



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“ALTERACIONES METABÓLICAS POST-DIABETES GESTACIONAL”

**TESIS:
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

**PRESENTA:
P.Q.F.B. NAYELLI DELGADO ARELLANO**

**ASESOR:
D. C. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ**

**CO-ASESOR:
E.H.D.L. JUDITH ESMERALDA PRIETO SIERRA**

Morelia, Michoacán. Agosto, 2013

I. ÍNDICE

I.1. Índice de figuras	3
II. RESUMEN	5
III. ABSTRACT	6
IV. INTRODUCCIÓN	7
V. ANTECEDENTES	8
IV.1. Diabetes mellitus	10
IV.1.1. Clasificación	10
INSULINA	16
Biosíntesis, acciones y mecanismos	16
SECRECIÓN DE INSULINA	17
Síntesis y secreción de Insulina en las células Beta.....	17
CONTROL DE SECRECIÓN DE INSULINA	19
METABOLISMO DE LA GLUCOSA	20
Metabolismo de los carbohidratos en el hígado.....	22
Principales enzimas reguladores de la síntesis (gluconeogénesis) y degradación (glucólisis) de la glucosa en el hígado.	22
Metabolismo de los carbohidratos en el tejido adiposo	24
METABOLISMO DE LÍPIDOS.....	25
Biosíntesis de ácidos grasos	25
Síntesis de ácidos grasos y grasas neutras (lipogénesis).....	31
Malformaciones congénitas en hijos de madres diabéticas	33
Alteraciones en las crías de las ratas diabéticas	34
MODELOS DE DIABETES EXPERIMENTAL	39
Diabetes experimental	39

Estreptozotocina (STZ),	39
DIABETES Y GESTACIÓN	41
JUSTIFICACIÓN	43
HIPÓTESIS	44
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	46
Inducción de Diabetes Mellitus Experimental.....	46
RESULTADOS.....	49
Características de las crías.....	49
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
CONCLUSIÓN	56
PERSPECTIVAS.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO	69
GLUCOSA	69
COLESTEROL TOTAL	72
COLESTEROL HDL.....	75
COLESTEROL LDL	78
TRIGLICÉRIDOS	81
LÍPIDOS TOTALES	84

I.1. Índice de figuras

Figura 1. Efectos transgeneracionales por la diabetes gestacional maternal inducida con estreptozotocina. Modificada Zambrano et al. 2009.....	16
Figura 2. Estimulación de la secreción de insulina.....	18
Figura 3. β -Oxidación de ácidos grasos.	28
Figura 4. Lipólisis.	31
Figura 5. Estreptozotocina. La cadena de nitrosurea le confiere una acción citotóxica que daña el DNA de las células β -pancreáticas.	40
Figura 6. Niveles de glucosa de las ratas gestantes de los grupos control y diabético. Promedio y desviación estándar de 6 ratas por grupo. * $p < 0.05$, t-Student.....	49
Figura 7. Peso corporal de las ratas madre. Promedio y desviación estándar de 6 ratas por grupo. * $p < 0.05$, t-Student.	50
Figura 8. Peso corporal de las crías. Promedio y desviación estándar de 6 ratas por grupo. * $p < 0.05$, t-Student.	50
Figura 9. Niveles sanguíneos de glucosa. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento. * $p < 0.05$, t-Student.	51
Figura 10. Niveles sanguíneos de triglicéridos. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento.	51
Figura 11. Niveles sanguíneos de colesterol. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento. * $p < 0.05$, t-Student.	52
Figura 12. Niveles sanguíneos de HDL. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento.	52
Figura 13. Niveles sanguíneos de LDL. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento. * $p < 0.05$, t-Student.	53

Figura 14. Niveles sanguíneos de lípidos totales. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento. * $p < 0.05$, t-Student..... 53

I.1. Índice de figuras

Figura 1. Efectos transgeneracionales por la diabetes gestacional maternal inducida con estreptozotocina. Modificada Zambrano et al. 2009.....	16
Figura 2. Estimulación de la secreción de insulina.....	18
Figura 3. β -Oxidación de ácidos grasos.	28
Figura 4. Lipólisis.	31
Figura 5. Estreptozotocina. La cadena de nitrosurea le confiere una acción citotóxica que daña el DNA de las células β -pancreáticas.	40
Figura 6. Niveles de glucosa de las ratas gestantes de los grupos control y diabético.....	49
Figura 7. Peso corporal de las ratas madre.....	50
Figura 8. Peso corporal de las crías.....	50
Figura 9. Niveles sanguíneos de glucosa.....	51
Figura 10. Niveles sanguíneos de triglicéridos.	51
Figura 11. Niveles sanguíneos de colesterol.....	52
Figura 12. Niveles sanguíneos de HDL.....	52
Figura 13. Niveles sanguíneos de LDL.	53
Figura 14. Niveles sanguíneos de lípidos totales.	53

II. RESUMEN

En el mundo, las personas están enfrentándose a un cambio en el estilo de vida, donde un factor importante es la nutrición. La transición nutricional involucra cambios en la dieta, un aspecto adverso repercute en el estado de salud, por la integración en la alimentación de productos con mayor contenido de grasa y azúcar añadida. Se ha relacionado que este cambio del estilo de vida, está involucrado con la aparición más frecuente de diversas patologías como la hipertensión, obesidad y diabetes. La diabetes tiene un alto impacto en la dinámica del individuo que la padece, y se puede presentar durante el embarazo. Este tipo de diabetes como la gestacional, puede repercutir tanto en la salud de la madre como la del producto.

El concepto de la “programación del desarrollo” describe cómo la vida intrauterina y neonatal genera cambios fisiológicos permanentes. En la diabetes gestacional el ambiente subóptimo intrauterino y durante la lactancia modifica el crecimiento, predisponiendo al individuo a la aparición de enfermedades en la vida adulta. Si no se controlan adecuadamente los cambios en el metabolismo de la madre durante el embarazo, pueden incrementar las afecciones en el desarrollo del feto, pudiendo observarse macrosomía al nacimiento o el desarrollo de síndrome metabólico en su vida adulta.

En el presente trabajo, se implementó un modelo de diabetes gestacional en ratas para evidenciar los cambios transgeneracionales. La afección fue severa al no controlar la hiperglucemia en la madre; como resultado se observó en las crías una disminución significativa de peso, debido al ambiente subóptimo intrauterino. Una vez que se destetaron a las crías, se les valoró el perfil de lípidos y los niveles de glucemia. Las crías de madres diabéticas tuvieron una concentración elevada de lipoproteínas de baja densidad y niveles elevados de colesterol, cuestiones que se han asociado al desarrollo de complicaciones de la presión arterial y desarrollo de síndrome metabólico. Por lo que concluimos que el ambiente intrauterino subóptimo que se produce durante la diabetes gestacional modifica el metabolismo de las crías lo que repercute en su estado de salud.

Palabras clave: diabetes mellitus gestacional, lípidos, cambio transgeneracional, síndrome metabólico.

III. ABSTRACT

Around the world, lifestyle, where an important factor is nutrition. The nutrition transition involves changes in diet, hard aspect affects the health, the integration in food products with higher fat and added sugar. It has been linked to the change in lifestyle, is involved with the development of various diseases such as hypertension, obesity and diabetes. Diabetes has a high impact on the dynamics of individual suffering, and can occur during pregnancy. Such as gestational diabetes, can affect the health of both the mother and the fetus. The concept of "development programming" describes how the intrauterine and neonatal generates physiological changes permanent. In gestational diabetes suboptimal intrauterine environment and during lactation modifies the growth, predisposing to the onset of disease in adult life. If not properly controlled changes in the metabolism of the mother during pregnancy, may increase the conditions in the developing fetus, can microsomia observed at birth or the development of metabolic syndrome in adulthood.

In this paper, we implemented a model of gestational diabetes in rats to demonstrate the changes transgeracionales. The condition was severe by not controlling hyperglycemia in the mother results in pups was observed a significant decrease in weight due to suboptimal intrauterine environment. Once weaned calves, they evaluated the lipid profile and blood glucose levels. The offspring of diabetic mothers had a high concentration of low-density lipoprotein cholesterol and elevated levels, issues that have been associated with the development of complications of blood pressure and metabolic syndrome development. So we conclude that suboptimal intrauterine environment that occurs during gestational diabetes modifies the metabolism of offspring which affects their health.

Keywords: Gestational diabetes mellitus, lipids, transgenerational changes, metabolic syndrome.

IV. INTRODUCCIÓN

Actualmente se sabe gracias a la epidemiología clínica y a los estudios de experimentación con animales que el fenotipo de un individuo no está determinado exclusivamente por sus genes, existe además una fuerte influencia ambiental, teniendo mayor impacto en etapas tempranas del desarrollo. El ambiente subóptimo intrauterino y durante la lactancia modifica el crecimiento y predispone al individuo al desarrollo de enfermedades en la vida adulta. El concepto de la “programación del desarrollo” describe como la vida intrauterina y neonatal genera cambios fisiológicos permanentes (Nijland, et al., 2008).

Una de las características más interesantes y significativas de la programación del desarrollo, es la evidencia generada en diversos estudios donde se muestra que las consecuencias adversas del ambiente intrauterino inadecuado pueden pasar a través de las generaciones, por mecanismos que no involucran cambios genéticos, sino la expresión alterada de los genes (Skinner, 2007). El paso transgeneracional puede definirse como la habilidad de adquirir un fenotipo fisiológico o enfermedad y que esta condición sea transmitida a las siguientes generaciones, las cuales no fueron expuestas directamente al ambiente negativo y, sin embargo, son afectadas (Skinner, 2008).

Se han descrito alteraciones persistentes en las crías cuando fueron expuestas a un ambiente subóptimo. Estos cambios pueden involucrar modificaciones en la función celular y probablemente en la expresión de los genes. El ambiente tanto fetal como neonatal es responsable de las modificaciones epigenéticas que impactan el crecimiento e inducen cambios metabólicos observados desde la niñez (Skinner, 2008).

El ambiente subóptimo durante el embarazo y/o la lactancia que puede generar la mala programación del individuo y puede tener diferentes orígenes. Entre ellos la malnutrición materna o la diabetes gestacional, esta última, puede producir un

incremento en el transporte placentario de glucosa y otros nutrientes de la madre al feto, generando estrés en el desarrollo de la progenie (Aerts y Assche, 2006).

V. ANTECEDENTES

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, en el año 2007 se reportaron 230 millones de personas con DM en el mundo, con una prevalencia del 4% en países desarrollados (92 millones) y del 3.3% en países en desarrollo (76 millones). Se estima que para el año 2025 esta cifra incrementará significativamente a 350 millones de personas con DM en el mundo, de las cuales 280 millones corresponden a los países en desarrollo. Actualmente, México ocupa el noveno lugar mundial en la prevalencia de la diabetes, sin embargo, las proyecciones del futuro calculadas por especialistas internacionales proponen que para el año 2025 la situación empeorará y nuestro país ocupará el séptimo lugar.

La prevalencia de diabetes gestacional (DG) a nivel mundial se ha estimado en 7% (Setji, 2005). En México, dependiendo de la prueba, los criterios diagnósticos utilizados y de la población estudiada, la prevalencia se ha reportado entre el 3% y el 19.6%. En estudios de seguimiento se ha demostrado que 70% de las pacientes repiten el trastorno en el siguiente embarazo, en tanto que de 30 a 50% desarrolla diabetes tipo 2 en los 10 años posteriores al alumbramiento (Duarte, 2004; Forsbach-Sánchez et al., 1997; Ramírez, 2005).

La prevalencia creciente de diabetes, que se diagnostica en mujeres a edad cada vez más temprana, aumenta las complicaciones durante el embarazo y se asocia a la aparición de DG (Magee et al., 2003). El diagnóstico de DG se caracteriza por la intolerancia a los carbohidratos con diversos grados de severidad. Los cambios fisiológicos que impone el embarazo, dificultan su control, además están asociados con la morbilidad y mortalidad perinatal (Kim, 2002). La evidencia clínica y científica sugiere que el estilo de vida de la madre puede tener efectos a largo plazo en su descendencia. Por ejemplo, fumar, el consumo de alcohol y la

presencia de entidades patológicas como la diabetes e hipertensión durante el embarazo, todas las anteriores pueden afectar el desarrollo fetal y estas alteraciones pueden contribuir a patologías en el adulto (Diabalea et al., 2000).

El embarazo produce resistencia a la insulina transitoria, que se manifiesta como la glucemia postprandial elevada, hiperlipidemia en forma de aumento de los triglicéridos, partículas de LDL, y los ácidos grasos libres y cetosis acelerada (Vorzimer et al., 1937). La Diabetes gestacional aparece, sobre todo, en mujeres con factores de riesgo fácilmente identificables, quienes por los cambios propios de su embarazo elevan la resistencia a la insulina y sus cifras de glucosa, y en el metabolismo de lípidos, lo que repercute en el desarrollo de su feto. La diabetes pregestacional o preexistente se refiere a pacientes conocidas con diabetes tipo 1 o 2 que se embarazan (Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes en el Embarazo, 2009; Metzger, 2007).

La exposición del feto a las concentraciones elevadas de glucosa plasmática de la madre, durante el segundo y tercer trimestres, resulta en crecimiento fetal excesivo (García, 2008), hipoglucemia, ictericia, hipocalcemia, policitemia y enfermedad por deficiencia de surfactante pulmonar en el neonato y posteriormente, obesidad y diabetes en niños y adultos (Pettit, 1998, Silverman, 1998). También se ha descrito que la diabetes gestacional está asociada con incremento del riesgo a desarrollar malformaciones congénitas (especialmente a nivel de sistema nervioso central, hepático, cardiovascular, renal y músculo-esqueléticas) y el aborto espontáneo (Kitzmilller, 1991), quizás la insulina, que actúa como una hormona del crecimiento, esté involucrada en estos trastornos (Steinke y Driscoll, 1965).

La probabilidad de malformaciones y aborto, tiene una relación lineal con la concentración de glucosa plasmática de la madre, expresada en la concentración de hemoglobina glucosilada (HbA1c) (DDCT, 1996) y este riesgo excesivo, se

puede reducir, cuando la madre mantiene un excelente control glucémico en el primer trimestre del embarazo (Mills, 1998).

En la patogénesis de la diabetes gestacional, la glucosa materna cruza la barrera placentaria por difusión e induce hiperglicemia fetal que estimula al páncreas del feto a incrementar los niveles plasmáticos de insulina (Naeye, 1965). Además, el incremento en la insulina fetal es causado por la hiperglicemia materna y el feto produce insulina para su propia reserva y para la glucemia de la madre (Naeye, 1965). Algunas observaciones recientes también han señalado que los productos de tales embarazos tienen mayor riesgo de obesidad, diabetes y enfermedad cardiovascular (Cheung y Byth, 2003). Sin embargo, en los productos se sabe poco sobre las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y en el metabolismo lipídico inducidos por el estado hiperglicémico gestacional; sobre la presencia de estas alteraciones y la dependencia del tiempo (tanto en el desarrollo en edad temprana como en la adultez).

IV.1. Diabetes mellitus

El término diabetes mellitus (DM) engloba una serie de enfermedades caracterizadas por un déficit absoluto o relativo de insulina, resultante de defectos en la secreción y/o acción de la hormona. La manifestación bioquímica más conocida de la diabetes es la hiperglucemia, además de las anomalías en el metabolismo de los hidratos de carbono, se altera también el metabolismo de lípidos y proteínas. (Islas-Andrade S, Diabetes mellitus: Concepto y nueva clasificación., 2004)

IV.1.1. Clasificación

El Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han propuesto una nueva clasificación que contempla 4 grupos:

- a) **Diabetes mellitus tipo 1**
- b) **Diabetes mellitus tipo 2**
- c) **Otros tipos específicos de diabetes**
- d) **Diabetes mellitus gestacional**

IV.1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1 (Destrucción de células β y posterior deficiencia absoluta de insulina).

Esta forma de diabetes, representa sólo 5-10% de los pacientes con diabetes, conocida como diabetes tipo 1 o diabetes juvenil, que involucra la destrucción de las células β -pancreáticas debido a alteraciones inmunológicas o por causas idiopáticas, en esta forma de diabetes, la tasa de destrucción de las células β es muy variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente los lactantes y los niños) y lenta en otros (principalmente los adultos). Algunos pacientes, especialmente los niños y los adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad. Otros tienen hiperglucemia moderada en ayunas que puede virar con rapidez a la hiperglucemia grave y/o la cetoacidosis, en presencia de infección u otras intercorrientes. Y otros, especialmente los adultos, pueden retener una función residual de las células β suficiente, lo que permite prevenir la cetoacidosis durante muchos años; estas personas finalmente se convierten en dependientes de insulina y están en riesgo de cetoacidosis. En esta última etapa de la enfermedad, la secreción de insulina es escasa o nula y se manifiesta por niveles bajos o indetectables del péptido C en el plasma.

La diabetes mediada por inmunidad suele ocurrir en la niñez y la adolescencia pero puede ocurrir a cualquier edad, incluso en la octava o novena décadas de la vida. La destrucción autoinmune de las células β tiene múltiples predisposiciones genéticas y también está relacionada con factores ambientales poco definidos. Aunque rara vez los pacientes son obesos, cuando la obesidad está presente no contradice el diagnóstico de diabetes. Estos pacientes también son propensos a otros trastornos autoinmunes, como la enfermedad de Graves, la tiroiditis de

Hashimoto, la enfermedad de Addison, el vitíligo, la enfermedad celiaca, la hepatitis autoinmune, la miastenia grave y la anemia perniciosa (ADA, 2012; Kido, 2001).

La diabetes idiopática. Algunas formas de esta diabetes tipo 1 no tienen causas conocidas. Algunos de estos pacientes tienen permanente insulinopenia y son propensos a la cetoacidosis, pero que no tienen evidencia de autoinmunidad. Las personas con esta forma de diabetes sufren de cetoacidosis episódica y la exhibición de diferentes grados de deficiencia de insulina entre los episodios. Esta diabetes es de forma fuertemente hereditaria, carece de pruebas inmunológicas y la genera la autoinmunidad a células β (ADA 2012).

IV.1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2. Desde resistencia a la insulina predominante con deficiencia relativa hasta un defecto secretor de la insulina con resistencia.

Esta forma de DM representa el 90% al 95% de la población diabética y abarca a los sujetos que presentan resistencia a la insulina acompañada por deficiencia relativa. Los pacientes no requieren de insulina en las primeras etapas de la enfermedad y no se observan lesiones autoinmunes en el páncreas. La mayoría de los casos presentan disposición adiposa central u obesidad, y la obesidad en sí misma provoca cierto grado de resistencia a la insulina. La cetoacidosis raramente aparece de forma espontánea; su presencia se asocia con el estrés o con otra enfermedad. Debido a que esta forma de DM cursa sin diagnóstico por varios años, los individuos están en riesgo de presentar complicaciones tanto macrovasculares como microvasculares.

La secreción de insulina es defectuosa y no alcanza a compensar la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina se puede mejorar con la reducción de peso y/o con el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, pero rara vez se restaura a la normalidad. El riesgo de presentar este tipo de DM aumenta con el

envejecimiento, la obesidad y el sedentarismo. Se presenta con mayor frecuencia en las mujeres con diabetes mellitus gestacional y en individuos con hipertensión o dislipidemia y la frecuencia varía en los diferentes subgrupos raciales o étnicos. A menudo se asocia con una fuerte predisposición genética (ADA, 2012).

IV.1.1.3. Otros tipos específicos de diabetes

Aquí se incluyen los tipos de diabetes que generalmente son secundarios a otras alteraciones patológicas, por ejemplo pancreatopatía fibrocalculosa, samatostatinoma, etc. y entre las que se encuentran las formas de diabetes asociadas con defectos monogénéticos en la función de las células β , estas formas de diabetes son frecuentemente caracterizadas por un inicio hiperglucémico a edad temprana (generalmente antes de 25 años).

Otro subtipo incluye las causas inusuales donde las anormalidades metabólicas se asocian con mutaciones en el gen que codifica para el receptor de la insulina. Algunos procesos patológicos afectan el páncreas exógeno, llegando a ocasionar diabetes mellitus, entre los que se encuentran la pancreatitis, trauma infección, pancreatectomía y carcinoma pancreático. Las endocrinopatías se refieren a un exceso en las concentraciones de las hormonas que antagonizan el efecto de la insulina.

Algunas infecciones por virus se han asociado con destrucción de las células β , entre estos se encuentra la rubéola congénita, coxsackievirus B, cytomegalovirus, adenovirus e incluso virus de la parotiditis. En otra categoría se incluyen algunas formas poco frecuentes, relacionadas con alteraciones inmunológicas, como el síndrome de Stiff-man, éste, es una alteración autoinmune del sistema nervioso central. Finalmente, se encuentran los síndromes genéticos que ocasionalmente son asociados con diabetes, como el síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, etc. (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes, 2010*).

IV.1.1.4. Diabetes mellitus gestacional

Definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo, se identifica durante la gestación a partir de las semana 24 a 28; en este grupo se incluyen, tanto las pacientes que necesitan insulina para su control, como las que únicamente requieren modificaciones en la dieta, el tratamiento se prolonga aún después del embarazo. Aunque la mayoría de los casos, persiste después del embarazo y no excluye la posibilidad de que la intolerancia a la glucosa no reconocida puede haber comenzado antes o concomitantemente con el embarazo. A medida que la obesidad y diabetes han dado lugar a más casos de diabetes tipo 2 en mujeres en edad fértil, el número de mujeres embarazadas con diabetes tipo 2 no diagnosticada ha incrementado. Esta alteración ocurre particularmente en el tercer trimestre del embarazo, de tal forma que después de seis o más semanas de su conclusión, las pacientes pueden ser reclasificadas, ya sea como diabéticas, con tolerancia alterada a la glucosa o con alteración de la glucosa en ayuno; aunque en la mayoría de estos casos, la glucosa se regulariza hasta valores *normales* (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes, 2010*). En la gran mayoría de los casos revierte en cuanto se presenta el parto. Es de importancia señalar que las mujeres que presentan diabetes gestacional tienen mayor probabilidad (5-10%) de desarrollar DM tipo 2 comparado con las que no sufren diabetes gestacional. Es importante destacar que si la DM gestacional se presenta desde el inicio del embarazo, la posibilidad de que los productos presenten malformaciones congénitas se incrementa, por lo que es recomendable determinar el nivel de glucosa de manera rutinaria desde que se diagnostica el embarazo (ADA, 2012).

IV.1.1.5. Modelos de diabetes gestacional

La diabetes gestacional moderada se induce mediante la infusión continua de glucosa. Son ratas preñadas sometidas (en donde la glicemia aumenta aproximadamente 20%) (Van Assche FA, 2001), se incrementa el desarrollo de los islotes fetales de las crías, lo que ocasiona mayor número de células beta y por

tanto producción de insulina. Estas crías provenientes de madres con diabetes, a pesar de tener la masa pancreática normal, se vuelven intolerantes a la glucosa cuando son adultas. Bajo condiciones normales, las crías de madres con diabetes moderada son normoglicémicas (Holemans K A. L., Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats, 1991); sin embargo, al embarazarse las concentraciones de insulina en suero son menores y como consecuencia la concentración de glucosa se incrementa en comparación con las ratas control. (Holemans K V. B., 1993)

La diabetes gestacional severa se induce inyectando a ratas preñadas estreptozotocina a mayor concentración en el día 11 de embarazo, lo que ocasiona hiperglicemia e hipoinsulinemia, sin cambios en el peso corporal. Los fetos son expuestos a concentraciones extremadamente elevadas de glucosa lo que genera desarrollo temprano de hiperinsulinemia y agotamiento de las células beta. Además presentan hipoinsulinemia severa con muy bajo ingreso de glucosa y por consiguiente nacen con peso bajo (aproximadamente 20% menos que los controles). (Holemans K A. L., Absence of pregnancyinduced alterations in tissue insulin sensitivity in the offspring, 1993)

En ambos casos se produce progenie que desarrolla diabetes gestacional moderada y, por consecuencia, la progenie de estas crías serán hiperinsulinémicas y macrosómicas; han demostrado que la transmisión de los efectos de madres diabéticas a las siguientes generaciones sólo pasa a través de la vía materna. Sin embargo, en ambas líneas (la paterna y la materna), pueden transmitir cambios epigenéticos en las crías; y la línea materna probablemente tenga mayor impacto porque la madre además provee del ambiente uterino para el desarrollo y crecimiento de la cría (Figura 1).

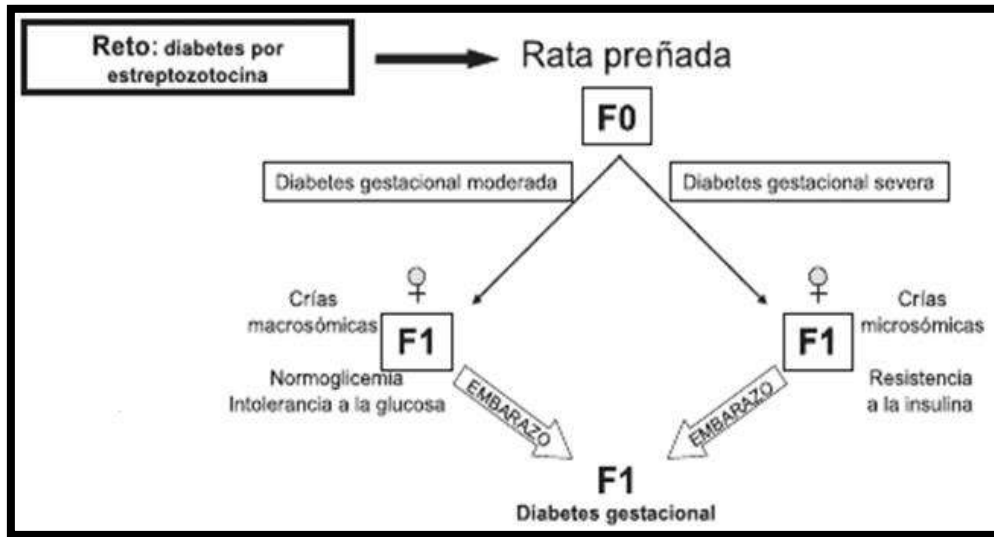


Figura 1. Efectos transgeneracionales por la diabetes gestacional maternal inducida con estreptozotocina. Modificada Zambrano et al. 2009.

INSULINA

Biosíntesis, acciones y mecanismos

La insulina es una hormona polipeptídica que es secretada por las células β de los islotes pancreáticos. El gen responsable de la síntesis de insulina está en el brazo corto del cromosoma 11. La insulina se sintetiza como una sola cadena polipeptídica en el retículo endoplásmico rugoso: la preproinsulina. Esta proteína se encierra en microvesículas en las cisternas del retículo endoplásmico, donde sufre algunas modificaciones en su estructura, con el plegamiento de la cadena y la formación de puentes disulfuro. (Melani F, 2011; Horwitz DL, 2011) Se forma así la molécula de proinsulina que se transporta al aparato de Golgi, donde se empaqueta en gránulos de secreción. (Wollheim, 2006) Durante la maduración de estos gránulos, la proinsulina es atacada por enzimas proteolíticas que liberan la molécula de insulina y el péptido C. Estos gránulos que contienen cantidades equimolares de insulina y péptido C, además de una pequeña proporción de proinsulina sin modificar, son expulsados por un complejo sistema de microtúbulos y microfilamentos hacia la periferia de las células β . Cuando se fusiona la membrana del gránulo con la membrana celular se disuelven ambas en el punto

de contacto y se produce la exocitosis del contenido del gránulo. (Freychet P, 2010; Wollheim, 2006) Las células β de los islotes pancreáticos funcionan como un sensor energético en general y de la glucemia en particular, lo que les permite integrar simultáneamente señales de nutrientes y moduladores. La llegada del alimento al tubo digestivo y su posterior absorción se acompaña de numerosas señales que son: aumento de los niveles de glucosa y de otros metabolitos en plasma, secreción de algunas hormonas gastrointestinales, activación de nervios parasimpáticos, etc. Todas estas señales controlan la secreción de insulina. (Ebina Y, 2005; Ullrich A, 2006)

SECRECIÓN DE INSULINA

En el páncreas existen alrededor de un millón de islotes que representan sólo el 2% de la masa de células pancreáticas. Dentro de los islotes se distinguen cuatro tipos celulares: células A o α , células B o β , células D o δ y células PP o F, que presentan una organización tridimensional con un núcleo central de células β rodeado por el resto de las células endocrinas. En ellos hay alrededor de 1,000 a 3,000 células, siendo las β alrededor del 60%, las α un 20-25% y menos de 10% restante corresponden a células generadoras de somatostatina y polipéptido pancreático δ (delta y PP); (Quesada I, 2006; Brissova M, 2005) hay contacto directo entre células β y las demás células de los islotes, generándose una interacción autocrina entre ellas. (Steiner DF, 2002) Cada una de las hormonas insulares es capaz de influir en la secreción de las restantes. Así, la somatostatina (SS) suprime la secreción de las otras tres. La insulina suprime la secreción de glucagón. El glucagón estimula la secreción de insulina y SS y, cada una de ellas, es capaz de suprimir su propia secreción (acción autocrina). La actividad celular se controla y regula por la acción de nutrientes, otros péptidos y señales paracrinas, igualmente una inervación simpática y parasimpática también ejerce acciones sobre el islote. (Goodner CJ, 2007)

Síntesis y secreción de Insulina en las células Beta

La liberación de insulina en respuesta a la glucosa se da en proporción a la

glucemia, a su vez regulada por la absorción intestinal, la producción y liberación hepática de glucosa y el metabolismo de los tejidos periféricos. Los receptores transportadores de glucosa (*glut 1*, por sus siglas en inglés) de las células β pancreáticas permiten el equilibrio extra e intracelular de glucosa. (<http://articulosdemedicina.com/insulina/>, 30-05-2010)

El metabolismo de la glucosa en la célula β utiliza trifosfato de adenosina (ATP). El aumento en las concentraciones intracelulares de adenosina difosfato (ADP), bloquea los canales de potasio dependientes de ATP despolarizando la membrana, con activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y aumento en la concentración intracelular de calcio que produce exocitosis de insulina. (<http://articulosdemedicina.com/insulina/>, 30-05-2010), (Figura 2).

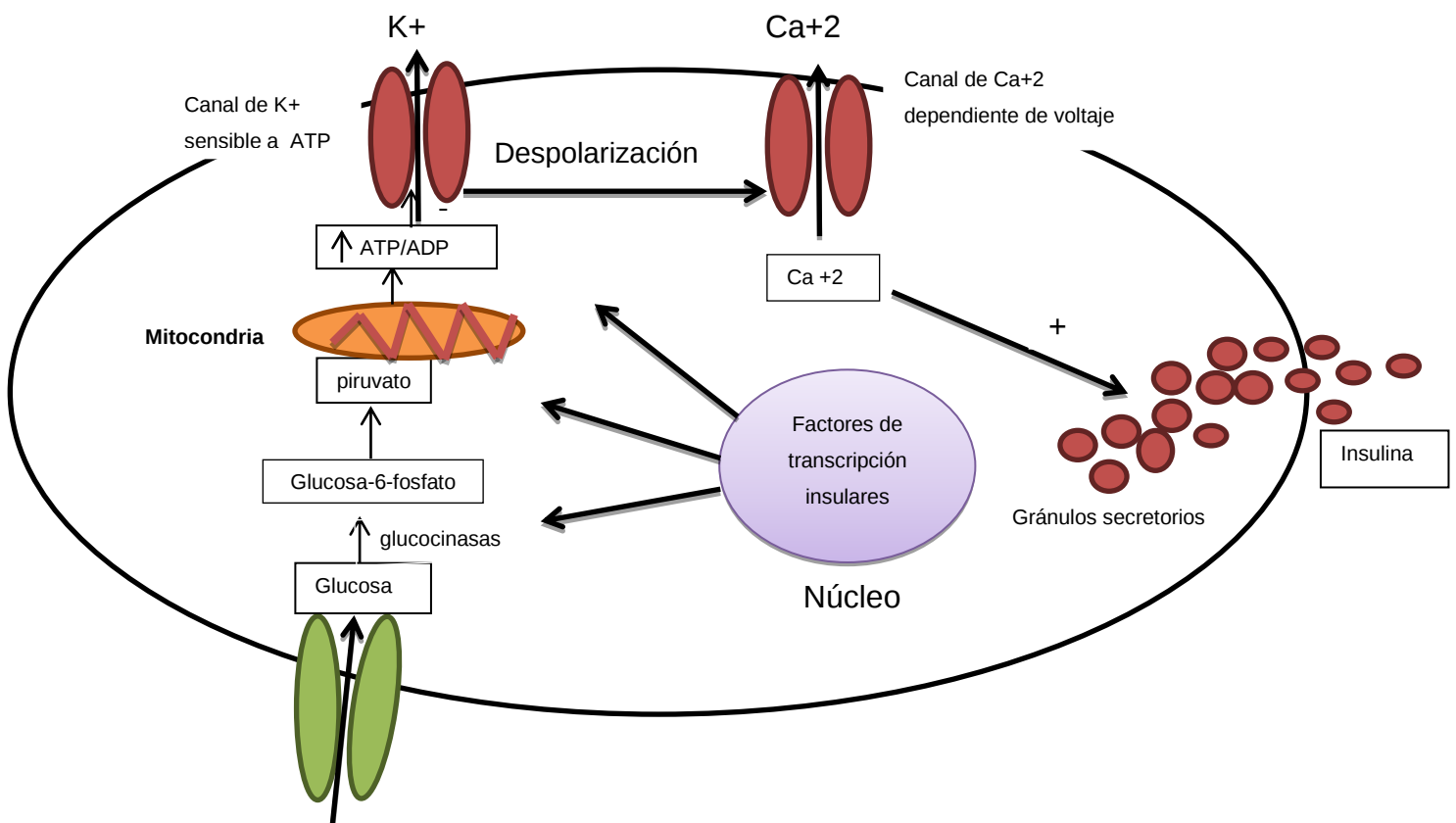


Figura 2. Estimulación de la secreción de insulina.

La insulina circulante a través de la unión a su receptor, aumenta la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, inhibe la producción hepática de glucosa, estimula la glucólisis, la lipogénesis, la glucogénesis y la síntesis de proteínas e inhibe la β -oxidación de ácidos grasos, la glucogenólisis y la proteólisis. (Kido Y J. N., 2001)

El receptor de insulina (RI) es una proteína de membrana citoplasmática que se expresa en células de músculo esquelético, hígado, riñón, cerebro y tejido adiposo. Tiene cuatro subunidades, dos β que poseen actividad tirosina cinasa dependiente de ATP, inhibida por dos subunidades α . Cuando la insulina se acopla a las subunidades α se pierde esta inhibición, con autofosforilación del RI por actividad tirosina cinasa en presencia de ATP. (Kido Y J. N., 2001)

CONTROL DE SECRECIÓN DE INSULINA

A la concentración en ayunas de glucosa de 80-90 mg/dL la secreción de insulina es de 25ng/min/Kg, lo cual tiene una mínima actividad fisiológica.

- 1) El aumento en la concentración de glucosa plasmática aumenta la secreción de insulina.
- 2) Secreción inmediata (3-5 min) a partir de vesículas preformadas (10 veces).
- 3) Secreción a los 15', debido a liberación de insulina preformada y recién formada.
- 4) Los aminoácidos también estimulan la secreción de insulina, aunque en presencia de una glicemia normal, esta estimulación es ligera.
- 5) En presencia de glicemia aumentada, los aminoácidos pueden aumentar la secreción de insulina hasta dos veces.
- 6) Los principales aminoácidos que lo estimulan son la arginina y la lisina.
- 7) Ello es importante ya que la insulina aumenta la formación de proteínas.
- 8) Las hormonas gastrointestinales también estimulan moderadamente la secreción de insulina:

- ❖ Gastrina
- ❖ Secretina

- ❖ Colecistoquinina (CCK)
- ❖ Péptido gástrico inhibidor

- 9) La insulina hace que las células pasen de utilizar ácidos grasos a carbohidratos, en caso de ausencia de insulina esto se invierte.
- 10) Lo que controla dichos cambios es la concentración en glucosa plasmática.
- 11) Si aumenta la glucosa, aumenta la secreción de insulina y el metabolismo celular utiliza carbohidratos
- 12) Si disminuye la glucosa, disminuye la secreción de insulina y el metabolismo celular utiliza ácidos grasos.
- 13) La epinefrina aumenta la glucogenólisis, lo cual aumenta la concentración de glucosa en sangre, además aumenta la hidrólisis de triglicéridos, liberando ácidos grasos al torrente sanguíneo (Revollo I. M., 2010).

METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Los carbohidratos que se ingieren en la dieta son mayoritariamente polisacáridos; y en menor proporción monosacáridos o disacáridos. Los primeros se encuentran presentes en diferentes alimentos como en los cereales, las legumbres y los tubérculos; mientras que los segundos se encuentran en la leche, las frutas y el azúcar. (Stryer L, Bioquímica, 2003)

Las primeras enzimas que participan en la degradación de los polisacáridos son las ptialinas o α -amilasas salivales y las α -amilasas pancreáticas. Las enzimas α -amilasas salivales se caracterizan por tener un pH óptimo de 6.7, teniendo una acción limitada por el poco tiempo que permanecen los alimentos en la boca. En cambio, las α -amilasa pancreáticas, formadas en el páncreas, ejercen su acción en el intestino delgado, siendo vertidas en este tras el vaciado gástrico. Estas últimas enzimas, podrían ser considerados como los principales enzimas de la degradación de los polisacáridos. Ambas enzimas presentan actividad similar, es decir, hidrolizan los enlaces glucosídicos de tipo α -(1,4), respetando los enlaces glucosídicos de tipo α -(1,6). Producto de la acción de estas enzimas se originan los oligosacáridos maltosa, maltotriosa y dextrinas límites. (Nelson DL, 2001)

A continuación las oligosacaridasas (tipo dextrina y glucoamilasa) se encargan de la hidrólisis de estos oligosacáridos, desdoblando la glucosa de la maltosa y la maltotriosa. (Stryer L, Bioquímica, 2003)

Por el contrario, la degradación de los disacáridos ingeridos con el alimento, pueden ser directamente hidrolizados en la superficie de la mucosa intestinal por la acción de un conjunto de enzimas: maltasa, lactasa o sacarasa. Finalizado el proceso de digestión, la mayor parte de monosacáridos por absorber son la glucosa, en menor cuantía fructosa y galactosa. (Cardellá, 2007)

La glucosa formada por la digestión de los carbohidratos de la dieta, se absorbe en el intestino. El transporte a través de la membrana de la mucosa del enterocito depende del tipo de monosacáridos que atraviesa la membrana:

- El transporte de D-glucosa y D-galactosa se lleva a cabo mediante cotransporte sódico.
- El transporte de D-fructosa se lleva a cabo mediante difusión facilitada.
- El transporte de las pentosas, se lleva a cabo mediante difusión simple.

El producto principal de la digestión de los carbohidratos de la dieta es mayoritariamente la glucosa, y en menor cuantía otros monosacáridos (fructosa, manosa y galactosa). (Nelson DL, 2001)

Insulina hormona favorecedora del almacenamiento de la energía que actúa estimulando la captación y el metabolismo de la glucosa, e inhibiendo la producción de la misma en el hígado. La disminución de la glucemia (hipoglucemia), en cambio, desencadena una serie de mecanismos pancreáticos opuestos que conllevan la inhibición significativa de la secreción de insulina y aumento en la secreción de glucagón. El glucagón, cuya función es opuesta a la de la insulina, actúa movilizandando las reservas endógenas en estado de ayuno o cuando la dieta es hiperproteica. (Devlin, 1999)

Metabolismo de los carbohidratos en el hígado

El hígado es el órgano esencial en el mantenimiento de la glucemia en el organismo (homeostasis de la glucemia) mediante un proceso que implica reducir la disponibilidad de glucosa en sangre, almacenándola en forma de reservas, cuando los niveles son superiores a la demanda (estado post-prandial); y degradar estas formas de reserva cuando los nivel de glucosa en sangre disminuyen (ayunas). (Fuentes X, 1998)

El ajuste y la regulación de la captación periférica y la producción hepática de la glucosa están sujetos al efecto que ejercen las hormonas insulina y glucagon, principalmente; haciendo del páncreas un instrumento de ajuste fino que evita fluctuaciones peligrosas de la glucosa sanguínea. Así, cuando el nivel de glucosa en sangre aumenta, el páncreas libera insulina (relación insulina/glucagon alta) promoviendo la utilización y almacenamiento de la glucosa en el hígado y otros tejidos, ya sea con la producción de un segundo mensajero de la acción de la insulina o bien reduciendo una cascada de proteína cinasas que promueve la utilización de glucosa por estos tejidos. En cambio cuando el nivel de glucosa sanguínea disminuye, el páncreas responde liberando menos insulina y más glucagón (relación insulina/glucagón baja), lo cual promueve la producción de glucosa hepática a través de una serie de eventos intracelulares que se activan con el aumento de la concentración intracelular de AMPc. (Boyer, 2000)

Principales enzimas reguladores de la síntesis (gluconeogénesis) y degradación (glucólisis) de la glucosa en el hígado.

Una vez dentro del hepatocito, el destino principal de la glucosa es su utilización para la síntesis de su forma de almacenamiento, el glucógeno. El glucógeno es un polisacárido altamente ramificado formado por la unión de glucosas mediante enlace glucosídico de tipo α -(1,4) y α -(1,6) en los puntos de ramificación. La principal función del glucógeno hepático es conservar la concentración sanguínea de glucosa, en particular durante las etapas iniciales del ayuno. (Fuentes X, 1998)

La síntesis de glucógeno ocurre a partir del precursor activo UDP-glucosa. En la síntesis de este polisacárido intervienen dos enzimas: la enzima glucógeno sintasa y la enzima “ramificante”; el primero de estos enzimas cataliza la formación de los enlaces glucosídicos α -(1,4) de las cadenas lineales, mientras que el enzima “ramificante” forma los enlaces glucosídicos α -(1,6) de los puntos de ramificación, dando lugar a una estructura arboriforme. La glucógeno sintasa es la principal enzima regulador de la vía, y se caracteriza por tener dos formas intercambiables entre sí por fosforilación-desfosforilación: una forma activa y una forma inactiva; siendo la forma desfosforilada la forma activa. (Champe PC, 2006)

Las ramificaciones incrementan el número de terminaciones no reductoras a las que se pueden añadir otras moléculas de glucosa, lo que acelera el ritmo de la síntesis (y también la degradación) del glucógeno e incrementa de manera considerable el tamaño de la molécula. El incremento de glucógeno ejerce un retrocontrol sobre la propia síntesis del glucógeno, disminuyendo la forma activa de la glucógeno sintasa a medida que este se acumula en el hígado. Debido a que la estructura polimérica del glucógeno es muy voluminosa (por el elevado nivel de hidratación de la cadena polisacárida), sus posibilidades de síntesis, y sobretodo de almacenamiento, están físicamente limitadas. (Martínez J, 2001)

No obstante, la capacidad de almacenamiento de glucógeno del hígado es alta, pudiendo llegar a constituir el 10% del peso húmedo de este órgano en una persona bien nutrida. Se estima que la cantidad máxima de glucógeno que puede almacenarse en el hígado (del orden de 100g en un individuo adulto) puede proveer suficiente cantidad de glucosa para cubrir las demandas energéticas corporales durante un tiempo comprendido entre 10 y 15 horas. (Cardellá, 2007)

Una vez recuperados los depósitos de glucógeno, el exceso de glucosa restante es utilizado para la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos. Para ello, la glucosa es convertida en piruvato por el proceso de glucólisis y este es transformado en acetil-CoA por acción de la piruvato deshidrogenada. Así pues,

aunque la glucólisis es una vía universal de degradación de la glucosa cuya función principal es el rendimiento energético en forma de ATP, en el hígado el acetil-CoA obtenido a partir del piruvato es a su vez utilizado primordialmente para la biosíntesis de ácidos grasos. (Nelson DL, 2001)

Los triglicéridos formados en el hígado son liberados al torrente circulatorio en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y del plasma pasan al tejido adiposo para su almacenamiento. (Devlin, 1999)

La glucólisis está promovida por la insulina mediante la estimulación de la actividad de las enzimas reguladoras de la vía: la glucocinasa, la fosfofructocinasa y la piruvato quinasa. Estas enzimas se denominan enzimas reguladores al catalizar reacciones irreversibles y estar sujetos a su vez a control alostérico (concentración de metabolitos) y/o modificación covalente. (Boyer, 2000)

Metabolismo de los carbohidratos en el tejido adiposo

El tejido adiposo es el principal depósito de triglicéridos, una forma de almacenar energía muy importante en el ser humano. Al igual que las células musculares, los adipocitos tienen un sistema de transporte de glucosa (GLUT-4) que requiere de la presencia de insulina para alcanzar la máxima velocidad de captación de glucosa. La síntesis y degradación de los triglicéridos en los adipocitos también está regulada por control hormonal (insulina, glucagón y adrenalina, principalmente). (Martínez J, 2001)

En situación de hiperglucemia, la insulina promueve la glucólisis y esencialmente su función es el aporte de precursores para la síntesis de triglicéridos. Asimismo, el glucagón junto con la noradrenalina y los bajos niveles de insulina, favorece la movilización de ácidos grasos almacenados en el tejido adiposo en situación de hipoglucemia. La oxidación de los ácidos grasos y el glicerol que forman los triglicéridos por el mecanismo de la α -oxidación en las células de muchos tejidos

rinden gran cantidad de energía metabólica útil en forma de ATP. (Champe PC, 2006)

La energía es necesaria para el funcionamiento normal de los órganos del cuerpo. La fuente de energía celular más importante es la glucosa. Muchos tejidos solo pueden utilizar grasas o proteínas como fuente de energía, pero otros, como el cerebro y los eritrocitos, solo pueden utilizar la glucosa. (Cardellá, 2007)

METABOLISMO DE LÍPIDOS

Los ácidos grasos (AG) son los componentes principales de los lípidos complejos (triacilglicerolos, fosfolípidos). Los triacilglicerolos son la forma más importante de almacenamiento de energía en los animales. Este tipo de almacenamiento presenta sus ventajas, al oxidarse el carbono (C) de los AG producen más ATP que cualquier otra forma de C, además, los lípidos están menos hidratados que los polisacáridos, por lo que ocupan menos espacio. Los AG se incorporan a las membranas celulares. El principal órgano de interconversión y metabolismo de lípidos es el hígado. (Felix, 2006)

Biosíntesis de ácidos grasos

El hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria son los sitios más importantes de biosíntesis de AG. (Donal Voet, 2006)

La actividad del tejido adiposo predomina en el rumiante. Los principales sustratos para la síntesis de AG son el acetil-CoA y el NADPH, éstos se generan en la glucólisis, el ciclo de las pentosas y el ciclo de Krebs. La enzima citrato sintasa convierte al acetil CoA y al OAA en citrato y de esta manera logra cruzar la membrana mitocondrial para salir al citoplasma; el citrato es retransformado en acetil CoA y OAA en el citosol por el enzima ATP-citrato liasa. El oxalato se convierte en malato para regresar a la mitocondria e incorporarse al ciclo de Krebs. La enzima málica descarboxila al malato en piruvato que puede ser transportado a la mitocondria. Esta enzima en el citosol genera NADPH, necesario para la síntesis de AG. Las enzimas para la síntesis de AG están organizadas en

un complejo multienzimático en los animales. El complejo es llamado ácido graso sintasa que además incluye la proteína transportadora de acilos (PTA o ACP). Sólo hay una reacción en la síntesis de AG que no ocurre en el complejo, ésta es la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA la cual es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa. El complejo ácido graso sintasa cataliza: la unión entre el acetil-CoA y malonil-CoA, una reacción de condensación, reacciones de reducción, de continuación, de elongación, desaturación. La síntesis de AG produce principalmente ácido palmítico, que será el sustrato para producir una variedad de AG. (Donal Voet, 2006; Felix, 2006)

En la diabetes mellitus tipo I, la deficiencia aguda de insulina produce un aumento rápido de la movilización de ácidos grasos desde los tejidos periféricos hacia el hígado, y determina un aumento de la formación y liberación de lipoproteína de muy baja densidad (VLDV) en este órgano. Al mantenerse el déficit de insulina, se inhibe la síntesis de triglicéridos hepáticos y la formación y liberación de VLDL. Sin embargo, por otro lado, existe una deficiencia de la depuración de triglicéridos plasmáticos, bien por disminución de la actividad de lipoproteína lipasa (LpL), enzima estimulada por la insulina, o por una posible modificación estructural de las VLDL (que las hace menos susceptibles a la acción de la enzima), e incrementa la concentración plasmática de esta lipoproteína. (García E. C., 1996)

Las LDL pequeñas y densas aparecen como consecuencia de las altas concentraciones de VLDL que condicionan estas transformaciones estructurales, de tal manera que se afecta su afinidad por los receptores (Kinoshita, 1990). Como consecuencia, estas LDL pequeñas y densas aumentan su tiempo de vida media en la circulación sanguínea, así como su concentración plasmática, y se favorece de este modo la aterogénesis.

En la hiperlipidemia crónica, el incremento de las lipoproteínas plasmáticas, y principalmente de las LDL oxidadas, ofrece como resultado una lesión endotelial o

el daño funcional de la pared arterial. La LDL oxidada es un quimiotáctico para los monocitos circulantes. De esta manera, estos son atraídos y adheridos a las células endoteliales, favorecen su penetración hacia la íntima, donde se transforman en macrófagos y éstos en células espumosas cargadas de ésteres de colesterol, los cuales están presentes desde las etapas iniciales de la formación de las estrías grasas. (Schwartz CJ, 1992)

Los aspectos principales del metabolismo de lípidos están implicados con oxidación de ácidos grasos para producir energía o la síntesis de lípidos que se llama la lipogénesis. El metabolismo de los lípidos está estrechamente relacionado con el metabolismo de los hidratos de carbono que pueden ser convertidos en grasas. (Ophardt, 2003)

El primer paso en el metabolismo de lípidos es la hidrólisis de los lípidos en el citoplasma para producir glicerol y ácidos grasos.

Dado que el glicerol es un alcohol de tres carbonos, que se metaboliza muy fácilmente en un intermedio en la glucólisis, dihidroxiacetona fosfato. La última reacción es fácilmente reversible si el glicerol es necesario para la síntesis de un lípido. La hidroxiacetona, obtenida a partir de glicerol se metaboliza en uno de los dos posibles compuestos. La dihidroxiacetona puede ser convertida en ácido pirúvico a través de la vía de glicolisis para producir energía. Además, la dihidroxiacetona también se puede usar en la gluconeogénesis para hacer glucosa-6-fosfato de glucosa a la sangre o el glucógeno en función de lo que se requiere en ese momento. (Ophardt, 2003)

Los ácidos grasos se oxidan a acetil CoA en la mitocondria mediante la espiral de ácido graso. El acetil CoA entonces se convierte finalmente en ATP, CO₂, H₂O y usando el ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte de electrones.

Los ácidos grasos se sintetizan a partir de los carbohidratos y de las proteínas de vez en cuando. En realidad, los carbohidratos y las proteínas han

sido primero catalizados en acetil CoA. Dependiendo de los requerimientos de energía, la acetil CoA entra en el ciclo del ácido cítrico o se utiliza para sintetizar ácidos grasos en un proceso conocido como la lipogénesis. (Ophardt, 2003).

β -Oxidación de Ácidos Grasos

Una vez que ha penetrado a la mitocondria el ácido graso experimentará oxidaciones sucesivas por la acción de un conjunto de enzimas localizadas en los compartimentos interiores de la mitocondria. El proceso es denominado β -oxidación por ocurrir en el carbono β del ácido graso obteniéndose al final de las distintas fases un acil – CoA. (Vera, 2011)

El balance energético de la degradación oxidativa de los ácidos grasos está determinado por la estrecha vinculación de la β -oxidación con el ciclo de Krebs, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. El valor real del balance es de 61 ATP. (Londoño., 2011)

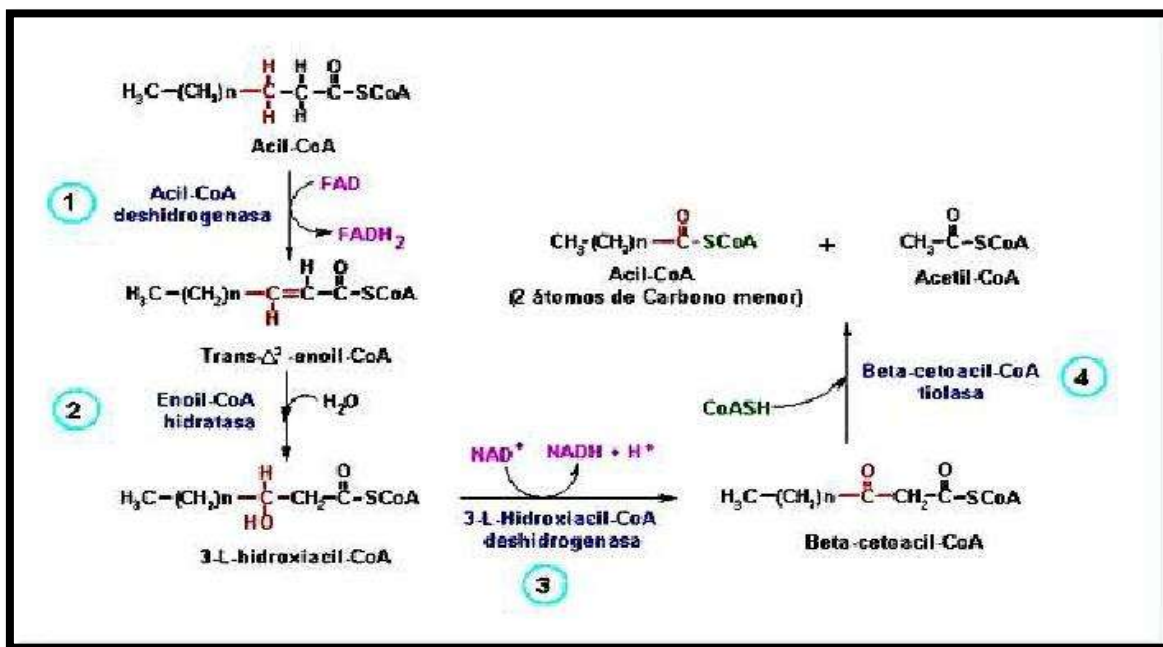


Figura 3. β -Oxidación de ácidos grasos. Torres Vera Reynaldo, 2011. <http://ricarducatse.files.wordpress.com/2011/02/folleto-4-metabolismo-de-lipidos.pdf>

En los ácidos grasos de número impar de átomos de carbono en el proceso de oxidación queda un compuesto de tres átomos de carbono **propionil-CoA** que posteriormente pasa a ser por la secuencia de reacciones:

metil-malonil ----->Succinil CoA que luego se incorpora al ciclo de Krebs. El balance energético total de estas reacciones es de 5 ATP. (Figura 3). (Londoño., 2011; Vera, 2011)

Reacciones de la β -oxidación

Activación de ácidos grasos: ácido graso + ATP produce adenilato del ácido graso y finalmente lo transfiere a CoA.

Reacción:

Ácido graso + ATP + CoA $\rightarrow$ ácido graso-CoA + AMP + PPi

Transporte a través de la membrana de la mitocondria: Sistema de carnitina

1. Activación del ácido graso en el citosol para dar ácido graso-CoA.
2. Paso de ácido graso-CoA a través membrana externa al espacio intermembranal. El ácido graso se transfiere a carnitina produciendo acilcarnitina.
3. Paso a través membrana interna a la matriz. El ácido graso se transfiere a CoA y libera carnitina al espacio intermembranal.

Reacciones del ciclo:

1. Activación: tiocinasa
2. Dehidrogenación: acil CoA deshidrogenasa.
3. Hidratación: enoil CoA hidratasa.
4. Dehidrogenación: L-3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa.
5. Rompimiento: tiolasa

DESTINO DE ACETIL-CoA

- Representa la forma en que carbohidratos, lípidos y algunos aminoácidos entran al ciclo de Krebs.
- Provee los carbonos para la síntesis de colesterol.
- Precursor de la síntesis de ácidos grasos.
- Precursor de la síntesis de cuerpos cetónicos

Lipólisis

La lipólisis es el proceso metabólico mediante el cual los lípidos del organismo son transformados para producir ácidos grasos y glicerol para cubrir las necesidades energéticas. (Vera, 2011)

La lipólisis es el conjunto de reacciones bioquímicas inversas a la lipogénesis. A la lipólisis también se le llama movilización de las grasas o hidrólisis de triacilglicéridos en ácidos grasos y glicerol. (Vera, 2011)

La lipólisis es estimulada por diferentes hormonas catabólicas como el glucagón la epinefrina, la norepinefrina la hormona del crecimiento y el cortisol, a través de un sistema de transducción de señales. La insulina disminuye la Lipólisis. Los ácidos grasos son vertidos al torrente sanguíneo y dentro de las células se degradan a través de la β -oxidación en acetil-CoA que alimenta el ciclo de Krebs. (Londoño., 2011)

En el adipocito el glucagón activa a determinadas proteínas G, que a su vez activan a la adenilato ciclasa, al AMPc y éste a la lipasa sensitiva, enzima que hidroliza los triacilglicéridos. (Figura 4). (Vera, 2011; Londoño., 2011)

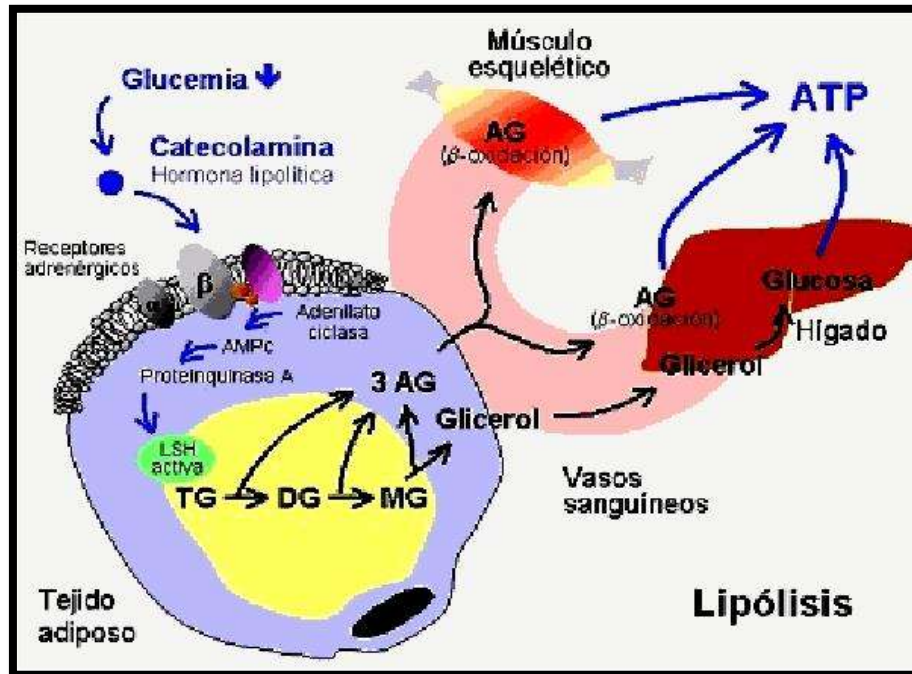


Figura 4. Lipólisis.

Síntesis de ácidos grasos y grasas neutras (lipogénesis)

La síntesis de los ácidos grasos no tiene lugar por la vía inversa a la degradativa.

1. La síntesis se produce en el citosol, a diferencia de la degradación, que tiene lugar en la matriz mitocondrial.
2. Los intermediarios en la síntesis de ácidos grasos están covalentemente unidos a los grupos sulfhidrilo de una proteína portadora de grupos acilo (acyl carrier protein, ACP), mientras que los intermediarios en la degradación de los ac. Grasos están ligados a la coenzima A.
3. El reductor en la síntesis de ácidos grasos es el NADPH.
4. La cadena del ácido graso en crecimiento se alarga por la adición secuencial de unidades de dos carbonos derivadas del acetil-CoA. El dador activado de las unidades de dos carbonos en la etapa de elongación es el

malonil-ACP. La reacción de elongación está dirigida por la eliminación de CO₂. (Londoño., 2011; Vera, 2011)

CUERPOS CETÓNICOS

Son compuestos de bajo peso molecular, solubles en agua, sirven de energía para el músculo y cerebro en condiciones de inanición, son la fuente principal de energía para el corazón. Incluyen: acetona, acetoacetato y beta hidroxibutarato.

Formación de cuerpos cetónicos

El acetil-CoA formado en la oxidación de los ácidos grasos entra en ciclo de Krebs si la degradación de las grasas y la de los carbohidratos están adecuadamente equilibradas. Si en el hígado predomina la degradación de las grasas, el acetil-CoA experimenta un destino diferente. (Londoño., 2011)

La razón de ello es que la entrada del acetil-CoA depende de la asequibilidad del oxalacetato para la formación del citrato ya que la concentración del oxalacetato esta disminuida si no hay carbohidratos disponibles o si no se utilizan apropiadamente. En estas condiciones, el acetil-CoA se desvía para formar acetato y D-3-hidroxibutirato. El acetato, D-3-hidroxibutirato y la acetona se llaman cuerpos cetónicos. (Londoño., 2011; Vera, 2011)

Catabolismo de los lípidos

El principal mecanismo de obtención de energía de los lípidos lo constituye la oxidación de los ácidos grasos, que se obtienen de los triglicéridos mediante hidrólisis por lipasas específicas. Éstos siempre podrán entrar en el ciclo de Krebs, por lo que cuanto más largo sea el ácido graso mayor cantidad de energía se obtendrá en su oxidación. La glicerina también podrá degradarse si se transforma en dihidroxiacetona, entrando en la glucólisis. (Londoño., 2011)

El principal mecanismo de obtención de energía de los lípidos lo constituye la llamada beta-oxidación de los ácidos grasos. Estos ácidos grasos se obtienen de la hidrólisis de los triacilglicéridos mediante el concurso de enzimas específicas y se difunden a la sangre donde los ácidos grasos se unen a las albúminas. Los ácidos grasos ligados a la albúmina son transportados a otros tejidos donde pueden emplearse como fuente energética. (Vera, 2011)

Los ácidos grasos se unirán a una molécula de coenzima A (CoA) en el citoplasma, quedando activados como acil-CoA. De esta forma pasan a la mitocondria, donde sufren el proceso denominado beta-oxidación. Los ácidos grasos se oxidan completamente hasta dióxido de carbono y agua. (Londoño., 2011)

El resultado de cada ciclo oxidativo de la beta-oxidación de los ácidos grasos es la formación de equivalentes reductores (FADH₂ y NADH), una molécula de acetil-coenzima A y una molécula de acil-coenzima A dos carbonos más corta. El acetil-coenzima A se incorpora al ciclo de Krebs para continuar su degradación. Como ejemplo el balance energético de 1 mol de ácido palmítico (16 átomos de carbono) da lugar a 129 ATP. (Vera, 2011)

Malformaciones congénitas en hijos de madres diabéticas

La mayor parte de las malformaciones congénitas en hijos de madres diabéticas ocurre entre la cuarta y séptima semanas de gestación, un periodo crítico en el desarrollo porque se producen procesos teratogénicos. La malformación más frecuente es el síndrome de regresión caudal (agenesia o hipoplasia del fémur y de las últimas vértebras). (Mills JL, 2002; Reece EA, 2003)

Los mecanismos etiopatogénicos de las malformaciones congénitas aún no se conocen con certeza. Puede ser que existan factores genéticos concomitantes que predispongan a los embriones a padecer estas alteraciones o que sean los

factores ambientales los que influyan en el desarrollo anormal. Lo más probable es que ambos interactúen. (Jaquet D, 2002) Se consideró a la insulina, *per se*, factor teratogénico; sin embargo, se demostró que la placenta es una barrera efectiva para evitar el paso de insulina materna al feto, por lo que tendría que ser la insulina fetal la que estuviera produciendo las alteraciones. La producción de insulina fetal se inicia después de haber concluido el periodo crítico para el desarrollo de malformaciones, alrededor de la semana ocho y diez de la gestación. La hiperinsulinemia fetal sólo ocurre durante la segunda mitad de la gestación; es decir, cuando el feto ya pasó la etapa embriogénica, por lo que lo afecta en su crecimiento más que en su desarrollo. (Mills JL, 2002)

Se propuso que la glucosa podría ser el factor ambiental que más afecta el desarrollo durante la embriogénesis. En los hijos de madres diabéticas con pobre control metabólico existe mayor incidencia de malformaciones congénitas; incluso una mínima elevación de la glucosa en etapas tempranas de la gestación provoca aumento en la frecuencia de malformaciones congénitas. (Nordstrom L, 2002)

Alteraciones en las crías de las ratas diabéticas

Al igual que en humanos, la diabetes materna afecta el desarrollo de los fetos de rata, lo cual produce aumento del número de reabsorciones, disminución del número de crías por camada, disminución del peso de las crías, retraso en el crecimiento y aumento de la frecuencia de malformaciones congénitas. (Palomino-Garibay MA, 2003)

Las alteraciones en los hijos de madres diabéticas dependen de la gravedad de la diabetes, el grado de descontrol metabólico y el momento de la gestación en la que se inicia la diabetes. Cuando la madre es diabética antes de la gestación existe mayor incidencia de abortos espontáneos, mortalidad perinatal y malformaciones congénitas. Cuando se trata de diabetes gestacional hay aumento en la cantidad de grasa corporal, macrosomía, hiperinsulinismo fetal, hipoglucemia

fetal, hipoxia, acidosis metabólica y aumento en el índice de muertes perinatales. (Rosenn B, 2004)

En la etapa final de la gestación la muerte intrauterina y perinatal es cuatro veces más frecuente. Las principales causas de morbilidad y mortalidad perinatal son: la hipoxia y la acidosis fetal (síndrome de insuficiencia respiratoria del recién nacido), la hipoglucemia e hipocalcemia. La macrosomía y el control inadecuado de la diabetes materna durante el embarazo también influyen en la mortalidad perinatal. (García-Carrapato, 2003)

La macrosomía que ocurre en el último trimestre de la gestación se ha explicado por la transferencia placentaria de mayor cantidad de glucosa y otros nutrientes. Este aporte adicional de nutrientes acelera la maduración secretora de los islotes fetales y provoca hiperinsulinismo fetal, lo que aumenta el potencial anabólico en el feto y, al mismo tiempo, produce hipoglucemia neonatal. (García-Carrapato, 2003)

El mecanismo que ocasiona las alteraciones en el desarrollo en los embriones de madres diabéticas aún no se conoce; sin embargo, parece ser multifactorial. (Polanco, 2001; Buchanan TA, 2002) La hiperglucemia *per se* tiene gran poder teratogénico. Actúa en diferentes campos celulares, lo cual provoca daño en el ADN (Lee AT, 1993) y produce cierto grado de estrés oxidativo que redundará en aumento en la producción de especies reactivas de O₂ (ROS) (Ornoy A, 2002) y óxido nítrico (NO) (Wentzel P, 2003), así como en la peroxidación de lípidos y la carboxilación de proteínas (Cederberg J B. S., 2001), y disminuye al mismo tiempo los sistemas de amortiguación (Eriksson UJ, Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro., 2001) y los de antioxidantes (Ornoy A, 2002). En etapas tempranas del desarrollo la glucosa puede dañar el ADN y provocar mutaciones que impidan la expresión de genes críticos para la embriogénesis normal. Este daño puede retrasar la duplicación del ADN y, por lo tanto, la división celular, lo que interrumpe los tiempos de los programas del desarrollo necesarios para la organogénesis. De

hecho, aun la hiperglucemia moderada durante un periodo corto es capaz de producir mutaciones al ADN (Buchanan TA, 2002). Se comprobó que el aumento en la formación de ROS y NO tiene gran influencia en el desarrollo de la embriopatía diabética. Aunque no se conoce el mecanismo mediante el cual la hiperglucemia genera aumento en la formación de radicales libres de oxígeno en los embriones de madres diabéticas, hay pruebas de cómo se producen en tejidos como el endotelio de los vasos sanguíneos. Hay tres rutas metabólicas mediante las cuales las mitocondrias producen superóxido, que a su vez activa la proteincinasa C y aumenta la producción de los productos finales de la glucólisis (AGEs), que en conjunto son los responsables de los daños a este tejido en pacientes diabéticos. (Wentzel P, 2003)

En la diabetes materna, el aumento de las concentraciones de ROS afecta la producción de la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En embriones de ratas diabéticas se observó *in vivo* e *in vitro* disminución en la producción de la GAPDH, lo que se correlaciona directamente con aumento en la frecuencia de malformaciones congénitas. De hecho, la adición de iodoacetato, inhibidor de la acción de la GAPDH, produce efecto similar al que presentan los embriones cultivados en ambiente hiperglucémico. (Wentzel P, 2003) Un efecto muy importante de la sobreproducción de ROS podría ser el aumento en la peroxidación de lípidos. Los productos principales de la peroxidación de los lípidos, los hidroperóxidos (estimulantes de la biosíntesis de prostaglandinas pero inhibidores de prostaciclina), producen desequilibrio perjudicial para el embrión. (Cederberg J B. S., 2001)

Desde 1990, en que se describieron los isoprotanos, se utilizan como marcadores de la peroxidación lipídica. Los isoprotanos son isómeros de las prostaglandinas que se forman a través de la reacción no enzimática del ácido araquidónico con radicales libres. En ratas madres diabéticas y sus fetos, se encontró el isoprotano 8-iso-prostaglandina F-2 α mucho más elevado que en ratas control, lo que indica aumento en las concentraciones de peroxidación lipídica. También se observó

aumento en la carboxilación proteica que se relaciona con daño tisular en el estrés oxidativo en las madres diabéticas y en sus fetos. Estos dos parámetros correlacionan positivamente con el aumento en las malformaciones congénitas y en las reabsorciones, lo que indica la participación de la sobreproducción de ROS en la génesis de la embriopatía diabética. (Cederberg J B. S., 2001)

La hiperglucemia disminuye la eficiencia de los mecanismos amortiguadores de las especies reactivas de O₂, además de aumentar la producción de ROS. En cultivos de embriones de rata diabética se observó disminución de enzimas antioxidantes, específicamente la superóxido-dismutasa (SOD) y la catalasa, lo que correlaciona positivamente con el aumento en la incidencia de malformaciones congénitas, disminución del peso y del contenido de proteínas de los productos. También se comprobó que la adición de citolina, SOD, catalasa y glutatión peroxidasa tiene efecto protector en embriones de ratas cultivados en suero diabético; sobre todo la SOD, que disminuye el retraso en el crecimiento y las malformaciones embrionarias. (Eriksson UJ, Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro., 2001)

Además, existe disminución del glutatión, el cual está en la mayor parte de las células y juega un papel importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo, ya que actúa como amortiguador contra ROS. Se detectó también disminución en los antioxidantes de bajo peso molecular tanto en el saco vitelino como en los embriones de ratas diabéticas. (Ornoy A, 2002) La adición de antioxidantes, como las vitaminas C molécula hidrofílica que puede amortiguar varios radicales y E antioxidante lipofílico que interfiere con la reacción en cadena de la peroxidación lipídica al medio de cultivo diabético puede disminuir el efecto de la diabetes en la organogénesis. (Cederberg J S. C., 2001) Además de la hiperglucemia, el ambiente intrauterino está alterado por la sobreproducción de cuerpos cetónicos, en especial del β hidroxibutirato, que es el producido en mayor cantidad en los fetos de ratas diabéticas. (Freinkel N, 2001)

Tanto la glucosa como los cuerpos cetónicos actúan sinérgicamente para producir retraso en el crecimiento e inducir malformaciones. Se demostró que la adición de β -hidroxibutirato a los cultivos de embriones de ratas diabéticas aumenta hasta 29% la tasa de malformaciones en comparación con los cultivos en los que únicamente se utilizó suero hiperglucémico; por otro lado, la adición de los inhibidores de somatostatina exacerba la inducción de malformaciones producidas por los cuerpos cetónicos y la glucosa. (Freinkel N, 2001) Se estudió el papel de la placenta en la transferencia de grandes cantidades de glucosa en fetos de ratas diabéticas y su relación con las alteraciones embrionarias que sufrieron. Se observó que las placentas de ratas diabéticas son más grandes y pesadas que las de las controles (Polanco, 2001), con mayor cantidad de glucógeno desde el día 16 hasta el 22, así como de contenido de ADN, lo que sugiere que estas placentas continúan con el proceso de síntesis del ADN mucho después que éste terminó en las placentas controles. Se observó que el flujo sanguíneo total de la placenta se encuentra disminuido, para lo cual se aseveró que la placenta aumenta de tamaño para compensar la disminución del flujo. A pesar de que el flujo sanguíneo en las placentas de madres diabéticas se encuentra disminuido, no se modifica la transferencia placentaria de grandes cantidades de glucosa hacia el feto. Las placentas de ratas diabéticas también acumulan grandes cantidades de glucógeno, lo que se debe a la hiperglucemia de la madre. Estas placentas tienen anomalías estructurales como: degeneración cística del espongiotrofoblasto, aumento en el volumen de la capa laberíntica e hipervascularización, así como células gigantes del trofoblasto en etapas en las que éstas no deberían estar presentes. Últimamente se encontraron alteraciones en proteínas de matriz extracelular (como laminina y fibronectina) en placentas de ratas diabéticas que pueden explicar, en parte, las alteraciones morfológicas y funcionales en las mismas. (Loredo, 2003)

Estas modificaciones se observaron en placentas de ratas con diabetes semejante a la tipo 1 y correlacionan positivamente con la disminución en el peso y la talla de los fetos. (Loredo, 2003)

MODELOS DE DIABETES EXPERIMENTAL

En humanos no se pueden realizar estudios para conocer la etiología de la Diabetes Mellitus, ni se pueden identificar en las gestantes diabéticas los teratógenos que afectan la embriogénesis. Por esta razón, se hace necesario recurrir a modelos experimentales ya que las características generales de la diabetes en animales son similares a las de la diabetes humana.

Se conocen cuatro grandes grupos de modelos experimentales para inducir la diabetes dependiendo de la metodología empleada:

- a) Inducción mediante procedimientos quirúrgicos (diabetes quirúrgica).
- b) Inducción por infecciones vírales (diabetes viral).
- c) Diabetes espontánea.
- d) Inducción mediante agentes químicos (diabetes experimental).

Diabetes experimental

Se ha demostrado que la administración de ciertas sustancias químicas a animales provoca síntomas similares a la diabetes. Entre estos agentes químicos, el aloxano y la estreptozotocina (STZ) han demostrado ser los más efectivos por lo que son los más comúnmente utilizados. Los valores de referencia son de 200mg/dl para considerar a una rata diabética.

Ambas sustancias actúan destruyendo las células β -pancreáticas; sin embargo, aunque los niveles de insulina en los animales tratados son muy bajos, no hay ausencia total de la hormona por lo que pueden sobrevivir durante meses sin tratamiento con insulina. (Bell RH, Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J, 2001)

Estreptozotocina (STZ), es un antibiótico producido por *Streptomyces acromogenes*; (Vaura JJ, 2002) su denominación química es N-(metilnitrosocarbamoil)- α -D-glucosamina. La molécula es estructuralmente similar

a la glucosa, (Figura 5) por lo que explica su acción específica irreversible sobre las células β -pancreáticas. (Johanson EB, 2001; Rodriguez B, Streptozotocin-Induced diabetes: induction, mechanism and dose dependency. En: Experimental models in diabetes, ed. John H McNeill. , 2002) En sistemas *in vivo* se halló que este fármaco penetra a las células β del páncreas a través de los transportadores GLUT2, porque tiene gran afinidad a la glucosamina del anómero del receptor. (Schnedl WJ, 2002)

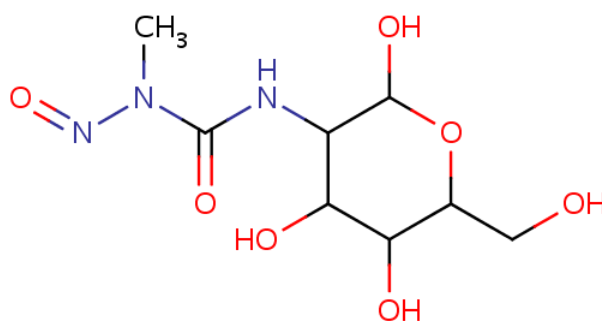


Figura 5. Estreptozotocina. La cadena de nitrosurea le confiere una acción citotóxica que daña el DNA de las células β -pancreáticas.

La STZ tiene un efecto directo sobre el páncreas, sin afectar otros órganos (Johanson EB, 2001; Rodríguez B, 2002) y produce hiperglucemia, sin cetogénesis ni elevación de ácidos grasos libres. (Méndez DJ, 2004) Es ideal para inducir la diabetes en ratas gestantes para investigar su efecto en el desarrollo fetal. Esto se debe a que en solución a la temperatura ambiente tiene una vida media muy corta, de aproximadamente 5 minutos; así mismo una vez inyectada se elimina del torrente sanguíneo en un lapso máximo de 4-6 horas. Estas propiedades de la SZT aseguran que al administrarla el 5º día de la gestación, poco antes de la implantación del blastocisto, las alteraciones encontradas en los productos (embriones, fetos, o recién nacidos) sean consecuencia de la hiperglucemia materna y no por la acción de la SZT. (Polanco A. , 2001)

La estreptozotocina actúa sobre el ácido desoxirribonucleico (DNA), ocasionando dos alteraciones importantes: en primer lugar, mediante una reacción de

alquilación sobre el DNA altera los mecanismos fundamentales de la proliferación celular; además produce enlaces cruzados entre dos cadenas de DNA o con la unión de una proteína nuclear, alterando la integridad y función del DNA, este último proceso provoca la formación de enlaces interfilamentosos responsables del efecto citotóxico de este agente alquilante (*Bhuyan, 1970; Marcus y Coulston, 1991; Bennett y Pegg, 1981*) describen a la estreptozocina como un potente agente de metilación del DNA, particularmente en la posición O-6 de la guanidina, que por su alta capacidad de metilación provoca necrosis celular, en roedores esto ocasiona una reducción del 60 al 65% en la secreción de insulina (*Kahn, 1996; Bernard et al., 1998*), de hecho Kahn (1996) considera que se comparten características fenotípicas con la diabetes mellitus tipo 1 del humano.

DIABETES Y GESTACIÓN

La DM tiene dos modalidades de presentación: la **pregestacional** que puede ser tipo 1 o 2 según la clasificación etiológica de la ADA (Asociación Americana de Diabetes), es un trastorno metabólico previo a la instauración del embarazo. La diabetes mellitus gestacional (clase IV), se manifiesta exclusivamente durante la gestación. En ambos casos se genera un ambiente no óptimo durante la gestación que compromete el desarrollo del embrión y/o feto relacionado principalmente con niveles altos de glucosa en sangre.

Crecimiento fetal. Los hijos de madre diabética (HDM) mantienen la homeostasis a costa de una serie de ajustes metabólicos que comprometen su capacidad de adaptación al medio extrauterino. Esta situación puede modificar el patrón de crecimiento intrauterino, ya sea incrementando el peso o bien retardando el desarrollo, lo que provoca un aumento de los riesgos de morbilidad y mortalidad.

Macrosomía. La palabra deriva del griego macros (grande) y soma (cuerpo). Su manifestación clínica es un aumento del tamaño corporal. En el caso de los HMD su origen se ha explicado de diversas maneras. Primero se pensó que el

crecimiento excesivo de los HMD era consecuencia de un pobre control de la diabetes durante el embarazo, en ausencia de enfermedad vascular. Más tarde Pedersen (Pedersen, 2002) estableció que en los HMD se involucraba el aumento tanto del tamaño corporal como de los órganos internos, especialmente hígado, corazón, bazo, timo, glándulas adrenales y músculos esqueléticos. Para explicar este fenómeno, el autor propuso un mecanismo denominado hiperglucemia-hiperinsulinemia, según el cual la hiperglucemia materna causa hiperglucemia e hiperinsulinemia fetal. No obstante, en la actualidad se sabe que la diabetes y la hiperinsulinemia fetal no solo involucran el aumento de la glucosa plasmática, resultante de alteraciones en la homeostasis de carbohidratos, también se incrementan los ácidos grasos libres y los triglicéridos, así como los niveles plasmáticos de aminoácidos como la alanina, serina e isoleucina. (Neiger, 2002) Con base en esta información, se diseñó un nuevo modelo para explicar la macrosomía de los HMD. Se piensa que la hiperinsulinemia fetal aumenta el consumo celular de glucosa y facilita la incorporación de aminoácidos a las proteínas; reduciendo el catabolismo protéico. Esto determina que en las últimas 12 semanas del embarazo diabético mal controlado, el feto deposite 60% más tejido graso que el feto normal. (Dar P, 2003)

JUSTIFICACIÓN

En la última década la Diabetes Mellitus ha incrementado a nivel mundial, de manera exponencial. La incidencia de esta enfermedad en mujeres en edad reproductiva ha aumentado, y con ello la posibilidad de que se manifieste durante el embarazo. Esta situación se relaciona con el riesgo de infertilidad, mortalidad materna y fetal, así como morbilidad neonatal debida principalmente a malformaciones congénitas. Además se ha observado que la Diabetes Gestacional, predispone al feto a la manifestación de diversas patologías, como los factores involucrados en el síndrome metabólico una vez que alcanza la edad adulta, al producir cambios en la programación de su desarrollo fetal.

La imposibilidad práctica y ética de investigar este proceso en mujeres gestantes diabéticas, hace indispensable realizar estudios experimentales en animales que permitan determinar si la diabetes materna produce cambios en el desarrollo fetal que repercutan en la salud de la siguiente generación.

Por esta razón, para evaluar cómo las condiciones de ambiente subóptimo intrauterino durante la diabetes gestacional repercuten sobre el estado de salud del feto, nos planteamos lo siguiente:

HIPÓTESIS

El estado hiperglucémico gestacional produce alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y de lípidos en crías de ratas madres con diabetes experimental.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos en crías de ratas con diabetes gestacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Establecer un modelo de diabetes gestacional en rata.
- 2.- Determinar alteraciones en el metabolismo de carbohidratos en crías de ratas diabéticas.
- 3.- Determinar alteraciones en el metabolismo de lípidos en crías de ratas diabéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales empleados en el presente trabajo fueron ratas hembra adultas de la cepa Wistar de 12 semanas de edad con un peso de 300 ± 20 g, las cuales fueron mantenidas en el bioterio del Instituto de Químico-Biológicas de la U.M.S.N.H., siguiendo los protocolos vigentes para el uso de animales de investigación ([SAGARPA, 2001](#)), con alimento y agua *ad-libitum*, ciclos de luz y oscuridad de 12h (7-19h), temperatura de 24.0 ± 2 °C y humedad relativa de $60.0 \pm 5\%$.

Inducción de Diabetes Mellitus Experimental

A las ratas, se les determinó la etapa del ciclo estral mediante frotis vaginal. Posteriormente, empleando el método de la triada, se colocaron tres ratas hembras en estro con un macho de fertilidad comprobada, manteniéndolos juntos en la misma jaula toda la noche. Por la mañana, se confirmó el apareamiento con base en la existencia del tapón vaginal mucoso y/o la presencia de espermatozoides. Ese día se consideró como el día cero de la gestación.

Una vez gestantes, al grupo experimental conformado por seis ratas, se le administró estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal (IP), en dosis única de 45 mg/Kg de peso, disuelta en solución amortiguadora de citratos pH 4.5; al grupo control se le administró un volumen equivalente del vehículo. Cuarenta y ocho horas después se cuantificó la glucosa en sangre obtenida por una punción de la vena caudal, empleando un glucómetro (Accu-Chek® performa) y su correspondiente tira reactiva. En estudios previos, se ha reportado que cifras iguales o superiores a 243mg/dL de glucosa en ayuno sugieren la presencia de DM en ratas y ratones. (Han et al.2008) Se consideraron diabéticas aquellas ratas que presentaron un nivel de glucosa $\geq$ a 200 mg/dl. Para estos grupos diabéticos,

solo se incluyeron las ratas preñadas que mantuvieron durante todo el embarazo un nivel de glucemia mayor o igual al valor mencionado.

Es importante señalar que la SZT inyectada a las madres gestantes se administró al cuarto día antes de la implantación del blastocisto, lo que sucede hacia el sexto día de gestación en la rata. Además, mediante estudios de farmacocinética se ha demostrado que este fármaco se elimina del torrente sanguíneo en un lapso máximo de 4-6 horas. (Rodriguez B, Streptozotocin-Induced diabetes: induction, mechanism and dose dependency. En: Experimental models in diabetes, 2001) Esto determina que los resultados obtenidos no se atribuyan a la SZT sino al efecto que tenga la hiperglucemia materna durante la gestación.

Durante el periodo de gestación se realizó lo siguiente:

1. Registro diario del peso corporal usando una balanza granataria con canastilla TRIPLE BEAN, marca OHAUS®.
2. Medición de glucemia, 1 vez/ semana, empleando un glucómetro Accu-chek® performa y su correspondiente tira reactiva Accu-chek® performa.

Obtención de muestra sanguínea intracardiaca

Antes del sacrificio de las crías de las ratas tuvieron alimento *ad libitum* debido a que las crías de ratas diabéticas, teniendo un mayor cuidado debido que presentaron microsomía, bajo peso etc.

A los 21 días, las ratas madres y crías fueron anestesiadas con pentobarbital 63mg/kg, se tomaron muestras por vía intracardiaca, y se obtuvo muestra sanguínea en ayuno para realizar la determinación de lo siguiente:

1. Glucosa.
2. Triglicéridos.
4. Colesterol.

5. HDLD**6. LDLD****7. Lípidos totales.**

NOTA: La glucosa, los triglicéridos, el colesterol, HDLD, LDLD y los lípidos totales se determinaron en espectrofotométricamente con un kit de reactivos de la marca Randox en un equipo marca spectronic® 20 genesys™ (La información de la metodología empleada para cada una de las determinaciones se encuentra descrita en la sección de anexos).

Medición de glucosa

La glucosa se midió antes del embarazo y fue monitorizada durante la preñez cada 7 días, durante los 21 días que dura la preñez en la rata, con ayuda de un glucómetro la muestra se obtuvo de la arteria caudal de las ratas. Al terminar el destete (21 días), las ratas madre fueron sacrificadas y al cumplir las crías un mes de edad fueron sacrificadas obteniendo antes una muestra sanguínea por vía intracardiaca.

Determinación de los niveles de lípidos

El colesterol, los triglicéridos y la glucosa se determinarán por los métodos especificados en el anexo.

Peso

Las madres gestantes y las crías de cada uno de los grupos se pesaron diariamente en una balanza granataria con canastilla.

RESULTADOS

Características de las crías

Fue observada una alta tasa de mortalidad en la descendencia de ratas que cursaron con diabetes durante el embarazo, algunas de las crías nacieron muertas, mientras que otras fallecieron pocos días después del alumbramiento. Este fenómeno no se observó en las crías de ratas control (CRC), pues el número de individuos por camada permaneció constante hasta el momento del sacrificio.

Se monitoreó la glucosa de las ratas madres durante el embarazo, para observar la correcta implementación del modelo de diabetes mellitus experimental con respecto al grupo control, y se obtuvieron los siguientes resultados.

Valores obtenidos en ratas diabéticas mayores a 650 mg/dL este valor es el máximo medible por el glucómetro utilizado.

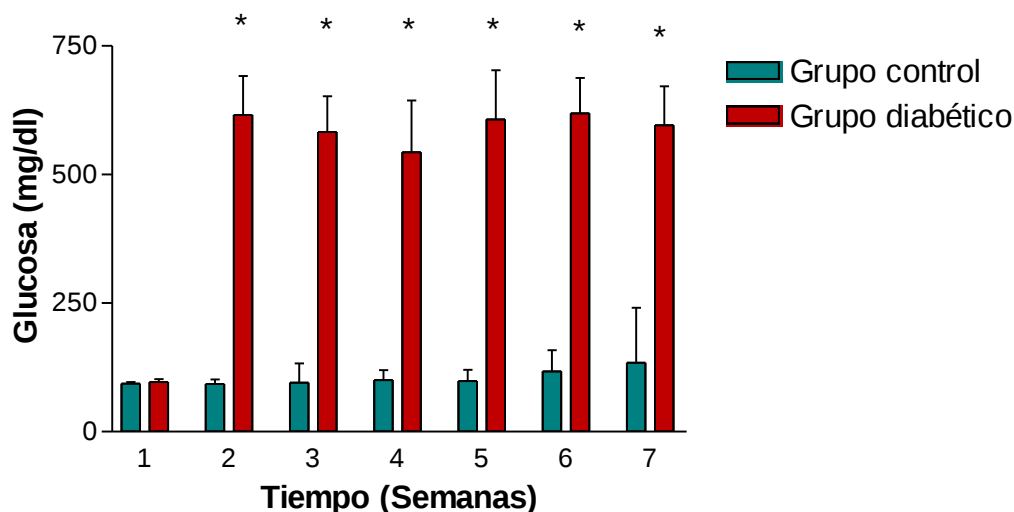


Figura 6. Niveles de glucosa de las ratas gestantes de los grupos control y diabético. Promedio y desviación estándar de 6 ratas por grupo. * $p < 0.05$, t-Student.

El registro de peso corporal se puede observar en la figura 4, donde se puede apreciar una disminución significativa de peso en las ratas diabéticas con respecto al grupo control.

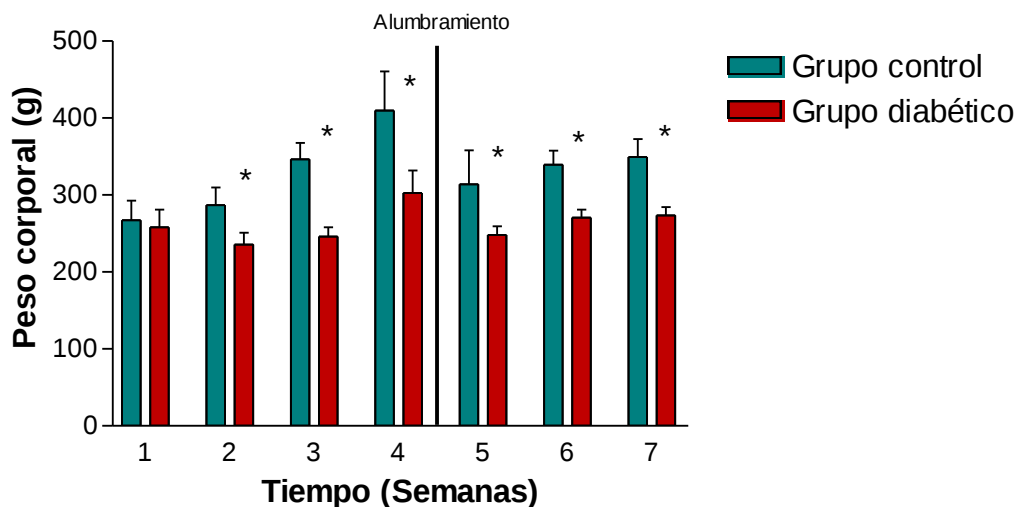


Figura 7. Peso corporal de las ratas madre. Promedio y desviación estándar de 6 ratas por grupo. * $p < 0.05$, t-Student.

Las crías de las ratas diabéticas mostraron una disminución significativa de peso como se observa en la figura 5.

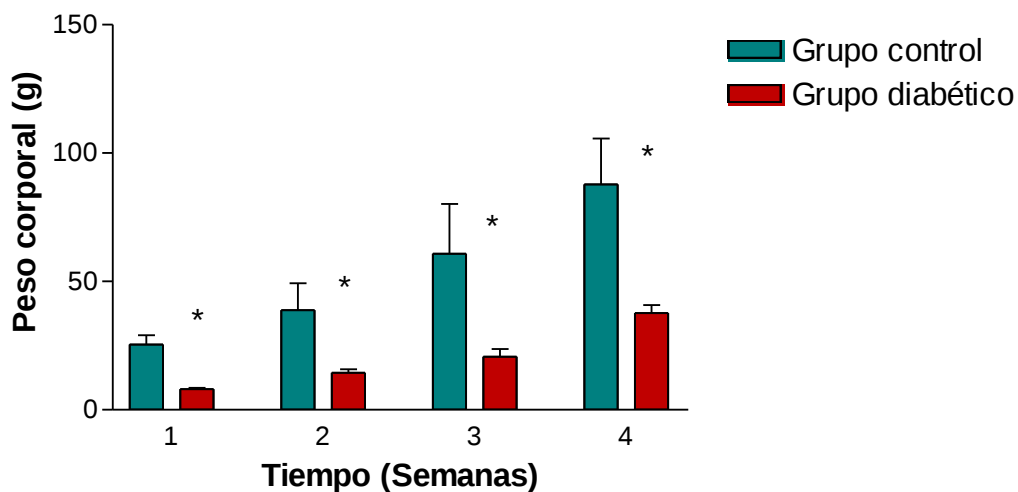


Figura 8. Peso corporal de las crías. Promedio y desviación estándar de 6 ratas por grupo. * $p < 0.05$, t-Student.

A un mes de nacidas, las crías de las ratas diabéticas mostraron un índice glucémico inferior a las descendientes de las ratas control ($p < 0.05$).

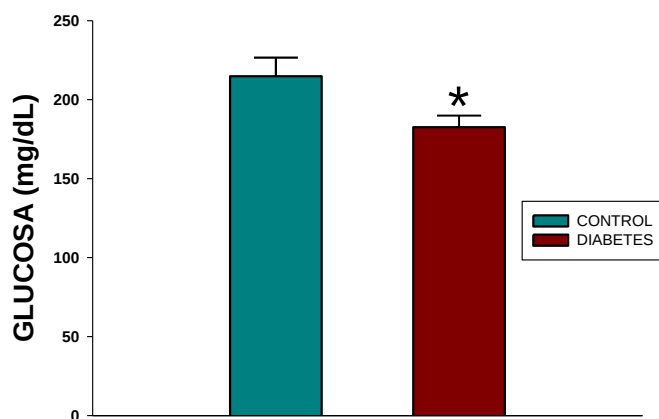


Figura 9. Niveles sanguíneos de glucosa. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento. * $p < 0.05$, t-Student.

Después de un mes de nacimiento de las crías, en las descendientes de ratas diabéticas el nivel de triglicéridos 113.6 ± 16.01 mg/dl es un poco mayor que el de las crías de madres control, las cuales muestran un valor de 100.4 ± 18.22 mg/dl; al realizar la comparación entre grupos, esta diferencia no es significativa.

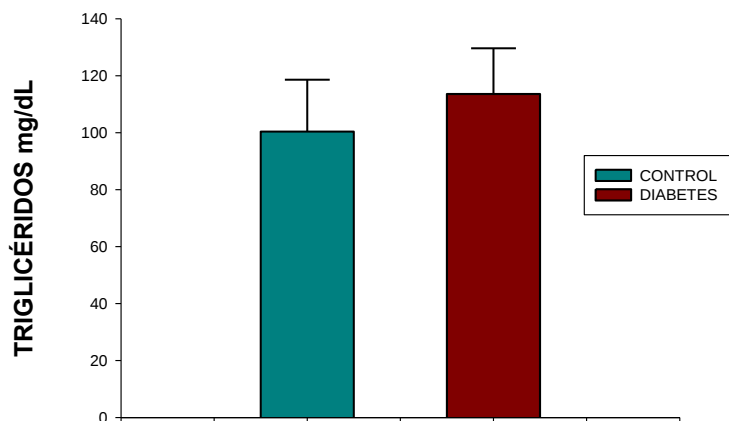


Figura 10. Niveles sanguíneos de triglicéridos. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento.

Una vez que transcurrió el tiempo de un mes, en las crías de ratas diabéticas el nivel de colesterol en sangre fue de 92 ± 2.88 mg/dL, un valor más elevado que el de las crías de madres control que alcanzaron 71.8 ± 3.21 mg/dL ($p < 0.05$).

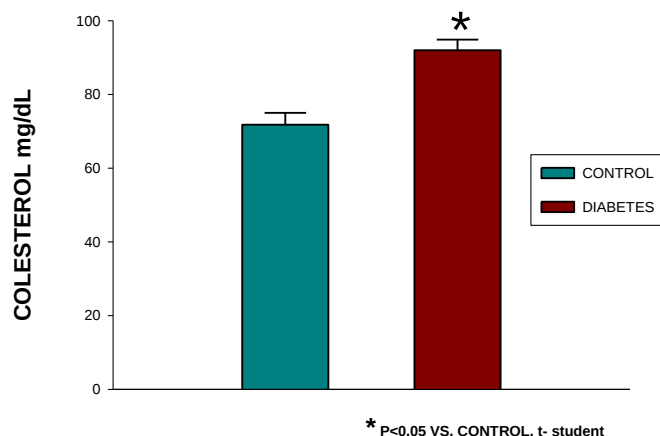


Figura 11. Niveles sanguíneos de colesterol. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento. * $p < 0.05$, t-Student.

Sin embargo, al comparar entre los índices de lipoproteínas de alta densidad, no hubo diferencia significativa entre los grupos (crías control 46.44 ± 2.09 mg/dl vs. crías diabéticas 43.16 ± 1.04 mg/dl).

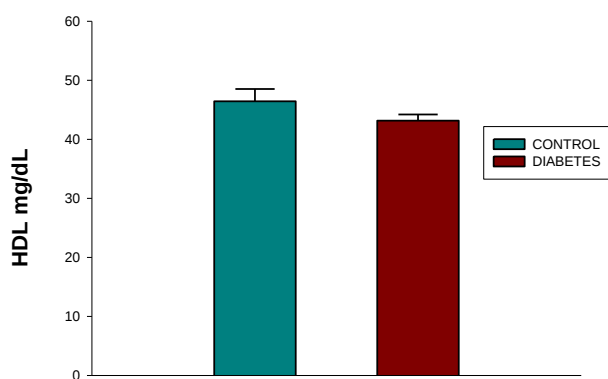


Figura 12. Niveles sanguíneos de HDL. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento.

Mientras que los valores de lipoproteínas de baja densidad, tuvieron un incremento considerable en las crías diabéticas $18.66 \pm 0.98 \text{ mg/dl}$ al compararse con el grupo control $29.24 \pm 2.12 \text{ mg/dl}$.

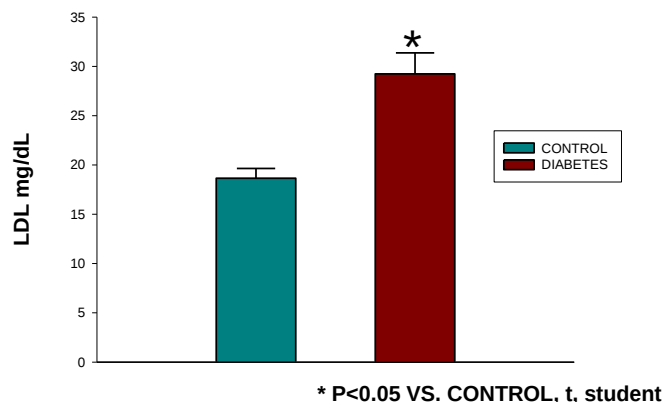


Figura 13. Niveles sanguíneos de LDL. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento. * $p < 0.05$, t-Student.

Al valorar el balance de lípidos totales en sangre, se observó que la concentración tiene un valor de $309.96 \pm 37.78 \text{ mg/dl}$ en crías de ratas control, lo que es menor que los niveles del grupo de crías diabéticas, quienes alcanzaron un valor de $370.08 \pm 33.81 \text{ mg/dl}$ ($p < 0.05$).

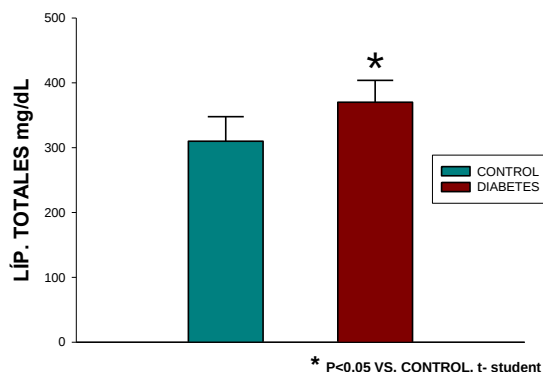


Figura 14. Niveles sanguíneos de lípidos totales. Cada valor muestra el promedio $\pm$ error estándar en 5 crías de madres control con 5 crías de madres diabéticas con un mes de nacimiento. * $p < 0.05$, t-Student.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio, mediante la administración de una dosis única de STZ de 45 mg/kg vía IP se implementó un modelo de diabetes mellitus experimental en ratas gestantes. Los niveles de glucosa en sangre, inicialmente en ambos grupos tuvieron valores normales de 93.16 ± 3.60 mg/dl. Una vez inducida la diabetes con STZ, se elevaron los valores de glucemia en las ratas del grupo diabético alcanzando niveles superiores a 400 mg/dL (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), la hiperglucemia en el grupo diabético se mantuvo hasta el final del experimento y fue significativamente mayor que los niveles de glucosa del grupo control ($p < 0.05$). El peso corporal de las ratas diabéticas se mantuvo en niveles inferiores con respecto al control, y este no alcanzó en ningún momento los niveles normales de peso (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), se observaron también algunos signos de la patología diabética. Lo que concuerda con estudios realizados por otros investigadores (Bell, 1983; Rodríguez, 1999; Rakieten, 1963), demostrando con ello que nuestro modelo de diabetes mellitus gestacional fue implementado correctamente.

Estudios experimentales de diabetes gestacional severa, demuestran que en la patología diabética se produce un retraso en el crecimiento fetal e incremento de días en el periodo de gestación, comparado con lo que sucede con las ratas no diabéticas (Erikson, 1980). En resultados de nuestra investigación observamos efectivamente en las crías de madres diabéticas, que no tuvieron un control de su hiperglucemia durante la gestación, presentaron una disminución significativa de peso al compararse con su control ($p < 0.05$), la diferencia fue de hasta un 36.38% menos al mes de edad de las crías (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Al mes de nacimiento, las crías de las ratas diabéticas mostraron un índice glucémico significativamente inferior a compararse con las descendientes de las ratas control (Figura 6). Esto podría deberse a que durante el periodo intrauterino

los fetos sometidos al estrés hiperglucémico desarrollan una sobreproducción de insulina; una vez que nacen y se alimentan por sí mismas, la producción de insulina continua siendo elevada por lo que la glucosa es absorbida en mayor proporción por las células ya que la insulina es una hormona que extrae la glucosa de la sangre (A.D.A.M., 2013).

Los resultados obtenidos muestran que en las crías de ratas diabéticas el nivel de colesterol es significativamente mayor que en el grupo control (figura 15). Un valor bajo de colesterol HDL observado en resultados de crías de madres diabéticas (figura 12); es un indicador firme de enfermedad coronaria además tiene el riesgo, de padecer la enfermedad cardíaca coronaria debiéndose ésta a diversas causas: triglicéridos elevados, sobrepeso y obesidad, inactividad física, tabaco, ingestas muy altas de carbohidratos (>60% de calorías) y ciertas drogas como los esteroides, anabolizantes.

Algunas investigaciones indican que un colesterol LDL elevado es una causa mayor de enfermedad cardíaca coronaria. Fenómeno observado en las crías de ratas diabéticas en cuanto a las LDL, lo que tuvo repercusión en el incremento sobre la cantidad de lípidos totales disponible en el torrente sanguíneo (figura 16 y 17). Como consecuencia, estas LDL pequeñas y densas aumentan su tiempo de vida media en la circulación sanguínea, así como su concentración plasmática (Kinoshita, 1990). Existe una correlación entre concentraciones elevadas de colesterol- LDL en plasma y la incidencia de aterosclerosis, base del infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares. Por lo que diversos estados patológicos se ven asociados con niveles elevados de LDL: nefrosis, diabetes, obesidad, algunos medicamentos y el tabaco (Tietz, 1991; Young, 1997).

Una elevación de la fracción LDL con respecto al HDL se ha relacionado con incremento en la viscosidad de la sangre, lo que involucra un mayor gasto cardíaco y que con el tiempo puede originar hipertensión, aterosclerosis, o enfermedad cardíaca coronaria (Bierman, 1992). Estos resultados evidencian que

la DG causa alteraciones transgeneracionales como se ha descrito por algunos autores (Zambrano, 2009).

CONCLUSIÓN

Debido a la prevalencia que existe en esta patología al obtener los resultados logramos concluir que:

- ❖ Las ratas tratadas con estreptozotocina presentaron signos de la patología diabética, además bajo peso el cual a pesar del embarazo nunca alcanzó a su respectivo control y un retardo en el periodo gestacional. El impacto en su salud fue tan significativo que incluso en algunos de los individuos experimentales provocó la muerte.
- ❖ Con respecto a las crías de ratas diabéticas, se observó una disminución de crías por camada e incremento del índice de muerte perinatal. Al nacer mostraron microsomía y retraso en el crecimiento; así como una disminución significativa de peso.
- ❖ Además, las crías de ratas diabéticas presentan alteraciones en su metabolismo, observándose cambios en los niveles de glucosa, colesterol, HDL, LDL y lípidos totales en la sangre.

PERSPECTIVAS

- Dar seguimiento a las crías de las madres diabéticas para evidenciar cambios tardíos en el metabolismo. Ya que dichos cambios en el animal adulto pueden estar involucrados con la manifestación del síndrome metabólico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Magee MS, Walden CE, Benedetti TJ, Knopp RH. Influence of diagnostic criteria on the incidence of gestational diabetes and perinatal morbidity. JAMA. 1993 Feb 3;269(5):609-15.

Dabelea D, Robert L. Hanson, Robert S. Lindsay, David J. Pettitt, Giuseppina Imperatore, Momin M. Gabir, Janine Roumain, Peter H. Bennett, and William C. Knowler. Intrauterine Exposure to Diabetes Conveys Risks for Type 2 Diabetes and Obesity A Study of Discordant Sibships, Diabetes (49) 2208-2211, 2000.

Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes en el Embarazo, México: Secretaria de Salud; 2009.
www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html

Metzger B, Buchanan T Coustan D et al. Summary and Recommendations of the Fifth International Workshop Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2007;30(S2):S251-260.

Naeye RI. Infants of diabetic mothers: A quantitative, morphologic study. Pediatrics. 1965, 35:980-8.

Steinke J, Driscoll SG. The Extractable Insulin Content of Pancreas from Fetuses and Infants of Diabetic and Control Mothers. Diabetes. 1965;14:573.

Cheung N, Byth K: Population health significance of gestational diabetes. Diabetes Care 26:2005–2009, 2003.

Duarte GM, Muñoz G, Rodríguez S, et al. Prevalencia, Detección y Tratamiento de la Diabetes Gestacional. Revista de Salud Pública y Nutrición 2004 Consultado junio 2009. Disponible en:
http://www.respyn.uanl.mx/v/1/ensayos/diebetes_gest.htm

Forsbach-Sánchez G, Gonzalez-Obele E, Villanueva-Cuellar MA et al Impacto del nuevo criterio para el diagnóstico de diabetes gestacional en la estimación de su prevalencia. Rev Inv Clin 2003;55:507-510.

Kim C, Newton K, Knopp P: Gestational diabetes and The incidence of type 2 diabetes Diabetes Care 2002;25:1862-1868

Kitzmiller J, Gavin L, Gin G, Jovanovic-Peterson L, Main E, Zigrang W, Preconception care of diabetes. Glycemic control prevents congenital anomalies JAMA 1991; 265: 731-736

Mills J, Knopp R, Simpson J, et al. Long Term effects of the intrauterine environment, birth weight and breast feeding in Pima Indians Diabetes Care 1998; 21 (Suppl 2): B138-B141

Ramírez M. Diabetes Mellitus Gestacional. Experiencia en una institución de Tercer Nivel de Atención. Ginecol Obstet Mex 2005;73:484- 491.
Setji T, Brown A, Feinglos M. Gestational Diabetes Mellitus Clinical Diabetes 2005;23:17-24.

Silverman B, Rizzo T, Cho N, Metzger B Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. Diabetes Care 1998; 21 (Suppl2): B142-B149.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of Pregnancy on Microvascular Complications in the Diabetes, Control and Complications Trial the Diabetes. Control and Complications Trial Research Group Diabetes Care 2000;23(8):1084-1091.

Mónica Elizabet Almirón, Silvana Carolina Gamarra, Mirta Soledad González
DIABETES GESTACIONAL

Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina - N° 152 – Diciembre 2005
23

Ana Cecilia Polanco Ponce,* María Cristina Revilla Monsalve,** Miguel Ángel Palomino Garibay,* Sergio Islas Andrade**

Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas
Ginecol Obstet Mex 2005;73:544-52

Islas-Andrade S, Revilla MC. Diabetes mellitus: Concepto y nueva clasificación. En: Islas S. Revilla- Monsalve C, editores. Diabetes mellitus. 3a Ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 2004; Sección I, cap. 1: p.3-20

Alberti KGMM, Zimmet PZ, WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. Diabetic Med 1998; 5:539-53

Silverman BL, Rizzo T, Green CC. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. Diabetes 1991; 40:121-125

Sheffield JS, Butler-Koster EL, Casey BM, McIntire DD, Levelo KJ. Maternal diabetes mellitus and Infant malformations. Obstet Gynecol 2002; 100:925-930.

King H, Aubert RE, Herman WH. Global Burden of Diabetes 1995-2025:

Prevalence, Numerical Estimates and Projections. Diabetes Care, 1998, 21:1414-1431.

Datos relevantes sobre diabetes. Diabetes hoy para el Médico y el profesional de la salud. 2007; 8:1774-75.

Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J Surg Res 1983; 35: 433-460

Vaura JJ, Deboer C, Dietz L, Hanke LJ, Sokolski WT. Streptozotocin, a new antibacterial drug. New York: Antibiotica, Inc; 1959-1960.

Johanson EB, Tjalve H. Studies on the tissue deposition and fate of (14-c)-Streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. Acta Endocrinol 1978; 89: 339-342.

Rodriguez B, Poucheret P, Battel ML, McNeill JH. Streptozotocin-Induced diabetes: induction, mechanism and dose dependency. En: Experimental models in diabetes, ed. John H McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999 chap 1: 3-17.

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH. Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2- expressing cells. Diabetes 1994; 43: 1326-1333.

Méndez DJ, Ramos GH. Modelos experimentales. En: Islas S, Lifshitz A, editores, Diabetes mellitus. Mc Graw Hill Interamericana. México. 1993. pp 303-333.

Polanco A. Efecto de la diabetes inducida sobre la gestación y el desarrollo de las crías de ratas. Tesis presentada para obtener el grado de maestría en biología de la reproducción. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM, México, 2001.

Pedersen J. La diabética gestante y su recién nacido. Problemas y tratamiento. Barcelona: Salvat Editores; 1981. pp 209-218.

Neiger R. Fetal macrosomia in the diabetic patient. Clin Obstet Gynecol 1992; 35 (1): 138-150

Dar P, Gross S. Macrosomia: A genetic perspective. Clinical Obstet and Gynecol 2000; 43:298-308

Rodriguez B, Poucheret P, Battel ML, McNeill JH. Streptozotocin-Induced diabetes: induction, mechanism and dose dependency. En: Experimental models in diabetes, ed. John H McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999 chap 1: 3-17.

Revollo, Álvaro José Fortich. 2010

Fisiología de la secreción de insulina y glucagón

Franco Yaquelin, Bioquímica, enero, 2012

Disponible en: <http://tesisbioquimica.blogspot.mx/2012/01/introduccion-el-metabolismo-es-el.html>

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL, Bioquímica, 5ª edición. Editorial Reverté. Barcelona. 2003.

Nelson DL, Cox MM, principios de bioquímica, 3ª edición. Ediciones Omega. Barcelona. 2001.

Cardellá, L, Bioquímica Humana, Editorial Ciencias Médicas. La Habana. 2007.
Disponible en:
http://www.enfermeriaynutricion.com/gfx/el_metabolismo_de_los_hidratos_de_carbono.pdf

<http://sasovi.blogspot.mx/2009/04/metabolismo-de-los-lipidos.html>

Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J, Siddiqi TA. Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformation in insulin dependent diabetes mellitus. Obstet Gynecol 1994;84:515-20.

Mills JL, Baker L, Goldman AS. Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implications for treatment. Diabetes 1979;28(4):292-3.

Reece EA, Homko CJ, Wu YK, et al. Metabolic fuel mixtures and diabetic embryopathy. Clin Perinatol 1993;20(3):517-32.

Jaquet D, Tregouet DA, Godefroy T, et al. Combined effects of genetic and environmental factors on insulin resistance associated with reduced fetal growth. Diabetes 2002;51:3473-8.

Polanco A. Efecto de la diabetes inducida sobre la gestación y el desarrollo de las crías de ratas. Tesis presentada para obtener el grado de Maestría en Biología de la Reproducción, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, México, 2001.

Ziegler B, Noack S, Diaz-Alonso JM, et al. Effect on pregnancy on B-cell replication and insulin content in normoglycemic rats with a reduced B-cell mass. Diabetologia 1983;25:129-207.

Boloker J, Gertz SJ, Simmons RA. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. Diabetes 2002;51:1499-506.

Palomino-Garibay MA, Revilla-Monsalve MA, Cárdenas- Sánchez A, et al. Efecto de la diabetes inducida sobre la reproducción y el desarrollo. Ginecol Obstet Méx 1998;66(10):403-6.

Buchanan TA, Denno KM, Sipos GF, et al. Diabetic teratogenesis. In vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose *per se*. Diabetes 1994;43:656-60.

Lee AT, Plump A, Cerami A, et al. Diabetes-induced teratogenesis: Role of DNA damage in a transgenic mouse model. Diabetes 1993;42(suppl 1):85A.

Ornoy A, Zaken V, Kohen R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos *in vitro*: reduction in antioxidant enzymes and low-molecularweight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. Teratology 1999;60(6):376-86.

Wentzel P, Ejdesjo A, Eriksson UJ. Maternal diabetes *in vivo* and high glucose *in vitro* diminish GAPDH activity in rat embryos. Diabetes 2003;52:1222-8.

Cederberg J, Basur S, Eriksson UJ. Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy. Diabetologia 2001;44:766-74.

Eriksson UJ, Borg LA. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. Diabetologia 1991;34:325-31.

Cederberg J, Siman CM, Eriksson UJ. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. Pediatr Res 2001;49:755-62.

Freinkel N, Crockroft DL, Lewis MJ, et al. The 1986 McCollum award lecture. Fuel-mediated teratogenesis during early organogenesis: the effect of increased concentrations of glucose, ketones or somatomedin inhibitor during rat embryo culture. Am J Clin Nutr 1986;44:986-95.

Polanco Ponce Ana Cecilia et. Al; Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas, medigraphic, Ginecol Obstet Mex 2005;73:544-52
<http://bioquimicamedicam4.wikispaces.com/El+metabolismo+de+los+l%C3%ADpidos>

Insulina <http://articulosdemedicina.com/insulina/>(consultado)30-05-2010).

Kido Y, J Nakae, D. Accili. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. J Clin Endocrinol Metab; 86:972-9 (2001).

La dislipidemia en el paciente diabético, José Illnait Pérez, Rev Cubana Med Gen Integr 1997;13(4):372-377;**Disponible en:**
http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol13_4_97/mgi10497.htm

Kinoshita M, Krul ES, Schonfeld G. Modification of the core lipids of low density lipoproteins produces selective alterations in the expression of Apo B-100 epitopes. *J Lipids Res* 1990;31(6):701-8.

Coll García E. Aterosclerosis, obesidad y diabetes. En: Cardona R, Soltero I ed. *PCM Aterosclerosis al Día*. Sup. 1(1):171-83. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprage EA, Kelley JL, Cayatte AJ, Roze KMM. Pathogenesis of the atherosclerotic lesions: Implications for diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1992; 15(49):1156-7.

Bierman EL. Atherogenesis in diabetes. *Atheroscler Thromb* 1992; 12(5):647-56. Duell PB, Oram JF, Biermann EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes* 1991; 40(3):377-84.

Scanu AM. Lipoprotein (a): A genetic risk factor for premature coronary heart disease. *JAMA* 1992;267(10):3326-9.

Ruiz J, Thillet J, Huby T, James RW, Erlich D, Flandre P, Froguel P, Chapman J. Passa PH. Association of elevated lipoprotein (a) levels and coronary heart disease in NIDDM patients. Relationship with apolipoprotein (a) phenotypes. *Diabetología* 1994; 37(5):585-91.

Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 1983; 35: 433-460.

Rodriguez B, Poucheret P, Battel ML, McNeill JH. Streptozotocin-Induced diabetes: induction, mechanism and dose dependency. En: *Experimental models in diabetes*, ed. John H McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999 chap 1:3-17.

Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarmi MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Rep.* 1963; 29: 91-96.

Cordero L, Landon M. Infant of the diabetic mother. *Clin Perinatol* 1993; 20:635-648

Erikson UJ, Anderson A, Efendic S, Elde R, Hellerstrom C. Diabetes in pregnancy: effects on fetal and newborn rat with particular regard to body weight, serum insulin concentration and pancreatic contents of insulin, glucagon and somatostatin. *Acta Endocrinol.* 1980; 94: 345-436.

Kinoshita M, Krul ES, Schonfeld G. Modification of the core lipids of low density lipoproteins produces selective alterations in the expression of Apo B-100 epitopes. *J Lipids Res* 1990;31(6):701-8.

Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Absence of pregnancy-induced alterations in tissue insulin sensitivity in the offspring of diabetic rats. *J Endocrinol* 1991; 131: 387-93.

Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 811-6.

Strauss RS. Effects of the intrauterine environment on childhood growth. *Br Med Bull* 1997; 53: 81-95.

Nijland MJ, Ford SP, Nathanielsz PW. Prenatal origins of adult disease. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20: 132-38.

Hanefeld M, Leonhardt W. Das metabolische syndrome. *Dtsch Gesundheitwes* 1981; 36: 545-51.

Boloker J, Gertz SJ, Simmons RA. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes* 2002; 51: 1499-506.

Kervran A, Guillaume M, Jost A. The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 1978; 15: 387-93.

Aerts L, Holemans K, Van Assche FA. Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. *Diabetes Metab Rev* 1990; 6: 147-67.

Ktorza A, Girard JR, Kinebanyan MF, Picon L. Hyperglycaemia induced by glucose infusion in the unrestrained pregnant rat during the last three days of gestation: metabolic and hormonal changes in the mother and the fetuses. *Diabetologia* 1981; 21: 569-74.

Aerts L, Van Assche FA. Islet transplantation in diabetic pregnant rats normalizes glucose homeostasis in their offspring. *J Dev Physiol* 1992; 17: 283-7.

Oh W, Gelardi NL, Cha CJ. The cross-generation effect of neonatal macrosomia in rat pups of streptozotocin-induced diabetes. *Pediatr Res* 1991; 29: 606-10.

Van Assche FA, Holemans K, Aerts L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br Med Bull* 2001; 60: 173-82.

Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1991; 34: 81-5.

Holemans K, Van Bree R, Verhaeghe J, Aerts L, Van Assche FA. In vivo glucose utilization by individual tissues in virgin and pregnant offspring of severely diabetic rats. *Diabetes* 1993; 42: 530-6.

Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Absence of pregnancy-induced alterations in tissue insulin sensitivity in the offspring of diabetic rats. *J Endocrinol* 1991; 131: 387-93.

NCCLS Document, "Procedures for the collection of arterial blood specimens". Approved Standard, 3rd Ed. (1999).

SPECIAL REPORT. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 285 : 2486 (2001).

Disponible

en:

<http://www.biosimex.com.mx/pdf/insertos/QUIMICA%20CLINICA/11648c.pdf>

Grove TH. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem* 1979; 25: 560-564.

Burstein M, Scholnick HR and Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *Scand J Clin Lab Invest* 1980; 40: 583-595.

National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). NIH Publication.

Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2001

Disponible en: http://www.linear.es/ficheros/archivos/56_1142005C.pdf

Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 2nd ed. Saunders Co, 1991.

Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997

A.D.A.M., Inc. está acreditada por la URAC, también conocido como American Accreditation HealthCare Commission (www.urac.org). La acreditación de la URAC es un comité auditor independiente para verificar que A.D.A.M. 2013.

Islas-Andrade S, Revilla MC. Diabetes mellitus: Concepto y nueva clasificación. En: Islas S, Revilla- Monsalve C, editores. Diabetes mellitus. 3^a Ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 2004; Sección I, cap. 1: p.3-20

Melani F, Ryan WG, Rubenstein AH, Steiner DF. Proinsulin secretion by a pancreatic beta-cell adenoma. Proinsulin and C-peptide secretion. *N Engl J Med*. 2011;283:713-9.

Horwitz DL, Starr JI, Mako ME, Blackard WG, et al. Proinsulin, insulin, and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *J Clin Invest*. 2011;55:1278-83.

Wollheim C.: "Glucose recognition and other signalling events in insulin secretion. In: New Horizons in Diabetes Mellitus Edit. Schwartz C.I. and Born GVR. Rapid Science. Pub. London 2006 pg. 28-38

Freychet P, Roth J, Neville DM Jr. Insulin receptors in the liver: specific binding of (¹²⁵I) insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;68:1833-7.

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*. 2005;40:747-58.

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*. 2006;313:756-61.

Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *Histochem Cytochem*. 2005;53:1087-97.

Steiner DF, James DE. Cellular and molecular biology of the beta cell. *Diabetologia*. 1992;35 (Suppl 2):S41-8

Goodner CJ, Walike BC, Koerker DJ, Ensinnck JW, et al. Insulin, glucagon, and glucose exhibit synchronous, sustained oscillations in fasting monkeys. *Science*. 1977;195:177-9.

Insulina (recuperado) [http://articulosdemedicina.com/insulina/\(consultado\)30-05-2010](http://articulosdemedicina.com/insulina/(consultado)30-05-2010))

Kido Y, Nakae D, Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*; 86:972-9 (2001).

Iván Martínez Duncker R., Insulina, glucagón y diabetes mellitus, 2010. Disponible en: <http://www.glycoactive.com/insulina.pdf>

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003) Bioquímica, 5ª edición, Barcelona: Editorial Reverté.

Nelson DL, Cox MM, (2001). Principios de bioquímica, 3ª edición. Barcelona. Ediciones omega.

Cardellá, L (2007) Bioquímica Humana. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
Díaz DP, Burgos LC (2002) ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? Latreía 15 (3), 179-189.

Devlin, TM (1999) Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas, 3ª edición. Barcelona: editorial reverté.

Fuentes X, Castiñeiras MJ, Queraltó JM (1998) Bioquímica clínica y patología molecular, 2ª edición, Barcelona: Editorial Reverté.

Boyer, R (2000) Conceptos de bioquímica, 1ª edición. México: Internacional Thomson Editores.

Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR (2006), Bioquímica, 3ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana.

Martínez J, García P (2001) Nutrición Humana. Valencia: Editorial Universidad Politécnica de Valencia.

Mills JL, Baker L, Goldman AS. Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implications for treatment. Diabetes 2002;28(4):292-3.

Reece EA, Homko CJ, Wu YK, et al. Metabolic fuel mixtures and diabetic embryopathy. Clin Perinatol 2003;20(3):517-32.

Jaquet D, Tregouet DA, Godefroy T, et al. Combined effects of genetic and environmental factors on insulin resistance associated with reduced fetal growth. Diabetes 2002;51:3473-8.

Nordstrom L, Spetz E, Wallstrom K, et al. Metabolic control and pregnancy outcome among women with insulin-dependent diabetes mellitus. A twelve-year follow-up in the country of Jamtland, Sweden. Acta Obst Gynecol Scand 1998;77:284-9.

Palomino-Garibay MA, Revilla-Monsalve MA, Cárdenas-Sánchez A, et al. Efecto de la diabetes inducida sobre la reproducción y el desarrollo. Ginecol Obstet Méx 2003;66(10):403-6.

Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J, Siddiqi TA. Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformation in insulin dependent diabetes mellitus. Obstet Gynecol 2004;84:515-20.

García-Carrapato MR. The offspring of gestational diabetes. J Perinat Med 2003;31:5-11.

Polanco A. Efecto de la diabetes inducida sobre la gestación y el desarrollo de las crías de ratas. Tesis presentada para obtener el grado de Maestría en Biología de la Reproducción, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, México, 2001.

Buchanan TA, Denno KM, Sipos GF, et al. Diabetic teratogenesis. In vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose *per se*. Diabetes 2002;43:656-60.

Lee AT, Plump A, Cerami A, et al. Diabetes-induced teratogenesis: Role of DNA damage in a transgenic mouse model. Diabetes 1993;42(suppl 1):85A.

Ornoy A, Zaken V, Kohen R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos *in vitro*: reduction in antioxidant enzymes and low-molecularweight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. Teratology 2002;60(6):376-86.

Wentzel P, Ejdesjo A, Eriksson UJ. Maternal diabetes *in vivo* and high glucose *in vitro* diminish GAPDH activity in rat embryos. Diabetes 2003;52:1222-8.

Cederberg J, Basur S, Eriksson UJ. Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy. Diabetologia 2001;44:766-74.

Eriksson UJ, Borg LA. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. Diabetologia 1991;34:325-31.

Cederberg J, Siman CM, Eriksson UJ. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. Pediatr Res 2001;49:755-62.

Freinkel N, Crockroft DL, Lewis MJ, et al. The 1986 McCollum award lecture. Fuel-mediated teratogenesis during early organogenesis: the effect of increased concentrations of glucose, ketones or somatomedin inhibitor during rat embryo culture. Am J Clin Nutr 2001;44:986-95.

Loredo E. Efecto de la diabetes materna sobre la estructura de la placenta de 20 días de desarrollo. Tesis para obtener la licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 2003.

Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J Surg Res 2001; 35: 433-460.

Vaura JJ, Deboer C, Dietz L, Hanke LJ, Sokolski WT. Streptozotocin, a new

antibacterial drug. New York: Antibiotica, Inc; 2002

Johanson EB, Tjalve H. Studies on the tissue deposition and fate of (14-c)-Streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. *Acta Endocrinol* 2001; 89: 339-342.

Rodriguez B, Poucheret P, Battel ML, McNeill JH. Streptozotocin-Induced diabetes: induction, mechanism and dose dependency. En: *Experimental models in diabetes*, ed. John H McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 2002 chap 1:3-17

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH. Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes* 2002; 43: 1326-1333.

Méndez DJ, Ramos GH. Modelos experimentales. En: Islas S, Lifshitz A, editores, *Diabetes mellitus*. Mc Graw Hill Interamericana. México.2004. pp 303-333.

Polanco A. Efecto de la diabetes inducida sobre la gestación y el desarrollo de las crías de ratas. Tesis presentada para obtener el grado de maestría en biología de la reproducción. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM, México, 2001.

Pedersen J. La diabética gestante y su recién nacido. Problemas y tratamiento. Barcelona: Salvat Editores; 2002. pp 209-218.

Neiger R. Fetal macrosomia in the diabetic patient. *Clin Obstet Gynecol* 2002; 35 (1): 138-150.

Dar P, Gross S. Macrosomia: A genetic perspective. *Clinical Obstet and Gynecol* 2003; 43:298-308

Han B, Hao C, Tchekneva E, Wang Y, Lee C, Ebraim B, Harris R, Kern T Wasserman D, Breyer M, Qi Z. Markers of glycemic control in the mouse: Comparision of six hours and overweight fasted blood glucose to HbA1c. *American Journal of Physiological Endocrinology Metabol*. 2008; 295(4):981-986.

Rodriguez B, Poucheret P, Battel ML, McNeill JH. Streptozotocin-Induced diabetes: induction, mechanism and dose dependency. En: *Experimental models in diabetes*, ed. John H McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 2001 chap 1: 3-17

Reynaldo Torres Vera. Bioquímica de los alimentos. Metabolismo de lípidos. Disponible en: <http://ricarducatse.files.wordpress.com/2011/02/folleto-4-metabolismo-de-lipidos.pdf>

Fernando Londoño. Fundamentos de alimentación animal. Metabolismo de lípidos. Disponible en: <http://ricarducatse.files.wordpress.com/2011/02/folleto-4-metabolismo-de-lipidos.pdf>

ANEXO

Medición de glucosa

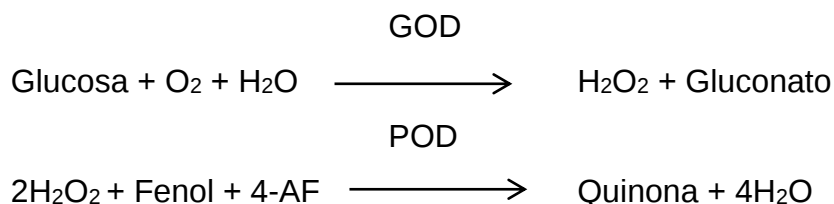
GLUCOSA

Método enzimático (GOD-PAD)

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La enzima glucoxidasa cataliza la oxidación de glucosa a gluconato y peróxido de hidrógeno. La concentración de glucosa es proporcional al H_2O_2 , este puede medirse apareándolo con un indicador de peroxidasa.

La determinación de glucosa se efectúa mediante el método de Trinder según las siguientes reacciones:



Abreviaturas:

GOD = Glucosa oxidasa

POD = Peroxidasa

4-AF = 4-aminofenazona

MUESTRA CLÍNICA:

- ❖ Suero o plasma venoso.
- ❖ La muestra debe recolectarse en ayuno excepto por el agua, durante ocho horas cuando menos antes de la prueba.

- ❖ La muestra debe recolectarse en tubo colector de tapón rojo para suero el cual no contiene anticoagulante, o de color lila el cual contiene EDTA anticoagulante para obtener plasma.
- ❖ La muestra debe centrifugarse a 3500 rpm durante 5 min para separar el suero y plasma.
- ❖ La glucosa en suero o plasma es estable al menos 3 días a 2-8°C.

REACTIVOS

REACTIVO 1 TRIS pH 7.4 92 mmol/L

Tampón Fenol 0.3 mmol/L

REACTIVO 2 Glucosa oxidasa 15000 U/L

Vial de enzimas Peroxidasa 1000 U/L

4-Aminofenazona 2.6 mmol/L

ESTÁNDAR Sol. Glucosa 100 mg/L

CONTROL NORMAL Spinreact.

Preparación:

- Disolver los enzimas del R.2 en el contenido del R.1.
- Esta solución monorreactiva es estable 1 mes a 2-8°C ó 7 días a 15 – 25°C, al abrigo de la luz.

EQUIPO

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas de 490-550 nm.
- Centrifuga.

MATERIAL

- 5 Tubos de ensaye de 13 X100mm.
- 1 micropipetas de 1.0 mL.

- 1 Micropipeta de 10 μ L.
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla.

CONDICIONES DE ENSAYO

- Longitud de onda: 505nm (490-550)
- Temperatura: 30/37°C
- Cubeta: 1cm. Paso de luz
- Ajuste a cero con blanco de reactivo.

1. Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra	Muestra Control
Estándar	--	10mL	--	--
Muestra	--	--	10mL	--
Muestra Control	--	--	--	10mL
Reactivo al uso	1.0mL	1.0mL	1.0mL	1.0mL

2. Mezclar e incubar 10 min a 37°C ó 30 min a temperatura ambiente.
3. Leer la absorbancia (A) a 505nm.
4. Coloración estable 30 minutos a temperatura ambiente.

CÁLCULOS

$$\text{mg /dL Glucosa} = \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Estándar}} \times \text{Conc. estándar.}$$

$$\text{mg/dL} \times 0.0555 = \text{mmol}$$

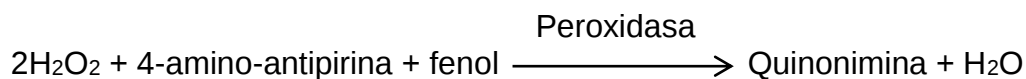
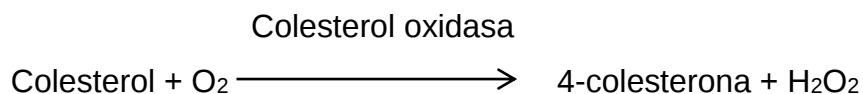
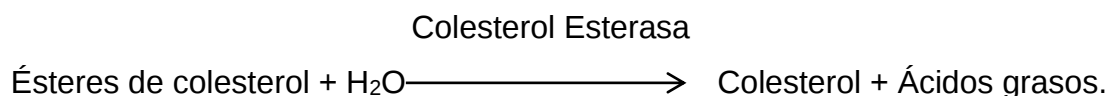
Concentración del estándar: 100 mg/dL

COLESTEROL TOTAL

Método enzimático (GOD-PAD)

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos, en una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa se forma H_2O_2 y colesteroína. El H_2O_2 se valora por la reacción Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4- Aminoantipirina, en presencia de Peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración, encarnada, es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.



REACTIVOS

REACTIVO 1 Tampón pH 6.9 90mmol/L

Fenol 26 mmol/L

REACTIVO 2

Vial enzimas Peroxidasa 1250 U/L

Colesterol esterasa

Colesterol oxidasa 300 U/L

4-Aminoantipirina 0.4 mmol/L

ESTÁNDAR Solución Colesterol 200 mg/dL

CONTROL NORMAL Spinreact.

Preparación:

- ❖ Disolver con agitación suave el contenido del vial de enzimas R.2 con un poco de R.1 amortiguador, una vez disuelto el liofilizado retornar al frasco original del amortiguador, homogeneizar la solución.
- ❖ Esta solución es estable 4 meses en refrigeración 2-8°C ó 40 días a 15-25°C protegido de la luz.

EQUIPO

- ❖ Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 500-550nm.
- ❖ Centrifuga.
- ❖ Baño de agua a 25 o 37°C.

MATERIAL

- ❖ 5 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- ❖ 1Micropipetas de 1mL
- ❖ 1Micropipeta de 10mL
 - Puntas para micropipeta.
 - Gradilla.

PROCEDIMIENTO

CONDICIONES DE ENSAYO

- ❖ Longitud de onda.....505nm (500-550)
- ❖ Cubeta.....1 cm paso de luz
- ❖ Temperatura.....25 – 37°C
- ❖ Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

1. Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra	Muestra Control
Estándar	--	10mL	--	--
Muestra	--	--	10mL	--
Muestra Control	--	--	--	10mL
Reactivo al uso	1.0mL	1.0mL	1.0mL	1.0mL

2. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C ó 10 min a temperatura ambiente.
3. Ajustar el aparato a cero con el blanco de reactivos.
4. Leer a 505nm (500-550) la densidad óptica del estándar y de la muestra.
5. La coloración será estable durante 60 min.

CÁLCULOS

$$\frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Concentración}} \times \text{Concentración del estándar (200 mg/dl)} =$$

Abs del estándar de colesterol

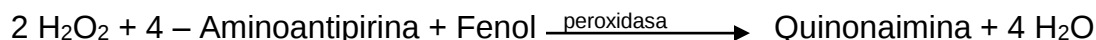
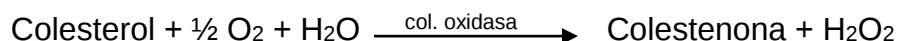
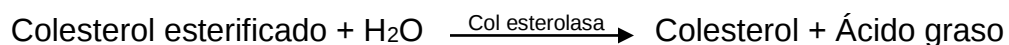
Factor de conversión: mg/dL x 0.0258 = mmol/L (SI).

COLESTEROL HDL

REACTIVO PRECIPITANTE

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de fosfotungstato y iones magnesio. El sobrenadante contiene las lipoproteínas de elevada densidad (HDL), cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación:



CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

A. Reactivo: 1 x 50 mL. Fosfotungstato 0,4 mmol/L, cloruro de magnesio 20 mmol/L.

S. Patrón de Colesterol HDL: 1 x 5mL. Colesterol 15 mg/dL. Patrón primario acuoso.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

El Reactivo y el Patrón son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

–Reactivo: Presencia de partículas o turbidez.

–Patrón: Presencia de partículas o turbidez.

REACTIVOS ADICIONALES

Estos reactivos auxiliares deben ser utilizados junto con el Reactivo de Colesterol contenido en cualquiera de los kits de Colesterol.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tanto el Reactivo como el Patrón están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Centrífuga de sobremesa
- Baño de agua a 37°C (opcional)
- Analizador, espectrofotómetro o fotómetro para lecturas a 500 ± 20 nm

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar.

El Colesterol HDL en suero o plasma es estable 7 días a 2-8°C. Los anticoagulantes como la heparina, EDTA, oxalato o fluoruro, no interfieren.

PROCEDIMIENTO**Precipitación**

1. Pipetear en un tubo de centrifuga (Nota 1):

Muestra 0,2 mL

Reactivo (A) (kit de Colesterol HDL) 0,5 mL

2. Agitar bien y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3. Centrifugar durante 10 minutos a un mínimo de 4.000 r.p.m.

4. Recoger con cuidado el sobrenadante (Nota 2).Colorimetría

5. Atemperar el Reactivo (kit de Colesterol) a temperatura ambiente.

6. Pipetear en tubos de ensayo: (Nota 3).

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	100μL	-----	-----
Patrón colesterol HDL	-----	100μL	-----
Sobrenadante muestra	-----	-----	100μL
Reactivo (A)	1,0mL	1,0mL	1,0mL

7. Agitar bien e incubar los tubos durante 30 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 10 minutos a 37°C.

8. Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 30 minutos.

CÁLCULOS

La concentración de colesterol HDL en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} \times \text{Factor dilución muestra} = C_{\text{Muestra}}$$

Si se utiliza para calibrar el Patrón de Colesterol HDL suministrado (Nota 4).

$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}}$	$\times 52,5 = \text{mg/dL colesterol HDL}$ $\times 1,36 = \text{mmol/L colesterol HDL}$
--	---

VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de colesterol de HDL varían considerablemente con la edad y el sexo. El siguiente valor discriminante ha sido recomendado para identificar individuos con elevado riesgo de enfermedad coronaria.

Hasta 35 mg/dL = 0,91 mmol/L > 60 mg/dL = > 1,56 mmol/L	Elevado Bajo
--	-----------------

NOTAS

1. Se pueden modificar los volúmenes de muestra y Reactivo A, manteniendo la misma proporción.
2. El sobrenadante debe ser completamente claro. En caso de persistir la turbidez o de no obtener una buena sedimentación del precipitado, adicionar otros 0,5 mL de Reactivo A, mezclar bien y centrifugar de nuevo. Multiplicar el resultado obtenido por 1,7 para corregir la dilución efectuada.
3. Estos reactivos pueden utilizarse en la mayoría de analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.
4. La calibración con el patrón acuoso suministrado puede causar sesgos, especialmente en algunos analizadores. En estos casos, se recomienda calibrar usando un patrón de base sérica (Calibrador Bioquímica, cod. 18011 y 18044).

COLESTEROL LDL

Método enzimático colorimétrico

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Este método directo para cuantificar el colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se basa en una prueba enzimática homogénea en la que la

precipitación diferencial y la posterior sedimentación del resto de lipoproteínas y quilomicrones han sido eliminadas.

El procedimiento consta de dos etapas. En la primera el colesterol de las lipoproteínas distintas a las LDL presentes en la muestra se descomponen por la acción simultánea de la colesterol esterasa (CE) y la colesterol oxidasa (CO) a pH 7,0, dando como productos finales colesteno y peróxido de hidrógeno convirtiéndose éste último en oxígeno y agua por la acción de la catalasa. En una segunda etapa, un tensioactivo que actúa específicamente sobre la LDL se añade al producto del paso anterior, cuantificándose el colesterol residual mediante una reacción tipo Trinder en la que el derivado anilínico, HDAOS*, y la 4-aminoantipirina (4-AA) se condensan por el H₂O₂ en presencia de peroxidasa (POD) para formar una quinonaimina roja proporcional a la concentración de colesterol-LDL de la muestra.

*N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina.

COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

R1 Reactivo enzimático. Tampón GOOD 100 mmol/L pH 7,0, CE 5 U/mL, CO 1 U/mL, catalasa 200 KU/L, HDAOS 1mmol/L.

R2 Reactivo POD/4-AA. POD 15 U/mL, 4-AA 4 mmol/L.

CAL Calibrador HDL/LDL. Optativo. Ref. 1972005.

El valor de concentración es trazable al Material de Referencia Certificado 1951a.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Los reactivos R1y R2 están listos para su uso. La estabilidad abiertos y situados en el analizador a 2-10°C es de 2 meses.

MUESTRAS

Suero o plasma heparinizado u obtenido con EDTA. El paciente estará en ayunas desde la noche anterior a la extracción. Separar las células dentro de las 3 horas siguientes a la venipuntura. Las muestras pueden conservarse 2 semanas a 4-8°C

ó 3 meses a -20°C .

INTERFERENCIAS

- Lipemia (intralipid >1 g/L) puede afectar los resultados.
- Bilirrubina (40 mg/dL) no interfiere.
- Hemoglobina (12 g/L) no interfiere.
- Otros medicamentos y sustancias pueden interferir

EQUIPO ADICIONAL

- Fotómetro o colorímetro para mediciones a 600 (± 10 nm).
- Unidad termostatzada ajustable a 37°C .
- Cubetas de 1-cm de paso de luz.
- Pipetas de volumen variable para reactivos y muestras.

TÉCNICA

1. Equilibrar reactivos y muestras a temperatura ambiente.
2. Pipetear en cubetas rotuladas:

Cubetas	Blanco	Muestra	Calibrador
R1	300 μL	300 μL	300 μL
Muestra	-----	4 μL	-----
CAL	-----	-----	4 μL

3. Mezclar e incubar 5 minutos a 37° .
4. Añadir.

R2	100 μL	100 μL	100 μL
-----------	-------------------	-------------------	-------------------

5. Mezclar por completo e incubar 5 minutos adicionales a 37°C .
6. Leer la absorbancia (A) de la muestra y del calibrador a 600 nm frente al blanco de reactivo.

CÁLCULOS

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{calibrador}}} \times C_{\text{Calibrador}} = \text{mg/dL Colesterol-LDL}$$

Para expresar los resultados en unidades SI aplicar: $\text{mg/dL} \times 0,0259 = \text{mmol/L}$

VALORES DE REFERENCIA

Grupos de riesgo clasificados según los niveles de C-LDL.

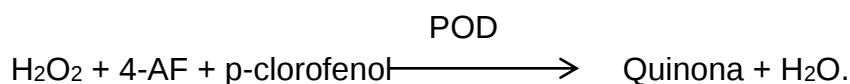
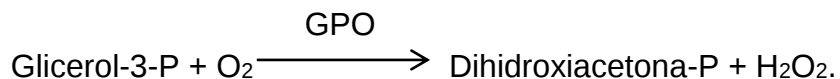
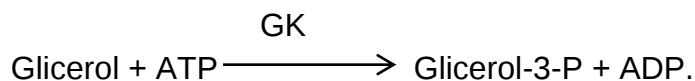
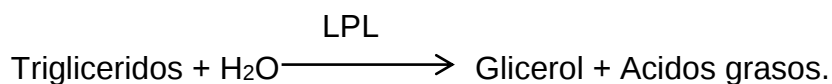
Niveles de Colesterol-LDL	RIESGO
< 100 mg/dL (2,59 mmol/L)	Muy bajo
100 - 129 mg/dL (2,59-3, 12 mmol/L)	Bajo
130 – 159 mg/dL (3,37 -4,12 mmol/L)	Moderado
160 – 189 mg/dL (4,14 – 4,89 mmol/L)	Alto
≥ 190 mg/dL (4,92 mmol/dL)	Muy alto

TRIGLICÉRIDOS

Método enzimático (GOD-PAD)

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los triglicéridos son hidrolizados enzimáticamente a glicerol, el cual, mediante Glicerol cinasa y Glicerol-P-oxidasa, libera el peróxido de hidrógeno que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguientes reacciones.



La cantidad de la quinona formada es proporcional a la concentración de triglicéridos.

Abreviaturas: LPL = Lipoproteinlipasa; GK = Glicerol Cinasa ; GOP = Glicerol-P-oxidasa; POD = Peroxidasa.

- ❖ La muestra debe recolectarse en ayuno total excepto agua, durante un lapso de 12 a 14 horas antes de la prueba.
- ❖ La muestra debe recolectarse en tubo recolector al vacío de tapón rojo el cual no contiene anticoagulante.
- ❖ Para separar el suero la muestra debe centrifugarse durante 10 minutos a 3500rpm.
- ❖ La estabilidad de la muestra es de una semana guardada, tapada y a 2-8° C ó 3 meses congelada a -20 °C.

REACTIVOS

REACTIVO 1 Tampón GOOD pH 7.5 50mmol/L

Tampón p-clorofenol 2mmol/L

REACTIVO 2 Lipoproteinlipasa 150000 U/L

Vial enzimas Glicerol Kinasa 500 U/L

Glicerol-P-oxidasa 2500 U/L

Peroxidasa 440 U/L

4-Aminofenazona 0.1 mmol/L

ATP 0.1 mmol/L

ESTÁNDAR Sol. Triglicéridos 200 mg/dL

CONTROL NORMAL Spinreact.

Preparación:

Disolver el contenido del vial enzimas R.2 en el frasco de solución tampón R.1

EQUIPO

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 500-550nm.
- Centrifuga.
- Baño de agua a 25 o 37°C.

MATERIAL

- 5 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- 1 Micropipetas de 1mL
- 1 Micropipeta de 10mL
- Puntas para micropipeta.
- Gradilla.

PROCEDIMIENTO**CONDICIONES DE ENSAYO**

- ❖ Longitud de onda.....505nm (490-550)
- ❖ Temperatura: 25/ 30/37°C
- ❖ Cubeta.....1 cm paso de luz
- ❖ Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

1. Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra	Muestra Control
Estándar	--	10mL	--	--
Muestra	--	--	10mL	--
Muestra Control	--	--	--	10mL
Reactivo al uso	1.0mL	1.0mL	1.0mL	1.0mL

2. Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a temperatura ambiente.
3. Medir la densidad óptica a 505 nm (490-550), frente al blanco de reactivos.
4. El color será estable durante 30 min.

CÁLCULOS

Absorbancia de la muestra

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times \text{Conc. del estándar} = \text{Conc. muestra.}$$

Absorbancia del estándar

Factor de conversión: mg/dL X 0.0113 = mmol/L

Conc. Estándar: 200mg/dL.

LÍPIDOS TOTALES

CÁLCULOS:

Triglicéridos + colesterol (1.8).