

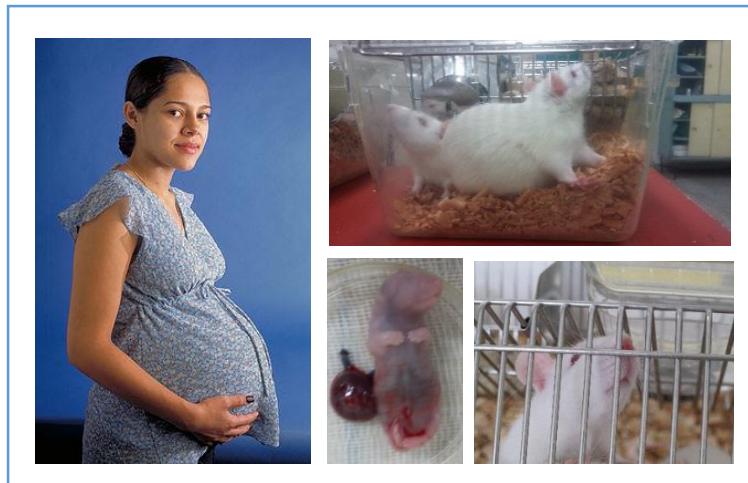


Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología

Santa Clara, 2016

Título: Repercusión metabólica y oxidativa materno-fetal
de la diabetes moderada en ratas Wistar

TESIS DE DIPLOMA



Autor: Claudia S. Chaviano M. de Oca

Tutoras: Msc. Leticia Béquer Mendoza

Msc. Tahiry Gómez Hernández



Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TESIS DE DIPLOMA

**Título: Repercusión metabólica y oxidativa materno-fetal
de la diabetes moderada en ratas Wistar**

Autor: Claudia S. Chaviano M. de Oca

Tutoras: Msc. Leticia Béquer Mendoza

Msc. Tahiry Gómez Hernández

Unidad de Investigaciones Biomédicas

Carretera al Acueducto y Circunvalación. Santa Clara. Villa Clara.

leticiacbm@infomed.sld.cu

tahirygh@infomed.sld.cu

Santa Clara

2016

Para curar una enfermedad primero hay que curar ratones...

Ana Mingorance

*A mis padres, especialmente a mi mamá por sufrir las
consecuencias de esta enfermedad.*

Alguien dijo “la felicidad no existe, solo momentos felices”. La universidad es un momento, uno que dura cinco años y termina en quince minutos de exposición. Un momento que define más que un buen profesional un tipo de persona. A todos aquellos que en alguna ocasión contribuyeron a formar esta persona que hoy termina uno de sus mejores momentos, Gracias.

A Dios, mi protector contra toda lógica de la ciencia, mi Señor y mi conciencia, mis límites para definir el bien o el mal y la esencia de mi personalidad.

A mis padres, porque no soy más que el resultado de sus esfuerzos. Su apoyo y todos los bienes materiales que pusieron delante de mi hicieron este camino transitable.

A cada uno de los profesores del botánico, mis primeros pasos en esta enseñanza fueron guiados por ustedes y de las primeras aventuras fueron los capitanes (Maritza, Idealfonso, Faife). A los profesores del departamento, sus clases me ayudaron a escoger mi verdadera pasión y por el sendero que quiero encaminarme. A todos, porque no hicieron de este tiempo un camino fácil sino que me enseñaron, me exigieron cada vez más y me obligaron a dar lo mejor de mí como futura profesional.

A la “Unidad de Investigaciones Biomédica” por abrirme las puertas y dejarme formar parte de su grupo de trabajadores. A mis tutoras y todo el equipo de investigación, su paciencia y dedicación me enseñaron a amar este trabajo, gracias por no dudar en compartir toda su inteligencia y tiempo.

A mis compañeros: Eric, Osnel, Yoandry, Abelito porque sus picardías y sentido del humor muchas veces sacaron de mí una sonrisa, porque las fiestas organizadas por ustedes siempre fueron las más locas y divertidas. A Divaldo y Milder porque fue un placer cubanizarlos y compartir con ustedes. A Diana, Claudia, Zulema, Dayli, Clairra y Ana porque un pedacito de cada uno de sus caracteres soy yo misma. A las Pachuli (Susset y Sara) porque formaron parte de los momentos más locos de mi vida y de los secretos que escondo bajo siete llaves. A Ivis porque sé que demoraré en conocer una persona tan incondicional y que me salve de tantos líos de la escuela y de la vida.

A los muchachos que no son del grupo pero parte de la gran familia Sheila, José Ángel y toda su pandilla; Odleny, Pachy, Tututu, Gilberto Yoan.. en fin todos los que me permitieron pasar ratos inolvidables.

A mis amigos por su apoyo incondicional porque me alentaron a llegar a la meta y fueron un fiel ejemplo de que sí podía lograrse (Ale, Chino, Juan, Yase)

A Ray porque hay mucho de su buen gusto en esta tesis y de paciencia para soportar cada minuto de estrés.

A todos porque hicieron de estos años una escuela para el futuro, experimenté todo tipo de emociones, reí, lloré pero sobre todas las cosas viví.

Resumen

La diabetes gestacional es motivo de consulta frecuente en medicina materno-fetal por complicaciones neonatales. Existen modelos animales de diabetes que permiten estudiar los mecanismos etiopatogénicos de estas alteraciones. El objetivo de este trabajo fue evaluar la repercusión metabólica y oxidativa materno-fetal de la diabetes moderada en ratas Wistar. La diabetes fue inducida en ratas Wistar hembras neonatas por dosis-única de STZ en buffer-citrato al 2do-día de vida, ratas controles recibieron sólo buffer en similares condiciones. Se comprobó la enfermedad con control de glucemia y PTGO a los 90 días. Las ratas fueron apareadas comprobando peso, glucemias, PTGO y PTI. El día 20 de gestación se practicó la cesárea y sacrificio, se colectó el hígado y muestras de sangre para determinar indicadores metabólicos y de estrés oxidativo. Se seleccionaron fetos con sus placentas extrayéndoles sangre e hígado para diferentes pruebas. El grupo tratado con STZ presentó afectaciones en el metabolismo de la glucosa y los lípidos además de valores alterados de HbA1c con respecto al grupo sano. Los fetos de las ratas enfermas mostraron menores valores de peso corporal con respecto al grupo control sin diferencias en las glucemias. En los indicadores de estrés oxidativo fue inferior el valor del glutatión en la placenta del grupo enfermo que el sano. La gestación en ratas Wistar complicada con una diabetes moderada trae complicaciones metabólicas y oxidativas en el desarrollo materno-fetal similar a lo observado en humanos; permitiendo en estudios futuros investigar y comprender mejor las causas, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.

Palabras clave: diabetes gestacional, estrés oxidativo, modelo animal

Abstract

One of the most frequent reasons in maternal-fetal consultation due to neonatal complications is gestational diabetes. There are several animal models for diabetes that allow the study of the ethiopathogenical mechanisms of this alterations. The purpose of this work was to evaluate the metabolical and oxidative maternal-fetal repercussion of moderate diabetes on Wistar rats. Diabetes was induced on female newborn Wistar rats by a single-dose of STZ on citrate-buffer on day 2 of living. Control rats received only the buffer on similar conditions. Presence of the disease was checked by glycemic control and PTGO at day 90. Rats were mated and weight, glycemic, PTGO and PTI were checked. On day 20th of pregnancy caesarea was practiced and later the rats were sacrificed. Liver and blood samples were taken for the determination of methabolic and oxidative stress indicators. Several fetus and their placentas were selected and his blood and liver was extracted for different tests. The group treated with STZ presented several affectations on glucose and lipids metabolism, besides altered values of HbA1c in comparison with the healthy group. Sick rats fetuses showed lower values of bodyweight than the control group without glycemic differences. Sick rats presented lower glutation levels in placenta than healthy rats. Wistar rats gestation alongside a moderated diabetes bring several methabolical and oxidative complications on the maternal-fetal development, just like it is observed on humans; allowing on future studies to investigate and have a better understanding of causes, diagnosis and treatment of this disease.

Key words: gestational diabetes, oxidative stress, animal model

Contenido

1. Introducción.....1

Objetivo general.....3

Objetivos específicos.....3

2. Revisión bibliográfica4

 2.1 Diabetes mellitus.....4

 2.1.1 Epidemiología.....4

 2.1.2 Clasificación.....5

 2.1.3 Complicaciones agudas y crónicas.....7

 2.1.4 Complicaciones para la madre diabética y el feto.....9

 2.2 Modelos animales 11

 2.3 Estrés oxidativo 14

 2.3.1 Antioxidantes 16

3. Materiales y Métodos..... 18

 3.1 Animales y diseño experimental..... 18

 3.1.1 Inoculación y comprobación de la enfermedad 19

 3.1.2 Apareamiento y gestación..... 20

 3.2 Pruebas bioquímicas realizadas durante la gestación..... 20

 3.2.1 Sacrificio y recogida de muestras 21

 3.2.2 Pruebas metabólicas realizadas a los fetos 22

 3.2.3 Indicadores metabólicos..... 22

 3.2.4 Indicadores de química clínica 23

 3.2.5 Indicadores de estrés oxidativo 23

 3.3 Aspectos éticos en el tratamiento de los animales..... 24

 3.4 Análisis estadístico 24

4. Resultados 26

 4.1 Animales y diseño experimental..... 26

 4.1.1 Inoculación y comprobación de la enfermedad 26

 4.1.2 Apareamiento y gestación..... 27

 4.2 Pruebas bioquímicas realizadas durante la gestación..... 27

 4.2.1 Sacrificio y recogida de muestra 29

 4.2.2 Pruebas metabólicas realizadas a los fetos 29

 4.2.3 Indicadores metabólicos..... 29

4.2.4 Indicadores de química clínica	30
4.2.5 Indicadores de estrés oxidativo	31
5. Discusión	34
5.1 Animales y diseño experimental	34
5.1.1 Inoculación y comprobación de la enfermedad	34
5.1.2 Apareamiento y gestación	35
5.2 Pruebas bioquímicas realizadas durante la gestación	36
5.2.1 Sacrificio y recogida de muestras	36
5.2.2 Pruebas metabólicas realizadas a los fetos	38
5.2.3 Indicadores metabólicos	39
5.2.4 Indicadores de química clínica	39
5.2.5 Indicadores de estrés oxidativo	41
6. Conclusiones	46
7. Recomendaciones	47
Referencias bibliográficas	48

1. Introducción

Según la Federación Internacional de Diabetes (FID) en su 6^{ta} edición la diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades no transmisibles más frecuente en los últimos años. La incidencia mundial fue evaluada en el 2 013 en aproximadamente 8,3% de los adultos representando 382 millones de personas con un pronóstico de 592 millones para el 2 035 lo que representa más del 50% en menos de 25 años. Estos valores se le atribuyen a los cambios en los modelos económicos, el estilo de vida sedentario, la poca accesibilidad a bebidas y alimentos sanos y un aumento en la urbanización (Sandína *et al.*, 2011, Guariguata *et al.*, 2013).

Según Guariguata *et al.* (2013) registra una carga financiera en 548 000 millones de dólares en gastos de salud lo que representa un 11% del gasto total en todo el mundo. En América Central y en América del Sur el costo directo fue evaluado en 26 000 millones de dólares (Guzmán *et al.*, 2010). Su impacto en nuestra región crece cada vez más y el sistema nacional de salud es insuficiente.

La DM es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemias causadas por defectos en la secreción y/o acción de la insulina, ocasionando daños en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Actualmente se identifican 4 tipos de DM: DM tipo I (DMI), DM tipo II (DMII), diabetes gestacional (DG) y otros tipos específicos de diabetes (Iglesias *et al.*, 2014).

Se ha encontrado que las hiperglucemias que se producen en pacientes con DM generan especies reactivas del oxígeno (EROs), que a largo plazo producen estrés oxidativo (EO) en una amplia variedad de tejidos (El-Wassef *et al.*, 2012). Algunos de los indicadores de EO se manifiestan de la siguiente forma: disminuyen las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes como la A y E, se incrementa la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (del inglés las siglas TBARS), se incrementa la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación, menor capacidad antioxidante total del plasma y se daña el material genético (Clapés, 2000).

El embarazo está acompañado por una serie de adaptaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que comienzan desde la concepción y continúan durante todo el embarazo, la glucosa constituye la fuente de energía primaria para el crecimiento y desarrollo del feto (Iva, 2013). Es conocido que la diabetes materna constituye un ambiente desfavorable para el desarrollo embrionario y feto-

placental. En el 2 013 más de 21 000 millones de niños nacidos vivos fueron afectados por la diabetes durante la gestación (Guariguata *et al.*, 2013).

En nuestro país la prevalencia de DM en mujeres en edad reproductiva en el año 2 000 fue de 30,2 por 1 000 habitantes, en el año 2 011 la prevalencia prácticamente se había duplicado 55,8 por 1 000 habitantes atribuyendo dicho fenómeno al incremento de la DM, al aumento del sobrepeso y a la tendencia a posponer el parto (Cruz *et al.*, 2013). De 10 480 nacimientos ocurridos en el Hospital Universitario Gineco-Obstétrico “Mariana Grajales”, de Villa Clara en el período de enero del 2 008 a diciembre del 2 009, 427 fueron pacientes diabéticos representando el 4% de incidencia. De estos el 87,6% de madres con DG y el 12,4% con diabetes pregestacional (Suarez, 2010).

A pesar de los tratamientos actuales, las mujeres embarazadas con DMI o DMII presentan un riesgo incrementado de abortos espontáneos, mortalidad perinatal, malformaciones congénitas, anomalías placentarias, afectación en la programación intrauterina, entre otras alteraciones (Jawerbaum y White, 2010).

Evidencias recientes demuestran que la hiperglucemia y el embarazo inducen incrementos en la producción de EROs (Sinzato *et al.*, 2009, Damasceno *et al.*, 2013). Una vez que el EO se establece se producen modificaciones de la expresión de genes que controlan el proceso en períodos críticos del desarrollo del embrión. El incremento del EO durante el embarazo es considerado como un factor importante en la etiología y patogénesis de las complicaciones de la diabetes durante la gestación (González, 2002, Fernández *et al.*, 2010).

El empleo de modelos animales provee una herramienta esencial para las investigaciones de mecanismos moleculares que controlan el crecimiento celular, y la interfase materno-fetal no es la excepción. Aunque existen algunas diferencias en la organización de la interfase materno-fetal en los roedores respecto a los primates, existen muchas similitudes en las funciones y líneas celulares que la componen (Srinivasan y Ramarao, 2007, Kiss *et al.*, 2009).

La diabetes moderada puede ser empleada en estudios experimentales para reproducir niveles de glucosa sanguínea similares a los observados en el embarazo humano (Sinzato *et al.*, 2009); sin embargo, sólo unos pocos estudios han evaluado la repercusión de la diabetes en ratas preñadas y /o su descendencia empleando modelos con este tipo de diabetes.

La inducción experimental de DM mediante la administración de fármacos citotóxicos como la estreptozotocina (STZ) es uno de los métodos mejor caracterizados. Los niveles de glucemia que

han sido reportados varían en dependencia de la especie del animal con la cual se trabaja; dosis, vía de administración y momento de administración de STZ, produciéndose valores de glucemias superiores a los 200/300 mg/dl (diabetes severa) o glucemias entre los 120 y 200/300 mg/dl (diabetes moderada) (Damasceno *et al.*, 2013).

La investigación actual sugiere que las principales complicaciones durante la gestación diabética pueden tener mecanismos etiológicos comunes entre los que se ha implicado el EO.

Teniendo en cuenta las limitaciones de estudios en humanos (razones éticas y existencia de diversas variables incontrolables: nutrición, dieta, factores genéticos y socioeconómicos) que exploren los mecanismos responsables de las alteraciones causadas por la diabetes en el embarazo, existe la necesidad de modelos animales apropiados para un mejor conocimiento del diagnóstico, patofisiología y tratamientos de la diabetes.

Por esta razón se crea en la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara un modelo experimental de diabetes moderada con trastornos en el metabolismo de la glucosa y los lípidos antes y durante la gestación con el fin de evaluar la repercusión metabólica y oxidativa materno-fetal de la diabetes moderada en ratas Wistar.

Hipótesis científica

Las hiperglucemias moderadas durante la gestación en ratas podrían provocar daños metabólicos y oxidativos en la madre y un impacto negativo en el desarrollo feto-placentar de la descendencia.

Objetivo general

- Determinar la repercusión metabólica y oxidativa materno-fetal de la diabetes moderada en ratas Wistar.

Objetivos específicos

1. Identificar la posible modificación de los indicadores metabólicos en las ratas diabéticas preñadas y sus fetos.
2. Describir los cambios en los niveles de indicadores de estrés oxidativo en las ratas diabéticas preñadas y sus fetos.

2. Revisión bibliográfica

2.1 Diabetes mellitus

2.1.1 Epidemiología

La DM es una enfermedad metabólica en la cual se evidencian altos niveles de glucosa en sangre y complicaciones tanto microvasculares como macrovasculares que aumentan de forma considerable la morbilidad y mortalidad de dicha enfermedad (Kalofoutis *et al.*, 2007). Este es probablemente uno de los padecimientos más antiguas conocidas por el hombre, reportado por primera vez en uno de los manuscritos en Egipto alrededor de 3 000 años atrás (Olokoba *et al.*, 2012). En la actualidad, la DM plantea un grave problema mundial de salud pública, debido a que ha aumentado su incidencia y prevalencia, en particular en los países en vías de desarrollo o de reciente industrialización. En México, según la Encuesta Nacional de Salud en el 2 000, en 1 980 ocupó el noveno lugar como causa de muerte, para colocarse a finales de los 90 en el tercero y primer lugar en el grupo de 55 a 64 años. Estas alarmantes cifras se asocian a un cambio en la alimentación y disminución de la actividad física cotidiana (Díaz *et al.*, 2004). Se suman además el incremento de la urbanización, los cambios en la elaboración y distribución de los alimentos, la elevada utilización de grasas y azúcares en las comidas y bebida y la poca disponibilidad de un alimento saludable (Sandína *et al.*, 2011).

Dicha enfermedad además de provocar aproximadamente 4,6 millones de fallecimientos cada año, disminuye considerablemente la calidad y expectativa de vida de los pacientes sin contar los elevados costos destinados al tratamientos (Béquer *et al.*, 2016).

Según la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) en el Consenso Prediabetes en Latinoamérica se observa un incremento en la población que padecen DMII semejante al que ocurre a nivel mundial pero con ciertas características especiales debido a la genética de la población, hábitos alimentarios inadecuados y una vida sedentaria, lo cual ha favorecido la expresión de dicha enfermedad (Guzmán y Calles, 2008). En el año 2 000 el costo directo de la diabetes en América Latina y el Caribe fue evaluado en 10 000 millones de dólares y el costo indirecto en 55 000 millones de dólares (Guzmán *et al.*, 2010). En América Central y el Caribe el gasto sanitario en el 2 013 se estimó en 26 200 millones de dólares, la región gasta el 13% de su presupuesto sanitario en adultos con este padecimiento (Guariguata *et al.*, 2013).

Estudios realizados en diversos países muestran tasas superiores de DMII en hombres que en mujeres, aunque también está relacionado con la posición económica. Un estudio realizado a la

población vasca refleja un elevado número de padecimientos de las mujeres con respecto a los hombres con baja posición económica pero se comportaba de forma contraria cuando el nivel de vida era elevado (Sandína *et al.*, 2011).

La Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud del Ministerio de Salud Pública de Cuba, presenta en el Anuario Estadístico de Salud, en su 43 edición, con información actualizada hasta el año 2 014 cómo se encuentra la manifestación de esta enfermedad. Está registrada dentro de las 10 principales causas de muerte en el país aunque con respecto al 2 013 no hubo un incremento en la tasa de mortalidad. En el 2 014 hubo 867 defunciones en los hombres y 1 343 en las mujeres. La provincia de Villa Clara constituye la tercera provincia después de La Habana y Santiago de Cuba con más muertes por esta enfermedad con 147 en el 2 014 (Bess S (Ed.), 2015).

2.1.2 Clasificación

El término de DM describe diferentes trastornos metabólicos que resultan de alteraciones en la secreción de insulina, en la respuesta periférica a la misma o en ambas; lo que conduce a un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica y alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos (Díaz *et al.*, 2004).

Según el “Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de la DM” ésta puede clasificarse en cuatro grupos fundamentales:

- DMI: debida a la destrucción de la célula β y, en general, con déficit absoluto de insulina.
- DMII: debida a un déficit progresivo de secreción de insulina sobre la base de una insulinoresistencia.
- Otros tipos específicos de DM: debidos a otras causas, como defectos genéticos en la función de las células β o en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística) o inducidas farmacológica o químicamente (como ocurre en el tratamiento del VIH/sida o tras trasplante de órganos).
- DG: DM diagnosticada durante el embarazo; no es una DM claramente manifiesta (Iglesias *et al.*, 2014).

DMI

La DMI aparece como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas siguiéndole una serie de complicaciones metabólicas (Ullah *et al.*, 2015). Existe una primera etapa que puede durar meses y hasta años donde se inicia el proceso de infiltrado leucocitario en los

islotos pancreáticos conocido como insulinitis y la destrucción continuada de la masa celular β . Aparecen los síntomas clínicos cuando ha desaparecido el 80% de las células productoras de insulina provocándole al organismo la incapacidad de controlar los niveles de glucosa en sangre. La susceptibilidad de esta enfermedad tiene origen multifactorial relacionándose tanto con factores genéticos como ambientales (infecciones víricas, dieta) (Verdaguer y Puertas, 2006).

Las complicaciones de esta enfermedad pueden presentarse agudas como son las hipoglucemias y la cetoacidosis diabética esta última como omisión del tratamiento o por un proceso infeccioso asociado. Se pueden presentar, además, complicaciones crónicas como: retinopatía, nefropatía, neuropatía diabética, enfermedades cardiovasculares y pie diabético (Villarreal *et al.*, 2015). Este tipo de diabetes constituye alrededor del 10% del total de personas diabéticas pero el número sigue creciendo (Barajas, 2011).

DMII

La DMII es una de las enfermedades más desafiantes del siglo XXI, se caracteriza por resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, bien sea por defectos a nivel de pre-receptor, receptor o post-receptor con posibles alteraciones en la producción de insulina por las células β . Depende de las interacciones entre el riesgo genético, medioambiental y factores conductuales. Ocurre generalmente en edades avanzadas y en personas obesas con un estilo de vida sedentario (Kalofoutis *et al.*, 2007, Saini, 2010, Olokoba *et al.*, 2012). Existe riesgo además en las personas fumadoras y en aquellos que tienen un consumo frecuente de alcohol y se ha probado que algunos tóxicos medioambientales aumentan las frecuencias de aparición de esta enfermedad (Olokoba *et al.*, 2012).

Aunque existe una amplia información de este tipo de diabetes todavía hay algunas dudas de la enfermedad; se conoce la predisposición genética y la influencia del estilo de vida pero el fin de cada mecanismo es incierto. Se plantean preguntas como la diferencia del sexo en el desarrollo y consecuencias de salud de la DMII, el papel del sistema nervioso central y los orígenes evolutivos de susceptibilidad (Kaplan y Wagner, 2006).

Las primeras manifestaciones de la enfermedad tienden a aparecer durante la edad adulta, después de la tercera década de vida, y son mucho más discretas que las que se presentan en la DMI; de hecho, un alto porcentaje de pacientes son asintomáticos y tan sólo exhiben altas concentraciones de glucosa en el plasma (Díaz *et al.*, 2004).

Algunos estudios realizados por epidemiólogos han descrito que tanto la DMI como la DMII son patologías complicadas y desventajosas con respecto a sus complicaciones tardías, ya que los pacientes diabéticos en comparación a otros presentan 25 veces más posibilidades de quedarse ciegos, 20 veces más de tener problemas renales, así como riesgo de sufrir amputaciones por gangrena y de 2-6 veces más de desarrollar enfermedades coronarias y daños isquémicos en el cerebro. Aquellas personas que se diagnostican con esta patología antes de los 30 años de edad mueren sin cumplir los 50, la mayoría por problemas cardiovasculares y renales (Ramos *et al.*, 2006).

DG

Se diagnostica la enfermedad en mujeres con altos niveles de glucosa en sangre durante el embarazo como resultado de una resistencia insulínica. Suele aparecer alrededor de la semana 24 (Guariguata *et al.*, 2013).

Aproximadamente el 7% de todas las embarazadas debutan con una DG, lo cual equivale a más de 200 000 casos que se presentan anualmente, este número varía en dependencia de la población estudiada y los criterios utilizados para el diagnóstico (Murthy *et al.*, 2002).

La fisiología del metabolismo materno está muy influenciada por las hormonas de la placenta que actúan, sobre todo, en el metabolismo de lípidos y proteínas con el objetivo de suministrarle al feto los nutrientes necesarios para el crecimiento (Facco, 2013). En esta etapa se crea, de forma natural, un estado fisiológico de resistencia a la insulina para dirigir los nutrientes de la madre hacia la unidad fitoplacentaria (García, 2008, Doshani y Konje, 2009).

Se recomienda llevar un estudio detallado a las mujeres con elevado riesgo, aquellas mayores de 35 años, con antecedentes de DG y de familiares, obesidad, glucosuria, malos antecedentes obstétricos, presencia en la gestación actual de hidramnios o feto macrosómico en estudios ecográficos (Contreras *et al.*, 2008).

2.1.3 Complicaciones agudas y crónicas

Las complicaciones en los pacientes con diabetes pueden ser agudas o crónicas. En el caso de las complicaciones agudas pueden manifestarse cetoacidosis diabética, hiperglucemias, hipoglucemias y coma hiperosmolar. Las complicaciones crónicas suelen dividirse en micro y macrovasculares. Las microvasculares más frecuentes son retinopatía, nefropatía y neuropatía. Las complicaciones macrovasculares son: enfermedades cardiovasculares periféricas, cerebrovasculares, cardiopatías (Muro, 2014).

Al paciente diabético se le identifica cuando manifiesta alguna complicación crónica de la enfermedad, como la neuropatía diabética. En la actualidad las complicaciones agudas han dejado de ser causa de muerte, por lo que el enfermo con DMII tiene una vida más larga, pero debe enfrentarse a las complicaciones crónicas de la enfermedad (Díaz *et al.*, 2004).

Se considera que el principal factor de riesgo es la hiperglucemia crónica, por ello las primeras complicaciones crónicas de la DM son el resultado de las reacciones químicas y de la activación o alteración del metabolismo causado por el exceso de glucosa (Fig. 1). Se ha postulado que la hiperglucemia puede causar complicaciones micro y macrovasculares asociadas a la diabetes mediante cinco mecanismos principales:

- I. acumulación y acción de productos de glicación avanzada
- II. incremento en la actividad de la vía del sorbitol
- III. aumento en la vía de las hexosaminasa
- IV. activación de diversas isoformas de la proteína quinasa C
- V. aumento en el estrés oxidativo (Díaz *et al.*, 2004).

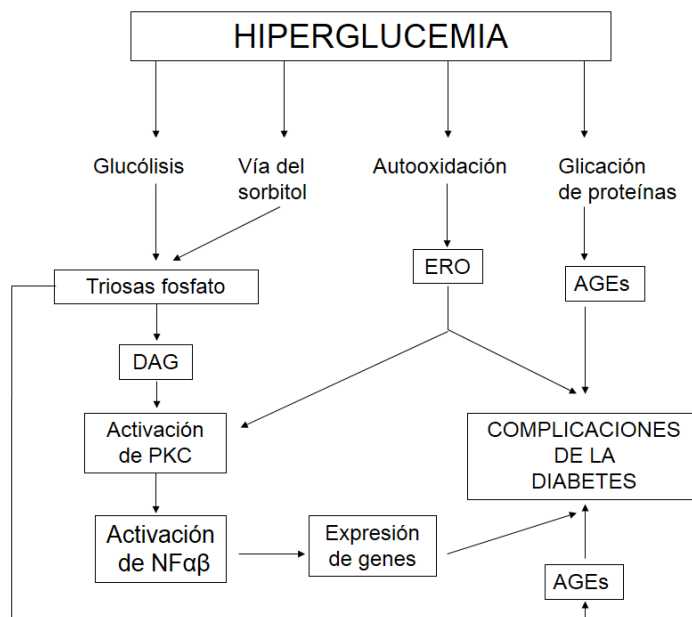


Figura 1 Modelo integrativo del mecanismo de inducción de las complicaciones de la diabetes (Díaz *et al.*, 2004).

2.1.4 Complicaciones para la madre diabética y el feto

Diagnóstico

Se conoce del padecimiento a través de la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO), cuyo valor no puede superar los 140mg/dl (Arizmendi *et al.*, 2012). Según ALAD en el Consenso Latinoamericano de Diabetes y Embarazo en la primera consulta se le solicita a las embarazadas una glucosa plasmática, si el resultado es un valor por encima de 100mg/dl se repite dentro de siete días con una dieta previa, si con el segundo se obtiene un valor similar al primero se diagnostica la DG. Si se obtienen valores inferiores se solicita una Prueba de Tolerancia a la Glucosa con 75g de glucosa, si los resultados dan alterados se puede afirmar que la paciente padece de DG si los valores están dentro de los rangos normales pero presenta factores de riesgo se repite la prueba entre las 31 y 33 semanas pero si los factores de riesgo son de suma importancia puede solicitarse antes de la semana 24 (Márquez, 2007).

Tratamiento

Uno de los tratamientos a la DG es un plan nutricional y un compromiso del paciente de mantener una revisión constante de sus glucemias (Arizmendi *et al.*, 2012). Se recomienda un ejercicio físico sistemático supervisado por un personal especializado. Existe, además, un grupo de medicamentos que estimulan la secreción de insulina como los sulfonilureas. Un ejemplo es la glibenclamida la cual se recomienda tomar una hora antes de las comidas ya que su concentración máxima es entre 2 y 4 horas y la glucosa se eleva a los 90 minutos posprandial. Atraviesa la placenta en cantidades ínfimas (García, 2008). Otro fármaco a utilizar es la metformina, decrece la resistencia insulínica, controla el aumento de peso y el hecho de presentar diabetes a largo plazo. Aun así es un fármaco que atraviesa la placenta y no se conocen los efectos que pueda tener sobre el feto. Se recomienda además la insulina humana aunque la dosis varía (Contreras *et al.*, 2008)

Afectaciones al feto

Las afectaciones que pueden presentar los hijos de madres con DG depende de cuan grave se presente la enfermedad, pudiéndose observar: macrosomía, hiperinsulinismo fetal, hipoxia, acidosis metabólica y aumento en el índice de muertes perinatales (Polanco *et al.*, 2005). Aumenta el riesgo de trastornos esqueléticos como el síndrome de regresión caudal, así como espinales y sirigomelia. En el sistema renal aparecen la hidronefrosis, agnesia renal y quistes. De las malformaciones del intestino las más abundantes son la atresia del duodeno y el recto (Arizmendi *et al.*, 2012). Estudios

muestran que la obesidad y la DMII son más frecuentes en niños y adolescentes cuyas madres fueron diabéticas o tuvieron DG. Los desórdenes en el metabolismo materno afectan el desarrollo y el metabolismo de la descendencia destacando la diabetogénesis en diferentes fases de la cría incluyendo a la madre (Barbalho *et al.*, 2011).

Afectaciones a la madre

En el caso de la DG la mujer con este padecimiento tiene tanto a corto, medio como largo plazo un mayor riesgo de continuar padeciendo DM luego del embarazo, así como complicaciones de hipertensión, dislipidemia y enfermedades cardiovasculares (Contreras *et al.*, 2008).

La diabetes en general está relacionada con desórdenes metabólicos que afectan la regulación homeostática. Durante el embarazo ocurren cambios en el metabolismo que tienen un impacto significativo en el desarrollo intrauterino. Las mujeres embarazadas con diabetes aumentan los riesgos de malformaciones congénitas, nacimientos prematuros y mortalidad neonatal/perinatal. Los estudios realizados para conocer los mecanismos responsables de los cambios causados por la diabetes están limitados, no solo por razones éticas sino por algunas variables incontrolables las cuales pueden alterar el desarrollo intrauterino e incrementar las malformaciones congénitas y la pérdida de los embriones (Bueno *et al.*, 2014).

La DM durante el embarazo está asociada con altos niveles de incontinencia urinaria (IU) y disfunciones del músculo pélvico, pero la patofisiología exacta de la IU no ha sido bien caracterizada. La misma está ejemplificada por tener un origen multifactorial, incluyendo malformaciones del esfínter de la uretra (Damasceno *et al.*, 2013).

La diabetes en las mujeres aumenta la susceptibilidad a abortos espontáneos este riesgo pudiera ser eliminado si hubiera un control de las glucemias desde la concepción o durante los tres primeros meses de embarazo. En adición los fetos en las mujeres diabéticas presentan anomalías congénitas de un 6-8% superior al 2% de las mujeres no diabéticas. Las evidencias indican que hay una excesiva producción de EROs lo cual aumenta el EO y puede estar implicado en la etiología de las complicaciones de la diabetes. Esta hipótesis es sustentada por el hecho que muchas rutas bioquímicas están estrictamente asociadas con hiperglucemias incrementando así los radicales libres (Damasceno *et al.*, 2002).

Los cambios celulares que afectan a la madre pueden igualmente afectar los tejidos embrionarios y en adición las malformaciones pueden ocurrir porque existe un exceso de glucosa cuyo metabolismo

interfiere en los tejidos morfogénicos. La identificación e intervención son importantes durante el período de preimplantación como prevención de las malformaciones (Damasceno *et al.*, 2013).

La placenta es un complejo órgano fetal que realiza roles pleiotrópicos durante el desarrollo fetal. Separa la circulación fetal de la maternal y juega un importante rol en la protección del feto de los efectos adversos del ambiente diabético maternal. La placenta genera EROs que puede contribuir al EO siendo normal durante el embarazo pero su aumento puede traer complicaciones como la preclampsia, restricción del desarrollo intrauterino y DG donde el EO y nitrosativo pueden ser claramente documentados. Estudios previos en mujeres con DG muestran la presencia de EO en sus placentas como resultado de la reducción de los mecanismos antioxidantes de defensa y el incremento en la producción de EROs (Machado *et al.*, 2014).

2.2 Modelos animales

Los modelos animales han sido utilizados para el desarrollo de investigaciones que han permitido el estudio de las diferentes enfermedades (Kiss *et al.*, 2009). La constante búsqueda desplegada por el hombre de respuestas a los mecanismos de la enfermedad de la diabetes se han visto limitados, razón por la cual son utilizados modelos animales (Damasceno *et al.*, 2013, Damasceno *et al.*, 2014).

Constituyen los roedores la opción más recomendada para efectuar las investigaciones, puesto que se requieren un menor número de animales como resultado de su multiparidad, la corta duración de su gestación así como su fácil mantenimiento (Kiss *et al.*, 2009).

Refiriéndonos a la inducción de la diabetes en animales y su clasificación se encuentran cinco categorías fundamentales.

- 1) Espontánea o que están predispuestos genéticamente representado fundamentalmente por ratones.
- 2) Inducción de la enfermedad a través de la dieta vinculada ésta a ratas y ratones.
- 3) La inducción química en la cual los animales más empleados son igualmente las ratas y los ratones.
- 4) La inducción quirúrgica empleado en un mayor número de animales como ratas, cerdos, primates y perros.
- 5) La mayoría de los experimentos preliminares en la diabetes se llevan a cabo en los roedores aunque algunos todavía se realizan en animales de mayor tamaño (Srinivasan y Ramarao, 2007).

De todas las metodologías la más empleada es la inducción química pues el protocolo de empleo resulta relativamente fácil, con baja mortalidad, poco costoso y de corta duración. Posee como desventaja la utilización de un agente tóxico y el hecho de que los componentes genéticos e inmunes de la enfermedad no se evidencian. A pesar de que este padecimiento tanto en los humanos como en los modelos animales, son diferentes, los químicos empleados para inducirla en animales desencadenan una serie de reacciones pro-inflamatorias semejantes a lo que ocurre espontáneamente en el páncreas humano permitiendo que la inducción química de la diabetes experimental sea una herramienta útil para su estudio y sus complicaciones así como posibles tratamientos (Jawerbaum y White, 2010).

El uso de agentes químicos para producir diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético. Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células β . En ratas y ratones la STZ, el aloxano y el vacor interfieren con el metabolismo celular específicamente en la célula β y como resultado se destruyen dichas células (Lenzen, 2008, Ishii *et al.*, 2012, Raza y John, 2012).

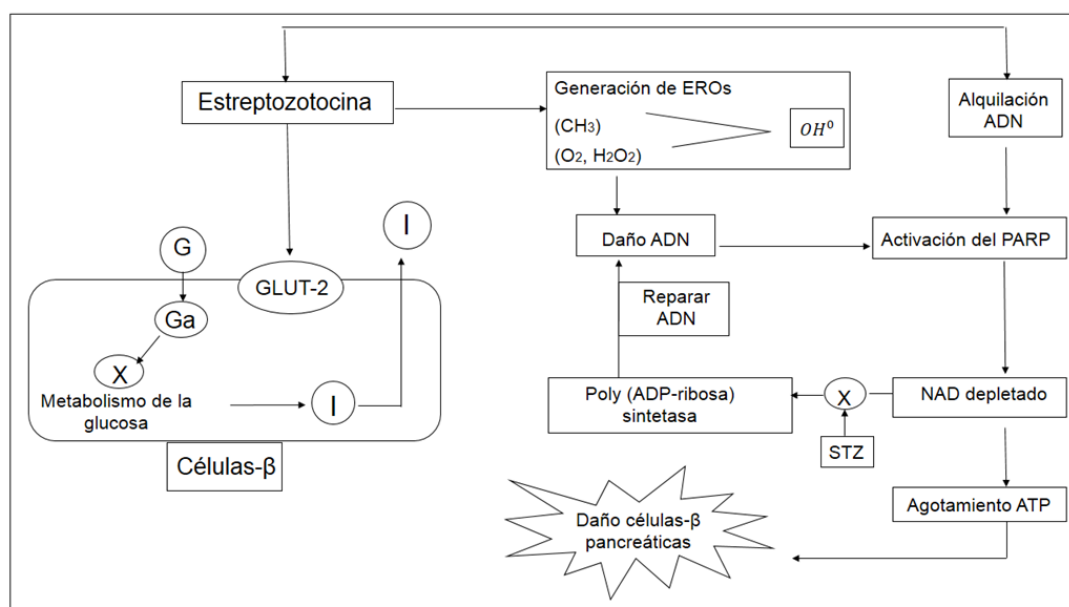
El aloxano, antiguamente muy empleado es desventajoso porque el porcentaje de diabetes es bastante inconstante, la cetosis y la mortalidad resultante es alta. La inversión de hiperglucemia debido a la regeneración pancreática es temprana y común en caso de tratarse a los animales con este químico. La STZ por su parte posee algunas ventajas para la inducción de diabetes en los animales del laboratorio (Lenzen, 2008, Raza y John, 2012). Tanto el aloxano como la STZ ejercen su acción diabetogénica por administración intravenosa, intraperitoneal o subcutánea (Junod *et al.*, 1969).

En dependencia del tipo de hiperglucemia que se desee inducir será la línea de roedor, su edad, así como la dosis y vía de inoculación del fármaco a emplearse. Aunque existen numerosas variantes, generalmente se utiliza la administración de STZ a edad adulta para lograr una destrucción total del páncreas endocrino y una hiperglucemia severa, mientras que la inyección de la droga en el período neonatal provoca hiperglucemias moderadas en la adultez debido a la regeneración parcial de células β (Kiss *et al.*, 2009, Damasceno *et al.*, 2014).

Una única dosis elevada de STZ (100 mg/Kg de peso corporal) administrada durante los primeros días de vida del gazapo provoca en el transcurso de varias semanas un déficit de insulina moderado y valores medios de hiperglucemia semejantes a una DMII (Arulmozhi *et al.*, 2004, Kiss *et al.*, 2009, Inhasz *et al.*, 2013).

El modelo neonatal que emplea STZ se considera, desde hace muchos años, una herramienta confiable para esclarecer los mecanismos asociados a la regeneración de las células pancreáticas y a las complicaciones a largo plazo de la DMII (Portha *et al.*, 1979, Damasceno *et al.*, 2013, Damasceno *et al.*, 2014).

Estructuralmente la STZ es una D-glucopiranososa derivada de N-metil-N-nitrosourea que debe su especificidad por las células β a la porción glucosa o azúcar que posibilita la entrada de toda la estructura a las células secretoras de insulina mediante el transportador de glucosa GLUT 2. La parte restante del compuesto es responsable de la acción citotóxica. Aunque todos los mecanismos de daño de la STZ sobre el páncreas no están completamente elucidados, si se conoce que causa alquilación del ADN y por tanto activación de los mecanismos de reparación celular, fundamentalmente la enzima PARP-1 que es sintetizada a partir de NAD⁺, importante molécula implicada en el metabolismo energético a nivel celular. El daño extenso sobre el ADN provoca por tanto un agotamiento sustancial de NAD⁺ y de ATP ya que la biosíntesis del primero se realiza a partir del segundo. También se han descrito otros daños relacionados con disfunción mitocondrial y EO (Junod *et al.*, 1969, Arulmozhi *et al.*, 2004) (Fig. 2).



GLUT – 2= transportador de glucosa, G= glucosa extracelular, G_a= receptor de glucosa activado, I= insulina, OH⁰= radical hidroxilo, CH₃ = radical metilo, O₂ =radical oxígeno, H₂O₂= peróxido de hidrógeno, ADN= ácido desoxirribonucleico, PARP= Poly (ADP-ribose) polimerasa, NAD= dinucleótido de nicotinamida y adenina, ATP= trifosfato de adenosina.

Figura 2 Mecanismo de acción de la estreptozotocina (Saini et al., 2013).

Aunque ningún modelo experimental recrea totalmente las particularidades de la enfermedad en humanos es necesario trabajar en la caracterización de estos para que los resultados obtenidos de su utilización sean lo más valiosos posibles. El modelo perfecto debería cumplir con las dos particularidades fundamentales de la DG: resistencia a la insulina y disfunción parcial de las células β pancreáticas, que junto a síntomas como hiperglucemia, desbalance metabólico y EO definen la enfermedad. Actualmente en nuestro país se trabaja en el desarrollo de un modelo de inducción neonatal de diabetes moderada experimental que ha logrado obtener en ratas Wistar parámetros bioquímicos, oxidativos, morfológicos e histológicos similares a los observados en humanos (Béquer *et al.*, 2014, Gómez *et al.*, 2014).

2.3 Estrés oxidativo

Los radicales libres (RL) son todas aquellas especies químicas cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad. Poseen estructura birradiática, son muy reactivos, vida media corta, actúan cerca del sitio en que se forman y son difíciles de dosificar (Venereo, 2002). Entre los RL más importantes están los derivados del oxígeno: el anión superóxido ($\cdot O_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el oxígeno singlete ($1O_2$) (Morales *et al.*, 2003).

El cuerpo humano está expuesto a RL tanto exógenos como endógenos (Ilechukwu *et al.*, 2014). Entre los exógenos pueden nombrarse:

- Radiaciones ultravioletas
- Sustancias químicas ambientales: ozono, nitrógeno, producto de la combustión de motores, tabaco, hidrocarburos halogenados y metales pesados.
- Infecciones: bacterianas, víricas, parasitarias y priones (Morales *et al.*, 2003)

En el caso de los endógenos son producto fundamentalmente del metabolismo celular. La cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal, en los cloroplastos y las reacciones de oxidación. Los procesos inflamatorios también generan RL por la activación de leucocitos polimorfonucleares (Céspedes y Sánchez, 2000, Venereo, 2002).

La familia de RL generadas por el oxígeno son llamadas EROs las cuales causan daño a otras moléculas por extracción de electrones para lograr estabilidad (Ilechukwu *et al.*, 2014). La

producción biológica de EROs, primeramente el anión superóxido ($\cdot O_2$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es capaz de dañar moléculas (Repetto *et al.*, 2012).

Daños a Lípidos

Afecta las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados alterando la estructura de la membrana, la provisión de energía, fluidez, flexibilidad, permeabilidad selectiva y la señalización celular provocando edemas y muerte celular (Venereo, 2002).

Daños a Proteínas

La exposición de oxígeno reactivo a proteínas provoca desnaturalización, pérdida de la función, entrecruzamiento, agregación y fragmentación de tejido conectivo como el colágeno (Repetto *et al.*, 2012).

Daño al ADN

Ocurren mutaciones y carcinogénesis, las proteínas no se expresan o no son sintetizadas por la pérdida de un gen, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentación, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamiento cromosómico y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (Venereo, 2002).

Las EROs son entidades que forman parte de los seres vivos, el disturbio entre el balance que existe en el organismo entre antioxidantes y pro-oxidantes a favor del segundo grupo trae como finalidad el ataque sobre células sanas haciéndolas perder su estructura y función en un proceso degradativo y acumulativo que favorecen el EO. Algunos de los eventos que estimulan su formación son: el envejecimiento, la acción de drogas y su toxicidad y procesos inflamatorios. El resultado final conlleva a diferentes estados fisiopatológicos como: aterosclerosis, cáncer, diabetes, la isquemia/reperfusión, Alzheimer, Parkinson, catarata, depresión, entre otros (Ospina *et al.*, 1995, Ramos *et al.*, 2006, Ullah *et al.*, 2015).

El EO puede definirse además como un desequilibrio bioquímico como resultado de la producción abundante de especies reactivas y RL que provocan daño oxidativo cuyo sistema antioxidante no pueden contrarrestar. Este estado ocasiona irregularidad en los procesos bioquímicos y fisiológicos de las células ocasionados por la activación de una reacción en cadena (Ramos *et al.*, 2006).

De forma natural los organismos crean los RL en cantidades “fisiológicas” los cuales son atacados por los agentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que se encuentran tanto dentro como fuera de la célula. Si la cantidad de RL se eleva o disminuye la capacidad de los antioxidantes ocurre el desequilibrio homeostático que conlleva al deterioro celular y tisular de órganos y sistemas de órganos (Tiskow, 2006).

2.3.1 Antioxidantes

Un antioxidante es una estructura molecular capaz de prevenir y/o evitar la oxidación de otras moléculas, bien por interacción y estabilización de especies reactivas, bien por la transformación de éstas a configuraciones más estables y de reactividad reducida.

Los antioxidantes pueden clasificarse en tres grupos dependiendo de su función.

- I. Grupo enzimático: evita la formación de RL (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), proteínas de unión a metales (GR).
- II. Grupo no enzimático: Vitaminas C, E, ácido úrico, bilirrubina y albúmina, carotenoides y ubiquinonas.
- III. Grupo de reparación a moléculas dañadas: proteasas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Céspedes y Sánchez, 2000).

En los últimos años se propone una relación entre la presencia de EO y los pacientes con diabetes debido a la formación excesiva de EROs contribuyendo a las complicaciones angiopáticas de la enfermedad (Romay, 1996). Se ha demostrado que las hiperglucemias favorecen este estado debido a que la autooxidación de la glucosa da lugar a alfa-cetoaldehído, peróxido de hidrógeno y radical superóxido entre otras EROs, aumenta los procesos de glicosilación y oxidación de lípidos y proteínas de membrana formándose productos como los AGE (Clapés *et al.*, 2001) (Fig. 3). La glicosilación no enzimática de las proteínas de larga duración de los tejidos, especialmente de la HbA1c la cual origina productos finales de glicosilación avanzada (PFGA) cuya acumulación favorece la formación de las EROs (Oré *et al.*, 2000).

Está probado que las hiperglucemias debilitan las barreras antioxidantes favoreciendo a los RL y su acción negativa en moléculas intra y extracelulares y proteínas estructurales. Disminuyen la presencia de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Cruz y Licea, 2010).

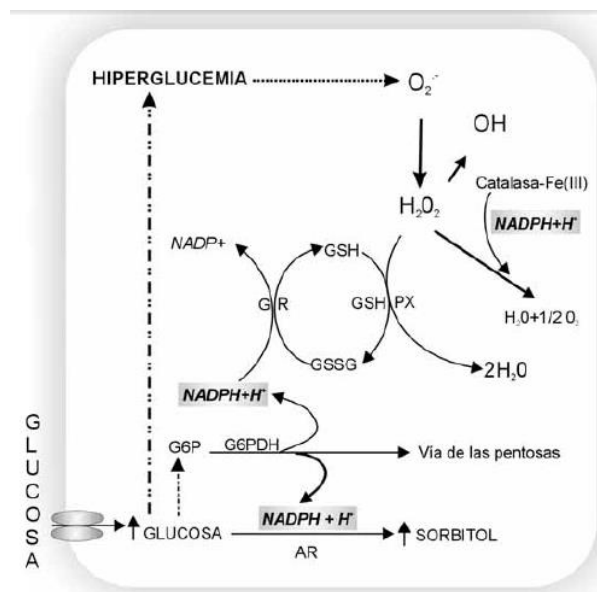


Figura 3 Formación de especies reactivas de oxígeno favorecidos por la hiperglucemia y disminución de los mecanismos antioxidantes por falta de NADPH ($NADPH + H^+$) (Díaz et al., 2004).

El incremento de EO en diabéticos puede tener un origen multifactorial y vincularse con anomalías metabólicas contribuyendo a las complicaciones de la enfermedad. Está probado que el aumento de los polimorfonucleares de diabéticos incrementan la cantidad de RL predisponiendo a los pacientes a procesos inflamatorios (García *et al.*, 2002).

La producción de EROs se eleva tanto en la DMI como en la DMII y en modelos experimentales, incluso antes que se evidencien las complicaciones diabéticas, sugiriendo que tanto la enfermedad como sus complicaciones y la resistencia a la insulina se asocian al EO. En la resistencia a la insulina interfiere en las vías de señalización inducida por esta hormona evitando que el transportador de glucosa GLUT-4 se trasloque a la membrana plasmática (Díaz *et al.*, 2004).

3. Materiales y Métodos

En el periodo comprendido entre diciembre del 2014 y diciembre del 2015 se llevó a cabo en la Unidad de Investigaciones Biomédicas (UNIB) de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara un estudio experimental en ratas de la línea Wistar basado en un modelo biológico de diabetes moderada, producido por inducción química en la etapa neonatal.

3.1 Animales y diseño experimental

En la investigación se utilizaron animales de ambos sexos aptos para la reproducción del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio de La Habana (CENPALAB), Cuba, con su certificado de salud (Fig 4).

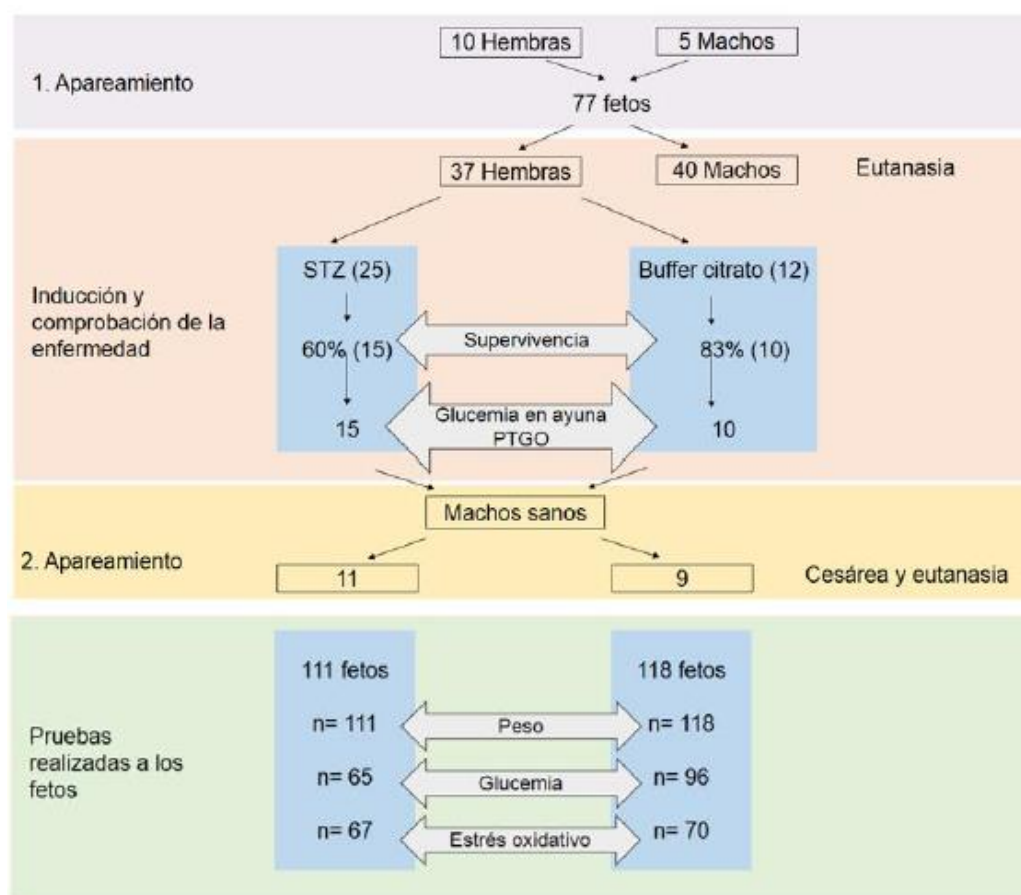


Figura 4 Diseño experimental. Criterios de inclusión y exclusión de las ratas madre y sus fetos.

Durante la experiencia todos los animales fueron alimentados a libre demanda con dieta completa concentrada para la alimentación de rata convencional todo propósito, fórmula CMO 1000, y con

libre acceso a agua. En la estación experimental se mantuvieron condiciones controladas de temperatura (19-25°C), humedad relativa (45-65%) y luz (ciclos 12h luz/oscuridad). Los animales fueron alojados en cajas de policarbonato cubierto con una cama de viruta de madera previamente esterilizada.

Los animales provenientes del CENPALB se cruzaron en proporción de 3 ratas hembras con un macho, realizando diariamente controles del contenido vaginal mediante visualización al microscopio. Las hembras con embarazo confirmado (se considera embarazo positivo cuando entre las 7 y 8 am se visualizan espermatozoides en el frotis vaginal) fueron trasladadas a cajas independientes en el área de gestación. Los machos fueron sacrificados por el método de dislocación cervical luego de ser previamente anestesiados.

3.1.1 Inoculación y comprobación de la enfermedad

Luego del parto, las crías fueron sexadas, seleccionando a las hembras para el estudio y sacrificando los machos. Se conformaron dos grupos de forma aleatoria: grupo control (GC) y grupo diabético (GD).

A los dos días de nacidas se realizó la inducción de la diabetes moderada a través de la inoculación subcutánea de 100 mg/kg de peso corporal (pc) de STZ (Aplichem) disuelta en buffer citrato 0,1 M, pH 4,5. La preparación de la STZ se realizó a través del método descrito por Akbarzadeh *et al.* (2007). Las ratas neonatas que formaron el GC fueron manipuladas similarmente recibiendo sólo buffer citrato sódico.

Las crías permanecieron con sus madres, en un número no mayor de 8 neonatas, durante el periodo de lactancia (21 días). Al final de este tiempo las crías fueron destetadas y mantenidas en el área experimental bajo condiciones controladas.

A los 90 días de edad estos animales son consideradas ratas adultas con un peso que oscila entre los 180-200 gramos. En esta fecha se realizaron determinaciones de los niveles de glucosa en sangre (glucosa oxidasa) con Glucómetro y Biosensores SUMA para confirmar la inducción de la enfermedad. Luego de ayuno de 12 horas se extrajeron muestras de sangre de la cola del animal. De igual forma se realizaron PTGO luego de administrar por vía oral una sobrecarga de glucosa (dextrosa monohidratada) de 2 g/kg de pc. Las mediciones se realizaron en ayuno, 30, 60 y 120 minutos luego de la sobrecarga. Las ratas que presentaron glucemias por encima de 6,1mg/dl en ayuno y/o PTGO alterada se consideraron diabéticas. Los animales que no cumplieron estos criterios se desecharon del experimento quedando conformado un GD de 15 ratas y un GC de 10 ratas.

3.1.2 Apareamiento y gestación

Una vez confirmada la enfermedad en el grupo diabético, las ratas de ambos grupos fueron apareadas con machos sanos en proporción de 3 hembras por 1 macho. La mañana en que se observaron espermatozoides en el frotis vaginal se designó como día 0 de gestación. El tiempo de apareamiento comprendió 15 días consecutivos, lo que corresponde aproximadamente tres ciclos estrales con el fin de garantizar la preñez de las ratas. Las que no resultaron preñadas fueron consideradas infértiles y excluidas del estudio.

$$\text{Índice de fertilidad} = \frac{\text{Número de ratas con frotis vaginal positivo}}{\text{Número de ratas apareadas}} \times 100$$

Las ratas preñadas fueron ubicadas en las cajas independientes, bien identificadas y durante los 20 días de gestación se realizaron una serie de mediciones y pruebas bioquímicas.

3.2 Pruebas bioquímicas realizadas durante la gestación

En las mañanas de los días 0, 7, 14 y 20 las ratas fueron pesadas (Balanza digital YAMATO con sensibilidad 0,01 g) y se determinó los niveles de glucosa en sangre por los métodos antes descritos.

El día 7 de gestación se realizó la PTGO (con dextrosa monohidratada, 2 g/kg de pc, en 4 ml de agua destilada a través de sonda esofágica) (de Mello *et al.*, 2001, Kiss, 2012), a las ratas, determinándose los niveles glucémicos en ayunas, a los 30, 60 y 120 minutos luego de la administración de dextrosa a partir de una gota de sangre de la punta de la cola del animal.

El día 14 de gestación se realizó la Prueba de Tolerancia a la Insulina (PTI) (de Mello *et al.*, 2001, Kiss, 2012) en condiciones de no ayuno. Se les inyectó una solución de insulina rápida (NovoRapid FlexPen-100 U/ml) por vía subcutánea en la región dorsal de la rata; a una dosis de 1 U/100g de pc, y se determinaron los niveles glucémicos a tiempo 0 y 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección de insulina, a partir de una gota de sangre de la punta de la cola del animal.

3.2.1 Sacrificio y recogida de muestras

El día 20 de gestación como corresponde al diseño experimental, los animales de ambos grupos fueron pesados y determinados los niveles de glucosa en sangre. Las ratas fueron anestesiadas con tiopental sódico (50-60 mg/kg) y se practicó la cesárea extrayendo los cuernos uterinos. Bajo los efectos de la anestesia fueron colocados en una tabla operatoria en decúbito supino. Mediante una laparotomía xifopubiana en la línea media abdominal se expusieron ambos cuernos uterinos (Fig. 5) posteriormente fueron extraídos y colocados en una placa de Petri con solución salina fisiológica. Ambos cuernos se dividieron extirpándoles la grasa y el tejido periuterino para su posterior análisis.

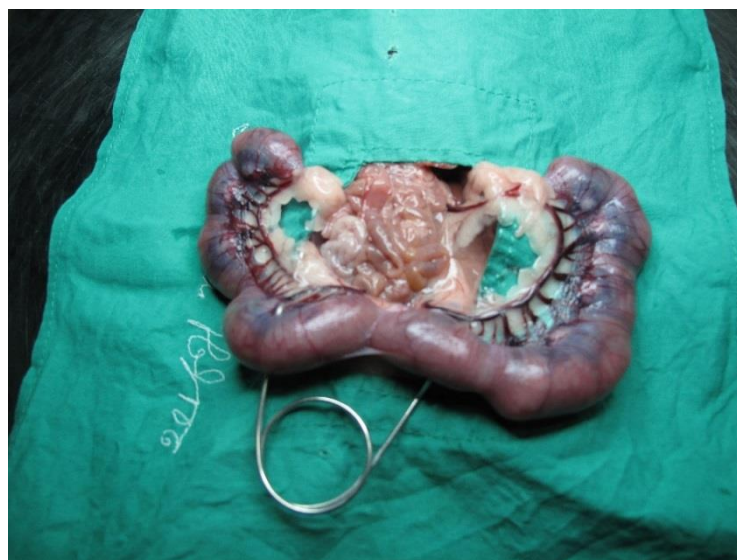


Figura 5 Cuernos uterinos de una ratona Wistar a los 20 días de gestación.

Posteriormente se realizó la eutanasia por exanguineación a través de una punción intracardiaca empleando jeringuillas plásticas de 10 ml. La sangre fue colectada en tubos secos y con anticoagulante (EDTA 0.1 ml/ml de sangre) (Béquer *et al.*, 2014).

Se extrajo además el hígado para estudios de EO. Un fragmento de 500 mg fue homogeneizado en frío (100 mg/ml de buffer fosfato 100 mM pH 7.8 y 0.1 mM de EDTA, en homogeneizador eléctrico HEIDOLPH a 30 000 rpm durante 1,5 min), y congelado en nitrógeno líquido garantizando la ruptura de prácticamente la totalidad de las células. El homogeneizado fue centrifugado a 4 °C por 20 min a 4400 rpm; el precipitado fue despreciado y el sobrenadante colectado y congelado a una temperatura de -40°C.

Fueron tomadas 20 µl de sangre total para la determinación de hemoglobina glicosilada (Hb A1c). Las muestras de suero y plasma (separados por centrifugación a 4°C en centrífuga Eppendorf con cabezal de ángulo de 45°) fueron distribuidas en alícuotas y almacenadas a -40°C hasta el momento

de realizar las determinaciones de la concentración de insulina, a partir del suero; y del resto de los indicadores metabólicos y de EO, a partir del plasma.

3.2.2 Pruebas metabólicas realizadas a los fetos

A continuación de separados los cuernos uterinos se extrajeron los fetos y placentas que fueron pesados y analizados individualmente (Fig. 6) Un estímulo táctil fue aplicado a cada feto para comprobar su viabilidad. Cada feto se examinó para determinar su sexo por la distancia ano-genital (en el macho es aproximadamente el doble que en la hembra). Se comprobó la glucemia a través de la extracción de sangre de la vena aorta con una lanceta.



Figura 6 Feto y placenta de una rata Wistar a los 20 días de gestación.

La placenta (400mg) e hígado (200mg) de estos mismos fetos se utilizaron para la evaluación de marcadores de daño oxidativo en homogeneizado de tejidos según el procedimiento de homogenización explicado anteriormente.

3.2.3 Indicadores metabólicos

- Glucosa sanguínea: se determinaron los niveles de glucosa por el método glucosa oxidasa (con Glucómetro SUMA).
- Hemoglobina A1C: se cuantificó la hemoglobina A1C por el método de aglutinación (Juego de reactivos CPM Scientifica Technologie Biomediche, en Analizador de Química Clínica Hitachi 902).

- Insulina: se determinó la concentración de insulina en suero mediante ensayo inmunoradiométrico (IRMA) (Juego de reactivos Insulina IRMA kit RK-400CT, en Radiómetro SRN1C-02).

- Estimación de la resistencia insulínica y la función de la célula β a través del Modelo de determinación de homeostasis HOMA (por Homeostasis Model Assessment) propuesto por Mathews *et al.* (1985) en humanos y validado por Cacho *et al.* (2008) en ratas de diferentes especies.

$$\text{Función de las Células } \beta \text{ HOMA Células } \beta = \frac{20 * \text{Insulina en aAyuno } \left(\frac{\mu U}{ml}\right)}{\text{Glucosa en Ayuno (mM)} - 3,5}$$

$$\text{Insulino - Resistencia HOMA - IR} = \frac{\text{Insulina en ayuno } \left(\frac{\mu U}{ml}\right) * \text{Glucosa en Ayuno (mM)}}{22,5}$$

3.2.4 Indicadores de química clínica

Se cuantificaron en plasma por técnicas enzimáticas los niveles de colesterol; triglicéridos; urea; creatinina; ácido úrico; TGP; TGO (Juego de reactivos HELFA Diagnóstico, QUIMEFA Epb. Carlos J. Finlay, CUBA); y VLDL. Todas estas determinaciones se realizaron en Analizador de Química Clínica Hitachi 902.

3.2.5 Indicadores de estrés oxidativo

Las determinaciones de EO se realizaron en hígado materno, fetal y en placenta por técnicas espectrofotométricas (T60 UV-visible).

- Cuantificación del contenido del antioxidante glutatión reducido (GSH).

La determinación de GSH se realizó según el método descrito por Beutler (1986)

- Cuantificación de malonildialdehído (MDA) como índice de daño a lípidos.

La determinación de MDA se realizó según el método descrito por Esterbauer y Cheeseman (1990) donde a 300 μ l de muestra, obtenida mediante el procedimiento descrito en el acápite 3.2.1, se le añadió 15 μ l de Hidroxitolueno-butilado (BHT) 0,5 M (0,551g de BHT disueltos en 5ml de acetonitrilo) y 975 μ l de la solución de N-metil 2-fenil Indol 10,3 mM (38.42 mg de reactivo en 18 ml de acetonitrilo). Se agitó fuertemente en vibroagitador. Después se añadió 225 μ l de HCL al 37% y se mezcló fuertemente en vibroagitador. Se encubó a 45 °C durante una hora. Las muestras se enfriaron en hielo por 10 minutos y se leyó la absorbancia inmediatamente en un espectrofotómetro (T60 UV-visible) a 586 nm. La concentración de MDA se obtuvo a través de la fórmula:

$$MDA = \frac{A - A_0}{\varepsilon}$$

Dónde: A = Absorbancia de la muestra A_0 = Absorbancia del Blanco reactivo y ε = Coeficiente de extinción molar aparente (pendiente de la curva de calibración). Cada determinación se realizó por triplicado.

- Cuantificación de productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP) como medida de daño oxidativo a proteínas.

La determinación de PAOP se realizó según el método descrito por Matteuci *et al.* (2001), donde a 100 μ l de la muestra, obtenida mediante el procedimiento descrito el acápite 3.2.1, se le añadió 900 μ l de solución Buffer de fosfato 10 mM; pH 7.4 a 100 μ . Luego se añadieron 50 μ de solución de yoduro de potasio (1.92 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua destilada). Después se adicionaron 100 μ l de ácido acético glacial, se agitó fuertemente en un vibroagitador y se leyó la absorbancia inmediatamente en un espectrofotómetro (T60 UV-visible) a 340 nm. La concentración de PAOP se calculó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón cloramina, en un rango de concentración entre 15,6 y 500 μ M. Los valores se expresan en unidades de μ mol/l de cloramina. Cada determinación se realizó por triplicado.

3.3 Aspectos éticos en el tratamiento de los animales

Los animales fueron obtenidos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). La investigación fue aprobada por el Consejo Científico y el Comité de Ética de la Unidad de Investigaciones Biomédicas en la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.

Fueron tratados según recomienda la guía del *National Institutes of Health* para el trabajo con animales de experimentación. Durante los experimentos se siguieron todas las normas que se requieren para tratar de forma compasiva los animales que se usaron para la experimentación, empleando la menor cantidad de ellos posible y provocando el menor sufrimiento para el animal. Los restos fueron eliminados en crematorio de la institución de acuerdo a las normas de bioseguridad establecidas.

3.4 Análisis estadístico

Los datos fueron procesados con el paquete estadístico SPSS para Windows Versión 18. Para la comparación de los resultados obtenidos en el estudio se realizaron pruebas de normalidad por la prueba de Shapiro Wilk y acorde a los resultados se llevaron a cabo pruebas no paramétricas (U de

Mann Whitney). Las diferencias se consideraron significativas con valores de p menores que 0,05. Los datos aparecen reportados como valores de la media \pm error estándar de la media.

4. Resultados

4.1 Animales y diseño experimental

4.1.1 Inoculación y comprobación de la enfermedad

La confirmación de la enfermedad a través de la PTGO en el día 90 después del nacimiento reveló niveles significativamente superiores de glucemia de las ratas inoculadas con STZ con respecto al control en el ayuno y los 30, 60 y 120 minutos después de la sobrecarga de glucosa (Fig. 7).

a)

Niveles de glucemia en ayuno	
<i>Grupo control</i>	5,15 ± 0,18
<i>Grupo diabético</i>	7,03 ± 0,35

b)

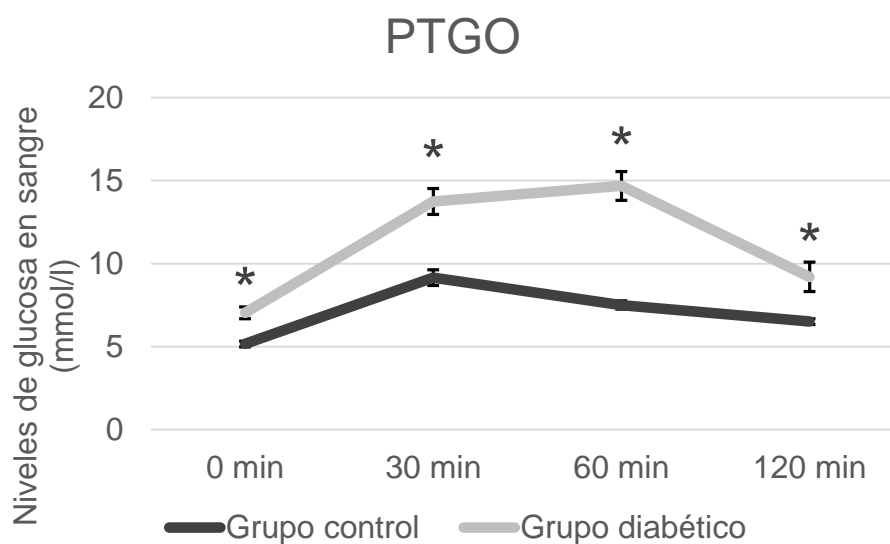


Figura 7 Niveles de glucemia en ayuno (a) y Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO) (b) en los grupos de estudio. Media ± EEM (* $p < 0,05$ Mann Whitney).

4.1.2 Apareamiento y gestación

Luego del periodo de apareamiento únicamente 11 ratas diabéticas y 9 sanas presentaron frotis vaginal positivo (presencia de espermatozoides). El resto de las ratas se consideraron infértiles y fueron excluidas del experimento. El índice de fertilidad fue de 73% en el grupo diabético y 90 % en el grupo control.

4.2 Pruebas bioquímicas realizadas durante la gestación

Durante la gestación se observó un incremento del peso corporal en ambos grupos. Sin embargo, la ganancia de peso materna en el grupo diabético (94,18 g \pm 7,064) fue significativamente menor ($P < 0,05$ o $P = 0,012$) que en el grupo control (121,03 g \pm 5,162).

En la (Fig. 8) se muestran los niveles de glucemia semanales medidos durante el embarazo. En los días 0 y 7 de gestación se observan hiperglucemias en las ratas diabéticas, no obstante, las determinaciones en los días 14 y 20 muestran resultados similares en ambos grupos de estudio.

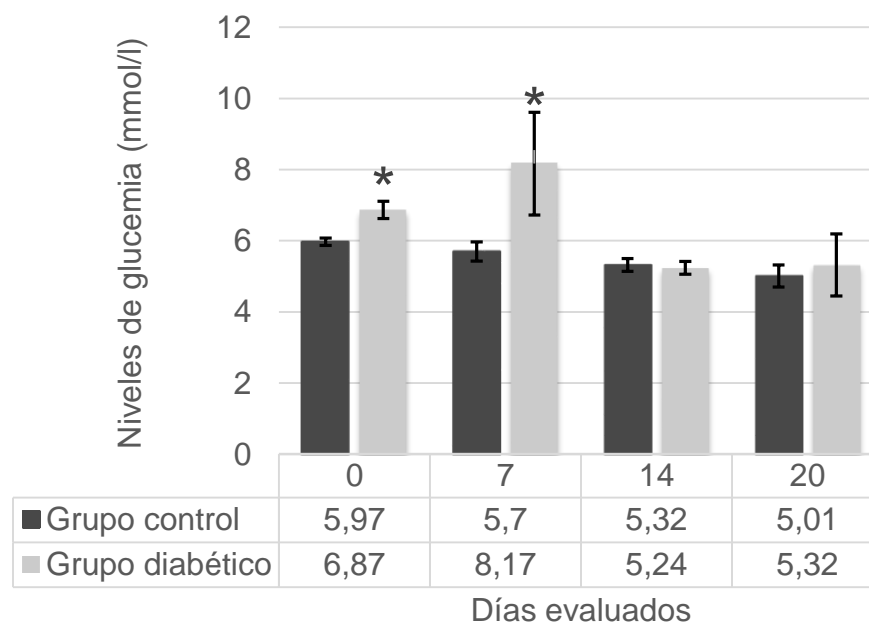


Figura 8 Niveles de glucemia durante el embarazo. Media \pm EEM (* $p < 0,05$ Mann Whitney)

La (Fig. 9) muestra los resultados de la PTGO y PTI a los 7 y 14 días respectivamente. Los animales diabéticos muestran una tolerancia alterada al exceso de glucosa oral a los 30 y 60 minutos respecto a los controles. El grupo diabético presenta una respuesta más marcada a la acción de la insulina

externa que se evidenció por las diferencias significativas entre ambos grupos en los tiempos 0, 30 y 60 minutos.

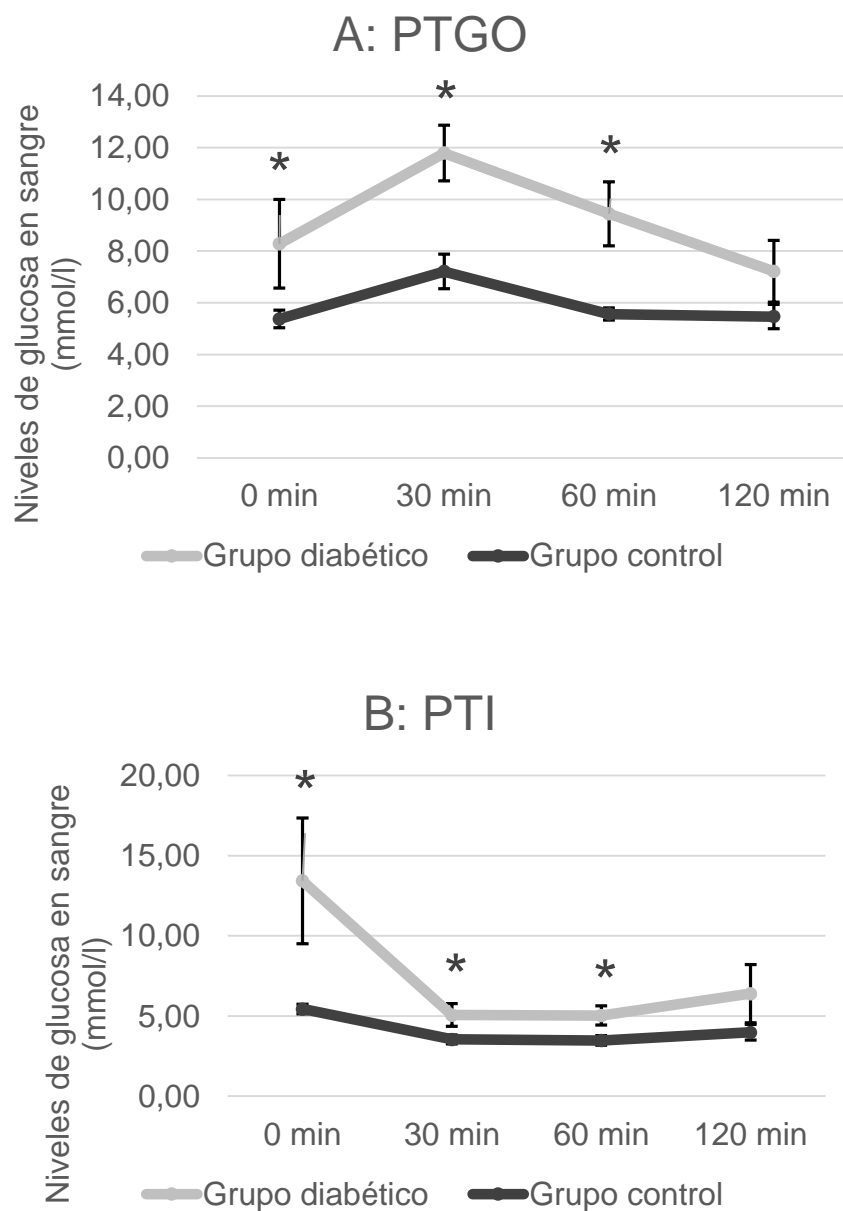
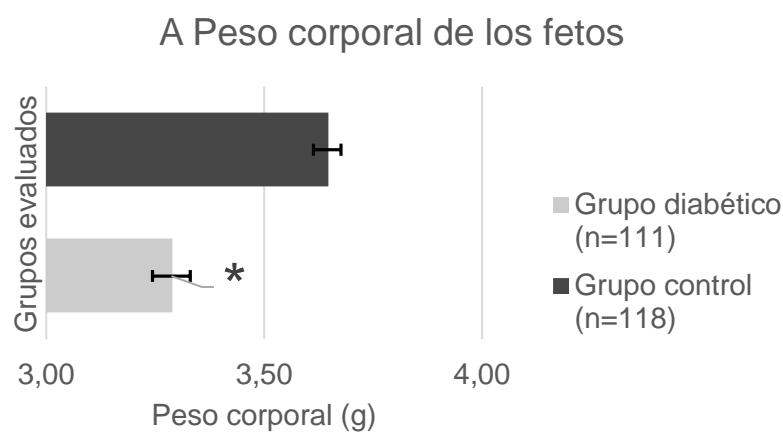


Figura 9 Niveles de glucosa en sangre en (A) Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO) y (B) Prueba de Tolerancia a la Insulina (PTI) en los días 7 y 14 de gestación respectivamente. Media \pm EEM (* $p < 0,05$ Mann Whitney).

4.2.1 Sacrificio y recogida de muestra

4.2.2 Pruebas metabólicas realizadas a los fetos

Las pruebas realizadas a los fetos mostraron diferencias significativamente inferiores en el peso de los fetos de madres diabéticas con respecto a las madres sanas sin embargo las glucemias fueron similares en ambos grupos (Fig. 10).



B Glucemias (mmol/l) de los fetos	
Grupo diabético (n=65)	8,08 ± 0,42
Grupo control (n=96)	7,53 ± 0,34

Figura 10 Valores de peso corporal (A) y glucemias (B) determinadas en los fetos luego de la cesárea. Media ± EEM (* $p < 0,05$ Mann Whitney).

4.2.3 Indicadores metabólicos

En la Tabla I se observan los resultados de los parámetros metabólicos determinados en ambos grupos. Los valores de HOMA no presentan modificaciones en los animales diabéticos respecto a los sanos. La HbA1c está significativamente aumentada en las ratas diabéticas.

Tabla I Niveles promedio de los indicadores metabólicos evaluados en los grupos de experimentación.

	Grupo control (n=9)	Grupo diabético (n=11)
<i>Insulina ($\mu\text{U/ml}$)</i>	12,24 \pm 0,92	10,74 \pm 0,76
<i>Glucemia (mmol/l)</i>	4,90 \pm 0,27	5,27 \pm 0,63
<i>HOMA-IR</i>	2,73 \pm 0,30	2,62 \pm 0,51
<i>HOMA-células β</i>	176,50 \pm 23,60	155,68 \pm 24,32
<i>Hemoglobina glicosilada (g/dl)</i>	3,37 \pm 0,17	4,82 \pm 0,58*

Los valores se expresan como la media \pm EEM.

* $p < 0,05$ comparado con el grupo control (Mann Whitney)

4.2.4 Indicadores de química clínica

Los parámetros bioquímicos determinados en suero se presentan en la Tabla II. Las concentraciones de colesterol, triglicéridos, VLDL y TGO están significativamente aumentados en el grupo diabético.

Tabla II Parámetros bioquímicos determinados en suero de los grupos de experimentación.

Variables metabólicas		Grupos	
		GC (n=9)	GD (n=11)
Perfil lipídico	<i>Colesterol (mmol/l)</i>	1,91 ± 0,14	2,42 ± 0,08*
	<i>Triglicéridos (mmol/l)</i>	1,47 ± 0,19	2,39 ± 0,35*
	<i>VLDL (mmol/l)</i>	0,67 ± 0,09	1,09 ± 0,16*
Perfil renal	<i>Creatinina (μmol/l)</i>	27,63 ± 2,25	27,25 ± 2,15
Perfil hepático	<i>TGP (U/l)</i>	46,62 ± 6,85	63,75 ± 15,03
	<i>TGO (U/l)</i>	72,27 ± 7,54	87,67 ± 10,34*

Los valores se expresan como la media ± EEM.

* $p < 0,05$ del grupo tratado con STZ comparado con el grupo control (Mann Whitney)

4.2.5 Indicadores de estrés oxidativo

La determinación de glutatión (GSH) como parámetro para evaluar las defensas antioxidantes de la madre, el feto y la placenta solo mostraron diferencias significativamente inferiores en la placenta del grupo diabético con respecto al grupo control (Fig. 11).

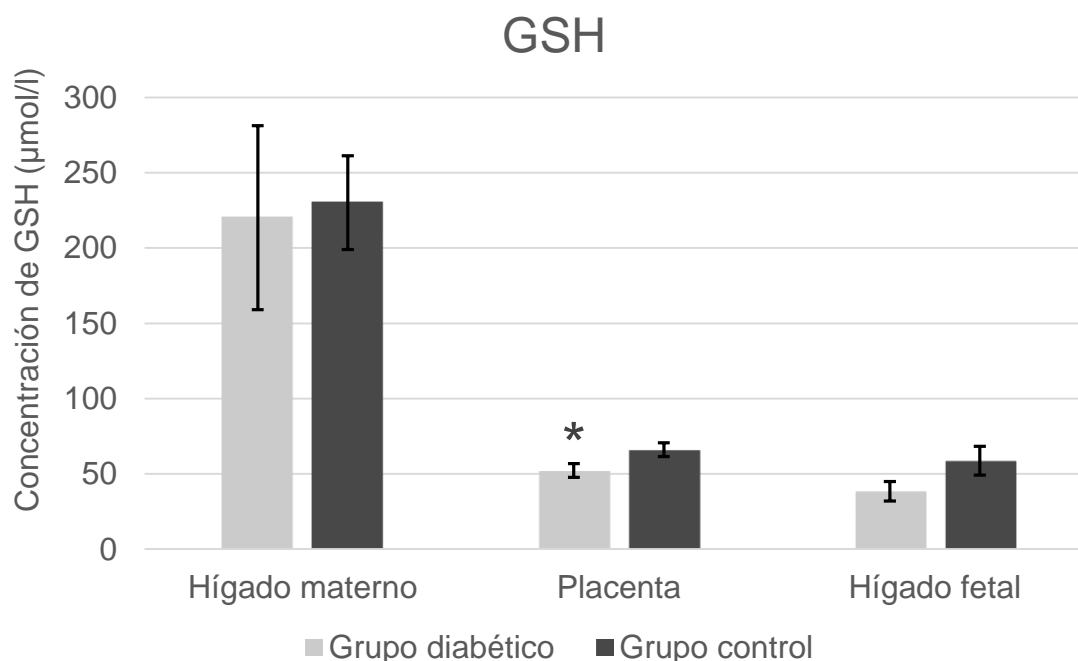


Figura 11 Indicador de las barreras antioxidantes. Concentración de glutatión (GSH) en homogenado de hígado materno, fetal y en placenta. Media \pm EEM (* $p < 0,05$ Mann Whitney)

Los resultados del estudio de los marcadores de daño oxidativo a biomoléculas (Fig. 12) realizado en hígado materno, fetal y en la placenta mostraron niveles inferiores en el PAOP de la placenta del grupo diabético con respecto al control. Los valores de MDA del grupo diabético fueron superiores con respecto al grupo control aunque no significativos. Los resultados tanto en el hígado materno como en el fetal oscilaron en concentraciones similares.

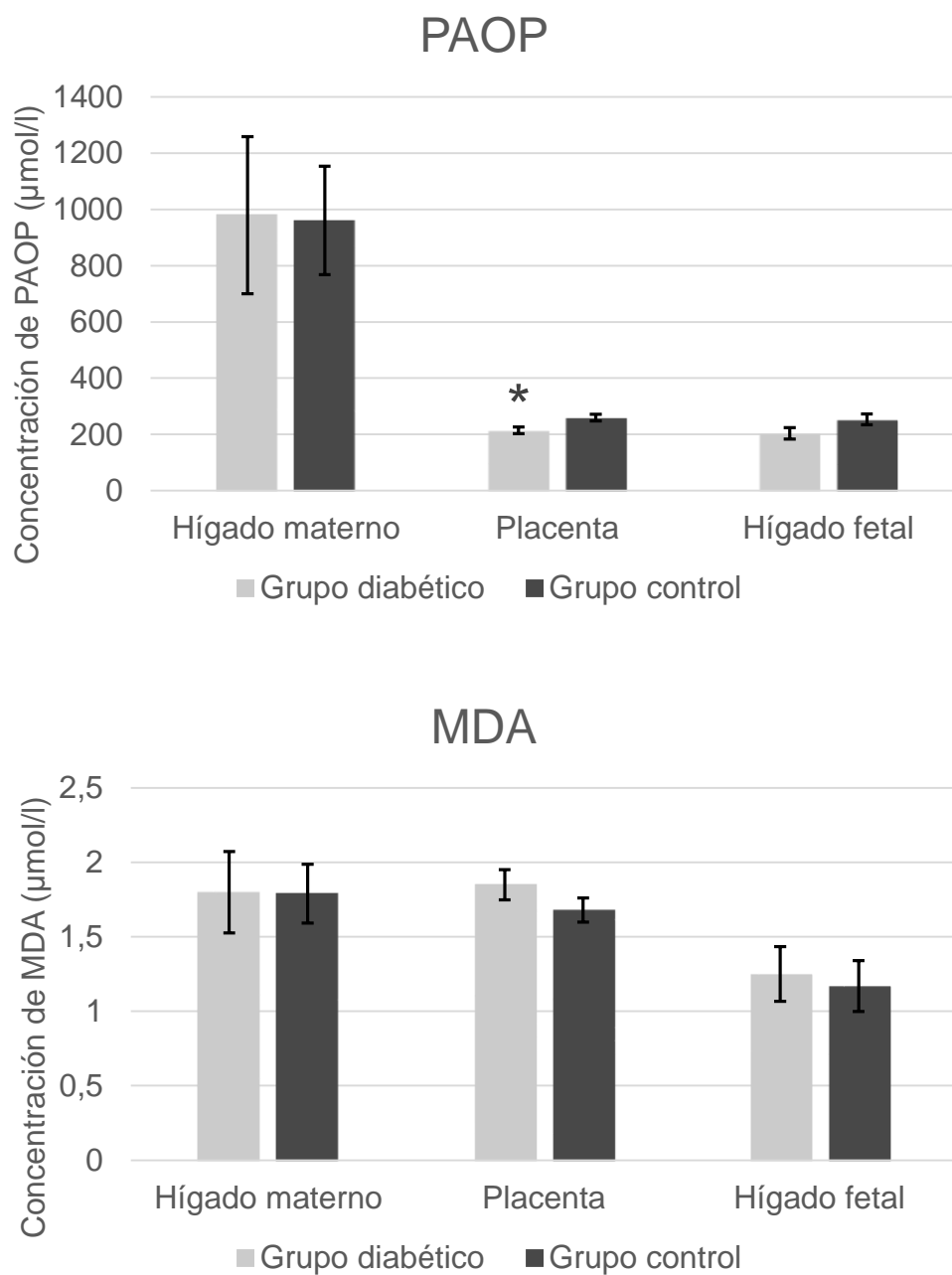


Figura 12 Indicadores de estrés oxidativo. Concentración de productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP) y malonildialdehído (MDA) en homogenado de hígado materno, fetal y en placenta. Media \pm EEM (* $p < 0,05$ Mann Whitney).

5. Discusión

5.1 Animales y diseño experimental

5.1.1 Inoculación y comprobación de la enfermedad

Entre los diferentes químicos que existen para inducir diabetes en animales de experimentación, la STZ es el preferido por la mayoría de los investigadores. Las alteraciones estructurales, funcionales y bioquímicas observadas en la diabetes inducida son similares a los que se evidencian en la diabetes en humanos (Goyal *et al.*, 2016).

La STZ fue aislado por primera vez de un microorganismo de la tierra *Streptomyces achromogenes* mostrando un ancho espectro de actividad antibiótica (Srinivasan y Ramarao, 2007, Etuk, 2010). Químicamente está formado por glucosa y un fragmento activo de nitrosurea nombrado por la IUPAC como 2-deoxy-D-glucosa derivado de N-metil-N-nitrosurea (Goyal *et al.*, 2016). Es un agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucoquinasa induciendo además varios puntos de ruptura en la doble hélice del ADN. La porción de glucosa posibilita la entrada de toda la estructura a la célula mediante el transportador de glucosa GLUT-2, una vez dentro, el fragmento de nitrosurea es liberado y comienza su acción tóxica. Se supone que el mecanismo de acción de la STZ es a través de la reducción del nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), esto lleva a la generación de EROs (Ch₃, O₂, H₂O₂ y OH) y provoca daño en el ADN, su reparación es por los procesos de escisión evitando la activación de la enzima PARP que se sintetiza a través del NAD. El daño generalizado del ADN provoca el agotamiento del ATP que permite la formación del NAD y por tanto el daño a las células β pancreáticas (Arias y Balibrea, 2007, Saini *et al.*, 2013).

Se han desarrollado diferentes modelos experimentales de DM por STZ en ratas con el objetivo de simular, de la mejor manera posible, lo que ocurre en el organismo humano. Para la DMI severa la STZ es administrada (40-60 mg/kg) vía intravenosa durante la vida adulta del animal, presentando durante la adultez glucemias superiores a los 300 mg/dl. La DMII y DG se logra por la administración de dosis diferentes de STZ en el periodo neonatal, antes del apareamiento o durante el embarazo. Las glucemias descritas para este modelo oscilan entre 110 mg/dl y 300 mg/dl, nombrado en la literatura como diabetes moderada (Kiss *et al.*, 2009, Béquer *et al.*, 2014).

La diferencia en el momento de administración del fármaco y los valores de la glucemia se explica porque en la adultez el animal pierde la capacidad regeneradora del páncreas provocando las altas

glucemias mientras que los neonatos sufren una destrucción y restablecimiento parcial del mismo, conservando así parte de su función (Inhasz *et al.*, 2013).

En este trabajo, debido a la forma y el tiempo de administración de la STZ, todos los animales tratados presentaron glucemias superiores a 6,1mmol/l (110 mg/dl) a los 90 días de nacidos; considerándose un modelo de diabetes moderada.

Otros grupos de investigación con el mismo fin han desarrollado modelos similares con diferencias en el día de inoculación, la vía de administración y la dosis del fármaco.

Sinzato *et al.* (2009) obtienen en su estudio incrementos en la glucemia alrededor del tercer y cuarto mes de vida con diferencias significativas con respecto al grupo control. A diferencia de este trabajo los neonatos fueron inoculados con STZ al quinto día de nacidos.

En un estudio presentado por Inhasz *et al.* (2013) donde los neonatos son inoculados con STZ el primer día de nacidos, son evaluadas las glucemias a los 35, 84 y 120 días de vida obteniendo como resultado un grupo tratado con STZ con glucemias entre 120 y 300 mg/dl y otro grupo tratado con STZ con valores inferiores a los 120 mg/dl.

Komolafe *et al.* (2009) registran en su estudio incrementos en la glucemia con diferencias significativas al igual que en el presente trabajo, la divergencia consiste en que la inducción de la enfermedad fue diferente. Los neonatos fueron administrados con dosis pequeñas (40 mg/kg) de STZ durante cinco días consecutivos por vía intraperitoneal.

5.1.2 Apareamiento y gestación

En este trabajo fueron apareadas las ratas adultas diabéticas y control con machos sanos obteniendo un 73% y 90% de fertilidad respectivamente.

En el estudio realizado por Kiss *et al.* (2009) solo 6 de las 20 ratas iniciales fueron declaradas preñadas con diabetes moderada según los criterios previamente establecidos (120 a 300 mg/dl). La inducción de la enfermedad fue realizada el 5to día de vida. Estas evidencias indican que la infertilidad de las ratas no sólo puede relacionarse con la enfermedad de la DM sino la integridad de cada organismo.

5.2 Pruebas bioquímicas realizadas durante la gestación

5.2.1 Sacrificio y recogida de muestras

La fisiología metabólica maternal durante el embarazo, sobre todo en el tercer trimestre, está influenciada principalmente por las hormonas de la placenta. Estas hormonas afectan el metabolismo de la glucosa y lípidos con el fin de proporcionarle al feto un amplio suministro de nutriente en todo momento. El metabolismo de los carbohidratos y aminoácidos se dirige al abastecimiento del feto proporcionando ácidos grasos libres y glicerol extra como fuente de combustible maternal.

Estos cambios fisiológicos durante el embarazo normal incluyen en el aumento de la secreción de insulina y la resistencia insulínica progresiva. El resultado son hiperglucemias moderadas después de comidas debido al aumento de la resistencia a la insulina e hipoglucemias transitorias entre las comidas. Estos estados apoyan la demanda creciente del feto sin embargo puede convertirse en una patología cuando la función pancreática de la mujer no es suficiente para superar este nuevo estado metabólico (Facco, 2013).

La DG definida como una fase de intolerancia a la glucosa que comienza o se reconoce durante el embarazo origina casi paralelamente un estado de resistencia insulínica. Este lleva a niveles altos de glucosa y ácidos grasos libres contraponiéndose al aumento en la secreción de insulina maternal (Doshani y Konje, 2009).

Durante la gestación de las ratas (21 días) fueron realizadas varias pruebas para comprobar el metabolismo de la glucosa. La glucemia se evaluó los días 0, 7, 14 y 20 obteniéndose valores significativamente superiores en las ratas diabéticas con respecto al control los días 0 y 7.

El resultado del estudio presentado por Machado *et al.* (2014) y Sinzato *et al.* (2009) donde realizan un control de glucemias en ratas preñadas los mismos días que este trabajo (0, 7, 14 y 21) muestran diferencias los días 0 y 14 desigual al obtenido en este trabajo.

Iessi *et al.* (2010) en un modelo animal de diabetes y embarazo similar al presente estudio obtienen valores de glucemias significativamente diferente los tratados con STZ con respecto al grupo control los días 0 y 14 de gestación.

El experimento llevado a cabo por Saito *et al.* (2010) en la primera etapa (administración de STZ vía subcutánea y apareamiento) fue similar al presente evaluando los niveles de glucemias en sangre los días 0, 7, 14 y 21 de gestación y encontrándose diferencias significativas con respecto al grupo

control el día 14. Este valor puede verse influenciado porque el día 7 de gestación aquellos animales con valores en las glucemias inferiores a los 120 mg/dl recibió otra dosis (20 mg/kg) de STZ vía intraperitoneal.

Según la ADA se recomienda a las mujeres embarazadas entre las semanas 24 y 28 realizar la prueba de tolerancia oral a la glucosa con 75 g. Siendo diagnóstico de DG cualquiera de los siguientes valores:

- Ayunas \geq 92 mg/dl.
- 1 hora después: \geq 180 mg/dl.
- 2 horas después: \geq 153 mg/dl (American Diabetes Association, 2014)

La PTGO puede ser considerada uno de los test que mejor imita la ruta seguida por los carbohidratos. La ingestión de glucosa es seguida por el tracto intestinal y posteriormente en la circulación sistémica. El aumento de la concentración de glucosa en sangre estimula las células β pancreáticas a la liberación de insulina provocando la captación de glucosa por los tejidos periféricos. En roedores suele medirse los niveles de glucosa 30, 60 y 90 minutos posteriores a la ingestión de glucosa (Pacini *et al.*, 2013).

En el presente estudio se llevó a cabo la PTGO el día 7 de gestación midiendo la glucemia en ayuno (minuto 0) y a los 30, 60 y 120 minutos después de la sobrecarga de glucosa oral, obteniendo valores de tolerancia alterada a los 30 y 60 minutos en los animales enfermos con respecto a los sanos.

Sinzato *et al.* (2009) realizan esta prueba el día 17 de gestación obteniendo diferencias marcadas del grupo diabéticos con respecto al control en cada uno de los momentos evaluados. (30, 60 y 120 minutos). Las alteraciones descritas en la PTGO en los animales enfermos del equipo de Lessi *et al.* (2010) son similares al presente estudio y al reportado en las semanas 24-26 de gestación en la mujer.

Durante el estado diabético la elevación de la glucosa sanguínea no está acompañada por un aumento de la insulina suficiente, por este motivo la glucosa no es capaz de entrar a la célula y sus niveles en sangre continúan elevándose (Mora *et al.*, 2009). Con este principio se realiza la PTI para evaluar la diferencia en el metabolismo de la glucosa luego de una dosis externa de insulina tanto en animales diabéticos como en sanos.

En el presente estudio se evidenció una diferencia marcada del grupo diabético con respecto al control en cada minuto evaluado después de la administración de la insulina (30, 60 y 120 minutos)

Debido a las irregularidades del organismo para mantener un metabolismo estable de los carbohidratos y la incapacidad de obtener al máximo su energía éste intenta alcanzarla a partir de las grasas por su movilización a partir del tejido adiposo. Se plantea que este mecanismo puede ser una de las razones del posible adelgazamiento en la diabetes. Otro mecanismo para obtener energía puede ser la utilización de las proteínas, se asocia además a la excesiva diuresis característica en los cuadros diabéticos (Muro, 2014).

En el presente trabajo hubo un incremento de peso tanto en el grupo de ratas preñadas con diabetes como en el grupo control pero más marcado en este último.

Kiss *et al.* (2009) exponen en su trabajo resultados similares a este en la evaluación del peso en las ratas preñadas los días 0, 7, 14 y 21; encontrándose diferencias significativas inferiores de las ratas preñadas tratadas con STZ con respecto a las control en cada uno de los días.

En el caso del estudio presentado por Lessi *et al.* (2010) se obtienen resultados similares con respecto a la diferencia de peso de las ratas diabéticas preñadas con respecto al grupo control. Según estos autores esta diferencia de peso puede deberse a la acción de la STZ durante el periodo neonatal, con un daño temprano a las células β pancreáticas reduciendo la secreción de insulina, considerada como un factor de crecimiento, de esta forma se ve afectado el desarrollo perinatal. Otros autores relacionan ésta pérdida de peso con la hormona del crecimiento GH (del inglés growth hormone) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 IGF-1 (del inglés: insulin-like growth factor-1)

Mora *et al.* (2009) en su estudio probaron diferentes dosis de STZ en la adultez de ratas Wistar, en la evaluación del peso post-inoculación obtuvieron una disminución considerable del peso del animal diabético con respecto al grupo control; similares a este trabajo. Según este equipo la explicación a esta tendencia puede estar asociada con la pérdida de proteínas debido a la incapacidad de usar los carbohidratos como fuente de energía o asociada a la excesiva diuresis típica del cuadro diabético. A diferencia del presente trabajo las ratas no estaban preñadas.

5.2.2 Pruebas metabólicas realizadas a los fetos

En el presente trabajo se obtuvo un menor peso corporal en los fetos de las madres diabéticas con respecto a las sanas, este resultado se esperaba debido a la menor ganancia de peso de las ratas

enfermas con respecto a las sanas y a la experiencia del grupo de investigación de fetos pequeños en ratas enfermas.

Los resultados de las glucemias en los fetos sin diferencias relevantes para ambos grupo no se esperaban debido a los altos niveles de glucosa en sangre de las ratas inoculadas con STZ con respecto a los controles

5.2.3 Indicadores metabólicos

La vida media del eritrocito en humanos es de 90 a 120 días y alrededor de 45-50 días en la rata. Este dato, unido a las concentraciones de carbohidratos circulantes, da una medida del porcentaje de glicación de la hemoglobina. La HbA1c se forma constantemente por la adición de la glucosa al extremo amino terminal de la cadena β de la hemoglobina en un proceso no enzimático, reflejando además el tiempo de exposición de esta molécula a la glucosa. La HbA1c en sujetos diabéticos es más elevada que en sujetos sanos. Su determinación es usada para evaluar el control glucémico en pacientes diabéticos indicando sus niveles de glucosa en las 4-8 semanas anteriores (Figuroa *et al.*, 2013).

Los resultados expuestos en el trabajo de Figuroa *et al.* (2013) son similares al presente encontrándose diferencias significativas superiores en las ratas diabéticas con respecto al control. A diferencia de este estudio las ratas no se encontraban preñadas. Similares experimento y resultados obtuvo Gómez *et al.* (2014) en la determinación del % de HbA1c.

La inducción de la diabetes en la etapa neonatal con STZ provoca daño en las células β pancreáticas. En la adultez estas ratas pueden regenerar una porción del mismo pero presentando irregularidad en el control glucémico. La interpretación de los Índice HOMA-IR y HOMA- β demuestra que en los animales diabéticos existe un % de células β inferior al que necesita el organismo para mantener las glucemias en valores saludables (Gómez *et al.*, 2014). En el presente trabajo, a pesar de no encontrarse diferencias significativas en ninguno de los dos valores, se aprecia una discrepancia en los valores obtenidos.

5.2.4 Indicadores de química clínica

La resistencia insulínica propia del embarazo agudizada con una DG afecta el metabolismo de lípidos. La deficiencia en la secreción de esta hormona influye en la regulación de la Lipasa Hormona Sensible (LHS) del tejido adiposo así como en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (García, 2008).

Las modificaciones en el perfil lipídico que más se evidencian en la diabetes son:

- ✓ Colesterol total normal o alto, triglicéridos aumentados, LDL normal o levemente aumentada, HDL disminuida.
- ✓ Aumento de remanente de quilomicrones, VLDL y de IDL (Muro, 2014).

Figuroa *et al.* (2013) registran en su trabajo resultados similares al presente estudio con valores de triglicéridos y colesterol superiores en las ratas tratadas con STZ con respecto a los controles. La diferencia entre las investigaciones es que estas ratas no estaban preñadas. Sena *et al.* (2011) presentan en su estudio diferencias superiores en los valores de colesterol y VLDL de las ratas enfermas con respecto a las sanas. La diferencia consiste en la inducción de la enfermedad durante la juventud y que no estaban preñadas.

El experimento llevado a cabo por Damasceno *et al.* (2002) muestra elevados niveles de triglicéridos y colesterol del grupo diabético con respecto al control. Esta evaluación se realizó el día 21 de gestación. La explicación expuesta por este equipo es que debido a la deficiente secreción de insulina que active las enzimas lipasa, hidrolizando los triglicéridos guardados y liberando grandes cantidades de ácidos grasos y glicerol en sangre. Sinzato *et al.* (2009) a pesar de los valores superiores de triglicéridos y colesterol en las ratas tratadas con STZ no hubo diferencias significativas con el grupo control.

Recientes estudios afirman la idea que la insuficiencia renal es una patología común en pacientes diabéticos. Las concentraciones de urea y creatinina plasmática dan una idea del funcionamiento renal, esta última más sensible. Inducción neonatal de hiperglucemias moderadas: indicadores metabólicos y de EO en ratas adultas. Estos parámetros son usados tanto en humanos como animales (Muro, 2014). En este experimento no se observaron diferencias marcadas en el grupo tratado con STZ con respecto al grupo control.

Las parámetros empleados para evaluar el perfil hepático son las transaminasas intracelulares TGO y TGP. Su elevada concentración en el plasma es evidencia de muerte y lisis celular (Muro, 2014). Este hecho permite seguir la evolución de ciertas enfermedades que afectan órganos ricos en estas enzimas como es el caso de la diabetes. En el presente estudio se constataron concentraciones de TGO significativamente elevadas en las ratas diabéticas con respecto a las sanas. Las concentraciones de TGP no mostraron diferencias relevantes.

5.2.5 Indicadores de estrés oxidativo

Dado que el embarazo es un estado fisiológico que se acompaña de una demanda energética elevada y un incremento en los requerimientos de oxígeno, aún en el embarazo normal se podría esperar un aumento de la carga pro-oxidante, lo que se une a evidencias de la participación del EO en la patogenia de varias afecciones propias de la gestación y al efecto perjudicial de otros factores cuando se asocian con el embarazo, como la exposición a sustancias tóxicas, al alcohol y al humo del cigarro; fenómenos del que son crecientes las referencias en la literatura científica en los últimos años.

La elevación de la tensión de oxígeno en la sangre materna coincide con cambios morfológicos en las arterias uterinas que permiten el libre flujo de sangre a la placenta, y que provocan alteraciones que se manifiestan por la expresión de la forma inducible de la proteína de shock térmico, la formación de residuos de nitrotirosina y la desorganización de las crestas mitocondriales dentro del sincitiotrofoblasto; alteraciones que nos indican que mientras se establece la circulación materna ocurre un estallido oxidativo en la placenta que pudiera ocasionar los efectos negativos señalados provocados por los RLO. Además del incremento placentario, se originan también RLO del propio metabolismo embrionario que pudieran ocasionar bloqueos y retardos del desarrollo (Gutiérrez, 2005).

GSH

El glutatión (GSH), tiol intracelular, es un barredor de radicales libres, su disminución en el organismo es muestra de su alto consumo como barrera antioxidante. En el presente trabajo se determinó las concentraciones de GSH en homogenado de hígado materno, fetal y en la placenta encontrándose diferencias significativamente inferiores en la placenta de los fetos de madres diabéticas con respecto a la de las madres sanas.

La placenta juega un rol fundamental en el embarazo como una interface entre el feto y la madre. Proporciona el intercambio y la modificación en la síntesis de nutrientes y gases y secreta un rango de hormonas esteroide y péptidos promoviendo una barrera inmune entre la madre y feto. Las medidas de EO observadas en la sangre y la orina, muestran que el embarazo en sí mismo es un estado de EO con una alta actividad metabólica no solo de la madre sino de la placenta (Machado *et al.*, 2014). Esta puede ser la explicación de por qué se evidenciaron valores inferiores de GSH en la placenta como resultado de un mayor consumo.

El estudio realizado por Fernández *et al.* (2010) a un grupo de embarazadas dentro de las cuales se encontraban con diabetes pregestacional y DG obtuvo como resultado una disminución significativa de los valores de GSH de las enfermas con respecto a las sanas. Además se evidenció una marcada diferencia en cuanto a los valores de GSH en las embarazadas con diabetes pregestacional con respecto a las que presentaron la enfermedad durante el embarazo. Estos datos coinciden con los reportados en otras bibliografías donde las embarazadas diabéticas presentan defensas antioxidantes disminuidas más agotadas que en aquellas que presentan diabetes pregestacional, cuyas biomoléculas han sido expuestas a eventos oxidativos durante mayor tiempo (Fernández *et al.*, 2010).

El GSH constituye el principal antioxidante endógeno no enzimático y se estima que en una célula sana sólo el 1% del contenido total de este compuesto debe encontrarse en la forma oxidada. El estudio presentado por Fernández *et al.* (2012a) en ratas de la línea Wistar a las cuales se les indujo la enfermedad en la adultez a través de una inyección intraperitoneal no mostraron diferencias significativas de GSH con respecto a las sanas.

PAOP

Las EROs también provocan un daño directo a las proteínas induciendo la pérdida o modificación de sus funciones, incrementan su catabolismo, dañan su estructura primaria y producen reacciones de agregación, entrecruzamiento y fragmentación que dan lugar a los PAOP (Gómez *et al.*, 2014).

Algunos resultados confirman que las proteínas circulantes pueden ser glucosiladas *in vivo* y que este hecho podría estar implicado en la patogenia de las complicaciones crónicas de la DM. La glucosilación produce disímiles modificaciones de las proteínas y sus efectos sobre estas también pueden ser variados: insolubilidad, resistencia a las enzimas de degradación, no reconocimiento por los receptores habituales y generación de autoinmunidad, entre otros (Cruz y Licea, 2010)

Se conoce que la hiperglucemia, la cual representa la característica fundamental de la DM, promueve la activación de varias reacciones involucradas en procesos metabólicos donde se generan metabolitos intermediarios que tienen acción pro-oxidante. Esta también condiciona el aumento del metabolismo anaerobio (glucólisis anaerobia), con la consiguiente excesiva producción y acumulación de lactato, lo que constituye un evento generador de radicales libres. Se sabe que una posible fuente de radicales libres en la diabetes es la autooxidación de la glucosa, la cual facilita la generación de cetoaldehídos reactivos y la formación de productos finales de la glucosilación avanzada (PFGA), potentes reductores que generan radicales de oxígeno en presencia de hierro o

cobre. Además, el aumento de la oxidación del sorbitol con la consecuente formación de fructosa, puede incrementar la producción del anión superóxido a través de la reducción de la prostaglandina G2 en H2 (Cruz y Licea, 2010).

Al evaluar los niveles de PAOP en hígado materno, fetal y placenta en el presente trabajo se obtuvo diferencias significativas inferiores en la placenta del grupo diabético con respecto al control y valores similares en hígado materno y fetal para ambos grupos. Este resultado no se esperaba, sobre todo, porque en la placenta se encontraron los niveles inferiores de GSH que evidencian mayor consumo de este indicador de la defensa antioxidante.

La tesis de diploma presentada por Muro (2014) donde realiza un control de los niveles de PAOP en hígado, riñón, páncreas y plasma obtiene diferencias superiores del grupo inoculado con STZ con respecto al control en cada una de las muestras evaluadas como evidencia de EO en este grupo de animales.

(Fernández *et al.* (2012b)) en el estudio realizado para cuantificar daño oxidativo en plasma a través de la cuantificación de PAOP obtuvieron valores superiores en las ratas enfermas con respecto a las sanas.

De forma general en este trabajo aunque se observa una tendencia a aumentar los valores de MDA (en algunos casos el PAOP aumentó) y la disminución de GSH como muestras de EO no hay evidencias estadísticamente marcadas de este estado en las madres y la descendencia. Una explicación a estos resultados puede deberse al tiempo de desarrollo de la enfermedad (90 días) ya que otros estudios registran daño a las biomoléculas principales (lípidos, proteínas, ADN) como consecuencia de las hiperglucemias desarrolladas debido a la DM. Otra explicación puede atribuírsele a que la glucemias inducidas en este modelo fueron moderadas por tanto el efecto negativo sobre el estado redox es menos severo.

MDA

La peroxidación lipídica es considerada un mecanismo molecular que involucra daño oxidativo a la estructura celular y procesos tóxicos que provocan su muerte. Es el resultado de un metabolismo tóxico provocado por las EROs. Además de contener concentraciones altas de ácidos grasos poliinsaturados y metales de transición, las membranas biológicas de las células y los orgánulos constantemente están siendo sujetas a varios tipos de daño. Involucra la formación y propagación de radicales de lípidos, la captación de oxígeno, la reestructuración de los dobles enlaces en los

lípidos insaturados y la destrucción eventual de las membranas lipídicas con la consecuente liberación de una variedad de productos que incluye los alcoholes, cetonas, alcanos, aldehídos y éteres. Los aldehídos, específicamente, son producidos durante la descomposición de ácidos grasos insaturados y en comparación con los RL son más estables, difunden fuera de la célula y su sitio de acción está alejado del sitio de formación. El más importante es el malonildialdehído (MDA) el cual fue considerado por mucho tiempo como el metabolito más importante de la peroxidación lipídica sin embargo es prácticamente no tóxico (Repetto *et al.*, 2012). Por esta razón es el más comúnmente utilizado para cuantificar el grado de lipoperoxidación en los tejidos y fluidos humanos.

En el presente trabajo se llevó a cabo un control de los valores de MDA en hígado materno, fetal y placenta sin encontrar diferencias considerables entre los grupos evaluados (control y diabético).

El estudio de Machado *et al.* (2014) "Oxidative Stress in Maternal Blood and Placenta From Mild Diabetic Rats" evaluaron MDA en una muestra de sangre extraída de las ratas preñadas y de una muestra de las placentas. Las ratas preñadas tratadas con STZ mostraron una diferencia significativa superior en los valores de MDA en la sangre en comparación con las sanas sin embargo no hubo ninguna diferencia en la prueba realizada a las placentas. En el presente trabajo no se encontró ninguna diferencia en las muestras evaluadas (hígado materno, fetal y placenta) a pesar de que los valores en el grupo diabético fueron más altos que en el grupo control.

Mohammad *et al.* (2011) evaluaron la concentración de MDA en hígado de ratas diabéticas y sanas con valores significativamente superiores en las enfermas, a diferencia de este trabajo eran ratas machos inoculadas con STZ en la adultez.

De forma general en este trabajo se observa un desequilibrio metabólico en alguna biomoléculas de la rata madre sin repercusiones graves en la descendencia. Aunque se observa una tendencia a aumentar los valores de y MDA y la disminución de GSH como muestras de estrés oxidativo no hay evidencias estadísticamente marcadas de este estado en las madres y la descendencia de las ratas Wistar. Una explicación a estos resultados puede deberse al tiempo de desarrollo de la enfermedad (90 días) ya que otros estudios reportan daño a las biomoléculas principales (lípidos, proteínas, ADN) como consecuencia de las hiperglucemias desarrolladas debido a la DM. Otra explicación puede atribuírsele a que la glucemias inducidas en este modelo fueron moderadas por tanto el efecto y la rapidez del estado oxidativo son más lentos.

No obstante el presente estudio crea las bases para futuras investigaciones en la prevención y/o repercusión de esta enfermedad en la madre diabética y su descendencia contribuyendo a la

constante búsqueda por aminorar los efectos de esta patología y contribuir a mejor la salud y calidad de vida de estas personas. La extrapolación de este estudio en humanos contribuye a disminuir la morbilidad maternal y perinatal, asociada a deficiente ovulación, alteración en el ciclo menstrual, aborto espontáneo, morbilidad y mortalidad perinatal, malformaciones congénitas, anormalidades placentarias, y afectación en la programación intrauterina. Además, estudios epidemiológicos en humanos y animales experimentales han mostrado que en la descendencia de mujeres/ratas con DG moderada aparecen nacimientos macrosómicos y microsómicos, así como desarrollo de la intolerancia a la glucosa en la adultez, entre otras alteraciones. Por tanto existe una tendencia diabetogénica entre diferentes generaciones asociada a un desfavorable ambiente intrauterino.

6. Conclusiones

1. La diabetes moderada en ratas Wistar preñadas provoca hiperglucemia e hiperlipidemia en la madre así como una disminución en el peso de los fetos.
2. La gestación en ratas Wistar complicada con diabetes provoca una disminución en los valores de glutatión en la placenta de los animales diabéticos con respecto a los sanos, evidenciando afectación en la defensa antioxidante.
3. La diabetes moderada en ratas Wistar preñadas repercute negativamente en el metabolismo y estrés oxidativo materno-fetal.

7. Recomendaciones

- Aumentar el período de evolución de la enfermedad de 90 a 120 días con el fin de acentuar las complicaciones de la enfermedad en la madre y su descendencia.
- Realizar pruebas morfológicas fetales que permitan determinar las principales malformaciones provocadas por la diabetes moderada experimental.
- Probar el efecto de compuestos y/o productos naturales que disminuyan las complicaciones de la diabetes durante la gestación con una futura aplicación en humanos.

Referencias bibliográficas

- Akbarzadeh, A., Norouzián, D., Mehrabi, M., Jamshidi, S., Farhangi, A., Allah, A., Mofidian, S. y Lame, B. (2007) Induction of Diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 22: 60-64.
- American Diabetes Association (2014) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. American Diabetes Association. 1-24.
- Arias, J. y Balibrea, J. (2007) Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*. 22: 160-168.
- Arizmendi, J., Pertuz, V., Colmenares, A., Gómez, D. y Palomo, T. (2012) Diabetes Gestacional y Complicaciones neonatales. *Revista Facultad Médica*. 20: 50-60.
- Arulmozhi, D., Veeranjanyulu, A. y Bodhankar, S. (2004) Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: A glance. *Indian Journal Pharmacology*. 36: 217-221.
- Barajas, M. (2011) Estrategias de terapia celular para el tratamiento de la diabetes tipo 1: dónde estamos y qué podemos esperar. *Avances en Diabetología*. 27: 115---127.
- Barbalho, S., Damasceno, D., Machado, A., Sellis da Silva, V., Aparecida, K., Oshiiwa, M., Farinazzi, F. y Gregorio, C. (2011) Metabolic Profile of Offspring from Diabetic Wistar Rats Treated with *Mentha piperita* (Peppermint). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-6.
- Béquer, L., Gómez, T., Molina, J., López, F., Gómez, C. y Clapés, S. (2014) Inducción de hiperglucemias moderadas en ratas Wistar por inoculación neonatal de estreptozotocina. ¿Inyección subcutánea o intraperitoneal? *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 51: 178-184.
- Béquer, L., Gómez, T., J., M., Artiles, D., Bermúdez, R. y Clapés, S. (2016) Acción diabetogénica de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal. *Biomédica. Revista del Instituto Nacional de Salud*. 36: 1-25.
- Bess S (Ed.) (2015) *Anuario Estadístico de Salud 2014*. 43 Ed. La Habana: Ministerio de Salud Pública, 190 pp.
- Beutler, E. (1986) Improved assay of the enzymes of glutathione synthesis. *Clinica Chimica*. 158: 115-123.
- Bueno, A., Sinzato, Y., Sudano, M., Landim, F., Paranhos, I., Vieira, M. y Damasceno, D. (2014) Short and long-term repercussions of the experimental diabetes in embryofetal development. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*. 30: 575–581.

- Cacho, J., Sevillano, J. y de Castro, J. (2008) Validaton of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Journal Physiology Endocrinology Metabolic*. 295: 1269-1276.
- Céspedes, T. y Sánchez, D. (2000) Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana Cardiología* 14: 55-60.
- Clapés, S. (2000) Diabetes mellitus, estres oxidativo y embarazo. *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*. 19: 191-195.
- Clapés, S., Torres, O., Companioni, M., Villariño, U., Broche, F. y Céspedes, E. (2001) Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*. 20: 93-98.
- Contreras, E., Arango, L., Zuluaga, S. y Ocampo, V. (2008) Diabetes y embarazo. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 59: 38-45.
- Cruz, J. y Licea, M. (2010) Glucosilación no enzimática y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus
- Cruz, J., Márquez, A., Lang, J. y Valdés, L. (2013) Atención a las gestantes diabéticas en Cuba: logros y retos. *MEDICC Review*. 15: 1-4.
- Damasceno, D., Volpato, G., Paranhos, I. y Vieira, M. (2002) Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Animal Reproduction Science*. 72: 235–244.
- Damasceno, D., Sinzato, Y., Bueno, A., Netto, A., Dallaqua, B., Gallego, F., Iessi, I., Corvino, S., Serrano, R., Marini, G., Piculo, F., Calderon, I. y Rudge, M. (2013) Mild Diabetes Models and Their Maternal-Fetal Repercussions. *Journal of Diabetes Research*. 1-9.
- Damasceno, D., Netto, A., Iessi, I., Gallego, F., Corvino, S., Dallaqua, B., Sinzato, Y., Bueno, A., Calderon, I. y Rudge, M. (2014) Streptozotocin-Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes. *BioMed Research International*. 1-11.
- de Mello, M., de Souza, C., Braga, L., dos Santos, J., Ribeiro, I. y Gobatto, C. (2001) Glucose tolerance and Insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol Chem Phys and Med*. 33: 63-71.
- Díaz, M., Baiza, L., Ibáñez, M., Pascoe, D., Guzmán, A. y Kumate, J. (2004) Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Médica de México*. 140: 437-448.
- Doshani, A. y Konje, J. (2009) Diabetes in pregnancy: insulin resistance, obesity and placental dysfunction. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*. 9: 208-212.

- El-Wassef, M., El-Saeed, G., El-Tokhy, S., Raslan, H., Tawfeek, S., Siam, I. y Salem, S. (2012) Oxidative DNA damage in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia Croatica*. 41: 121-127.
- Esterbauer, H. y Cheeseman, K. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymology*. 186: 407-421.
- Etuk, E. (2010) Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and biology journal of North América*. 1: 130-134.
- Facco, F. (2013) Sleep disruption and gestational diabetes. *The Open Sleep Journal*. 6: 23-27.
- Fernández, T., Clapés, S., Suárez, G., Casanueva, K., Armas, D., Tormo, M., Sáez, G., Egaña, E. y Rojo, D. (2010) Marcadores de estrés oxidativo en embarazadas diabéticas. *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*. 29: 1-10.
- Fernández, T., Clapés, S., Suárez, G., Antiguas, A., Uriarte, O., Rodríguez, V., Soca, M., Perera, A., Herrera, M., Rodríguez, M. y Cabrera, A. (2012a) Marcadores de estado metabólico, estrés oxidativo e inflamación en ratas diabéticas tratadas con vitamina E. *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*. 1-8.
- Fernández, T., Clapés, S., Suárez, G., Uriarte, O., Núñez, N., Gorrita, Y., Rodríguez, V., Herrera, M. y Purón, C. (2012b) Efecto de la vitamina E en ratas diabéticas y sus fetos. *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*. 1-7.
- Figueroa, M., Pérez, I. y Mejía, R. (2013) Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Revista Medicina Veterinaria Zootecnia Córdoba*. 18: 3699-3707.
- García, C. (2008) Diabetes mellitus gestacional. *Medicina Interna de México*. 24: 148-156.
- García, J., Arias, J., García, C., Vara, E. y Balibrea, J. (2002) Modificación de los mediadores inflamatorios en isquemia-reperfusión intestinal en un modelo de diabetes tipo 2. *Cirugía Española*. 71: 276-286.
- Gómez, T., Béquer, L., Sánchez, C., Barrera, M., Muro, I., Reyes, M. y Clapés, S. (2014) Inducción neonatal de hiperglucemias moderadas: indicadores metabólicos y de estrés oxidativo en ratas adultas. *Asociación Latinoamericana de Diabetes*. 4: 148-157.
- González, E. (2002) Diabetes mellitus experimental: etiología de las malformaciones congénitas en descendientes de ratas diabéticas. *Revista Cubana de Endocrinología*. 13: 53-63.
- Goyal, S., Reddy, N., Patil, K., Nakhate, K., Ojha, S., Patil, C. y Agrawal, Y. (2016) Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions*. 244: 49-63.

- Guariguata, L., Nolan, T., Beagley, J., Linnenkam, U. y Jacqmain, O. (2013) *Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes*. 6ta Ed. Federación Internacional de Diabetes, 160 pp.
- Gutiérrez, A. (2005) Estrés oxidativo en la gestación: ¿una nueva óptica en la atención a la embarazada? . *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 31.
- Guzmán, J. y Calles, J. (2008) Consenso de Prediabetes Documento de Posición de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD). *Consensos ALAD*. 1-12.
- Guzmán, J., Lyra, R., Aguilar, C., Cavalcanti, S., Escaño, F., Tambasia, M., Duarte, E. y Group, A. C. (2010) Treatment of type 2 diabetes in Latin America: a consensus statement by the medical associations of 17 Latin American countries. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 28: 463-471.
- Iessi, I., Bueno, A., Sinzato, Y., Taylor, K., Rudge, M. y Damasceno, D. (2010) Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2: 1-8.
- Iglesias, R., Barutell, L., Artola, S. y Serrano, R. (2014) Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de la diabetes mellitus. *American Diabetes Association*. 1-22.
- Ilechukwu, C., Ebenebe, U., Ubajaka, C., Ilika, A., Emelumadu, O. y Nwabueze, S. (2014) The Role of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus: A 24-year Review. *AFRIMEDIC Journal*. 5: 1-7.
- Inhasz, A., Woodside, B., Sinzato, Y., Bernardi, M., Kempinas, W., Anselmo, J. y Damasceno, D. (2013) Neonatally induced mild diabetes: influence on development, behavior and reproductive function of female Wistar rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 5: 1-10.
- Ishii, Y., Ohta, T. y Sasase, T. (2012) Non-Obese Type 2 Diabetes Animals Models. En: Chackrewarthy S (ed.). *Glucose Tolerance*. pp. 224-242. tech.
- Iva, S. (2013) Metabolic adaptations in pregnancy in lean and obese women-a literatura review. *Research in Obstetrics and Gynecology*. 2: 37-47.
- Jawerbaum, A. y White, V. (2010) Animal Models in Diabetes and Pregnancy. *Endocrine Reviews*. 31: 680-701.
- Junod, A., Lambert, A., Stauffacher, W. y Renold, A. (1969) Diabetogenic Action of Streptozotocin: Relationship of Dose to Metabolic Response. *The Journal of Clinical Investigation*. 48: 2129-2139.
- Kalofoutis, C., Piperi, C., Kalofoutis, A., Harris, F., Phoenix, D. y Singh, J. (2007) Type II diabetes mellitus and cardiovascular risk factors: Current therapeutic approaches. *Experimental & Clinical Cardiology*. 12: 17-28.

- Kaplan, J. y Wagner, J. (2006) Type 2 Diabetes—An Introduction to the Development and Use of Animal Models. *ILAR Journal*. 47: 181-185.
- Kiss, A., Lima, P., Sinzato, Y., Takaku, M., Takeno, M., Rudge, M. y Damasceno, D. (2009) Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 1: 1-7.
- Kiss, A. (2012) Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. *Physiology Behavior*. 107: 292-300.
- Komolafe, O., Adeyemi, D., Adewole, S. y Obuotor, E. (2009) Streptozotocin-Induced Diabetes Alters The Serum Lipid Profiles Of Adult Wistar Rats. *The Internet Journal of Cardiovascular Research*. 7.
- Lenzen, S. (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51: 216-126.
- Machado, A., Damasceno, D., Sinzato, Y., Campos, K., Faria, P., Dallaqua, B., Mattos, I., Vieira, M. y Rodrigues, T. (2014) Oxidative Stress in Maternal Blood and Placenta From Mild Diabetic Rats. *Reproductive Sciences*. 1-5.
- Márquez, A. (2007) Consenso Latinoamericano de Diabetes y Embarazo. *Consensos ALAD*. 1-14.
- Mathews, D., Hosker, J. y Rudenski, A. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fastng plasma glucose and insulin concentratons in man. *Diabetología*. 28: 412-419.
- Matteuci, E., Biasci, E. y Giampietro, O. (2001) Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta Diabetología*. 38: 187-189.
- Mohammad, R., Daryoush, M., Ali, R., Yousef, D. y Mehrdad, N. (2011) Attenuation of oxidative stress of hepatic tissue by ethanolic extract of saffron (dried stigmas of *Crocus sativus* L.) in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5: 2166-2173.
- Mora, A., Aragón, D. y Ospina, L. (2009) Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Farmacología y toxicología*. 16.
- Morales, M., Figueroa, H. y Bustamante, S. (2003) Bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* en patologías asociadas al estrés oxidativo. *Revista de Fitoterapia*. 3: 135-144.
- Muro, I. (2014) *Caracterización de un modelo de diabetes moderada en ratas Wistar* In: *Departamento de Morfofisiología* Cuba: Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.
- Murthy, E., Pavilic, I. y Metelko, Z. (2002) Diabetes and Pregnancy *Diabetología Croatica*. 31: 131-146.

- Olokoba, A., Obateru, O. y Olokoba, L. (2012) Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal*. 27: 269–273.
- Oré, R., Valdivieso, R. y Huerta, D. (2000) Capacidad Antioxidante en ratas diabéticas rol de la vitamina E. *Revista Peruana de Biología* 7.
- Ospina, L., Olearte, J., Calle, J. y Pinzón, R. (1995) Comprobación de la actividad hipoglicemiante y captadora de radicales libres oxigenados de los principios activos de Curatella americana. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 6-11.
- Pacini, G., Omar, B. y Ahrén, B. (2013) Methods and Models for Metabolic Assessment in Mice. *Journal of Diabetes Research*. 1-8.
- Polanco, A., Revilla, M., Palomino, M. y Andrade, S. (2005) Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas. *Ginecología y Obstetricia de México*. 73: 544-552.
- Portha, B., Picolon, L. y Rosselin, G. (1979) Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia*. 17: 371-377.
- Ramos, M., Batista, C., Gómez, B. y Zamora, A. (2006) Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Medigraphic*. 7: 7-15.
- Raza, H. y John, A. (2012) Streptozotocin-Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Human Hepatoma HepG2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 5751-5767.
- Repetto, M., Semprine, J. y Boveris, A. (2012) *Lipid Peroxidation* Rijeka, Croatia, 546 pp.
- Romay, C. (1996) Capacidad antioxidante total del suero en la diabetes mellitus. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 15.
- Saini, S., Kumari, S., Kumar, S. y Kumar, A. (2013) A Review on Different Types of Animal Models for Pharmacological Evaluation of Antidiabetic Drugs. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*. 3: 2-12.
- Saini, V. (2010) Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 1: 68–75.
- Saito, F., Damasceno, D., Kempinas, W., Morcel, G., Sinzato, Y., Taylor, K. y Rudge, M. (2010) Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2: 1-8.
- Sandína, M., Espelt, A., Escolar, A., Arriola, L. y Larrañaga, I. (2011) Desigualdades de género y diabetes mellitus tipo 2: la importancia de la diferencia. *Avances en Diabetología*. 27: 78–87.

- Sena, L., Dutra de Melo, A., Andreazzi, A., de Caires, L., Barros, M. y González, R. (2011) Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*. 38: 117-127.
- Sinzato, Y., Lima, P., de Campos, K., Kiss, A., Rudge, M. y Damasceno, D. (2009) Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 55: 384-388.
- Srinivasan, K. y Ramarao, P. (2007) Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal of Medical Research*. 125: 451-472.
- Suarez, J. (2010) Buenas prácticas clínicas en la atención a las gestantes diabéticas. *Revista Centroamericana de Obstetricia y Ginecología* 15.
- Tiskow, G. (2006) Evaluación del estrés oxidativo en ratas con Diabetes Mellitus tipo I inducida por estreptozotocina: efecto protector de la hormona melatonina. *Gacetas de Ciencias Veterinarias*. 12: 19-26.
- Ullah, A., Khan, A. y Khan, I. (2015) Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 1-7.
- Venereo, J. (2002) Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*. 31: 126-133.
- Verdaguer, J. y Puertas, M. (2006) La diabetes tipo 1 como enfermedad mediada por células T. De los modelos animales al ser humano. En: Ediciones Mayo, S. A. (ed.). *Prediabetes y Diabetes Tipo 1 de Reciente Diagnóstico*. pp. 25-50. España.
- Villarreal, Y., Briceño, Y. y Paoli, M. (2015) Diabetes mellitus tipo 1: características clínicas y demográficas. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 13: 33-47.