la manifestación de inestabilidad cromosómica. El daño a la mitocondria puede contribuir a que persista el fenotipo inestable y la condición de estrés oxidativo ha sido señalada como un mecanismo bioquímico capaz de perturbar la integridad del genoma¹⁹⁵⁻¹⁹⁹.

Existe abundante información y respaldo experimental para vincular los mecanismos que generan inestabilidad genómica con las especies reactivas del oxígeno¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Entre las sustancias clastogénicas se han identificado varias

especies reactivas del oxígeno, así como algunos productos que derivan de las reacciones que ellas provocan²⁰⁰. La participación de las especies reactivas del oxígeno en el daño por isquemia-reperfusión está debidamente fundamentada. Se ha asegurado que pacientes que experimentan este tipo de eventos presentan altos índices de fragilidad cromosómica como consecuencia de poseer sustancias con actividad clastogénica en su circulación sistémica²⁰¹.

Al evaluar la integridad cromosómica en las embarazadas con diabetes (grupo DE completo) observamos un incremento del número de rupturas cromosómicas en este grupo, así como en el grupo D. La variable “número de rupturas” se calcula contando el número de cromosomas con daño en su fenotipo, ya sean gap, u otro tipo. El porcentaje de casos con fragilidad cromosómica es algo inferior en el grupo DE que en el D. Si dentro del grupo DE separamos los casos con diabetes pregestacional (DEP), resalta el hecho de que más del 70 % de ellas resultaron positivas o con IFC mayor o igual que 4 rupturas. En el grupo E el índice de rupturas fue mucho menor a los otros dos y un solo caso resultó positivo. Todo esto corrobora que el estado diabético, que ya ha sido caracterizado de pro-oxidante¹⁹⁴, cursa con inestabilidad cromosómica al menos en las células linfoides.

Otro aspecto interesante que emana de este estudio es el tipo de rupturas encontradas, la mayoría de las cuales involucra una sola de las cromátidas. Este patrón de rupturas es similar al encontrado en los experimentos con cultivos a los que se les añadieron sustancias con actividad clastogénica^{201,202} conducidos por Ingrid Emerit, que permitieron demostrar que varias ERO poseen dicha actividad clastogénica.

Este patrón de aberraciones permite suponer que las rupturas ocurren durante todo el ciclo celular, especialmente en G 2, ya que este patrón de ruptura cromatídica es característico de esta etapa en que el ADN empieza a condensarse nuevamente²⁰³.

El índice de rupturas se puede modificar como consecuencia del contenido de antioxidantes de los diferentes medios de cultivo²⁰². En el laboratorio en el que desarrollamos la técnica de citogenética se emplea medio de cultivo RPMI rico en L-cisteína y anticlastogénico (no favorece las rupturas). Se consideró un número de rupturas mayor o igual a 4 como índice positivo de fragilidad cromosómica (IFC \geq 4), teniendo en cuenta además que el número de aberraciones estándar para los controles es de 1 en 100 metafases.

Los cromosomas mayormente dañados en nuestras observaciones fueron los de los grupos A, B y C. En estos grupos están presentes la mayoría de los genes que codifican las enzimas que participan en el metabolismo oxidativo de la célula. Al menos 6, de los 10 genes de enzimas antioxidantes que han sido localizados, están presentes en estos 3 grupos de cromosomas²⁰⁴. En el cromosoma 2 se encuentra localizado el gen pax 3, cuya expresión disminuye en cultivos de embriones en medios con alta concentración de glucosa¹⁰⁵.

Por otro lado la respuesta de los genes que codifican para sustancias antioxidantes ha sido evaluada de anormal en condiciones de hiperglucemia en pacientes con diabetes Tipo 1²⁰⁵. El desajuste en la producción intracelular de enzimas antioxidantes en respuesta a altas concentraciones de glucosa puede conducir a algunas complicaciones como vasculopatías, lo cual se asocia a

polimorfismos de genes de enzimas antioxidantes. Los polimorfismos en la región promotora del gen de la aldosa reductasa (*ALR2*) que provocan incremento de su expresión está asociado con la susceptibilidad de algunas personas a desarrollar neuropatías y nefropatías. El incremento de la velocidad de esta vía en condiciones de hiperglucemia conduce a la generación de ERO por diversos mecanismos^{78,79} entre los cuales está el aumento de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y mediadores inflamatorios como factor de crecimiento transformante²⁰⁵. De existir alguna relación de causalidad entre los hallazgos que aquí se exponen, ésta debe ser confirmada en investigaciones posteriores pues está fuera del alcance de este trabajo.

Se desconoce la repercusión que los altos índices de fragilidad cromosómica pueden tener en el desarrollo fetal, pues los mecanismos por los cuales se producen trastornos del desarrollo embrionario y fetal no están aún completamente descritos. Sin embargo hay una teoría cada vez más fundamentada que propone que los cambios en el funcionamiento de las mitocondrias generados por estrés oxidativo son responsables de las alteraciones morfogénicas en el desarrollo^{24,58,94,105,198}. Recientemente se demostró que con independencia de las MFC que se diagnostican en el momento del nacimiento, los hijos de las mujeres con diabetes Tipo 1 poseen incrementos en plasma del péptido Natriurético Tipo B. Dicho incremento coincidió con una alta correlación con las concentraciones de hemoglobina glucosilada de la madre y marcadores de estrés oxidativo. El incremento en plasma de esta sustancia representa un factor de riesgo para padecer afecciones cardiacas en la adultez²⁰⁶.

Como se sabe los trastornos de cierre del tubo neural se reconocen como una de las MFC de mayor frecuencia en los hijos de madres diabéticas. Se ha comprobado inestabilidad cromosómica en células amnióticas de fetos con defectos del cierre neural²⁰⁷. Todo lo anterior permite suponer la posible participación de las ERO en los mecanismos que conllevan a inestabilidad cromosómica y MFC.

El hallazgo de aberraciones cromosómicas en las embarazadas con diabetes, así como en el grupo de mujeres con diabetes no embarazadas, sugiere que la producción de ERO excedió la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante y de reparación, lo cual caracteriza al estado diabético.

No se pudo demostrar correlación entre los dos indicadores de daño al ADN. Una posible explicación es que el ensayo cometa mide daño basal que es reparado por las enzimas que participan en el mecanismo de escisión de bases¹⁵³, por lo que el daño es transitorio. La técnica citogenética permite que se detecte un daño más permanente. Incluso se postula que la presencia de grandes cantidades de cromosomas con gap puede ser una señal de que han tenido lugar eventos de reparación de daño al ADN¹⁵⁵.

Los análisis de correlación que habíamos propuesto realizar solo confirmaron nuestras predicciones con el par proteínas carboniladas vs. tiempo de evolución de la diabetes, donde se obtuvo una alta correlación ($r=0,65$) con una probabilidad mayor del 99 % (Figura 5). Esto ratifica que la concentración de grupos carbonilo es un buen indicador de daño oxidativo¹⁹¹ y que estos procesos de oxidación de proteínas - cuya implicación para la salud han sido discutidos aquí- se incrementan en el estado diabético.

El tiempo de evolución de la enfermedad se encuentra entre los factores de riesgo para la aparición de la neuropatía y la nefropatía²⁰⁸. Así se reconoce en el Programa Nacional de Prevención y Control de la Diabetes Mellitus del MINSAP²⁰⁹ donde se especifica que las personas que viven con la enfermedad desde hace 10 años o más presentan mayor riesgo de padecer estas alteraciones. En personas con diabetes que presentan vasculopatías se han encontrado los marcadores de daño oxidativo más altos. En este estudio no se realizó el análisis de la incidencia de vasculopatías en los valores alcanzados por los marcadores de daño a biomoléculas por ser muy pequeño el número de casos con este trastorno (n=5). No obstante el grupo DE presenta valores muy altos de daño oxidativo al ADN, que como ya se ha señalado son mayores que en el grupo de embarazadas sanas.

Las mujeres con diabetes Tipo 1 y 2 de cada uno de los grupos *DE* (n=52) y *D* (77) fueron clasificadas de acuerdo al tiempo de padecimiento de la enfermedad: menor que 10 ó igual o mayor que 10 años de diagnóstico de la diabetes. La comparación entre los subgrupos así formados aportó que las concentraciones de MDA y el % de ADN fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en el grupo de mayor tiempo de evolución de la enfermedad cuando se consideraron las mujeres no embarazadas con diabetes (*D*). Este hallazgo concuerda con lo esperado para todas las biomoléculas en las cuales se exploró la relación entre tiempo de evolución y daño oxidativo. Se supone que al incrementar el tiempo de padecimiento de la enfermedad también es mayor la exposición de las biomoléculas a las ERO que se acumulan producto de la enfermedad, aunque no se pudo demostrar este efecto sobre el ritmo de oxidación de proteínas. Tampoco se hizo

evidente en el grupo *DE* que las concentraciones de antioxidantes o de biomoléculas oxidadas se afectaran por encontrarse en el grupo de más o menos tiempo de evolución. No obstante las concentraciones de biomoléculas oxidadas evaluadas se encontraron elevadas en todos los subgrupos de pacientes con diabetes.

Al indagar el efecto que el tipo de diabetes podía ejercer sobre los indicadores de estrés oxidativo, encontramos que sólo las concentraciones de proteínas carboniladas estaban disminuidas entre las mujeres con diabetes gestacional al compararlas con aquellas con diagnóstico de la diabetes previo a la gestación, pero todos los grupos poseen este marcador alto.

Ya fueron explicadas las consecuencias que para el funcionamiento celular trae este tipo de daño, el cual afecta todos los sistemas de organización biológica, llegando a perturbar el correcto funcionamiento del organismo de un individuo. La existencia de elevadas concentraciones de grupos carbonilo se han puesto de manifiesto en otras investigaciones con gestantes diabéticas^{183,188} y en personas con diabetes Tipo 2²¹⁰. El tipo de diabetes que experimenta el paciente condiciona la aparición de complicaciones de grandes o pequeños vasos. Los pacientes con diabetes Tipo 2 sufren más infartos y aterosclerosis²¹¹ que los de Tipo 1, en los que son más frecuentes las microangiopatías².

El subgrupo de embarazadas con diabetes gestacional (DEG) exhibió un valor promedio de GSH más alto que el resto de los grupos, los cuales son similares a los valores normales. La diabetes gestacional se diagnostica generalmente luego de la semana 20, por lo que las perturbaciones en el

metabolismo de los carbohidratos y grasas son de corta duración con respecto a aquellas que se producen en mujeres con diabetes pre gestacional. Por esta razón suponemos que el daño por acumulación de ERO sea menor, pues como vimos, el tiempo de evolución afecta a algunos marcadores de estrés oxidativo y en particular conduce a agotamiento de las reservas de GSH.

El embarazo en la mujer con diabetes se ha asociado con carencia de adecuadas concentraciones intracelulares de antioxidantes de origen vitamínico y otros^{6,97,98}. En este trabajo exponemos un resultado similar, ya que las concentraciones de Vitaminas E y A resultaron más bajas que los de las mujeres embarazadas sanas e incluso que los de las mujeres no embarazadas con diabetes. También resultan inferiores a los resultados obtenidos por investigadores del Instituto de Nutrición e Higiene de los alimentos de Cuba²¹² en una muestra de gestantes sanas de la capital. Las concentraciones de vitaminas antioxidantes en pacientes diabéticos se han reportado elevados²¹³, disminuidos^{87,97,98} y sin cambio con respecto a grupos de personas sanas en diferentes investigaciones^{214,215}. La aplicación de terapias antioxidantes a personas con diabetes basadas en suplementos de vitamina E, ha reportado efectos beneficiosos en algunos casos^{216,217,218}.

En otras investigaciones se ha explorado el beneficio de una terapia antioxidante para contrarrestar los trastornos asociados al embarazo diabético¹⁰⁷ y la preeclampsia, y confirmaron que la suplementación con antioxidantes (vitaminas E y C) pudiera ser beneficiosa en el tratamiento de la diabetes¹⁷⁵, para contrarrestar

el estrés oxidativo²¹⁹ y en la prevención de los efectos adversos en la descendencia^{111,112,126,220-222}.

Por otra parte, la evidencia disponible parece indicar que la ausencia de control metabólico afecta la disponibilidad de Vitamina A en pacientes con diabetes Tipo 1 pero no con diabetes Tipo 2²²³.

Resultados similares se obtuvieron en ratas BB donde se encontraron disminuidos no solo las concentraciones de retinol sino también los de la proteína que transporta esta sustancia desde el hígado a los tejidos que es la proteína de unión al retinol (RBP por sus siglas en inglés)²²⁴.

Varios ensayos clínicos en los que se han administrado antioxidantes vitamínicos han tenido resultados contradictorios. Las dosis de vitaminas antioxidantes que por lo general han logrado reducir los marcadores de disfunción endotelial y daño oxidativo a biomoléculas son altos y el tiempo de administración prolongado. Sin embargo en un ensayo con personas que padecían diabetes Tipo 2 se logró disminuir las concentraciones de PAI-1 con cantidades relativamente bajas de vitamina E²¹⁴.

No se conoce cuál es el límite inferior en las concentraciones de Vitamina E que debe tener una persona sana. Los estudios con dosificación de estas vitaminas siempre presentan un grupo control contra el cual se realizan las comparaciones. En este trabajo, los grupos controles no son representativos de una población supuestamente sana, pues uno de los grupos que actúan como control es de mujeres gestantes en el tercer trimestre del embarazo, período donde se ha

demostrado que se elevan los triacilgliceroles y los productos de las reacciones de peroxidación lipídica y el otro grupo control es de mujeres con diabetes.

La gestación constituye una situación fisiológica en la que existe una especial demanda de vitamina E, debido al incremento de los lípidos plasmáticos, permitiendo así mantener una relación vitamina E/lípidos similar a la de las mujeres no gestantes³⁴. Además, el rápido crecimiento fetal requiere un elevado aporte de vitamina E por el aumento en la síntesis de membranas celulares.

La vitamina E es una sustancia que, más allá de su mencionado poder antioxidante, cumple importantes funciones en la comunicación celular, estimula la transcripción de genes que codifican proteínas que participan en la regulación del ciclo celular (Ciclina D y E, p53 y p27) y reprime genes cuyos productos están involucrados en la respuesta inflamatoria como los de las moléculas de adhesión celular VCAM e ICAM²²⁵. Además, el α tocoferol es capaz de bloquear la producción de radical superóxido porque inhibe la actividad de la NADPH oxidasa. En resumen es una molécula señalizadora, responsable de la transferencia de información en las células y la regulación de la expresión genética²²⁵, de ahí la importancia que pudiera tener su disminución en el grupo de las embarazadas con diabetes.

En los estudios cuyos resultados se han discutido hasta aquí hemos demostrado que las mujeres diabéticas en el tercer trimestre de la gestación, presentan disminución de algunos de los antioxidantes plasmáticos que se cuantificaron como el GSH y las Vitaminas A y E, así como una elevada presencia de biomoléculas dañadas oxidativamente. El desbalance REDOX es muy similar en

cada variable al obtenido para el grupo integrado por mujeres con diabetes en edad fértil, lo cual permite asegurar que son los cambios metabólicos y activación de vías específicas que se producen en la diabetes, los principales causantes del daño oxidativo a biomoléculas. Unido a lo anterior se confirmó la elevada proporción de casos con fragilidad cromosómica entre las mujeres con diabetes pregestacional que rebasa el obtenido en las mujeres con diabetes o embarazadas con diabetes gestacional (Figura 6).

La presencia de un estado pro oxidante se evidenció desde el primer trimestre de la gestación en el grupo de las 15 mujeres con diabetes pregestacional, a las cuales se le midieron algunos parámetros de estrés en los tres trimestres de la gestación. Las concentraciones de proteínas carboniladas se mantuvieron altas en todos los períodos evaluados, sin que se produjeran cambios de significación estadística entre los tres períodos evaluados. Un comportamiento similar se obtuvo para el MDA, el cual se mostró sostenidamente alto durante los períodos analizados. La actividad de las enzimas antioxidantes tampoco se diferenció entre los diferentes trimestres. Podemos afirmar que los valores se encuentran en el mismo intervalo que los obtenidos en grupos de personas sanas y no se diferencian de los calculados para el grupo *DE* del estudio 1. Este resultado concuerda con el análisis hecho en un estudio donde en condiciones similares al nuestro se midió la actividad de la enzima SOD²²⁶. Entre los diferentes trimestres del embarazo en mujeres con diabetes no se encontraron diferencias en la actividad de esta enzima antioxidante. En otro trabajo con embarazadas diabéticas se encontró que la actividad de la enzima, medida en lisado de eritrocitos, aumentó de forma paralela

al curso del embarazo¹⁷⁴. Puede que esta medición en lisado, refleje mejor que en plasma, el cambio en la actividad que esta enzima experimenta durante la gestación. Al parecer las enzimas que participan en la defensa antioxidante primaria responden de modo diferente al ambiente oxidante condicionado por la diabetes materna. Algunos factores como los genéticos pueden propiciar una respuesta diferente en el feto, pero parece indiscutible que el incremento en la actividad de la SOD juega un papel crucial en la protección de este contra la dismorfogénesis^{228,229}.

En estudios de teratogenicidad por fenitoína, donde se involucran mecanismos mediados por acumulación de sustancias pro-oxidantes, se ha detectado una baja actividad de estas enzimas²²⁸. Otro dato de interés es que los defectos de cierre del tubo neural (DTN) en modelo animal de diabetes reflejó una correlación negativa con respecto al contenido de enzimas antioxidantes en eritrocitos de ratas²²⁹.

Uno de los resultados que más resaltan en este estudio es el referido a las bajas concentraciones de GSH en los tres trimestres. Teniendo en cuenta que el GSH es uno de los principales antioxidantes en los tejidos embrionarios^{105,123}, su disminución pudiera ser relevante, pues se encuentra 3 órdenes de magnitud por debajo de la cifra que se estima como límite inferior en plasma de personas sanas. Ya expusimos la importancia de mantener alta la disponibilidad de antioxidantes para la madre y el feto, lo cual está respaldado por numerosos estudios en los que se ha ponderado el papel de esta sustancia en el mantenimiento de la función celular²³⁰.

El método experimental utilizado en el tratamiento del aceite permitió disponer de muestras de aceites y extractos acuosos con la cantidad de TBARS suficiente para demostrar que estos lípidos hidrosolubles, de pequeño peso molecular, son capaces de producir rupturas en los linfocitos de donantes sanos.

El estudio de la actividad clastogénica de las sustancias producidas durante el calentamiento del aceite comercial, se desarrolló con el objetivo de darle continuidad a algunos de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. En particular el que se deriva de los estudios 1 y 3 en los que se verificó que las embarazadas con diabetes pregestacional poseían los más altos índices de fragilidad cromosómica y que por otra parte el embarazo en estas mujeres cursaba con altas concentraciones de TBARS, incluso desde el primer trimestre de la gestación. Si los productos de la peroxidación lipídica son capaces de transferir su actividad clastogénica, estos pudieran constituir posibles mediadores de la teratogenicidad en la diabetes ya que su presencia está asegurada en la circulación sistémica de estas mujeres con diabetes.

El hecho de que las roturas cromosómicas en linfocitos incubados con el aceite tratado fuera entre 2 y 3 veces superior a los índices obtenidos con el extracto de aceite sin tratar, incluso a concentraciones relativamente bajas de $0,75 \cdot 10^{-4}$ mM y $1,5 \cdot 10^{-4}$ mM (comparable a las encontradas en plasma de embarazadas diabéticas en este trabajo), permite corroborar la hipótesis de que los productos de la peroxidación lipídica pueden inducir daño oxidativo al ADN que se puede observar durante la etapa de metafase del ciclo celular, que es cuando se produce el máximo empaquetamiento de los cromosomas.

Para que este daño se haga visible, éste debe involucrar a cientos de pares de bases y burlar los estrictos mecanismos de reparación y parada del ciclo celular. Por otra parte las alteraciones en la replicación del ADN por reacción de los aldehídos con los grupos sulfidrilo de las ADN polimerasas, ha sido descrito como posible mecanismo inductor de las roturas cromosómicas^{197,199}. Por lo tanto, son múltiples los mecanismos mediante los cuales los aldehídos generados en el aceite sometido a calentamiento son tóxicos para la célula. La inducción de alteraciones cromosómicas pudiera ser especialmente relevante, dado que éstas parecen producirse con concentraciones muy bajas de aldehídos. Las consecuencias podrían no presentarse de forma inmediata, como sucede durante el periodo embrionario (dando lugar a MFC), sino que también podrían tener lugar a largo plazo, dado que las roturas cromosómicas se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer^{41,231}.

En estudios llevados a cabo por otros autores en los que se han incubado linfocitos con determinados aldehídos como el 2-butenal y 4-HNE, se produjeron también roturas cromosómicas^{56,78,232}. Cuando en experimentos similares al anterior se utilizaron aldehídos de mayor tamaño molecular y sin grupos hidrofílicos, no se observaron alteraciones en los cromosomas^{69,232}.

En los embriones de las gestantes diabéticas -dada la constante presencia de productos de la peroxidación lipídica- la estructura del ADN podría experimentar alteraciones como las observadas en linfocitos cultivados con extracto acuoso del aceite sometido a estrés térmico. No obstante, la repercusión que para la salud del feto pudieran tener resultados como estos, queda aún por descubrir.

CONCLUSIONES

1. La capacidad antioxidante plasmática que depende del GSH y las vitaminas E y A, está comprometida en las mujeres con diagnóstico de diabetes mellitus, estén o no embarazadas.
2. No se obtuvieron evidencias de disminución de los antioxidantes enzimáticos evaluados en las embarazadas con diabetes en el tercer trimestre, con respecto a los grupos controles.
3. En los grupos de mujeres con diabetes, ya sea embarazadas o no, se detectó un incremento de los niveles de daño oxidativo a biomoléculas por las tres técnicas utilizadas.
4. El desbalance REDOX se evidencia desde el primer trimestre de la gestación en las embarazadas diabéticas y mantiene niveles similares en los diferentes trimestres de la gestación.
5. Se corroboró un efecto de inestabilidad cromosómica en sangre periférica de embarazadas diabéticas, el que se agudiza cuando la diabetes que padece la madre es previa a la gestación. Un efecto similar se obtuvo en el grupo control de mujeres con diabetes.
6. En el grupo de diabéticas embarazadas los niveles de daño al ADN fueron mayores en las mujeres con 10 años o más de evolución de la diabetes.
7. El tipo de diabetes influyó en algunos de los indicadores de estrés oxidativo analizados; las concentraciones de GSH resultaron mayores en el grupo de embarazadas con diabetes gestacional, alcanzando valores comparables a la población sana, mientras que los mayores índices de rupturas cromosómicas se le atribuyeron a las mujeres con diabetes pregestacional.
8. Los productos de la peroxidación lipídica evaluados *in vitro* demostraron capacidad para inducir rupturas cromosómicas.

RECOMENDACIONES

1. Proponer a la dirección del MINSAP que el Programa de atención preconcepcional a la mujer diabética se inserte de alguna forma con el programa de asesoramiento genético que se desarrolla en todas las áreas de salud de nuestro país, para que de esta forma se incremente el control preconcepcional y se logre un diseño de la atención previa y durante el embarazo que logre disminuir la tasa de malformaciones congénitas en las mujeres diabéticas.

2. Diseñar un estudio donde se compruebe la capacidad de sustancias que se encuentran en la circulación sistémica de mujeres con diabetes, de inducir fragilidad cromosómica en linfocitos de donantes sanos en cultivo.

3. Identificar las regiones cromosómicas que se afectaron en mayor medida en los estudios donde se demostró fragilidad cromosómica, ya sea en cultivos de sangre de embarazadas, o de linfocitos aislados de donantes sanos e incubados con productos de peroxidación lipídica.

4. Diseñar una investigación en modelo animal de diabetes mellitus durante la gestación donde se verifique el efecto protector de la vitamina E sobre los embriones y se trabaje en la identificación del probable mecanismo molecular responsable de dicha protección.

Bibliografía

1. The genetic landscape of diabetes. Created July 7, 2004. NIH Lectures. 122 pantallas. Acceso el 19 de junio del 2005. Disponible en URL: <http://www.NCBI.nlm.nih.gov/80/books/bv.fcgi?tool=bookshelf&call=bv.View>.
2. Baynes JW and Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48:1-9.
3. González ET. Diabetes experimental: etiología de malformaciones congénitas en descendientes de ratas diabéticas *Rev Cubana Endocrinol* 2002;13(1):53-63.
4. Nathan DM. Finding New Treatments for Diabetes. How Many, How Fast . . . How Good? *N Engl J Med* 2007;356:437-440.
5. Loeken M R. Corrent perspectivas on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy. *Semin. Med. Genet.* 2005;135C:77–87.
6. Martin C, Eriksson UJ. Vitamin E decreased the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* 1997;46:1054-63.
7. Samper E, Nicholls DG and Melov S. Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts. *Aging Cell* 2003;2:277-285.
8. Buchanan TA and Xiang AH .Gestational diabetes mellitus *J. Clin. Invest.* 2005;115:485–491.
9. Valdés L. Congenital Malformations In Children Born To Diabetic Mother. *Oficial J Int Diab Fed* 2002;50:1:424 - 425.

10. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 2002: jan. Vol. 25; 5(16 pantallas). Acceso el día 8 de junio 2002. Disponible en URL: <http://www.Diabetes endocrine glands-diseases.com>.
11. MINSAP, Anuario Estadístico 2005. Acceso el día 23 de abril 2006. Disponible en <http://www.infomed.sld.cu>.
12. Cabrera E. Anticuerpos antiislotos asociados a diabetes tipo 1 en sujetos infectados por Echovirus 16. *Diabetología*. 2003,46:1348-1353.
13. Evans JL., Goldfine ID., Maddux BA, Grodski GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insuline resistance and beta cell dysfunction? *Diabetes* 2003;52:1-8.
14. Toren F. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:247–254.
15. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine* 1999. Oxford, U.K.: Oxford University Press.
16. Sies H.; Strategies of antioxidant defense. *Eur. J Biochem* 1993;215: 213-219.
17. Iris FF, Benzie F. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr* 2000;39:2:48-54.
18. Halliwell B and 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: 231–255, 2004.

19. Alvarez S. The mitochondria. Published in Antioxidants and life style on line. Revista antioxidantes 2002 enero; 1(10 pantallas). Acceso el día 5 de febrero 2002. Disponible en URL: [http:// www.antioxidants.com.ar](http://www.antioxidants.com.ar).
20. Azzi A, Davies KJ, Kelly F. Free radical biology - terminology and critical thinking. FEBS Lett 2004;558:3-6.
21. Sang-Oh Y, Chang-Hyun Y, An-Sik CH. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. Mech Ageing Dev 2002;123:1597-1604.
22. Sheldon M. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? Critical Care 2006, 10:208-218.
23. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 2000;408:239-247.
24. Balaban RS, Nemoto S and Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging Cell. Nature 2005;120:483–495.
25. Fattman CL, Schaefer L M, Oury T D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Rad Biol Med 2003;35:236-56.
26. Muzykantov V R. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. J Control Release 2001;71:1-21.
27. Scandalios J G. The rise of ROS. Trends Biochem Sci 2002;27:483-6.
28. Akcil E, Tug T, Doseyen Z. Antioxidant enzyme activities and trace element concentrations in ischemia-reperfusion. Biol Trace Elem Res 2004;76:13-17.
29. Mates JM, Pérez- Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin biochem 1999. Vol 32, (6) 395-406.

30. Halliwell B and Gutteridge JMC. Detection of hydroxyl radical in biological system. En *Free Radical in Biology and Medicine*. Second edition 1989. Clarendon press. Oxford. p47-58.
31. Garcia de la Asunción J, Millian A, Pla R, Bruseguini L, Pallardó E, Viña J. Mitochondrial glutathione oxidations correlates with age associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J*. 1996;10:333-38.
32. Kleinman W A, Richie J P. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Molecular and Cellular Pharmacology; J Biochem Pharmacol* , 2000, 60:1:19-29.
33. Ono H, Sakamoto A and Sakura N. Plasma Total GSH concentrations in healthy pediatric and adults subjects. *Clin Chem Acta* 2001;312(1-2):227-233.
34. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiology Biochem*. 2001;57:1:43-56.
35. Meagher E A. Treatment of atherosclerosis in the new millennium: is there a role for vitamin E? *Prev Cardiol* 2003;6:85-90.
36. Chertow B. Advances in Diabetes for the Millennium: Vitamins and Oxidant Stress in Diabetes and Its Complications. *Medscape General Medicine* 2004;6(3s):25-31.
37. Szweda PA, Friguet B, Szweda L I. Proteolysis, free radicals, and aging(1,2). *Free Radic Biol Med*. 2002;33:29-36.
38. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:191-208.
39. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R & Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Genes Mol. Med*. 2003;9:169–176.

40. Grune T, Merker K, Sandig G, and Kelvin J A. Davies. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;05:709–718.
41. Charames GS and Bapat B. Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med.* 2003;3:589-596.
42. Rehmana A, Nourooz-Zadehb J, Mollerc W, Tritschlerc H, Pereirad P, Halliwell B. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1999;448:120-122.
43. Sancar A, Lindsey-Boltz L, Unsal-Kasmaz K and Linn S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Ann. Rev. Biochem.* 2004;73:39–85.
44. Kang D and Hamasaki N. Mitochondrial Oxidative Stress and Mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:10:1281–1288.
45. Burcham PC. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 1998;13:287-305.
46. Tesoriere L, D'Arpa D, Butera D, Pintaudi AM, Allegra M, Livrea MA. Exposure to malondialdehyde induces an early redox unbalance preceding membrane toxicity in human erythrocytes. *Free Radic Res.* 2002;36:89-97.
47. Ames N B, Shigenaga M K. y Hagen T M. Oxidants antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7915-22.
48. Witz G. Biological interactions of alfa and beta unsaturated aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1989;7:333-349.

49. Comporti M. Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Molec Aspects Med.* 1993;14:199-207.
50. Boullier A, Bird DA, Chang MK, Dennis EA, Friedman P, Gillotre-Taylor K, et al. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;947:214-222.
51. Soriguer A, Rojo MF, Dobarganes G, Garcia MC, Almeida JM, Esteval M, Ruiz A, Tinahones F, Gomez-Zumaquero JM, Garcia-Fuentes E, Gonzalez S. Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:1092-1097.
52. Ammouche A, Rouaki F, Bitam A, Bellal MM. Effect of ingestion of thermally oxidized sunflower oil on the fatty acid composition and antioxidant enzymes of rat liver and brain in development. *Ann Nutr Metab* 2002;46:268-275.
53. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11:91-128.
54. Lovell MA, Xie CH, Markesbery WR. Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:714-720.
55. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem.* 1999;274:2234-2242.

56. Bacot S, Bernoud-Hubac N, Baddas N, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, Guichardant M. Covalent binding of hydroxy-alkenals (4-HDDE, 4-HHE and 4-HNE) to ethanolamine phospholipid subclasses. *J Lipid Res* 2003;9.1:213-222.
57. Guichardant M, Bernoud N, Chantegret B. Aldehydes from n-6 fatty acid peroxidation. Effects on aminophospholipids. *Prostaglandins leukot essent fatty acids* 2002;67:147-149.
58. Indart A, Viana M, Clapés S, Izquierdo L, Bonet B. Clastogenic and cytotoxic effects of lipid peroxidation products generated in culinary oils submitted to thermal stress. *Food Chem Toxicol* (2007), doi:10.1016/j.fct.2007.04.019
59. Vlassara H and Rashelle PM. Glycoxidation. The Menace of Diabetes and Aging. *The Mount Sinai J Med* 2003;70:4:232-242.
60. Siems WG, Hapner SJ, Van Kuijk FJ. 4-Hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:215-223.
61. Pocker Y and Janjic N. Differential modification of specificity in carbonic anhydrase catalysis. *J Biol Chem*. 1988;263:6169-6176.
62. Gan J, Ansari G. Inactivation of plasma alpha 1-proteinase inhibitor by acrolein: adduct formation with lysine and histidine residues. *Mol Toxicol*. 1989;2:137-145.
63. Manoj K, Kashyap B, Yadav V, Badan S, Sherawat, Jain S, Kumari S, Khullar M, Sharma P C and Nath R. Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hipertensión. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005;277: 89–99.

64. Bosch-Morell F, Flohe L, Marin N, Romero FJ: 4-Hydroxynonenal inhibits glutathione peroxidase: protection by glutathione. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1383-1387.
65. Nicol CJ, Zielenski J, Tsui LC, Wells PG: An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *FASEB J.* 2000;14:111-127.
66. Vanderveen LA, Hashim MF, Nechev LV, Harris TM, Harris CM, Marnett LJ. Evaluation of the mutagenic potential of the principal DNA adduct of acrolein. *J Biol Chem* 2001;276:9066-9070.
67. Yang MH and Schaich KM. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxydes and aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:225-236.
68. Cabre A, Girona J, Vallve J C, Heras M, Masana L. Cytotoxic effects of the lipid peroxidation product 2,4-decadienal in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003;169:245-250.
69. Dittberner U, Eisenbrand G, Zankl H. Genotoxic effects of the a,b-unsaturated aldehydes 2-trans-butenal, 2trans-hexenal and 2-trans,6-cis-nonadienal. *Mutat Res.* 1995;335:259-265.
70. Schaeferhenrich A, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Kuechler A, Haag N, Weise A, Liehr T, Claussen U, Marian B, Sendt W, Scheele J and Pool-Zobel BL. Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res.* 2003;526:19-32.

71. Niedernhofer L J, Daniels J S, Rouzer C A, Greene R E, Marnett L J. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem.* 2003;278:31426-31433.
72. Nair J, Vaca CE, Velic I, Mutanen M, Valsta LM, Bartsch H. High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:597-601.
73. Gros L. Enzymology of the repair of free radical induced ADN damage. *Oncogene* 2002;21:8905-25.
74. Freitas J P, Filipe P, Yousefi A, Emerit I. Oxidative stress in Adamantiades- Behcet's Disease. *Dermatology* 1998;197:343-8.
75. Emerit I, Filipe P, Meunier P. Clastogenic Activity in the Plasma of Scleroderma Patients: A Biomarker of Oxidative Stress. *Dermatology* 1997;194:140-146.
76. Emerit I, Levy A and Pagano G. Transferable clastogenic activity in plasma from patients with Fanconi Anemia. *Hum Genetic* 1995;96:14-20.
77. Emerit I. Detection of Clastogenic Factors in Oxidative Strees-Associated Diseases. Usefulness of this Assay for the Evaluation of Anti-oxidants. *CEJOEM* 1998;4:1:3-10.
78. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813–20.

79. Rönnemaa T, Olli T, Tuula J R, Knuuti J, Toikka J , Ahotupa M, Nuutila P. Perfusion in Young Adults With Type 1 Diabetes. Effect of Pravastatin on Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2004;24:1303-1308.
80. Kalousavá M, Skrha J, Zima T. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Diabetes Mellitus. *Pphysiol Res* 2002;51:597-604.
81. Abou-Seif M A, Youssef A A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta.* 2004;16:346:2:161-70.
82. Güzel S, Seven A, Satman I, Burçak G. Comparison of oxidate stress indicators in plasma of recent-osed and long-term type 1 diabetic patients. *J Toxicol Environ Health* 2000; Jan 14:59: 1 4-17.
83. Vessby J, Basu S, Mohsen R, Vessby B. Oxidative Stress and antioxidant status in type I diabetes mellitus. *J Intern Med* 2002: 251: 69-76.
84. Opara EC. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Invest Med.* 2004;52:19-23.
85. Vessby J, Basu S, Mohsen R, Vessby B. Oxidative Stress and antioxidant status in type I diabetes mellitus. *J Int Med* 2002:251:69-76.
86. Blasiak J, Arabski M , Krupa R, Wozniak K , Zadroznyb M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mut Res* 2004:554:297–304.
87. Maritim AC, Sanders RA and Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A Review. *J Bioch Mol Toxicol* 2003;17:1:24:38.

88. Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Rosi R, Maier A, Esposito K, and Giugliano D. Hyperglycemia on Circulating Adhesion Molecules and Oxidative Stress Generation and the Possible Role of Simvastatin Treatment. *Diabetes* 2004;3:701–710.
89. Jakuš V, Rietbrock N. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol Res* 2004;53:131-142.
90. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidate stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999;1:3: 23-30.
91. Koya D and King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998;47, 859–866.
92. Ganz, MB and Seftel A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol* 2000;278, E146–E152.
93. Marshall S and Bacote V and Roger R. Traxinger. Discovery of a Metabolic Pathway Mediating Glucose-induced Desensitization of the Glucose Transport System. Role of Hexosamine Biosynthesis In the Induction of Insulin Resistance. *J Biol Chem* 1991;266:8:4706-4712.
94. Du X, Edelstein D, Rossetti L, George IF, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J and Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Develop Biol* 2004; 100:26:15613-15618.
95. Feener EP. Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contrib Nephrol* 1996;118:180–187.

96. Keenan H, Bursell SE, King GL. The effect of vitamin E on Endothelial function of micro and macro circulation in Type 1 and Type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54:204-211.
97. Rosen P and Nawroth P P. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17:189-212.
98. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Nightingale P, Kendall M J, Brydon P, Dunne F. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci Lond* 2004 Jan;106:1:93-8.
99. Herrera E, Alvarez JJ. Cambios en las gestantes y sus implicaciones hormonales. En: *Bioquímica Clínica*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana 1998; 345-52.
100. Herrera E. Metabolismo lipídico durante la gestación. *Aliment Nutr Salud* 1997;4:2:43-49.
101. Moretti M, Phillips M, Abouzeid A, Renee N, Greenberg J. Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *Am J Obst Gynecol* 2004; 190, 1184-90.
102. Mazzanti L and Nanetti A V. Gestacional diabetes affects platelet behaviour through modified oxidative radical metabolism. *Diabet Med* 2004;21:68-72.
103. Herrera E, Ortega H, Alvino G, Giovannini N, Amusquivar E, Cetin I. Relationship between plasma fatty acid profile and antioxidant vitamins during normal pregnancy. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1231-1238.

104. Abassi S, Ludomirski A, Bhutani V and Weiner S. Maternal and fetal plasma Vitamin E to total lipid ratio and fetal RBC antioxidant function during gestational development. *J Am Coll Nut* 1990;9:4:314-3198.
105. Chang TI, Horal M, Jain SK, Wang F, Patel R, Loeken MR. Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of NTD. *Diabetología* 2003;46:538-545.
106. Siman C M, Eriksson U J. Vitamin C supplementation of the maternal diet reduces the rate of malformation in the offspring of diabetic rats. *Diabetologia*. 1997;40:1416-1424.
107. Viana M, Herrera E, Bonet B. Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. *Diabetologia* 1996;39:1041-46.
108. Baker L, Piddington R. Diabetic embriopathy: A selective review of recent trends. *J Diabetes Complications* 1993,7:204-12.
109. Ericksson UJ , Cederberg J, Wentzel P. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers-Animal and human studies. *Endocrinol Metab Dis* 2003;4:79-93.
110. Phelan S A and Loeken M R. Neural tube defects in embryos of diabetic mice. *Diabetes* 1997;46:1189-97.
111. Eriksson UJ, Borg LA. Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* 1993,42:411-419.
112. Ornoy V. Zaken K and R. Kohen. 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; 60:376–386.
113. Wentzel P, Wentzel CR, Gareskog MB, Ericksson UJ. Induction of embryonic dysmorphogenesis by high glucose concentration, disturbed inositol metabolism, and inhibited protein kinase C activity. *Teratology* 2001;63:193-201.
114. Fine EL, Horal M, Chang TI, Gary F and Loeken MR. Evidence that Elevated Glucose Causes Altered Gene Expression, Apoptosis and Neural Tube Defects in a Mouse Model of Diabetic Pregnancy. *Diabetes* 1999;48:2454-2462.
115. Dhanasekaran N, Wu YK and Reece E A. Signaling pathways and diabetic embryopathy. *Semin Reprod Endocrinol* 1999;17:167-74.
116. Jawerbaum A, Gonzalez ET, Novaro V, Faletti A, Sinner D and Gimeno MAF. Increased prostaglandin E generation and enhanced nitric oxide synthase activity in the non-insulin-dependent diabetic embryo during organogenesis *Reprod Fertility and Develop* 1998;10: 191–196.
117. El-Bassiouni EA, Helmy MH, Rawash NA, El-Zoghby SM. Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of oxidative stress and antioxidant defence. *Br J Biomed Sci* 2005; 62:22, 71-76.
118. Gareskog M and Wentzel P. Altered protein Kinase C, Activation Associated with Rat Embryonic Dysmorphogenesis. 2004. *Pediatric Res* 56;849-57.
119. Wentzel P, Ejdesjo A, Eriksson UJ. Maternal diabetes in vivo and high glucose in vitro diminish GAPDH activity in rat embryos. *Diabetes*. 2003;52:1222-1228.

120. Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys* 1999;1432:159–184.
121. Loeken MR and Horal M. Regulation of transcription and morphogenesis by glucosamine: Does hexosamine flux mediate the molecular effects of high glucose metabolism on embryogenesis? *Diabetes* 2000;49:1:A274.
122. Horal M, Zhang Z, Stanton R, Virkamaki A and Loeken MR . Activation of the Hexosamine Pathway Causes Oxidative Stress and Abnormal Embryo Gene Expression: Involvement in Diabetic Teratogenesis. *Birth Defects Res Clin Mol Teratol* 2004;70:519–527.
123. Menegola E, Broccia M L, Prati M, Ricolfi R y Giavani E. Glutathione status in diabetes induced embryopathies. *Biol. Neonate* 1996;69:293-97.
124. Ericksson UJ, Borg LAH. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes vs glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetología* 1991;34:325-31.
125. Pani L, Horal M, and Loeken MR . Polymorphic Susceptibility to the Molecular Causes of Neural Tube Defects During Diabetic Embryopathy. *Diabetes* 2002;51: 2871–2874.
126. Cederberg J, Galli J, Luthman H and Ericksson UJ. Increased mRNA levels of Mn-SOD and catalase in embryos of diabetic rats from a malformation-resistant strain. *Diabetes* 2000;49:101-7.
127. Guijarro M V, Indart A, Aruoma O I, Vian M and Bonet B. Effects of ergothioneine on diabetic embryopathy in pregnant rats. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1751-1755.

128. Cai J, Phelan SA, Hill AL and Loeken MR. Identification of Dep-1, a new gene regulated by the transcription factor Pax 3, as a marker for altered embryonic gene expression during diabetic pregnancy. *Diabetes* 1998;47:1803-5.
129. Pani L, Horal M and Loeken MR . Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3- dependent development and tumorigenesis. *Gen Develop* 2002;16:676–680.
130. Reece EA, Ma X-D, Zhao Z, Wu Y-K, Dhanasekaran D. Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy in rats: II, membrane signalling. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192, 967–72.
131. Hudgins L and Cassidy SB. Congenital Anomalies. In *neonatal Perinatal Medicine*. Fanaroff AA, Martin RJ, Eds. Mosby, 2001:488-510.
132. RECUMAC.
133. Kucera J. Rate and type of congenital anomalies among offspring of diabetic women. *J Reprod Med* 1971;7:61 –70.
134. Hill AL, Phelan SA, Hill AL, Loeken MR. Reduced expression of Pax-3 is associated with over expression of cdc46 in the mouse embryo. *Dev Genes Evol* 1998;208:128-34.
135. Wentzel P and Eriksson U J. 8-Iso-PGF2alfa Administration Generates Dymorphogenesis and Increases Lipid Peroxidation in Rat Embryos In Vitro. *Teratology* 2002;66: 164-168.
136. Finnell RH, Waes JG, Eudy JD and Rosenquist TH. Molecular basis of environmentally induced birth defects. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:181-208.

137. Burcham PC, Kaminskas LM, Fontaine FR, Petersen DR and Pyke SM Protein adduct-trapping by hydrazinophthalazine drugs: mechanisms of cytoprotection against acrolein-mediated toxicity. *Mol Pharmacol* 2004; 65:655-664.
138. Thrasher JD and Kilburn KH. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Arch Environ Health*. 2001;56:300-311.
139. Indart A, Viana M, Grottveld MC, Sánchez-Vera I and Bonet B. Teratogenic actions of thermally stressed culinary oils in rats. *Free Radic Res* 2002;3:5:1051-1058.
140. Indart AM . Efectos teratogénicos y toxicidad de los productos derivados de la peroxidación lipídica del aceite sometido a estrés térmico. Tesis Doctoral. Madrid, 2004.
141. Graf WD, Oleinik OE, Pippenger CE, Eder DN, Glauser TA and Shurtleff D B. Comparison of erythrocyte antioxidant enzyme activities and embryologic level of neural tube defects. *Eur J Pediatr Surg*. 1995;5:8-11.
142. Tesoriere L, D'Arpa D, Butera D, Pintaudi AM, Allegra M and Livrea MA. Exposure to malondialdehyde induces an early redox unbalance preceding membrane toxicity in human erythrocytes. *Free Radic Res* 2002;36:89-97.
143. Hiroyuki S, Shoichi A, Miwa I, Kiyohiro I. Significance of glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes* 1999;48:1138-45.

144. Raza H and John A. Glutation metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissue from streptozotocin-induced diabetic mothers. *Diabetes Metab Res Rev* 2004: 72-78.
145. Menegola E, Broccia ML, Di Renzo F and Giavini E. Acetaldehyde in vitro exposure and apoptosis: a possible mechanism of teratogenesis. *Alcohol* 2001;23:35-39.
146. ALAD: Normas de atención a la diabética embarazada aprobadas en Mendoza, 1994 y modificadas en Cancún, 1997.
147. Marklund S and Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol as a convenient assay for superoxide dismutasa. *Eur. J. Biochem.* 1974;47:469-74.
148. Beer RF and Sizer W. Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase: *J Biol Chem* 1952: 195; 137-140.
149. Beutler E. Improved assay of the enzymes of glutathions syntesis. *Clin Chim Acta* 61. 1986;158:115-123.
150. Yagi K. Assay for blood plasma and serum. Oxygen radicals in biological systems. In: L Packer, editor. *Methods in enzymology*. Academic Press, Orlando 1984. vol. 105. pp 328-31.
151. Reznick AZ and Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for the carbonyl assay. In: L Packer editor. *Methods in Enzimology* 1994; 233:357-63.

152. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A, Motchnik PA, Packer L and Halliwell B. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *Biochem J* 1992;286, 607–611.
153. Collins AR. Measurement of oxidative DNA damage using the comet assay, In: Griffiths, H.R., Lunec, J. (Eds.), *Measuring in Vivo Oxidative Damage: A Practical Approach*, 2000;83–94. Wiley, New York.
154. Collins A and Horvathova E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem. Soc. Trans.* 2001;29:337–341.
155. Gosden CM, Davidson C and Robertson M. Lymphocyte culture in a practical approach. Rooney DE, Czepulkowsky BH, Eds. New York, Oxford University Press, 1992;39-57.
156. Barbas C, Castro M, Bonet B, Viana M and Herrera E . Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high performance liquid chromatography. *J.Chromatography* 1997;778:415-420.
157. Wong SH, Knight J A, Hopfer S M, Zaharia, O, Leach C N and Sunderman FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987;33:214-220.
158. Wottawa A. A method for the isolation of human and animal lymphocytes with ficoll-urografin. *Wiener Klin Wochenschr* 1974;86:161-163.
159. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M and Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients

- with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med.* 2003; Jun 15:34:12:1563-74.
160. Obrosova I, Fathallah L and Greene DA . Early Changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina. *Europ J Pharmacol* 2000;398:139-146.
161. Kesavulu MM, Giri R, Kameswara RB and Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab* 2000;26:5:387-92.
162. Darmaun D, Smith SD, Sweeten S, Sager BK, Welch S and Mauras N. Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:190–196.
163. Ono H ,Sakamoto A and Sakura N . Plasma total glutathione concentrations in healthy pediatric and adult subjects. *Clin chim acta* 2001:312: 227–229.
164. Dale-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D and Milzani A . Biomarkers of oxidative damage in human diseases. *Clin Chem* 2006;52:4:601-623.
165. Damasceno DC, Tadeo G, Mattos I and Vieira M. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Rep Sci* 2002;72:235-244.
166. Orhan H, Önderoglu L, Yücel A and Sahin G . Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 267:4:189-195.
167. Rajdl D, Racek J, Steinerová A, Novotný Z, Stožický F, Trefil L, Siala K. Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. *Physiol Res* 2005;54:429-436.

168. Forman H J, Torres M and Fukuto L. Redox signaling. *Mol Cell Biochem* 2002;234:49-62.
169. Jackson M J .*Molecular Aspects of Medicine* 2002;23:209–285.
170. Clapés S,Torres O, Companioni M. Indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Educ méd continua. Ecuador* 2000;66:2-6.
171. Sagol S , Okinay E and Ozsener S. Impaired antioxidant activity in women with pre-eclampsia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 1999; 64:121–127.
172. Montelongo A, Lasunción MA, Pallardo LF and Herrera E. Longitudinal study of plasma LP and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes* 1992;41:1651-59.
173. Peuchant E, Jean-Luc B, Rigalleau LD , Thomas MJ , Jean D Y , Leng J J and Gin H . Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2004;37:4:293-298.
174. Djordjevic S, Spasic A ,Janovic G, Djordjevic R and Grubor-Lajsic G. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J matern fetal neonatal med* 2004;16:367–372.
175. Llurba E, Grataco EE, Martin PG, Cabero L and Domínguez C. Comprehensive study of oxidative stress and anti oxidant Status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free radic biol med* 2004;37:4:557 – 570.
176. Guo Z, Xia Z, Jiang J and cNeill JH. Down-regulation of NADPH oxidase, antioxidant enzymes and inflammatory markers in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats by N-acetylcysteine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006:223-230.
177. Goth L, Coth S, Tarnay I, Berces M, Torok P. Blood catalase activity in gestational

diabetes mellitus is decreased but not associated with pregnancy complications. Clin Chem 2005;51;12:2401-2404.

178. Salo DC , Pacifici RE , Lin SW , Giulivi C and Davies KA . Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. The journal of biological Chemistry 1999;265:20:11919-11927.

179. Sobki H, Sdulrahman M, Al-Senaidy Tamader A. Al-Shammari I .Impact of gestational diabetes on lipid profiling and indices of oxidative stress in maternal and cord plasma. From Saudi Med J 2004; 25 (7): 876-880.

180. Chaudhari L, Tandon OP, Vaney N and Agarwal N. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetics. J Physiol Pharmacol 2003;47(4):441-446.

181. Coughlan MT , Vervaart P P , Georgiou H M and Rice E. Altered placental oxidative stress status in Gestacional diabetes mellitus.. Placenta 2004;25:78-84.

182. Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free Radical oxidation products in plasma in normal and abnormal pregnancy. Ann Clin Biochem 1991;18: 158-62.

183. Cao W and Duan Y. Breath Analysis: Potencial for Clinical Diagnosis and Exposure Assessment. Clinical Chemistry 2006;52:5;800-811.

184. Polanco AC, Revilla MC, Palomino MA, Islas S. Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal en humanos. Ginecol Obstet Mex 2005;73:544-552.

185. Valdés L y Márquez A. Diabetes y embarazo. Estudio y análisis de 401 gestantes. Trabajo de Terminación de Residencia en Ginecoobstetricia. Hospital Ginecoobstétrico Docente "Ramón González Coro", Ciudad de La Habana. 1979

186. Ide H and Truman KM . DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull* 2004;27:480-5.
187. Dotan Y, Lichtenberg D and Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 2004; 43: 200-227.
188. Odetti P, Garibaldi S, Noberasco G, Aragno I and Valentini S. Levels of Carbonyl Groups in Plasma Proteins of type 2 Diabetes subjects. *Acta Diabetol.* 1999;36: 179-183.
189. Valdéz L , Alvarez S y Boveris A . ADN estructura y daño oxidativo. Published in *Antioxidants and life style on line. Revisit Antioxidants* 2002 enero; 1(10 pantallas) Acceso el día 15 de junio del 2005. Disponible en URL: <http://www.antioxidants.com.ar>.
190. Hannon M P, Hughes C, O'Kane M J, Moles K W, Barnett C R, Barnett Y A. Antioxidant status and DNA damage in patients with insulin-dependent diabetes mellitus *Biochem Soc Trans.* 1998 Feb;26:1:S57.
191. Collins, AR, Raslova K, Somorovsha M, Pretovsha M, Ondrusova A, Collins BH, et al. DNA damage in diabetes: Correlation with a clinical marker. *Free radical Biology and medicine* 2001;25:3:373-377.
192. Collins, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. *Molec. Biotech.* 2004 ;26: 249-261.
193. Mary PA, Fletcher H and Maurice J. O'Kane L and. Barnet YA. Levels of peripheral blood cell DNA damage in IDDM human subjets. *Mutation research* 2000;460:53-60.

194. Devaraj s , Glaser N, Griffen S, Wang JP , Miguelino E and Jialal I . Increased Monocytic Activity and Biomarkers of Inflammation in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2006;55:774–779.
195. Halliwell, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* 2002;32:968–97.
196. Méhes K, Kosztolányi G. Clinical Manifestations of Genetic Instability Overlap One Another. *Pathology Oncology Research* 2004;10:1:12-16.
197. Limoni CI , Giedzinski E, Morgan WF , Swart SG and Hyun W. Persistent Oxidative Stress in Chromosomically Unstable Cell. *Cáncer Research* 2003; 63:3107-3111.
198. Van Houten B , Woshner V and Santos J H . Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2005;4:6:639-747.
199. Waris G and Ahsan H . Reactive Oxygen Species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* 2006, 5:14-42
Acceso el día 20 de enero del 2007. 29 pantallas completas. Disponible en <http://www.carcinogenesis.com/content/5/1/14>.
200. Emerit E, Khan SH and Esterbauer H. Hydroxynonenal, a component of clastogenic factors? *Free Radic Biol Med* 1991;10:371-377,
201. Emerit I, Fabiani JN, Levy A and Ponzio O. Plasma from patients exposed to ischemia reperfusion contains clastogenic factors and stimulates the

- chemiluminescence response of normal leukocytes. *Free Rad Biol Med* 1999;19:4:405-410.
202. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1994;16: 99-109.
203. Voguel F, Motulski AG. Problems and approaches of Human Genetic. First ed. Berlin Heiderberg: Springer_Verlag Publisher; 1979.
204. Ferreira R. Enzimas antioxidants y prooxidantes: características principales y su ubicación en el genoma humano. Revisiones avanzadas.2000.24 screens.Avaliable from VRL: [http// WWW.antioxidantes.com](http://WWW.antioxidantes.com).
205. Hodgkinson A D , Bartlett T , Oates P J , Millward B A and Demaine A G. The Response of Antioxidant Genes to Hyperglycemia Is Abnormal in Patients With Type 1 Diabetes and Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2003;52:846–851.
206. Karen G. Halse, Marie L.S. Lindergaad, Jenz P. Goetze, Peter Damm, Elizabeth R. Mathiensen. Increased Plasma Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Infants of Womewn with Type 1 Diabetes. *Clin Chem* 2005;51:12;2296-2302.
207. Sepulveda W, Corral E, Ayala C, Be C, Gutierrez J and Vasquez P Chromosomal abnormalities in fetuses with open neural tube defects: prenatal identification with ultrasound. *Ultrasound obstet gynecol* 2004;23:352-356.
208. Ruiz M. Prevención de la Nefropatía diabética. *Rev. ALAD* 2006;14:1:125-27.

209. MINSAP Cuba .Programa Nacional de Prevención y control de la diabetes mellitus. 2002.pag.30
210. Memisogulları R and Bakan E .Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. J diabetes complications 2004;8:193– 197.
211. Grundy SM. Arterioscler. Gamma-Glutamyl Transferase: Another Biomarker for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. Thromb. Vasc. Biol. 2007;27:4-7.
212. Pita G, Pineda D, Serrano G, Macías C, Cabrera A, Rodríguez Y Monterrey P. Rev Nutr 2002;16:2.85-94.
213. Tamai H, Kim H , Hozumi M , Kuno T ,Takuji Murata and Morinobu T . Plasma tocopherol level in diabetes mellitus. Biofactors 2000;11:7-9.
214. Hozumi M, Murata T, Morinobu T, Manago M and Kuno T. Plasma β -Carotene, Retinol, and α -Tocoferol Levels in Relation to Glycemic Control of Children With Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. J Nutr Sci Vitaminol1998;44:1-9.
215. Sánchez- Vera Isabel. Estrés Oxidativo en Gestaciones Normales y Complicadas por la Diabetes, Preeclampsia y Retraso de Crecimiento Intrauterino. Tesis Doctoral. Universidad San Pablo CEU. Madrid, 2004.
216. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. Diabetes Care. 2003;26:1589-1596.
217. Sacco M, Pellegrini F, Roncaglioni MC, Avanzini F, Tognoni G and Nicolucci A. Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in

- type 2 diabetic patients: results of the primary prevention project (PPP). *Diabetes Care*. 2003;26:3264-3272.
218. Marchioli R, Schweiger C, Levantest G, Gavassi L and Valagussa F. Antioxidant Vitamin and prevention of cardiovascular diseases. *Lipids* 2001;36:553-563.
219. Choi S W, Benzie IF, Collins AR, Hannigan BM and Strain JJ. Vitamins C and E acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative. *Mutat Res* 2004;551:109-17.
220. Astley S, Langrish-Smith A, Southon S and Sampson M. Vitamin E supplementation and oxidative damage to DNA and plasma LDL in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22:10: 1626-31.
221. Botto LD, Olney RS and Erickson JD Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects. *Am J Med Genet*. 2004;125C:12-21.
222. Cederberg J, Simán M, Eriksson UJ. Combined treatment with Vitamine E and Vitamine C decreased oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr Res* 2001;49:755-762.
223. Basu TK and Basualdo C. Vitamin A Homeostasis and Diabetes Mellitus. *Nutrition* 1997;13:9:804-806.
224. Lu J, Dixon A, Andrew T, Sin TC and Basu TK. The metabolic availability of Vitamin A is decreased at the onset of diabetes in BB Rats. *J Nutr* 2000;130:1958-1962.
225. Azzi A and Zingg J. Vitamin E. *Biochem Mol Biol Edu* 2005;33:3:184-187.

226. Wender-Ożegowska E, . Koźlik J, Biczysko R, Ożegowski S. Changes of oxidative stress parameters in diabetic pregnancy. *Free radic Res.* 2004 Aug;38:8:795-803.
227. Fetita L, Sobngwi E, Serradas P, Calvo F, and Gautier JF. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:10:3718–3724.
228. Winn LM and Wells PG. Maternal administration of superoxide dismutase and catalase in phenytoin teratogenicity. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:266-274.
229. Graf WD, Oleinik OE, Pippenger CE, Eder DN, Glauser TA and Shurtleff DB. Comparison of erythrocyte antioxidant enzyme activities and embryologic level of neural tube defects. *Eur J Pediatr Surg.* 1995; 5:8-11.
230. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002, 82:47-95.
231. Bonassi S, Znaor A, Norppa H, Hagmar L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res* 2004; 104:376-382.
232. Herbst U, Toborek M, Kaiser S, Mattson M P and Hennig B . Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1999;181:295-303.

ANEXO I

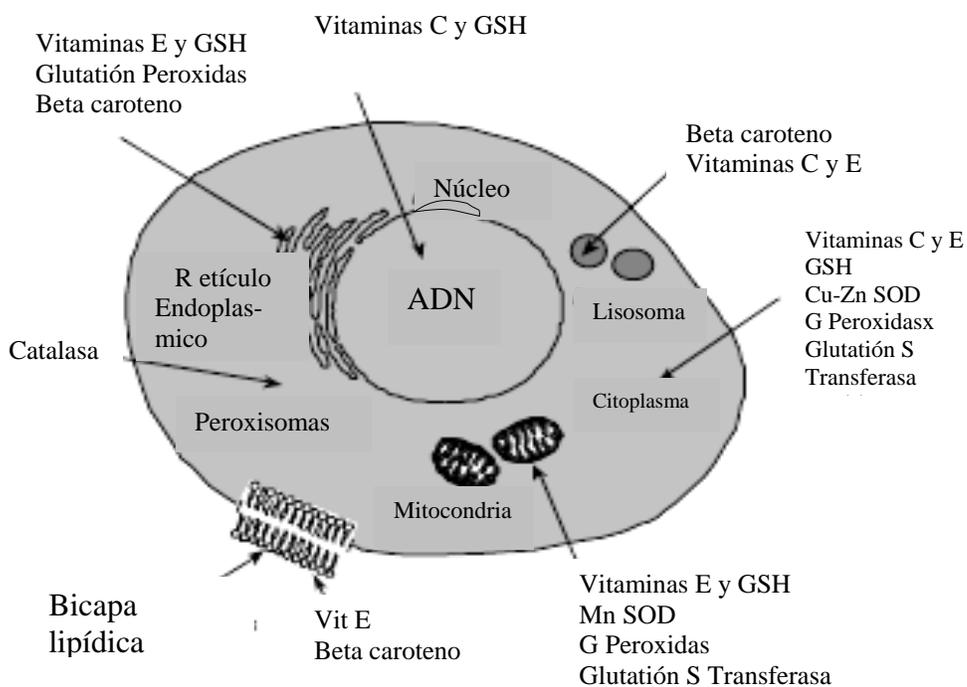


Figura 1. Localización de los principales antioxidantes en la célula. Modificado y tomado de Iris F. F.; Benzie F.; Evolution of antioxidant defence mechanisms. European Journal of Nutrition 2000

ANEXO II

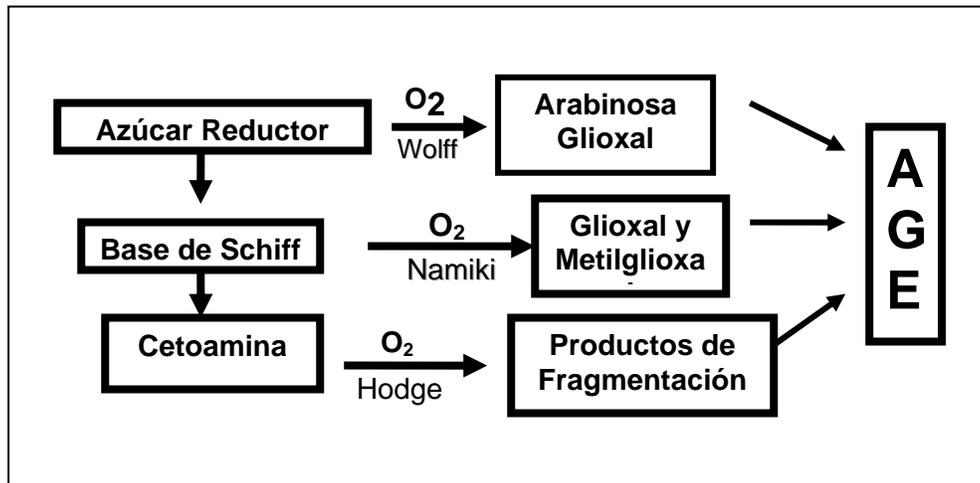


Figura 2. Diferentes vías de formación de AGE. Tomado de H. Vlassara et al. Glycoxidation: The Menace of Diabetes and Aging. THE MOUNT SINAI JOURNAL OF MEDICINE , September 2003. Referencia 59.

ANEXO III

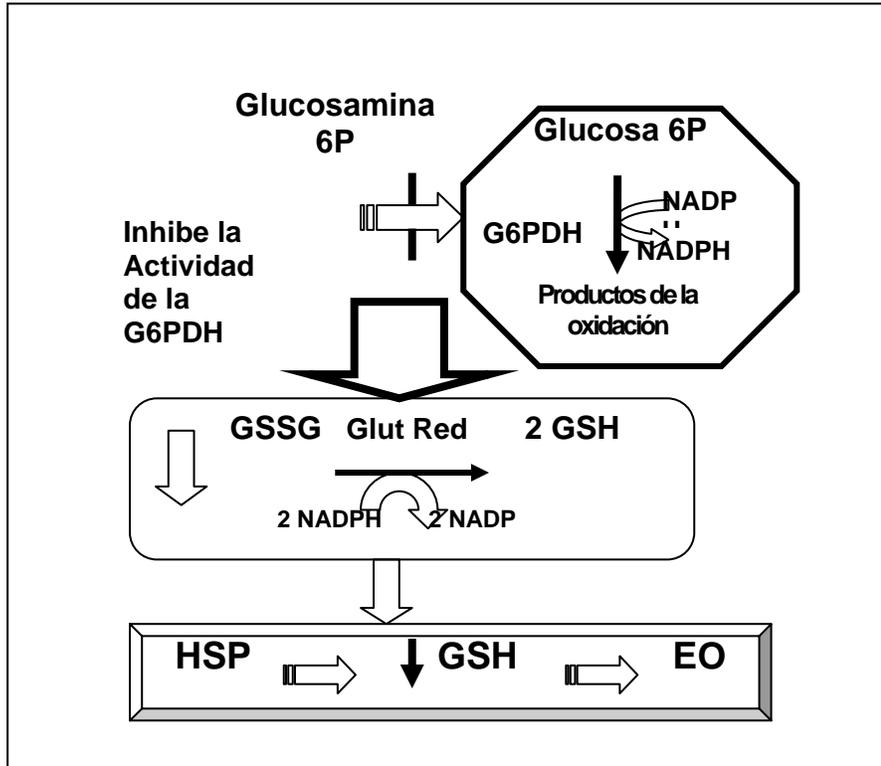


Figura 3. Consecuencias de la activación de la Vía de la Hexosamina (HSP)

ANEXO IV

Tabla 2. Cambios metabólicos, bioquímicos y en la concentración de sustancias en la gestación.

Cambios en el metabolismo lipídico ¹⁰⁹	Incremento de la actividad lipolítica del tejido adiposo.
	Llegada al hígado de más sustratos para la síntesis de triacilgliceroles (TG).
	Disminución de la actividad de la lipasa lipoproteínica (menor degradación de lípidos)
	Mayor oxidación de las LDL
	Incremento de las VLDL.
Cambios en la concentración de hormonas	Incrementos en la cantidad de estrógeno circulante que provoca activación de la lipasa hepática (HL). Mayor producción de insulina.
Otros cambios	Se incrementa la secreción de TNF alfa ¹¹² . Resistencia a la insulina

ANEXO V

ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Datos del paciente:

Nombres y apellidos: _____

Edad _____ Sexo _____

Dirección particular: _____

Consulta donde es atendido: _____

Nombres y apellidos del médico que la atiende: _____

DECLARACION

Por este medio expreso mi consentimiento a participar en la investigación: Indicadores de Estrés Oxidativo y Daño al Material Genético en Embarazadas Diabéticas. La misma se desarrolla en el ICBP Victoria de Girón y los hospitales Ramón González Coro y Julio Trigo de la capital del país.

Antes de la primera toma de muestra y en consulta con el médico he sido informada que:

1. La investigación en la que me incorporo no contempla ningún tratamiento especial.
2. Se tomarán muestras de sangre en los tres trimestres del embarazo para estudiar parámetros bioquímicos. Esta muestra será tomada el mismo día en que se recolecta sangre para otros análisis de rutina.
3. En el tercer trimestre se hará una toma de muestra para estudiar indicadores bioquímicos de daño al ADN.
4. La recolección de la sangre se hará por el personal autorizado para ello del hospital.
5. Al participar en esta investigación no me expongo a ningún riesgo físico adicional ni de ningún otro tipo.
6. Si los resultados recomiendan alguna intervención seré informada oportunamente por parte de mi médico.
7. Los resultados que se publiquen no incluirán mi nombre ni el de mis familiares.
8. Estoy obligada a brindar la información que se me solicita sobre mis antecedentes patológicos y los de mi familia, consumo de medicamentos u otros fármacos.
9. Estoy obligada a cumplir el tratamiento con apego total a lo orientado, lo cual incluye las vitaminas que se distribuyen a las embarazadas, me encuentre o no hospitañizada.
10. Que puedo abandonar la investigación en el momento en que crea conveniente sin perjuicio para mi salud ni cambio en el nivel de atención sobre mi embarazo.

Y para que así conste, firmo la presente a los _____ días del mes de _____ del año _____, en Ciudad de la Habana, Cuba.

_____ Firma

ANEXO VI

Determinación de Vitamina E (α -TOCOFEROL) y Vitamina A

Las determinaciones en plasma se llevaron a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), siguiendo el método descrito en la referencia¹⁶³.

Instrumental y Materiales

El equipo empleado en la determinación de la vitamina E fue un modelo Beckman Mod. 126 (Fullerton, CA, USA), acoplado a un detector ultravioleta Diode Array (Beckman Mod.168) y a un detector de fluorescencia Waters 474 (Milford, MA, USA), con un procesador de datos Gold System Nouveau. La columna cromatográfica utilizada fue una Nucleosil C-18 (5 μ m, 15 x 46 mm) colocada en un horno para columnas Bio-Rad (Hercules, CA, USA) que mantuvo una temperatura constante de 40° C durante todo el proceso de valoración.

Todos los solventes utilizados fueron de alto grado de pureza, para HPLC, de Sharlau (Barcelona, España) y los patrones vitamina E, A, A acetato, A palmitato y K₁ se obtuvieron de Fluka (Madrid, España).

Procesamiento de los Patrones y de las Muestras.

Se prepararon las siguientes soluciones madre de vitaminas patrón en etanol: vitamina E (α -tocoferol) a una concentración de 8 mg ml⁻¹, vitamina A a una concentración de 0,4 mg mL⁻¹ y vitamina A acetato a una concentración de 0,8 mg ml⁻¹. Posteriormente se realizó una mezcla de las soluciones A y E madre en la proporción 1:1. Estas soluciones una vez preparadas, se conservaron a -20° C y protegidas de la luz hasta el día del análisis. La vitamina A y E se utilizaron como patrones externos y la vitamina A acetato como patrón interno.

El día del análisis se llevó a cabo una dilución 1/200 de la mezcla A y E previamente preparada y una dilución 1/100 de la soluciones madre de vitamina A acetato.

Las muestras se prepararon pipeteando 200 μ l de plasma, a los que se le añadieron 50 μ l de la solución diluida de patrón interno A acetato y 400 μ l de una mezcla de etanol y metanol en una proporción 1:1. Se agitó con vortex y a continuación

de le añadió 1ml de hexano para realizar la extracción de la fracción liposoluble que contiene la vitamina E, agitándose durante 1 minuto. Con este proceso se obtuvo la fracción liposoluble y se repitió el proceso, juntándose las dos fracciones orgánicas. A continuación se evaporó el disolvente en un concentrador de muestras y se redisolvió el residuo seco en 200 μ l de metanol, de los cuales se inyectaron 40 μ l en el cromatógrafo.

Los patrones se procesaron de la misma forma que las muestras, sustituyendo el plasma por 200 μ l de una solución de tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 y añadiendo 50 μ l de la mezcla diluida de las vitaminas A y E, 50 μ l de patrón interno Vitamina A acetato, 150 μ l de etanol y 200 μ l de metanol. El proceso se continuó con la extracción con hexano, evaporación y resuspensión, del mismo modo que las muestras.

El proceso cromatográfico se llevó a cabo en fase inversa, utilizando como fase móvil una mezcla de metanol/agua 97,5/2,5 (v/v) a un flujo constante de 2,0 mLmin⁻¹. La detección se realizó espectrofotométricamente a 294 nm para la detección de α -tocoferol con un tiempo de retención de 4,5 min. La detección de Vitamina A se realiza a 325 nm de longitud de onda y el tiempo de retención es de 6 min. La duración total del cromatograma fue de 7 minutos.

Cuantificación

Para la cuantificación del α -tocoferol en las muestras, el día del análisis se midió la absorbancia de la mezcla diluida de las vitaminas A y E utilizada en la valoración, a las longitudes de onda de 325 nm y 294 nm respectivamente. La concentración de dichas soluciones se determinó espectrofotométricamente a partir de su coeficiente de extinción en etanol ($\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}}$ vit E=71 a 294 nm, $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}}$ vit A=1.835 a 325 nm y 1.006 a 294 nm).

Las concentraciones de las Vitaminas E y A en las muestras, se calcularon mediante el método del patrón interno, utilizando la relación de las áreas de los picos de detección del analito y el patrón interno, y la concentración calculada de acuerdo a los patrones externos. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g} \cdot \text{d} \cdot \text{L}^{-1}$.

ANEXO VII

Técnica para medir sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el extracto acuoso y en el aceite recalentado.

La determinación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Wong y colaboradores¹⁶⁵. Este método se basa en la cuantificación espectrofotométrica por HPLC de los complejos MDA-TBA formados como consecuencia de la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Los hidroperóxidos contenidos en las muestras se hidrolizaron por calentamiento en ácido fosfórico diluido a 90° C, para que uno de los productos de esta hidrólisis, el MDA, reaccionara con el TBA y formara complejos MDA(TBA)₂ posteriormente cuantificables. Para ello se mezclaron 50 µL de muestra con 750 µL de ácido fosfórico diluido (0,44 M). Se agitó con vortex y posteriormente se añadieron 450 µL de agua destilada y 250 µL de TBA (4,2 mM).

Se prepararon patrones de concentraciones conocidas de tetraetoxipropano (TEP) que fueron sometidas al mismo tratamiento que las muestras. Así se logró obtener una curva patrón para el cálculo deseado.

El análisis del contenido en MDA en las muestras se realizó utilizando la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Beckman) con una columna de octadecil silica gel C-18, para separar el complejo MDA-TBA del resto. El complejo MDA-TBA es detectado a 532 nm y abandona la columna con fase móvil metanol-tampón fosfato (mezcla 4:6, V:V). Los resultados se calcularon interpolando en la curva patrón y se expresaron en µmol/L de MDA.

ANEXO VIII

Procedimiento en la técnica citogenética

Se tomaron 5 mL de sangre por pacientes y se dejaron sedimentar a 37 °C por más de una hora. Para los cultivos se utilizó Medio de Cultivo RPMI 1640 suplementado con glutamina al 1% y fitohemaglutinina (FHA), sin la adición de suero exógeno, utilizando plasma del propio paciente (Todos los reactivos son de SIGMA y Gibco). Por cada individuo se montaron dos cultivos, los que se detuvieron a las 68 horas con la adición de colcemid al 0,04%. El tratamiento posterior es el que se emplea habitualmente en este tipo de ensayo. Para la identificación de las rupturas cromosómicas se realizó tinción oscura con Giemsa, sin bandeado. Se contaron 100 metafases por pacientes, usando 5 láminas para ello, de manera que en cada lámina solo se contaban 20 metafases según se recomienda en este tipo de estudio^{75,76}.

Para el estudio citogenético en los cultivos de células a las que se le adicionó extractos de aceites, se cultivaron en cada una de las condiciones experimentales $2,5 \times 10^6$ linfocitos diluidos en 5 mL de medio M199 suplementados con 20% de suero bovino fetal, $10,000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies) y $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de fungizona (todos son de la firma Life Technologies). Los linfocitos fueron estimulados con $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ fitohemaglutinina. El cultivo se realizó en frascos estériles (60 mL) durante 68 horas y en una estufa a 37 °C con atmósfera de 5% de CO_2 .

Preparación de las extensiones¹⁵⁵

A las 72 horas del inicio del cultivo de linfocitos, se añadió colchicina ($1-2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Roche) para detener las diferentes mitosis en metafase, se agitó suavemente y se incubó durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, se realizó la fijación de linfocitos, transfiriendo el contenido del frasco de cultivo a un tubo de centrifuga que se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadió 5 mL de una solución hipotónica de KCl 75 mM que se dejó actuar durante 5 minutos y tras los cuales se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se retiró el sobrenadante y los linfocitos se fijaron añadiendo al tubo 5 mL de una solución metanol: ácido acético glacial (3:1) que se preparó en el momento y se guardó en el congelador durante su utilización. Se dejó que el fijador actuase durante 5 minutos y se volvió a centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y la fijación se volvió a repetir dos veces más.

Tras la última centrifugación, se retiró el sobrenadante y se añadió a los linfocitos 7-8 mL de fijador. Se tapó el tubo y se dejó hasta el otro día en refrigeración. El día de la extensión se centrifugó a 1 500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se dejó las células suspendidas en 1-2 mL de fijador, quedando las células preparadas para la extensión. Los porta objetos sobre los que se extienden las células permanecieron en una cubeta con metanol y a 2-4° C desde la tarde-noche previa a su utilización. Las láminas se sacaron del metanol y se pasaron por una cubeta de agua hasta que se formó una monocapa sobre la que se realizó la extensión dejando caer 3-4 gotas de la suspensión de células desde una distancia sobre el porta de entre 10-15 cm seguidas de otras 3-4 gotas de fijador. Posteriormente se dejó escurrir el porta en el papel de filtro y se volvieron a añadir otras 3-4 gotas de fijador. Las preparaciones se colocaron en un baño a 40° C para secarlas completamente y posteriormente se introdujeron en una estufa a 80° C para su envejecimiento. Por último y para su visualización al microscopio se tiñeron con colorante Giensa (Sigma) durante 10 minutos.

ANEXO IX

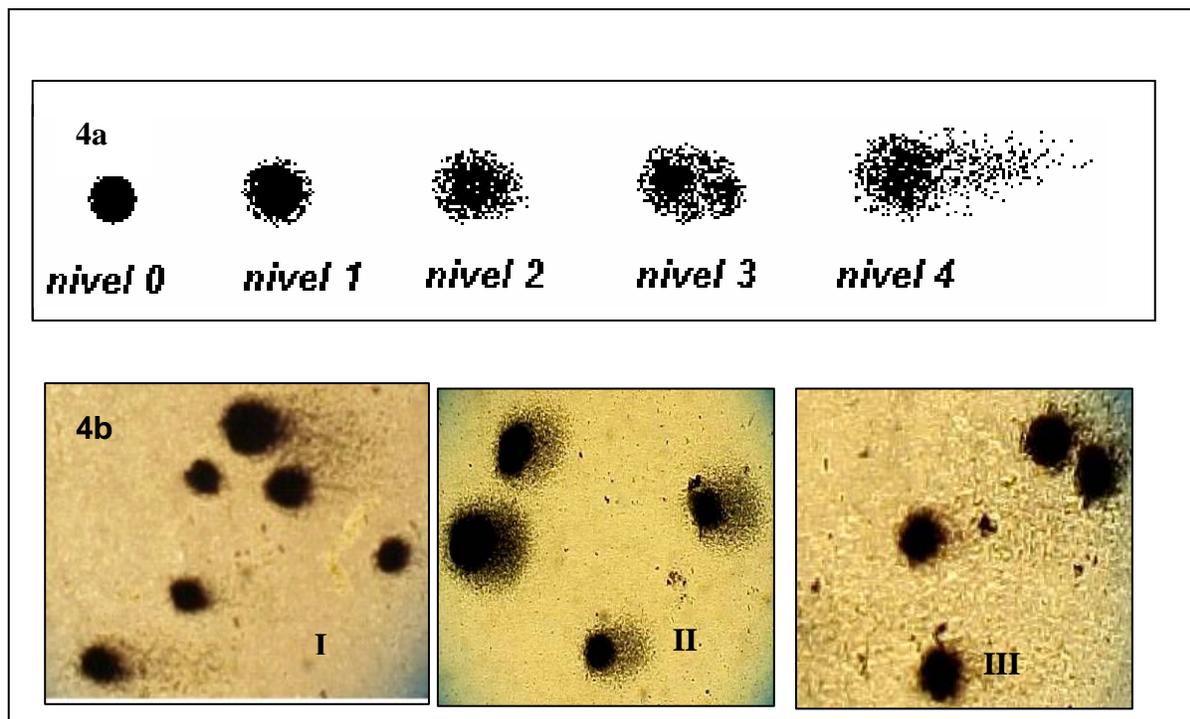


Figura 4. a: Esquema de células representando las 5 escalas en la evaluación del daño al ADN.

b: Campo visual de un microscopio óptico con un objetivo de 40 que enfoca láminas de pacientes diabéticos. Se observan células con diferentes tipos de daño. Panel I al III.

ANEXO X

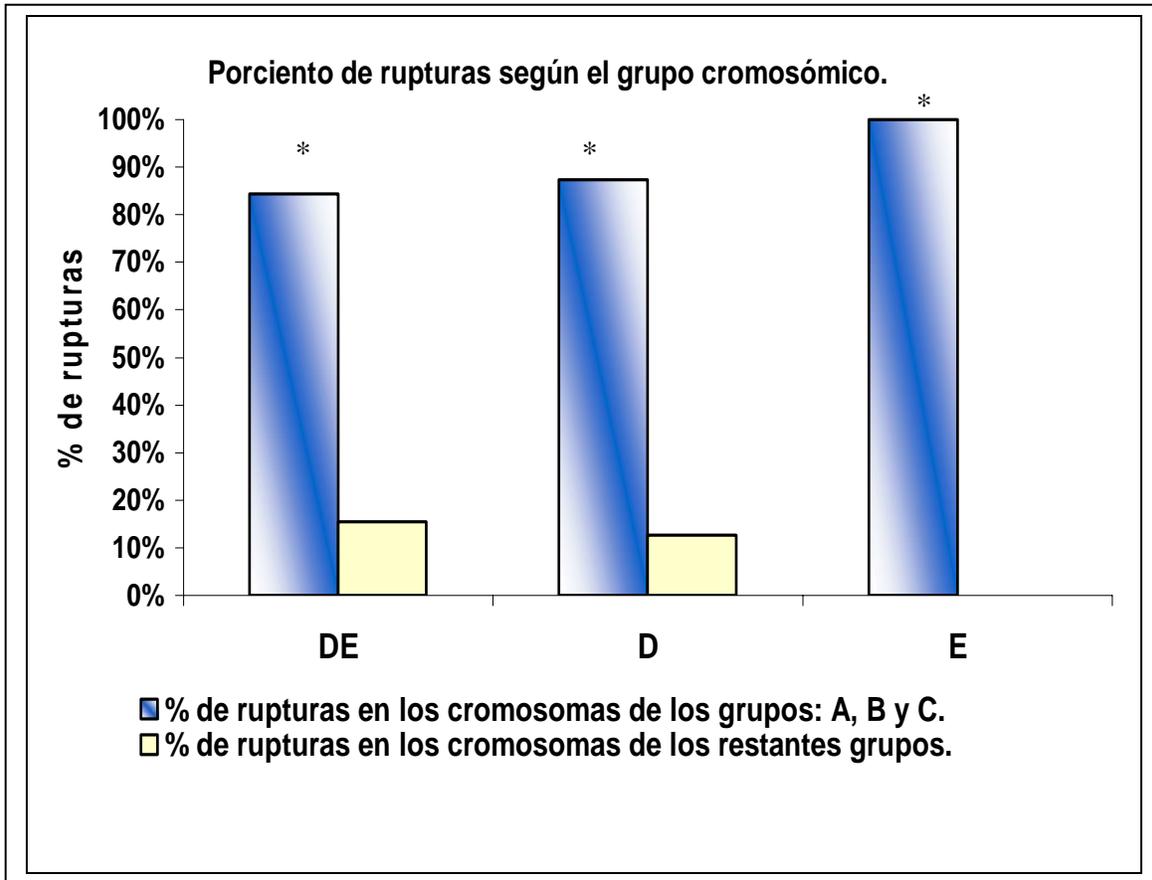


Figura 7. Porcentaje de rupturas localizadas en los cromosomas de los grupos A, B y C comparadas con los cromosomas con rupturas del resto de los grupos.

DE diabética embarazada, **D** diabética en edad fértil, **E** embarazada sana

* $p < 0,0001$ para cada grupo. El porcentaje de rupturas cromosómicas es mayor entre los cromosomas pertenecientes a los grupos A, B y C. Este resultado se repite para cada grupo de personas estudiadas: **DE**, **D** y **E**.

ANEXO XI

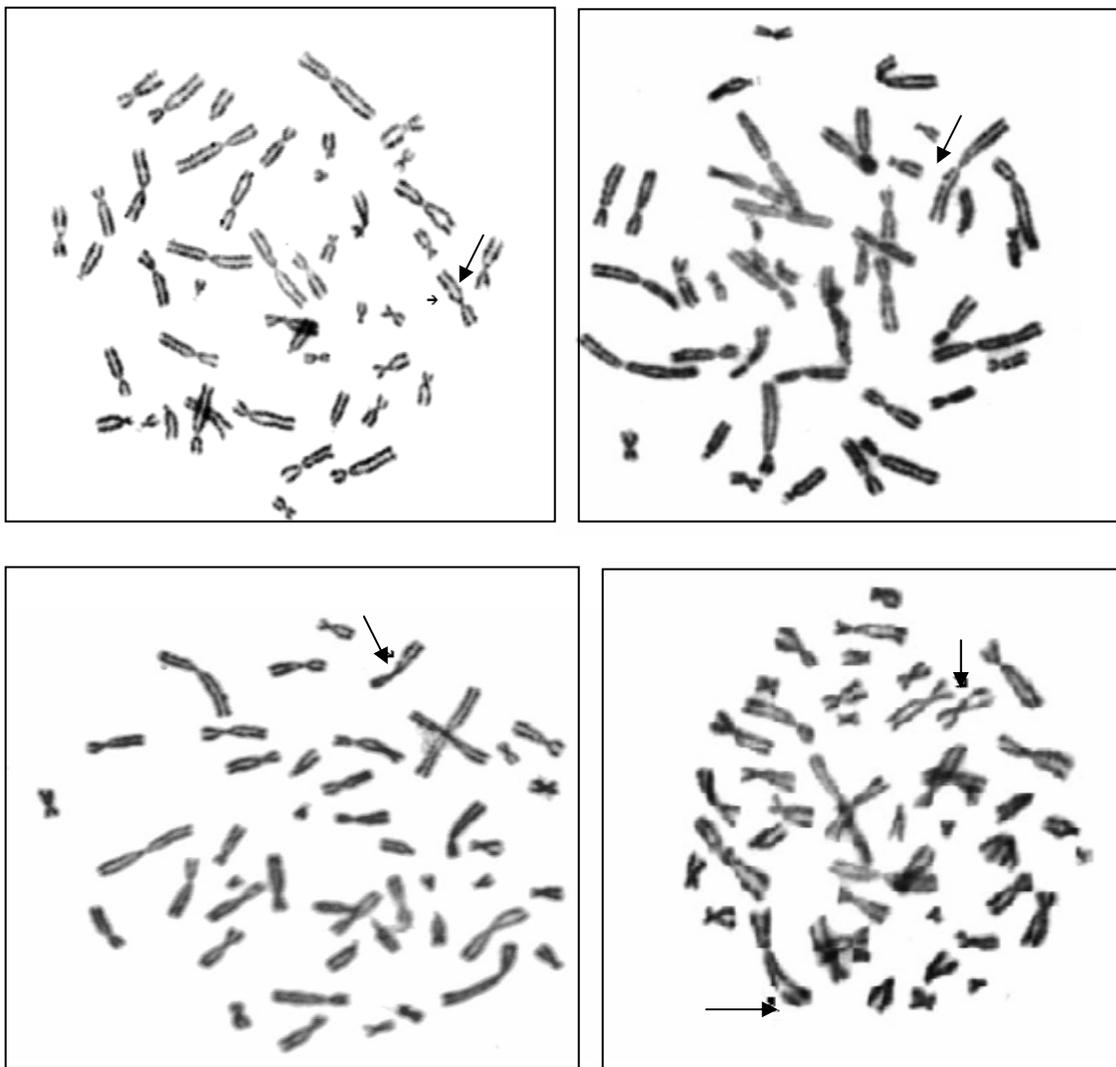
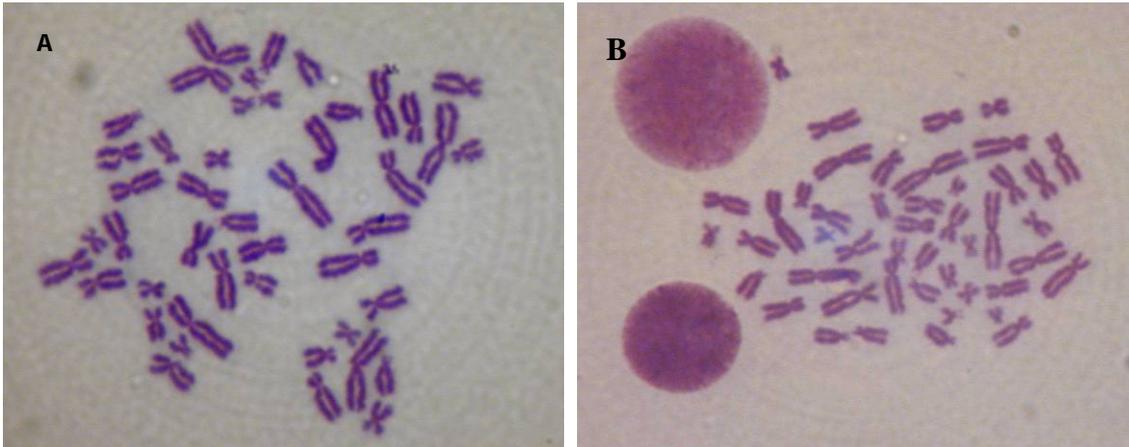
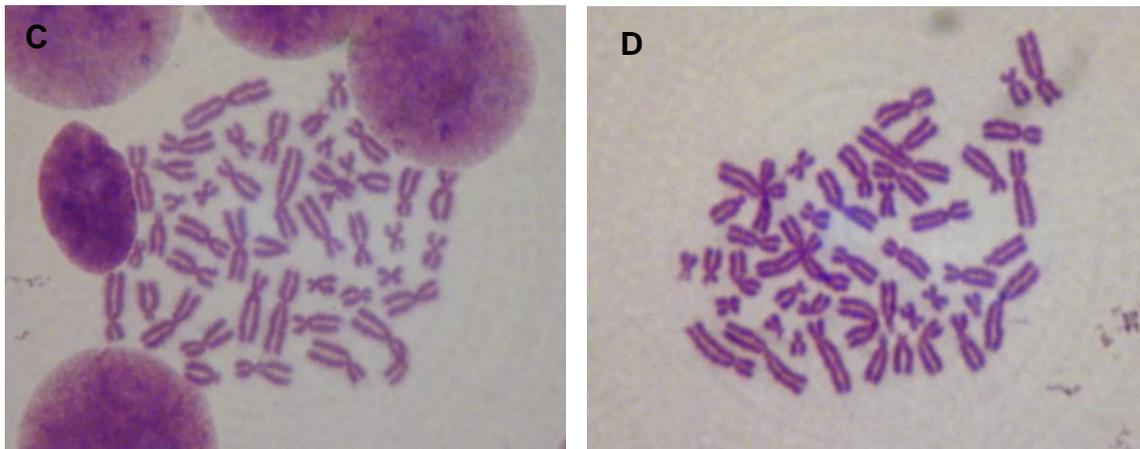


Figura 8. Microfotografías de metafases de células linfoides que corresponden a mujeres embarazadas diabéticas donde se muestran rupturas de tipo cromatídica. Campos visuales de un microscopio óptico con un objetivo de 40.

ANEXO XII



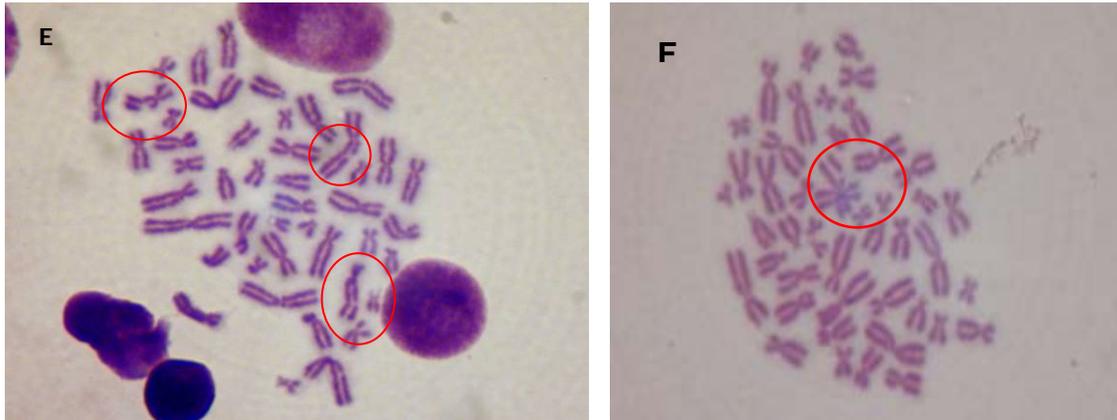
Panel **A** y **B**: Microfotografías de metafases de células linfoides incubadas con 25 μ L y 50 μ L de agua destilada, respectivamente.



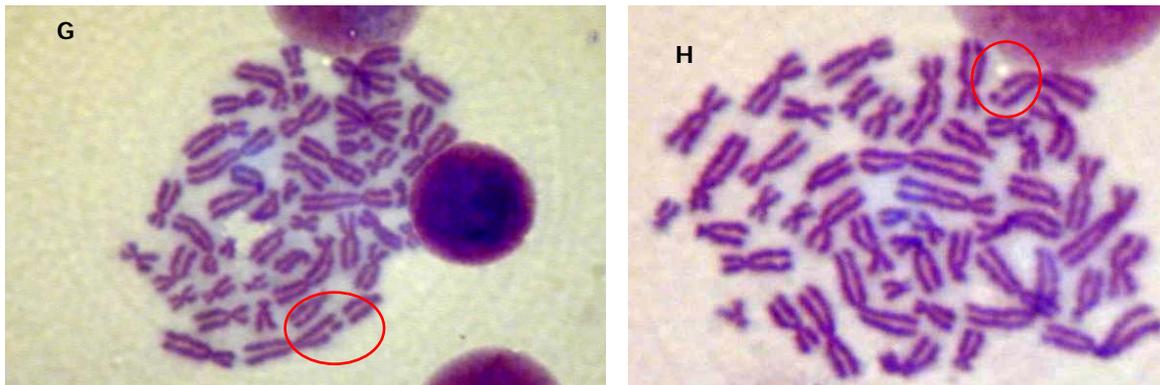
Panel **C** y **D**: Microfotografías de metafases de células linfoides incubadas con 25 μ L y 50 μ L respectivamente de la fase acuosa de aceite sin calentar. No se observan rupturas.

Figura 11.1 (Paneles A-D): Microfotografías de metafases de células linfoides sin rupturas cromosómicas. Campos visuales de un microscopio óptico con un objetivo de 100.

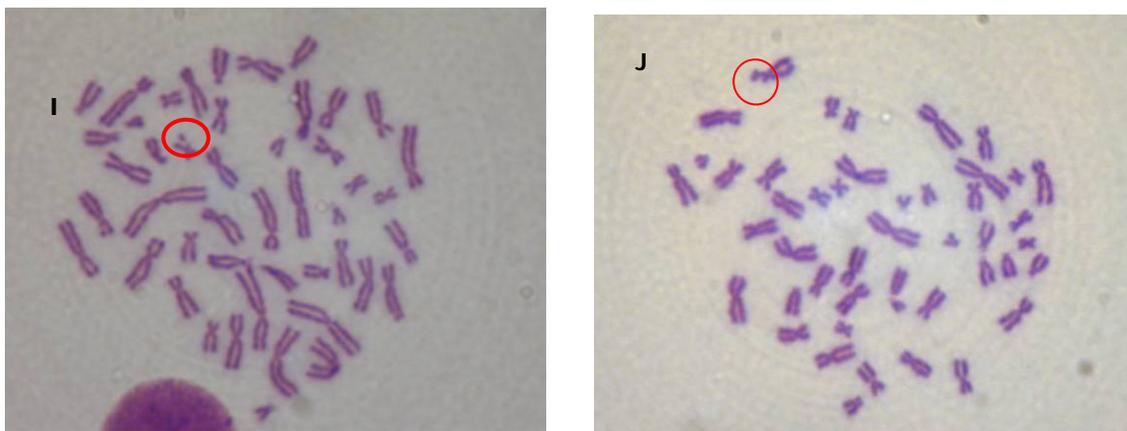
ANEXO XII



Panel E y F: Microfotografías de metafases de células linfoides incubadas con una concentración de $0,75 \times 10^{-4}$ mM de MDA. En el panel E se observan 3 rupturas en cromosomas del grupo A, B y C. En el panel F en cromátida larga de un cromosoma del grupo B.



Panel G, H: Microfotografías de metafases de células linfoides incubadas con una concentración de $1,5 \times 10^{-4}$ mM que presentan ambos una rotura en una cromátida larga de un cromosoma del grupo A.



Panel I: Microfotografías de metafases de células linfoides incubadas con una concentración de $1,5 \times 10^{-4}$ mM de MDA que presenta una ruptura en cromátida larga de un cromosoma del grupo E.

Panel J: Microfotografías de metafases de células linfoides incubadas con una concentración de $1,5 \times 10^{-4}$ mM de MDA con ruptura en cromosoma del grupo C.

Figura 11.2. (Paneles E-J): Microfotografías de metafases de células linfoides que muestran rupturas cromosómicas. Campos visuales de un microscopio óptico con un objetivo de 100.