



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA

“EFECTO ANTITERATOGENICO DEL
RESVERATROL EN RATAS
DIABÉTICAS POR
ESTREPTOZOTOCINA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA
NINNA LESLIE TREJO GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. MARTÍN PALOMAR MORALES

Tlalnepantla, Edo. De México, 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIORREGULACION (L-511). BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. PALOMAR MORALES. SE TUVO APOYO ECONOMICO DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO Y DE LA UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LA FES IZTACALA.

Dedicado a...

mi madre y mi padre, esto no hubiera sido posible sin su esfuerzo, empeño y dedicación, si sus consejos y su guía. Gracias por celebrar conmigo los triunfos y por ayudarme a superar las derrotas, gracias por enseñarme que el amor de los padres es infinito e incondicional. Los amo.

Lorena, siempre mi amiga, mi cómplice, te amo hermana, no te rindas nunca, siempre hay algo grande para cada uno de nosotros.

Gerardo (chiki) gracias por tu apoyo, por darme un motivo más para seguir adelante, por mostrarme que la vida es bella y que todo lo que se hace día a día es un peldaño más para alcanzar los sueños que tenemos junto a la gente que queremos, te amo. STXS.

a Dios, sé que sin el en mi vida, nada de esto sería realidad.

Gracias...

Dr. Martin Palomar por su instrucción diaria, por compartir sus conocimientos y por su infinita paciencia.

Biól. Gladys Chirino Galindo por su apoyo, su ayuda y por esas pláticas tan amenas.

Dra. Ana García, Dra. Leticia Verdín y Dr. Rodolfo Cárdenas por su tiempo y dedicación a este trabajo.

Aleida, Ere, Denisse, Karen, Mariela y Mary por el tiempo compartido, por las carcajadas, por su amistad, las quiero.

Tía Laura, tía Arlette y tío Jorge por sus palabras y su compañía, los amo.

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
- Definición de la diabetes mellitus (DM)	3
- Clasificación de la DM	3
- Modelos de diabetes experimental	7
- Estrés oxidativo, DM y embarazo.	11
- Antioxidantes	14
Hipótesis	17
Objetivo general y particulares	18
Materiales y métodos	19
Resultados	25
Discusión	34
Conclusión	42
Referencias	44

RESUMEN

En México la Diabetes mellitus ocupa el primer lugar en número de defunciones por año. Es una de las enfermedades que más repercute sobre el embarazo teniendo, por altas concentraciones de glucosa, efectos embriotóxicos a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's). Los antioxidantes son compuestos reconocidos por ser capaces de neutralizar la cascada de reacciones generada en la formación de radicales libres y por consiguiente la disminución de ERO's en un ambiente de estrés oxidativo. Por tal motivo el objetivo del presente trabajo fue evaluar el poder teratogénico de diferentes dosis de STZ así como la capacidad antiteratogénica del compuesto antioxidante resveratrol. Para lo anterior se tuvo en una primera etapa cuatro grupos de ratas Wistar hembras preñadas, cada uno de 5 individuos, a tres de ellos en el día 4 de gestación se les administro STZ disuelta en amortiguador de citratos (100 mM pH 4.5) en las siguientes dosis 40, 50 y 60 mg/Kg, el grupo control solo fue tratado con el amortiguador. Se obtuvieron los fetos el día 19 de gestación y fueron analizados morfológicamente. De las madres se obtuvo sangre por punción cardiaca para realizar pruebas de niveles de colesterol, glucosa, triglicéridos y lípidos totales. Los datos arrojaron que la mejor dosis de STZ para producir daño teratogénico fue de 50mg/Kg. En una segunda etapa se tuvieron tres grupos de ratas Wistar preñadas cada uno de 5 ratas, el control tratado únicamente con amortiguador de citratos, a los dos restantes se les administro una dosis de 50 mg/Kg de STZ disuelta en amortiguador de citratos administrada, todo lo anterior en el día 4 de gestación, a uno grupo con STZ se le administro también una dosis de 100 mg/Kg de resveratrol durante los días 8 al 12 de gestación. Los fetos se obtuvieron el día 19 de gestación y se realizó un análisis morfológico y pruebas de actividad enzimática hepática de CAT, SOD y GPx. Los resultados indican que el resveratrol puede disminuir el efecto teratogénico de la diabetes producida por STZ, ya que las actividades enzimáticas estudiadas se vieron altamente beneficiadas gracias a la administración de este antioxidante. Los efectos protectores de las enzimas CAT, SOD Y GPx hepáticas se ven potenciados gracias a la administración de

resveratrol durante la gestación disminuyendo el estrés oxidativo que se presenta a causa de la hiperglucemia materna.

INTRODUCCIÓN

Definición de la diabetes mellitus (DM)

La diabetes es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, con grados variables de predisposición hereditaria, ya que en su desarrollo participan diferentes combinaciones de genes junto con factores ambientales. Este padecimiento se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. Los principales síntomas de la DM son la poliuria, la polidipsia, la pérdida de peso, algunas veces polifagia y visión borrosa (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003). Además, la hiperglucemia crónica se asocia con daño a largo plazo de varios órganos, especialmente riñones (nefropatía), ojos (retinopatía), nervios (neuropatía), corazón (cardiopatía) y vasos sanguíneos (Restrepo, 2000).

La DM afecta actualmente a más de 366 millones de personas en el mundo, y se espera que alcance los 540 millones en el 2025. La mayoría de los casos se presentan en países en vías de desarrollo. La Federación Mexicana de Diabetes reporta que en nuestro país la DM ocupa el primer lugar como causa de defunciones por año; tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente, con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales. Cabe señalar que según la Dirección General de Información en Salud, en el 2007 hubo un número mayor de defunciones en el grupo de las mujeres (37,202 muertes) comparado con el de los hombres (33,310), con una tasa de 69.2 por 100,000 habitantes en mujeres y de 64 en hombres. Estas son diferencias importantes a considerar en las acciones preventivas, de detección, diagnóstico y tratamiento de este padecimiento.

Clasificación de la DM

La clasificación actual de la DM, aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), está basada en la propuesta por el National Diabetes Data Group (NDDG) en 1979. En ésta se utilizan números arábigos, de forma que la DM de tipo 1 es la

que antes se conocía como dependiente de insulina o juvenil, y la DM tipo 2 sustituye a la nombrada previamente como no dependiente de insulina o tipo II. Además de introducir por separado a la diabetes gestacional, la intolerancia a la glucosa y un grupo denominado “otros tipos de diabetes”. Ya en 1997, una comisión formada por expertos de la OMS y de la American Diabetes Association (ADA), dio a conocer los nuevos criterios de clasificación que quedaron reducidos a cuatro grupos (Tébar y Escobar, 2009):

- DM tipo 1: las células β se destruyen, lo que conduce a una deficiencia absoluta de insulina. Sus primeras manifestaciones clínicas suelen ocurrir alrededor de la pubertad, cuando ya la función se ha perdido en alto grado y la insulino terapia es necesaria para que el paciente sobreviva. Abarca entre el 5 y el 10% de los casos.
- DM tipo 2: se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina pero se requiere también que exista una deficiencia en la producción de insulina que puede o no ser predominante. Ambos fenómenos deben estar presentes. Es la más común, representa más del 90% de los casos.
- Otros tipos específicos: conforma un número considerable de patologías específicas, que se enumeran en la Tabla 1.
- DM gestacional (DMG): se define como una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, de severidad variable, que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Este término se aplica independientemente de si se requiere o no insulina, o si la alteración persiste después del embarazo y no excluye la posibilidad de que la alteración metabólica este presente después de la gestación. Para algunos autores, se debe a casos de DM tipo 2 que se disparan por la gestación. Se presenta en aproximadamente 5% de las mujeres consideradas sanas hasta ese momento.

Si bien, existen bastantes tipos de diabetes, los más comunes dentro de la población son las DM tipo 1 y DM tipo 2, con mayor prevalencia de esta última.

Por lo anterior a continuación se describe, según Tebar y Escobar (2009), brevemente las características más importantes de estas patologías:

- La diabetes mellitus tipo 1 es aquella en la que la destrucción de las células β del páncreas conducen a una diferencia absoluta de insulina. Se reconocen dos subtipos:
 - DM tipo 1 mediada por inmunidad, o DM tipo 1A: esta forma, que represente el 95% de esta enfermedad, aparece como consecuencia de una destrucción tipo autoinmune de las células β del páncreas. Ya en fases precoces de la enfermedad, cuando todavía no hay criterios de diagnósticos de DM, pero si de otras anomalías del metabolismo de la glucosa, aparecen en sangre diferentes tipos de anticuerpos, unos dirigidos contra las propias células (anticuerpos anti-islotos o ICA), otros contra la insulina (anticuerpos anti-inulina) o también contra la descarboxilasa del ácido glutámico (anticuerpos-GAD₆₅) o contra las tirosin-fosfatasa (anticuerpos anti-IA-2 β). Estos anticuerpos, uno o más, aparecen ya en fase de alteración de la glucemia en ayunas. Refuerza el concepto de autoinmunidad la frecuente asociación a otras entidades de etiología autoinmune como las tiroidopatías autoinmunes, la enfermedad de Addison u otras que se encuentran en los síndromes pluriglandulares autoinmunes tipo 1 y 2. Estos pacientes, en su mayoría, desarrollan su enfermedad antes de los 25 años de edad, con igual presentación en ambos sexos y diferente incidencia según raza y hábitat geográfico. La velocidad de aparición de la enfermedad es muy variable y va a depender de la velocidad de destrucción de las células β . En niños y adolescentes la destrucción suele ser rápida, de tal forma que los síntomas cardinales, poliuria, polidipsia y polifagia, aparecen de forma abrupta en pocos días o semanas, induciendo con frecuencia la aparición de una grave complicación aguda de la DM que es la cetoacidosis diabética. En otros casos la destrucción es progresiva; esto

ocurre sobre todo en adultos y hace que el inicio de la diabetes se asemeje a la de una DM tipo 2.

- DM tipo 1, idiopática, o de tipo 1B: en la actualidad todavía hay algunas formas de DM tipo 1 en las que desconocemos su etiología y que componen este grupo. No presentan anticuerpos conocidos ni asociados con el antígeno leucocitario humano (HLA). Clínicamente, la insulinemia es muy fluctuante por lo que hay tendencia a frecuentes episodios de cetoacidosis.
- En cuanto a la DM tipo 2, es el tipo más frecuente, el del 90 a 95% de las personas con DM. Patogénicamente se caracteriza por la resistencia a la acción periférica de la insulina, secreción de insulina defectuosa o ambas. En el momento del diagnóstico suele haber una mezcla de ambas alteraciones y, etiológicamente lo característico es la multifactorialidad, con ausencia de destrucción autoinmune de las células β . La obesidad abdominal está presente en más de un 85% de los diabéticos tipo 2, siendo estos precisamente los que entroncan, habitualmente, con el diagnóstico de síndrome metabólico y, por tanto, con la resistencia a la insulina como elemento fundamental es su patogenia. Estos componentes tienen una carga genética importante, pero sin la participación de factores ambientales, sobre todo, del sedentarismo, no se ponen en marcha los mecanismos que provocan la aparición clínica del cuadro. La presencia de cetoacidosis no excluye el diagnóstico de DM tipo 2, si bien en estos casos debe existir un factor precipitante que incremente la demanda de acción insulínica, lo que ocurre en infecciones, intervenciones quirúrgicas o situaciones muy estresantes, entre otros.

Mientras el páncreas mantiene una secreción de insulina suficiente para vencer la resistencia insulínica, el diabético tipo 2 se mantiene en situación funcional de no insulinodependencia, pero lo habitual es que, con el paso de los años, el páncreas vaya claudicando y la secreción de insulina sea insuficiente para controlar la glucemia, momento en el que el diabético tipo 2 cambia su situación funcional a

diabético insulino dependiente. Su diagnóstico se realiza normalmente en la edad adulta (más de 40 años).

En las últimas décadas, ha aparecido un subtipo de DM tipo 2, en adolescentes y más raramente en niños con obesidades abdominales importantes y/o gran resistencia a la insulina, por lo cual a menudo se describe como “diabetes del adulto de inicio juvenil”, o “diabetes del adulto de aparición temprana”, denominada brevemente MODY, del inglés **M**aturity **O**nset **D**iabetes of the **Y**oung. En esta DM, la carga genética es importante, como lo es en las mujeres haber tenido una diabetes gestacional previa.

Por último, hay otros tipos de DM, o DM secundaria, en los cuales los signos y síntomas característicos de éste padecimiento se presentan de manera secundaria a otro padecimiento, que puede ser hormonal, cromosómico, o por intoxicación laboral o involuntaria (ver tabla 1).

Modelos de diabetes experimental

En humanos no se pueden realizar estudios para conocer la etiología de la DM, por razones tanto éticas como técnicas, ni se pueden identificar en las mujeres diabéticas embarazadas cuáles son los teratógenos que afectan la embriogénesis, ni los mecanismos mediante los cuales lo hacen. Por esta razón es necesario recurrir a modelos experimentales, ya que las características generales de la diabetes en animales son similares a las de la diabetes humana (Salazar, 2010). Hay cuatro grandes grupos de modelos experimentales que se conocen para inducir la diabetes, dependiendo de la metodología empleada:

TABLA 1. Otros tipos de diabetes mellitus (Tomada de The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997).	
Defectos genéticos de la función de la célula β	Cromosoma 12, HNF-1 α (MODY 3)
	Cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2)
	Cromosoma 20, HNF-4 α (MODY 1)
	ADN mitocondrial
	Otros
Endocrinopatías	Acromegalia
	Síndrome de Cushing
	Glucagonoma
	Feocromocitoma
	Hipertiroidismo
	Somatostatina
	Aldosterona
	Otras
Inducidas por fármacos o sustancias químicas	Vacor
	Pentamidina
	Ácido nicotínico
	Glucocorticoides
	Hormonas tiroideas
	Diazóxido
	Agonistas β adrenérgicos
	Tiazidas
	Dilantín
	Interferón α
	Otros
Infecciones	Rubéola congénita
	Citomegalovirus
	Otras
Defectos genéticos en la acción de la insulina	Resistencia a la insulina tipo A
	Leprechaunismo
	Síndrome de Rabson-Mendenhall
	Diabetes lipoatrófica
	Otros
Enfermedades del páncreas exócrino	Pancreatitis
	Pancreatectomía/traumatismo
	Neoplasia
	Fibrosis quística
	Hemocromatosis
	Pancreatopatía fibrocalculosa
	Otras
Formas infrecuentes de diabetes autoinmunes	Síndrome de Down
	Síndrome de Klinefelter
	Síndrome de Turner
	Síndrome de Wolfram
	Ataxia de Friedreich
	Corea de Huntington
	Síndrome de Lawrence-Moon-Biedel
	Distrofia miotónica
	Porfiria
	Síndrome de Prader-Willi
	Otros

- Diabetes quirúrgica. Consiste en realizar una pancreatectomía total o parcial para desencadenar estados hiperglucémicos parecidos a la diabetes tipo 1 y tipo 2 respectivamente (Ingle, 1948). Actualmente, solo tienen importancia histórica. Mediante este modelo Banting y Best descubrieron en perros la importancia de la carencia de la insulina en la patogenia de la DM tipo 1.
- Diabetes viral. La infección viral se señala como una causa de diabetes tanto en animales como en humanos (Craighead, 1975; Barret-Connor, 1985). Varios tipos de virus se han utilizado para inducir diabetes experimental en diversas especies animales, por ejemplo el virus de la encefalomiocarditis, el virus de la rubeola, el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus de coxackie y el reovirus (Salazar, 2010). Estos modelos presentan numerosas dificultades experimentales, por lo que hoy en día son muy poco utilizados en investigación.
- Diabetes espontánea. Existen especies que pueden desarrollar esta enfermedad espontáneamente; algunas de ellas son la rata Wistar BB, que se nombran así ya que fueron descubiertas en el laboratorio BioBreeding de Ottawa, Canadá (Bieg y Lernmark, 1999); el hámster chino y el ratón obeso (OB). Con estas variedades, de los cruces adecuados, se pueden obtener cepas con individuos que desarrollan la enfermedad en un elevado porcentaje (Ozturk y cols. 1996). Estas cepas, sin embargo, son caras, en su mayoría son modelos de la DM2, y no siempre los resultados obtenidos en estudios donde se utilizan pueden extrapolarse a la especie humana.
- Diabetes química. La administración de ciertas sustancias químicas a animales provoca síntomas similares a la diabetes. Entre estos químicos, la aloxana y la estreptozotocina (STZ) han mostrado ser los más efectivos, por lo que son los que se utilizan comúnmente. Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células β pancreáticas (Mora y cols. 2009).

Tanto la aloxana como la STZ 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. La aloxana, a pesar de haber sido utilizada desde hace más de 60 años, da resultados variables, a causa de su corta vida media a pH fisiológico; y los roedores tratados con este agente pueden recuperarse en algunos casos, y en otros el descontrol metabólico puede causar que los sujetos pierdan la vida antes de que se termine el estudio (Méndez y Ramos, 1994).

La STZ es un antibiótico producido por la levadura *Streptomyces acromogenes* (Vaura y cols, 1959), su denominación química es N-(metilnitrosocarbamoil)- α -D-glucosamina. Pertenece al grupo de las nitrosoureas, junto con la fotemustina y la procarbazona. Durante su metabolización, estas sustancias inducen daño al ADN debido a la alquilación de sitios específicos de seis bases generando radicales libres como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$). También se ha encontrado que estos compuestos aumentan la generación del radical superóxido por el sistema xantina oxidasa de las células pancreáticas, de la misma forma que estimulan la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y causan la fragmentación del ADN en islotes pancreáticos aislados de rata, que es una de las características de la apoptosis (Szkudelski, 2001). Sus ventajas principales son: 1) que la dosis diabética de esta sustancia son menores que las necesarias con aloxana; 2) la homogeneidad del daño causada, ya que rara vez los organismos se recuperan o se pierden; 3) la estabilidad, ya que hay reportes de que pueden tenerse animales diabéticos meses después del tratamiento, lo que no ocurre con la aloxana. Su principal desventaja es económica, ya que su costo es cerca de 100 veces mayor al de la aloxana.

Para inducir un estado metabólico y fisiológico semejante a la DM tipo 1 con STZ en rata, hay dos aproximaciones, la inducción con dosis única (50-80 mg/Kg, según la cepa); y la inducción con múltiples dosis (un esquema un poco más complejo, en el que se administran dosis de 10-25 mg/Kg tres o cuatro veces, espaciadas 2-3 días (Bolzán y Bianchi, 2002).

Estrés oxidativo, DM y embarazo.

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y radicales libres (RL), que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa (Ramos y cols, 2006).

El oxígeno (O_2) contenido en el es fundamental para la vida, sin embargo, muchas reacciones en las que participa el O_2 generan especies reactivas de oxígeno (ERO), algunas tienen el carácter químico de ser RL, es decir, presenta al menos un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándoles una configuración espacial que genera una alta inestabilidad con una enorme capacidad para combinarse con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular (Valdez-Penagos y Mendoza-Núñez, 2004).

Hay numerosas investigaciones que evidencian que las ERO contribuyen significativamente a la progresión de la diabetes y sus complicaciones (Al-Dallen y cols, 2004).

Los principales efectos bioquímicos de la hiperglucemia que caracteriza a la DM son la glucosilación no enzimática de proteínas y la reacción de Maillard o glicatación. En este sentido, inicialmente se produce una reacción entre el azúcar con la proteína formando un compuesto que se denomina base de Schiff, cuya estructura se reordena hacia una forma más estable llamada producto de Amadori, la cual sufre una serie de complejas transformaciones que llevan a la formación de los productos finales de glucosilación avanzada (AGEs) los cuales favorecen el EOx (Valdez-Penagos y Mendoza-Núñez, 2004).

La DM es considerada como la entidad metabólica más común durante la gestación, presentándose más o menos en el 5% de los embarazos. El 90% de estas pacientes presentan DMG, es decir son mujeres con predisposición genética o metabólica a la diabetes, incapaces de compensar adecuadamente los efectos diabetogénicos del embarazo; el restante 10% está conformado por mujeres con

diabetes ya diagnosticadas antes del embarazo (DM1, DM2 y otros tipos) (Restrepo, 1992).

Se sabe que las hormonas que son secretadas durante el embarazo tienen efecto diabetogénico porque producen alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos. Los estrógenos, la progesterona, el lactógeno placentario y el cortisol, son antagonistas de la insulina; por lo tanto la captación periférica y la utilización de la glucosa disminuyen. Además de lo anterior, la placenta atrapa y destruye la insulina, lo que agrava el problema; sin embargo, el páncreas tiende a producir mayor cantidad de insulina para mantener una buena tolerancia a la glucosa (Malacara, 1990).

El embarazo es una condición metabólica de tipo oxidativa en que la unidad feto-placentaria se forma a expensas de la madre (Acevedo y cols, 2007). El ambiente hiperglucémico e hiperlipémico que rodea al embrión genera sustancias oxidantes con alta capacidad para dañar la estructura de las biomoléculas y alterar las funciones en que ellas participan. Dichas sustancias pueden provocar cambios en eventos de señalización cruciales durante determinados períodos del desarrollo, afectar la expresión de genes relacionados con la morfogénesis y producir daño estructural del material genético, mecanismos que han sido implicados en la embriopatía diabética (Loeken, 2006).

Freinkel y cols. (1986) lograron demostrar, en cultivo de embriones de rata de día 9.5 días de gestación, que agregando glucosa y/o hidroxibutirato (uno de los dos cuerpos cetónicos) se incrementa la presencia de retraso en el crecimiento neuronal y la organogénesis extraneuronal.

La incidencia de malformaciones congénitas aumenta cuatro veces entre los niños de madre con diabetes pregestacional, debido al medio metabólico alterado durante la organogénesis (primeras semanas del embarazo) (Carpenter, 2007).

La descompensación de la enfermedad alrededor del período de organogénesis a sido relacionada con un espectro de alteraciones del desarrollo que incluye:

anomalías del sistema nervioso, cardiovascular, renal, sistema esquelético, retardo en el crecimiento y aborto (García y García, 2009).

La etiología del efecto teratogénico de la diabetes no está completamente dilucidada aún, pero las malformaciones congénitas producidas por diabetes experimental son prevenidas en animales con la administración *in vivo* de diferentes antioxidantes, tales como vitamina C y/o E, α -tocoferol, ácido lipoico, butil-hidroxitolueno butilado, resveratrol y N-acetil cisteína (Cederberg y cols. 2001; Cederberg y Eriksson, 2005; Singh y cols. 2011; Wentzel y Eriksson, 2005; Zabihi y cols. 2007).

Por citar algunos ejemplos, Méndez y Palomar-Morales (1999), concluyen, después de haber trabajado en un modelo *in vivo* de rata, que las poliaminas putrescina, espermina y espermidina administradas el día 5 de gestación, pueden prevenir las reabsorciones y los efectos embriotóxicos causados por una DM inducida por aloxana.

Fernández y cols. (2013) observaron que la administración de vitamina E durante la gestación de ratas Wistar, disminuye el número de reabsorciones, aumenta la talla de los embriones, además de registrar menor retraso del desarrollo, severidad de las malformaciones y contenido de marcadores de daño oxidativo a proteínas y lípidos.

Guney y cols. (2011) demostraron que el tratamiento de vitamina E más selenio en ratas preñadas, reduce los niveles de lipoperoxidación lipídica y aumenta significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa y concluye que es un potente antioxidante que puede desempeñar un papel en la prevención de enfermedades relacionadas con la diabetes presente en el embarazo.

Siman y Eriksson (1997) utilizaron diferentes dosis de vitamina C en ratas diabéticas preñadas, reportando la disminución de reabsorciones tempranas y tardías así como malformaciones. Además de que el tratamiento aumento la

concentración de α -tocoferol en la placenta y reducción de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico en suero.

Antioxidantes

Un antioxidante (AOx) es toda sustancia que en concentraciones normales posee una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un RL (Mayor-Oxila, 2010). Las estructuras críticas en la célula son protegidas por la capacidad de varios tipos de AOx y también por otros mecanismos como los de reparación o eliminación del daño por enzimas específicas (Pérez y cols, 2008).

Los antioxidantes se clasifican en endógenos, los cuales se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células, estos son principalmente mecanismos enzimáticos como superóxido-dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y mecanismos no enzimáticos como la coenzima Q-; y exógenos, estos ingresan a través de la dieta (Tabla 2). La dieta es la mayor fuente de nutrientes que contienen propiedades antioxidantes o son elementos para la síntesis de enzimas antioxidantes. En la protección de las células contra la oxidación, todos los niveles de defensa antioxidantes deben actuar en conjunto para formar un sistema integrado (Pérez y cols, 2008).

Tabla 2. Componentes del sistema antioxidante en humanos (Tomada de Lozada y García, 2009).	
COMPONENTE	ACCIÓN ANTIOXIDANTE
Enzimas <ul style="list-style-type: none"> • Superóxido dismutasa <ul style="list-style-type: none"> •Catalasa •Glutación peroxidasa •Tioredoxina 	<ul style="list-style-type: none"> • Remover radical superóxido • Convertir H₂O₂ a H₂O
Secuestradores de iones de metales <ul style="list-style-type: none"> •Metalotioneina •Fitoquelantes •Transferrina •Albúmina 	<ul style="list-style-type: none"> • Quelantes de zinc, cobre e hierro
Antioxidantes de bajo peso molecular <ul style="list-style-type: none"> •Uratos (endógenos) •Vitamina C (exógeno) •Vitamina E (exógeno) •Carotenoides (exógeno) •Fitoquímicos (exógeno) 	<ul style="list-style-type: none"> • Recicladores de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

Actualmente se ha propuesto el uso de diversos antioxidantes para la prevención de enfermedades crónicas degenerativas y del envejecimiento prematuro (García-Álvarez y cols, 2009).

Los alimentos de origen vegetal, en especial las frutas, vegetales, nueces, vino tinto y jugos presentes en la dieta, de acuerdo a estudios epidemiológicos realizados, pueden ejercer un efecto protector contra algunas enfermedades tales como el cáncer, trastornos cardiovasculares y cerebro-vasculares (Weisburger, 1999). Esta propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como la vitamina C, vitamina E, β-caroteno, y una mezcla compleja de compuestos fenólicos (Padilla y cols. 2008).

El resveratrol (3, 5, 4' trihidroxiestilbeno), es un compuesto fenólico producido por algunas plantas espermatofitas, es particularmente abundante en las uvas, donde se produce en respuesta a condiciones de estrés (Montero y cols, 2003), Este compuesto tiene la característica de contener en su estructura dos grupos

bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, lo que le confiere una alta capacidad antioxidante (Gutiérrez y cols, 2009).

Gutiérrez y cols. (2009), reportaron que el resveratrol disminuyó eficientemente los niveles de lipoperoxidación, debido probablemente a que en su estructura contiene dobles enlaces y grupos hidroxilo que son capaces de neutralizar radicales libres tales como el anión superóxido, el hidroxilo y radicales lipídicos a través de la donación de electrones, convirtiéndose finalmente en un radical estabilizado por resonancia.

Por otra parte Singh y cols. (2011) realizaron un estudio en el que utilizaron resveratrol para prevenir los efectos teratogénicos producidos por el 2, 3 ,7 ,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, y encontraron que el resveratrol es un candidato atractivo para prevenir efectos inmunotóxicos inducidos por los contaminantes ambientales durante el embarazo, lo que protege al feto de los efectos nocivos.

Hung y cols. (2007), en un estudio teratológico en ratas expuestas a etanol, obtuvieron en sus resultados que la generación de ERO está relacionada con la apoptosis de células madre en embriones de rata, y confirmaron la hipótesis de que el resveratrol inhibe la muerte celular mediante la interrupción de la síntesis de ERO.

HIPÓTESIS

Debido al alto índice de malformaciones provocadas por el padecimiento de la DM, existe una gran preocupación por la progenie; por lo tanto es de vital importancia la realización de estudios en los que se pueda evaluar el efecto embriotóxico de esta enfermedad. Así mismo, la búsqueda de compuestos que logren neutralizar los daños de teratogénos, es una tarea que el hombre debe tratar de resolver día a día.

Por todo lo anterior se espera, que el resveratrol por su capacidad antioxidante pueda funcionar como un agente de reversión ante los efectos teratogénicos de la DM.

OBJETIVOS

General:

- Evaluar el potencial antiteratogénico del resveratrol en ratas gestantes diabéticas.

Particulares:

- Encontrar la dosis diabetógena de STZ que induzca malformaciones embrionarias en ratas.
- Realizar una revisión morfológica de los fetos de ratas diabéticas.
- Evaluar la actividad de los principales complejos enzimáticos relacionados con la neutralización de las ERO (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) en hígado de fetos de ratas diabéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se dividió en dos fases, en las cuales se utilizaron 28 ratas hembra, de la cepa Wistar, de 250-300 g, que se obtuvieron en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

Primera fase.

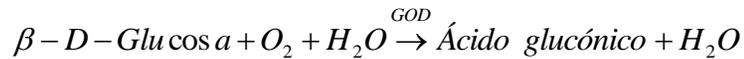
En la primera fase, se buscó la dosis de STZ que produjera diabetes en la totalidad de los organismos sin causar muertes, y que se acompañara de aparición de malformaciones. Para este fin, se utilizaron 16 hembras en etapa reproductiva, las cuales en etapa de proestro fueron alojadas con ratas macho fértiles, durante 12 horas. Para determinar si la fertilización fue efectiva, se realizó un frotis vaginal y la presencia de espermatozoides determinó el día 0 de gestación.

Una vez preñadas, las ratas se asignaron al azar en 4 grupos homogéneos: a tres de ellos se les administró STZ el día cuatro de preñez, a dosis de 40, 50 y 60 mg/Kg respectivamente, disuelta en amortiguador de citratos (100 mM pH 4.5) ya que son las dosis a las cuales diversos autores han reportado daño a páncreas, y aparición de un estado similar a la DM. Al otro grupo se le aplicó solo el amortiguador, y fue considerado como el grupo testigo.

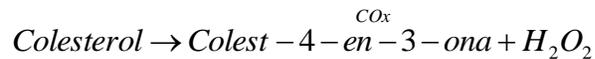
El día 19 de gestación, las hembras se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/Kg), una vez anestesiadas se obtuvo sangre por punción cardíaca. En seguida los fetos se obtuvieron por laparotomía, se pesaron y midieron. Posteriormente la sangre se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm para la obtención de suero, con el cual se hicieron las siguientes pruebas:

- Glucosa: se utilizó el estuche comercial Spinreact Ref. 1001190. Su fundamento está basado en oxidación de la glucosa a ácido glucónico por medio de la glucosa oxidasa (GOD); también conocido como Trinder. El H₂O₂ producido de dicha reacción se detecta mediante un aceptor

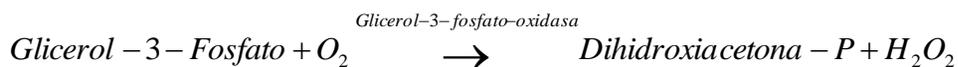
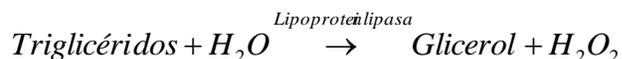
cromogénico de O₂, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). Las reacciones son las siguientes:



- Colesterol: se utilizó el estuche ELITech Ref. CHSL-5505. Su principio está dado por la hidrolización de los esterases a partir de la colesterol esterasa (CE), con la cual se origina colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre producido más el colesterol preformado se oxidan en presencia de colesterol oxidasa (COx) para dar colest-4-en-3-ona y H₂O₂. Un cromógeno quinonaimina se produce cuando el fenol se acopla oxidativamente con 4 aminofenazona, en presencia de POD con H₂O₂. Las reacciones son las siguientes:



- Triglicéridos: se midieron con el estuche Spinreact Ref. 1001310, que se basa en que los triglicéridos incubados con lipoprotein lipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y H₂O₂ por GPO. Al final, el H₂O₂ reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol. Las reacciones son las siguientes:



- Lípidos totales: la medición se realizó con el estuche Spinreact ref. 1001270. Los lípidos insaturados reaccionan con ácido sulfúrico en caliente con formación de iones carbonio. En una segunda etapa, estos en presencia de fosfovainillina dan una coloración rosada.

Los fetos se evaluaron en su aspecto morfológico mediante la técnica de Wilson modificada (Barrow y Taylor, 1969).

Purificación de resveratrol

El resveratrol fue extraído de las pastillas de venta al público Resveratrol CAPS (Green side) a partir de procesos de cromatografía en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos de la FES Iztacala, con el apoyo y supervisión de la Dra. Ana María García Bores. A continuación se hace una breve descripción del proceso de extracción:

Primeramente, el contenido de las capsulas se pesó en balanza analítica y se mezcló con metanol en proporción 1:5, la mezcla se dejó reposar en un matraz de vidrio tapado con aluminio durante tres días. Cumplido el tiempo, el material recuperado de la mezcla se hizo pasar por embudo de vidrio con papel filtro (previamente humedecido con metanol) y se colectó en un vaso de precipitados. La pastilla se volvió a mezclar con metanol, siguiendo el mismo procedimiento antes descrito, esto se realizó 3 veces más.

El filtrado recuperado de los procedimientos anteriores se sometió a destilación en rotavapor y finalmente se dejó secar en una campana de vacío, esto tardó 3 días. Se realizó una cromatografía en capa fina para comprobar la presencia de resveratrol, el cual en lámpara UV se observa de color azul.

Al comprobar que el resveratrol se encontraba en la muestra, se procedió a montar la columna cromatográfica. Cada alícuota constó de 200 ml, los cuales fueron destilados en rotavapor y el producto se dejó secar en frascos de vidrio numerados. Para el procedimiento se ocupó como solvente, primeramente diclorometano puro y en la alícuota número 7 se utilizó como solvente diclorometano-metanol en relación 95:5. Se obtuvieron en total 48 alícuotas. El resveratrol se obtuvo con las alícuotas 29 a la 43, las cuales fueron disueltas en metanol y con ellas se llevó a cabo una cromatografía en capa fina para compararlo con el compuesto de referencia identificado previamente por estudios de resonancia magnética nuclear de protones (^1H) y carbono (^{13}C).

Segunda fase

Una vez que se tuvo la dosis diabetogénica, se llevó a cabo la segunda fase de la tesis. Se emplearon tres grupos de ratas, de 4 individuos cada uno. Al grupo testigo se le administró el amortiguador de citratos (100 mM pH 4.5) el día 2, y a los otros dos grupos se les indujo diabetes por medio de una inyección intraperitoneal de 50 mg/Kg de estreptozotocina (STZ), la dosis que se encontró con mayor efecto diabetógeno en la primera parte, esto se hizo el día cuatro de gestación; de aquí se formaron los grupos restantes, un grupo diabético (DM) y al otro se le administró resveratrol (DM+R) en dosis de 100 mg/Kg de peso corporal (Singh y cols, 2011); por vía oral, del día 9 al 16 de gestación.

Las ratas se sacrificaron el día 19 y se valoraron los fetos como se describió anteriormente; además, se les extrajo el hígado para homogeneizarlo en solución salina, y en los extractos crudos se evaluaron las actividades de tres enzimas antioxidantes, las cuales fueron:

- Catalasa o CAT (Aebi, 1960), esta técnica está basada en la reacción que tiene lugar cuando la enzima consume el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y en su lugar forma agua y O_2 . La reacción se monitorea dentro de los primeros 60 segundos de agregado el extracto, por la disminución de la absorbancia a 240 nm, ya que el peróxido de hidrógeno absorbe energía luminosa a esta longitud de onda, mientras que el agua y el oxígeno molecular no lo hacen.
- Glutación Peroxidasa o GPx (Paglia y Valentine, 1967), esta enzima consume glutatión y como cofactor oxida NADPH, esta reacción se acopla con la reacción de la glutatión reductasa, que regenera al cofactor. El aumento en la absorbancia a 340 nm, el pico de absorción de la NADPH, durante los minutos 2 a 4 después de la adición del extracto, se utiliza para obtener la actividad de la enzima.
- Superóxido dismutasa (SOD) (Beauchamp y Fridovich, 1971), su fundamento está basado en la reducción del nitroazul de tetrazolio por medio de la xantina, transfiriendo electrones desde el ión superóxido a la xantina. La adición de SOD o extracto biológico donde se encuentra la actividad enzimática inhibe la transferencia y disminuye la reducción de nitroazul de tetrazolio, en medio alcalino. La reducción del nitroazul de tetrazolio se refleja en un aumento en la absorbancia a 560 nm.

Los resultados anteriores fueron referidos por la cantidad de proteínas evaluadas por el método de Lowry y cols. (1951) en el cual se forma un complejo coloreado de cobre con el enlace peptídico y un derivado de tirosinas que contribuyen a la absorbancia total.

Análisis estadístico

Los datos de las pruebas bioquímicas y los parámetros fetales (peso, talla) se analizaron con ANOVA simple seguida de prueba de Tukey o LSD, cuando fue

necesario. Para los datos de tamaño de camada, frecuencia de malformaciones, se utilizó ANOVA en rangos de Kruskal Wallis. Las pruebas se realizaron en el paquete estadístico SPSS para Windows.

RESULTADOS

Dosis diabética de STZ

Variables maternas

En cuanto al peso corporal, este fue registrado diariamente durante el periodo gestacional, y en la figura 1 se muestra el peso al momento del sacrificio. Se observa que todos grupos mantuvieron un peso homogéneo, aunque se aprecia una ligera tendencia a perder peso en el grupo de 40 mg/Kg de STZ con respecto al resto de los grupos, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

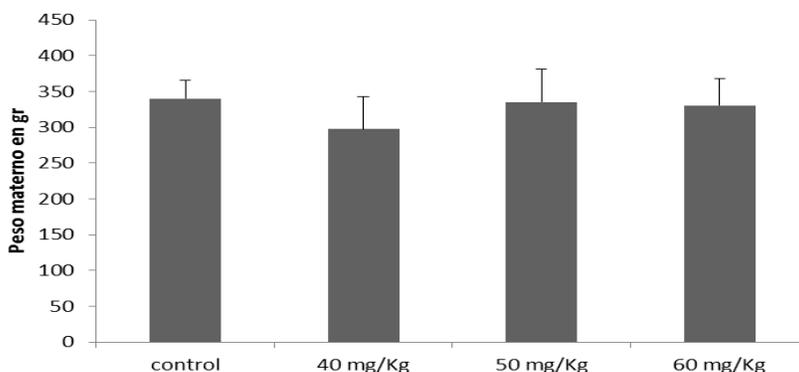


Figura 1. Peso corporal de ratas gestantes, tratadas con diferentes dosis de STZ el día de sacrificio (n = 5).

La concentración de glucosa en suero sanguíneo se muestra en la figura 2. Es claro un aumento en el nivel de glucosa sérica en los tres grupos experimentales con respecto al grupo control, siendo más notorio en el grupo de 50 mg/Kg de STZ, aun cuando no hay diferencia significativa en términos estadísticos.

La concentración del colesterol se mostró un tanto homogénea para todos los grupos mostrándose una ligera tendencia al aumento en los grupos de 50 mg/Kg y 60 mg/Kg de STZ, con respecto al grupo control. En este parámetro tampoco se encontraron diferencias significativas (figura 3).

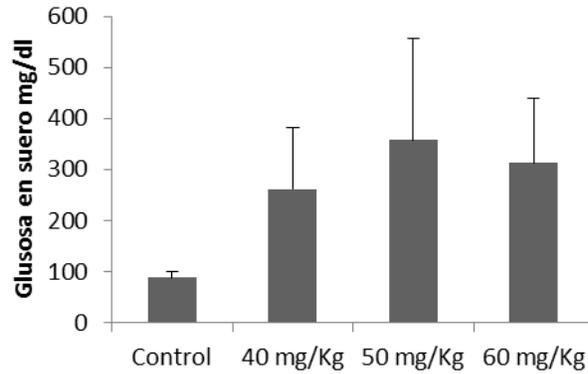


Figura 2. Concentración de glucosa en suero de las ratas gestantes tratadas con STZ a varias dosis el día de sacrificio (n = 5).

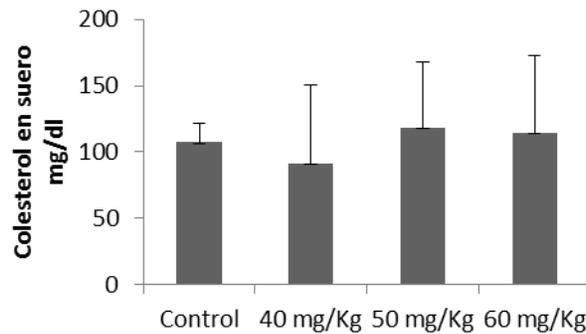


Figura 3. Concentración de colesterol en sangre de las ratas gestantes tratadas con STZ a diferentes dosis el día de sacrificio, (n = 5).

En la concentración de triglicéridos, los resultados se comportaron de manera uniforme, aunque es un poco evidente una tendencia al aumento en el grupo de 40 mg/Kg de STZ con respecto al grupo control, aunque aquí tampoco se encontraron diferencias significativas (figura 4).

Los lípidos totales se encontraron más altos en todos los grupos experimentales, siendo más evidente en los grupos de 40 mg/Kg y 60 mg/Kg de STZ. No hay diferencias significativas entre grupos (figura 5).

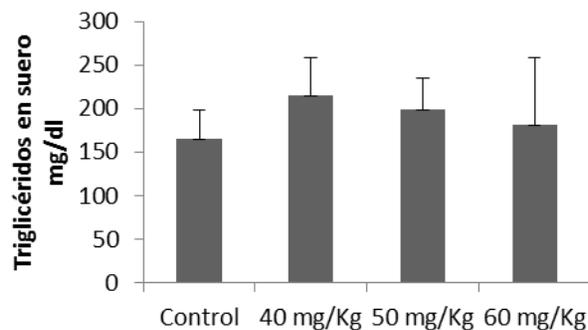


Figura 4. Concentración de triglicéridos en sangre, el día de sacrificio, de las ratas gestantes tratadas con diferentes dosis de STZ (n = 5).

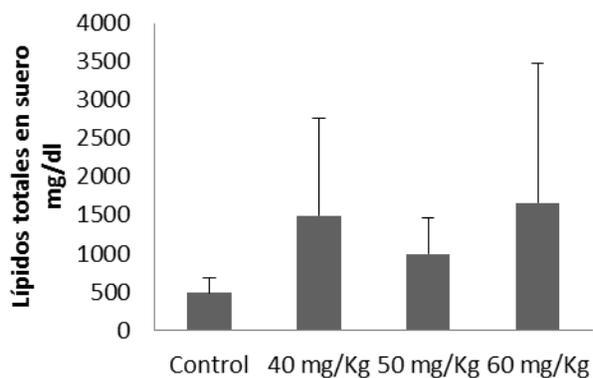


Figura 5. Concentración de lípidos totales de las ratas gestantes tratadas con STZ a distintas dosis el día de sacrificio (n = 5).

Variables fetales

Los pesos corporales de los fetos de las ratas gestantes tratadas con diferentes dosis de STZ se muestran en la figura 6. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

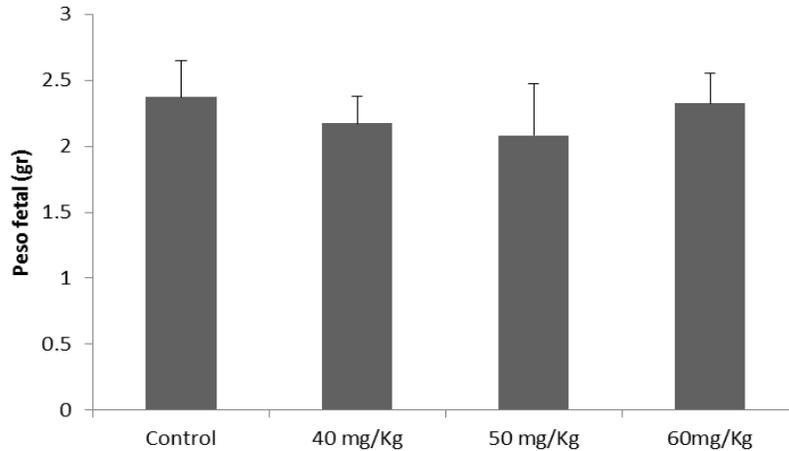


Figura 6. Peso de los fetos de 19 días de edad gestacional de las ratas gestantes tratadas con diferentes dosis de STZ (n = 40 - 50).

La longitud cefalocaudal de los fetos de las ratas gestantes tratadas con diferentes dosis de STZ mostrada en la figura 7, tuvo diferencias significativas entre el grupo de 40 mg/Kg de STZ y el grupo testigo, los otros grupos no mostraron diferencias.

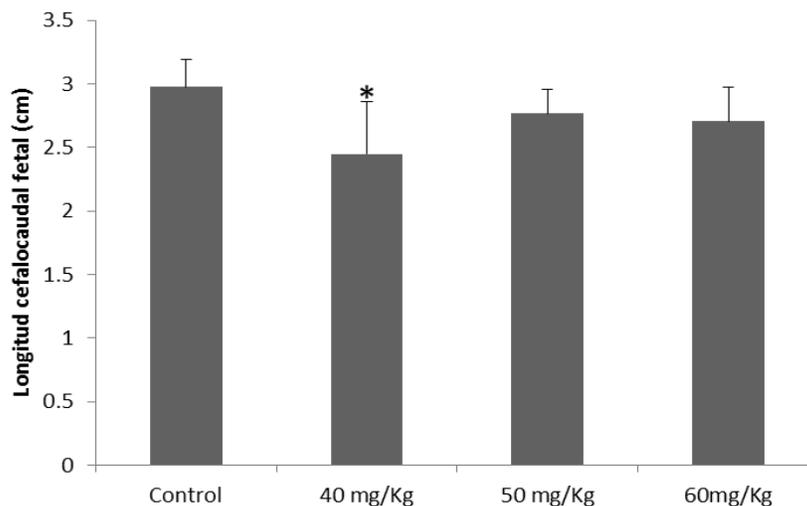


Figura 7. Longitud (tamaño) de los fetos de 19 días de edad gestacional, de las ratas gestantes tratadas con diferentes dosis de STZ (n = 40 a 50) (*p<0.05).

En cuanto al estudio morfológico, el grupo testigo tuvo un porcentaje de malformaciones exactamente a 0, lo que se encuentra dentro de lo reportado en condiciones normales para esta especie, mientras que en los grupos experimentales se observaron diferentes malformaciones, la mayoría de ellas

relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso central y particularmente con el desarrollo del cerebro. Se observó una cavidad en el área del mesencéfalo que represento el 14.70 % en el grupo tratado con 40 mg/Kg de STZ, el 26.47% en el grupo que recibió 50 mg/Kg de STZ y el 33.33 % en el grupo que fue sometido a 60 mg/Kg de STZ. En el grupo de 50 mg/Kg de STZ también se encontró el 5.88 % de exencefalia al igual que una observación de pulmones perforados (figura 8).

De los resultados obtenidos en la primera fase, se concluyó que no hay diferencias significativas en los parámetros evaluados en las ratas gestantes y en los fetos en las dosis de 50 y 60 mg/Kg de STZ, por lo que para la segunda fase se utilizó la dosis de 50 mg/Kg.

puede usarse la STZ tanto a dosis de 50 mg/Kg como a la de 60 mg/Kg, por lo que para la segunda fase se utilizó la dosis de 50 mg/Kg (ver Resultados).

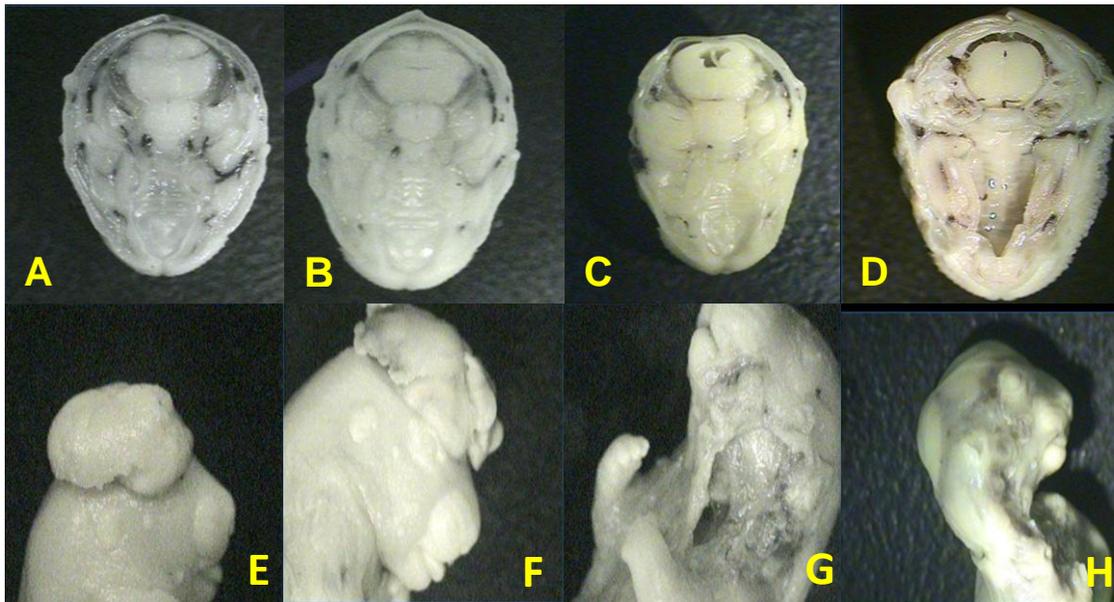


Figura 8. Superior. Corte transversal de cerebro de fetos de ratas tratadas con STZ a diferentes dosis. A. Testigo. B. 40 mg/Kg STZ, C. 50 mg/Kg STZ y D. 60 mg/Kg STZ. Inferior. E y F casos de exencefalia, G y H presentaron tejido degenerado. Estos cuatro pertenecen al grupo de 50 mg/Kg STZ. 12.5 aumentos.

Efecto del resveratrol sobre las malformaciones fetales

En esta fase, se evaluó el peso corporal de las progenitoras durante todo el estadio gestacional. Este registro, no presentó diferencias significativas, aunque sí se observa una leve ganancia de peso en las ratas del grupo tratado con resveratrol con respecto a los grupos testigo y al tratado con STZ. En la figura 9 se muestra el peso al momento del sacrificio de las ratas.

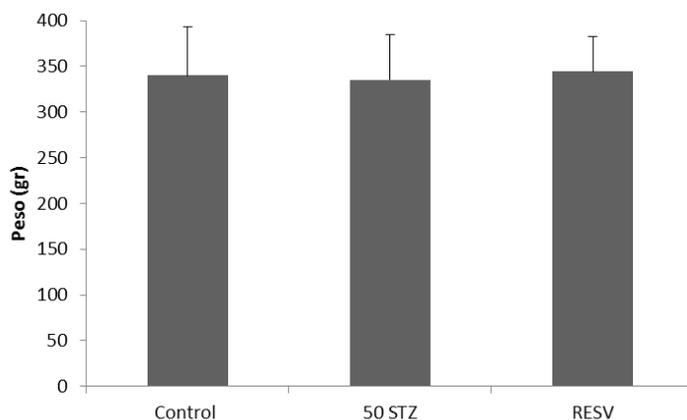


Figura 9. Peso al momento de sacrificio (día 19 de gestación) de las ratas progenitoras gramos (n=5).

En cuanto a las características de las camadas, se puede decir que tanto el grupo tratado con 50 STZ como el grupo tratado con resveratrol tuvieron mayor número de crías con respecto al grupo testigo, sin embargo el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas. Las reabsorciones fueron más recurrentes en el grupo diabético, el grupo tratado con resveratrol mostro una reducción en la frecuencia de este parámetro, pero no alcanzo el nivel del grupo testigo (figura 10).

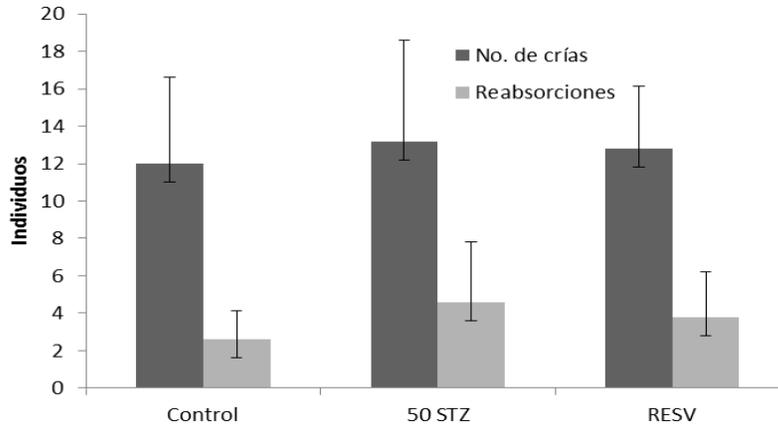


Figura 10. No. de crías y reabsorciones obtenidas en las camadas.

Variables fetales

Los registros de los pesos de los fetos de las ratas de los diferentes grupos arrojaron que tanto el grupo diabético como el tratado con resveratrol, presentaron una reducción con respecto al grupo testigo, siendo más notoria esta reducción en el grupo de resveratrol; las diferencias no son estadísticamente significativas (figura 11).

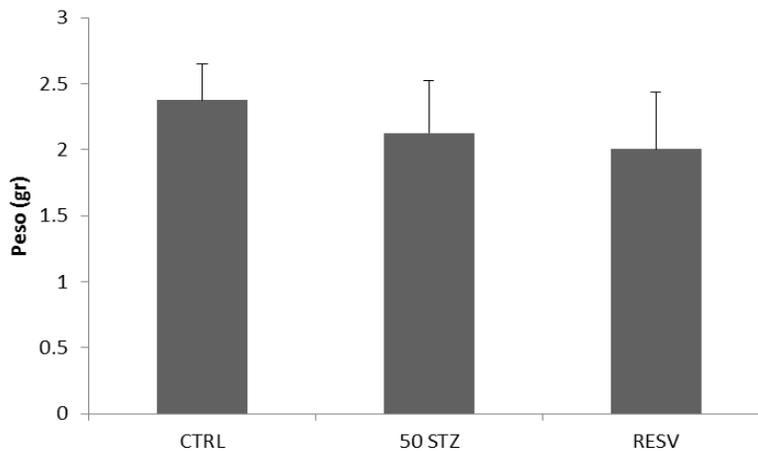


Figura 11. Peso corporal de los fetos obtenidos de ratas preñadas y tratadas con STZ y resveratrol.

La longitud cefalocaudal de los fetos se vio también reducida en los grupos diabético y con resveratrol, con respecto al testigo, mostrándose más bajo en el de resveratrol. No existen diferencias significativas (figura 12).

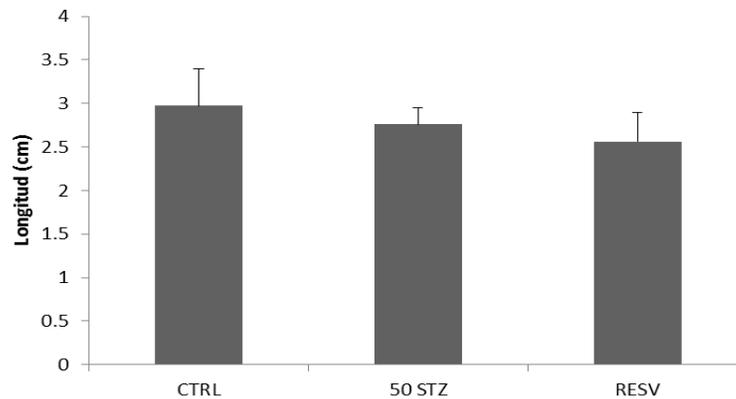


Figura 12. Longitud cefalocaudal de los fetos obtenidos de ratas diabéticas gestantes tratadas con STZ y resveratrol.

Los resultados arrojados en el estudio morfológico de hueso no se muestran cambios significativos con o sin la administración del resveratrol.

En cuanto a la actividad enzimática hepática fetal, se observaron diferencias significativas en los tres complejos enzimáticos estudiados, que fueron catalasa, SOD y GPx (figuras 13, 14 y 15). Se observó que tanto CAT como GPx, se vieron incrementadas en el grupo de RESV respecto al grupo diabético, mientras que en SOD se produjo un resultado contrario, pero este resultado no es significativo.

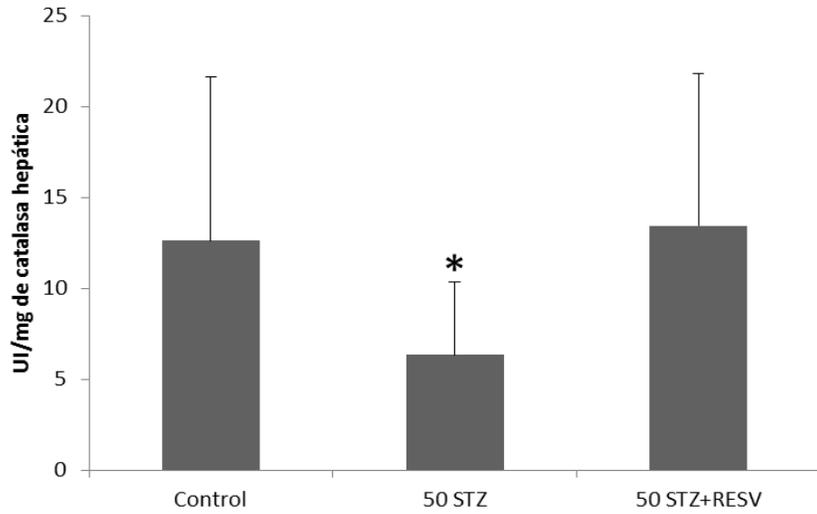


Figura 13. Actividad de catalasa hepática, de fetos de ratas diabéticas preñadas tratadas con STZ y resveratrol (* p < 0.05).

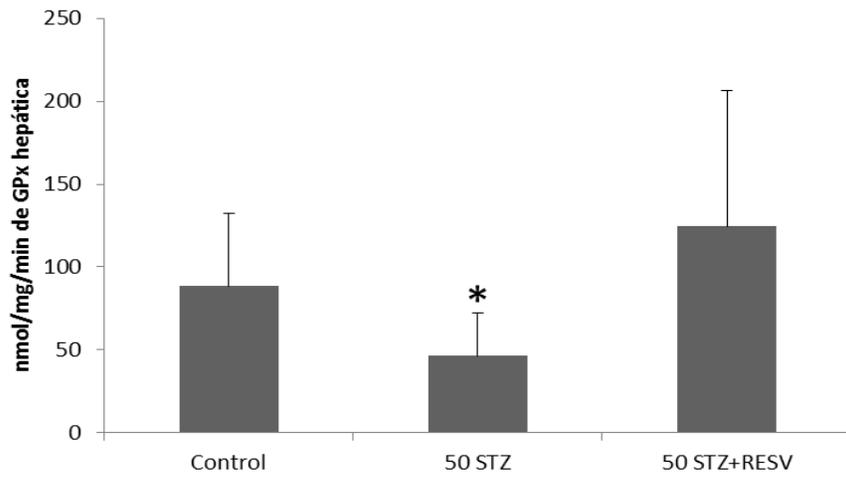


Figura 14. Actividad de GPx hepática de fetos de ratas diabéticas preñadas tratadas con STZ y resveratrol (* p < 0.05).

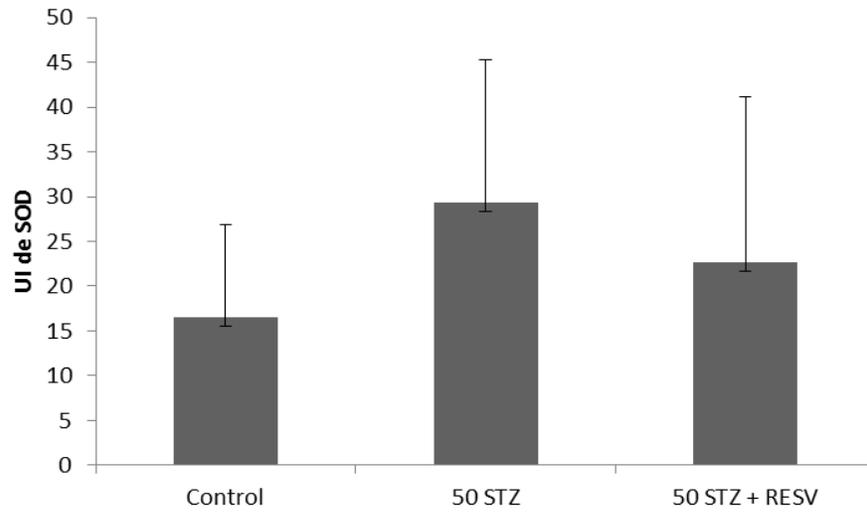


Figura 15. Actividad de SOD hepática de fetos de ratas diabéticas preñadas tratadas con STZ y resveratrol.

DISCUSIÓN

Aunque solo uno de los parámetros evaluados arrojó diferencias estadísticas significativas, cabe mencionar que se observaron tendencias que permiten decir cuál de las 3 dosis de STZ fue más efectiva para lograr los efectos deseados, la cual fue de 50 mg/Kg.

En cuanto a los pesos de las ratas progenitoras, se observó que los grupos experimentales mostraron una disminución con respecto al grupo testigo. Los animales que, como consecuencia de la administración de un agente diabetogénico como la STZ, entran en fase de hiperglucemia sufren una mayor reducción del peso corporal. Este efecto en el peso corporal observado en pacientes diabéticos puede ser el resultado de la pérdida de proteínas debido a la imposibilidad de usar los carbohidratos como fuente de energía. Esta baja de peso también es asociada a la excesiva diuresis característica en los cuadros diabéticos (Moray cols, 2009).

La STZ se ha reportado ampliamente como inductora de DM experimental debido a la destrucción selectiva de los islotes β pancreáticos productores de insulina. Es conocido que después de la administración de la STZ, la glucosa en sangre presenta un respuesta trifásica; a las dos horas los niveles se elevan, posiblemente por un efecto glicogenólico en el hígado, más tarde tiene un decaimiento muy marcado a las 10 horas, para después incrementarse a las 24 horas originando hiperglucemia permanente (Szkudelski, 2001). En este estudio se pudo comprobar el efecto hiperglucemiante de la STZ ya que en todo los grupos diabéticos, la medición de glucosa en sangre arrojó resultados muy por encima de los reportados para ratas gestantes normoglucémicas, como los resultados obtenidos por Bolant y cols. (1990) que reportan valores de 81.0 ± 2.8 mg/100ml para ratas de 19 días de gestación sin ayuno. El grupo testigo de este estudio presentó valores de 88.23 ± 11.51 mg/dL y de 261.02 ± 120.38 , 357.52 ± 200.34 y 312.68 ± 125.83 mg/dL en los grupos tratados con 40, 50 y 60 mg/Kg de

STZ, respectivamente. No se observó diferencia significativa a causa de la gran dispersión en los tres grupos tratados con STZ, pero los valores de glucosa indican hiperglucemia.

Junod y cols. (1969) hicieron estudios en ratas Wistar macho con dosis de STZ de 45, 55 y 65 mg/Kg, reportando mediciones de 223.4 ± 18 , 333.7 ± 25 y 262.2 ± 62 mg/100 ml de glucosa en suero, respectivamente, estos datos se obtuvieron 27 días después de la inyección de STZ. Se sabe que la duración y severidad del estado diabético está relacionada con la dosis de STZ (Rosales, 1994). Los datos obtenidos en este estudio rebasan los anteriores aunque fueron obtenidos 16 días después de la aplicación de la STZ, esto puede deberse, además de la acción hiperglucemiante de la STZ, a que el parámetro de la hiperglucemia se puede ver afectado por el mismo estado de gestación. Se sabe que el embarazo tiene efectos “diabetógenos” debido principalmente a un aumento de la resistencia tisular a la acción de la insulina y al mayor metabolismo de ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol, como sustratos energéticos para el metabolismo materno.

En cuanto a la medición de los parámetros del metabolismo lipídico, cabe mencionar que, a excepción del grupo de 40 mg/Kg de STZ, todos los grupos diabéticos tanto en colesterol, triglicéridos y lípidos totales mostraron un aumento en los resultados de medición. Esto es algo que se esperaba ya que la diabetes está asociada a cambios en el metabolismo de los lípidos (Shenoy y Goyal, 2002). Debido a la falta de insulina, la enzima lipasa sensible a hormona se activa energéticamente, provocando hidrólisis de los triglicéridos almacenados, con lo que se liberan grandes cantidades de ácidos grasos y de glicerol a la sangre. En consecuencia, la concentración de ácidos grasos libres comienza a elevarse en minutos. El exceso de éstos en el plasma promueve la conversión hepática de parte de los ácidos grasos en fosfolípidos y colesterol, dos de los principales productos del metabolismo de los lípidos (Guyton y Hall, 2011).

Por otra parte, sabemos que la naturaleza de las alteraciones de la diabetes

asociadas al embarazo y al desarrollo del feto hace necesario el estudio de aspectos fundamentales como áreas de prioridad en la investigación. La STZ se usa de manera constante para la inducción de la DM experimental en diferentes modelos, muchos de los cuales emplean la rata; la manera más simple de hacerlo es inyectar a las ratas en algún momento de la gestación y estudiar las alteraciones en el desarrollo de sus fetos (Polanco y cols. 2005).

Los resultados obtenidos con este método de inducción, el cual se hizo a partir de una inyección intraperitoneal de STZ, deben tomarse con precaución ya que la STZ puede atravesar la barrera placentaria y ocasionar daños en el producto, en general, y en las células pancreáticas en desarrollo, en particular (Polanco y cols, 2005). Una manera de evitar esto es inyectar a las ratas antes del sexto día de gestación, es decir, antes de la implantación, lo cual da como resultado que las alteraciones observadas en los embriones sean consecuencia de la hiperglucemia materna y no de la acción de la STZ (Polanco, 2001). En este estudio, la STZ fue administrada a las ratas el día 4 de gestación, por lo que todas las malformaciones encontradas en los productos son atribuidos completamente al estado diabético de las progenitoras.

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 y cols, 1998). Esto es más que confirmado en este trabajo, ya que todas las malformaciones observadas en este trabajo corresponden a los grupos diabéticos, el grupo testigo no manifestó aparición de malformaciones congénitas (el valor fue exactamente 0.0%); se sabe que para esta especie el valor normal de malformaciones espontáneas está entre 0.0 y 1.0% (Beaudoin, 1977).

Se ha reportado que la hiperglucemia materna es uno de los principales factores en la producción de las malformaciones. El estudio de la patogénesis de los

defectos congénitos, realizado en animales de experimentación, ha revelado un complejo proceso en el cual el estado diabético induce alteraciones en una serie de vías metabólicas interrelacionadas que conducen a la teratogenicidad al interferir la expresión de importantes genes del desarrollo embrionario (Goldman y cols. 1985), dicho lo anterior, podemos explicar que la presencia del mayor porcentaje de malformaciones encontradas fue en el grupo de 50 mg/Kg de STZ el cual también registro los valores más altos en glucosa sanguínea. El aporte incrementado de glucosa a los tejidos embrionarios, hace que aumente el metabolismo oxidativo con incremento del consumo de O₂. La hipoxia generada excede los límites fisiológicos que caracterizan al desarrollo normal. En estas condiciones puede estimular la producción mitocondrial de radical superóxido llevando a un estado de estrés oxidativo como consecuencia de la oxidación de la glucosa en exceso (Wentzel y cols , 2003).

Sin embargo, con respecto a la nomenclatura de las malformaciones, no siempre se pudo asignar un nombre específico a cada una de ellas; como es el caso de los fetos en los que se observó una cavidad en el mesencéfalo; se buscó en el glosario avalado por la mayoría de las asociaciones, federaciones y comités de teratología, así como la FDA (Wise y cols, 1997), pero ninguno de los nombres nos pareció adecuado para este hallazgo.

En cuanto al número de reabsorciones por camada, es notoria una disminución de éstas en el grupo tratado con resveratrol, en contraste con el grupo diabético, esto pone en evidencia que la diabetes es capaz de alterar la naturaleza de ovocitos inmaduros, ovulados, fecundados, procesos implantatorios, embrión en desarrollo, placentación, mortalidad uterina y parto (García, 2002).

Por otro lado, en la enfermedad diabética se ha encontrado una relación directa entre el descontrol metabólico y la presencia de hiperglucemia con respecto al incremento de estrés oxidativo del organismo, con elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en todos los sistemas estudiados (González y cols.

2000). Un desbalance REDOX provoca el envenenamiento y alteración de todos los compuestos y procesos enzimáticos expuestos (García, 2002). Esto se comprobó en este trabajo, ya que todos los sistemas enzimáticos analizados, se vieron alterados por la presencia de la DM durante el estado gestacional.

Los sistemas antioxidantes son los que se encargan de revertir el daño oxidativo actuando a diferentes niveles: intracelular, a nivel de la membrana celular o extracelular (González y cols. 2013).

Djordjevic y cols. (2004) dieron a conocer que los efectos teratogénicos de la diabetes. Los cuales están relacionados, entre otros aspectos, con el aumento del estrés oxidativo que la acompaña, lo cual afecta directamente a la unidad feto-placentaria. Esta teoría es confirmada en este trabajo, al obtener los resultados de la medición de uno de los sistemas antioxidantes enzimáticos,

La SOD es una enzima que cataliza la disminución del radical O_{-2}^{\bullet} a H_2O_2 y O_2 . Marklund (1984) concluyeron, después de trabajar con hepatocitos aislados que la SOD puede ser inhibida por altas concentraciones de H_2O_2 .

En este estudio se observó un incremento de SOD en el grupo diabético, con respecto a los otros dos. Esto puede explicarse ya que, como menciona Marklund (1984), la producción de H_2O_2 conduce a la inhibición de SOD, esto está asociado a altas concentraciones de CAT; aunado a lo anterior, la célula utiliza para la reducción de H_2O_2 las enzimas CAT y GPx. Estos son los comportamientos que se observaron en el grupo testigo. Basándonos en lo anterior, es lógico esperar en el grupo diabético una reducción en la actividad de CAT y GPx, y un aumento significativo en la actividad de SOD.

Al inicio de la patología ocasionada por la DM se ha observado que se produce un incremento en la actividad de SOD, como respuesta a la elevada generación de

O_2^{\bullet} en la célula y su eliminación por la enzima. No obstante, la intensa producción de este radical, por un tiempo prolongado, agota la estimulación de la actividad enzimática ya que, como se mencionó anteriormente, el producto de la reacción puede inhibirla (Bravo, 2007).

Mora y cols. (2009) reportaron que la actividad de SOD en ratas diabéticas por STZ tiene un incremento significativo en relación con el grupo testigo. Esta diferencia en la actividad enzimática, puede asociarse también, a que el estrés oxidativo induce la producción de enzimas, como mecanismos compensatorios, incrementando su actividad en los animales diabéticos con el fin de mantener la homeostasis.

En cuanto al grupo tratado con resveratrol se observó un aumento en los tres complejos enzimáticos con respecto al grupo testigo, y solo la actividad de SOD se vio disminuida con respecto al grupo diabético.

Por pertenecer al grupo de los flavonoides, el resveratrol ha sido considerado como un potente antioxidante (Hung y cols, 2002), ya que tiene la característica de contener en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Gutiérrez, 2002).

Aribal-Kocaturk y cols. (2007), administrando un pretratamiento a ratas diabéticas, obtuvieron un aumento en la actividad de la CAT con respecto al grupo diabético y testigo y lo definieron como un efecto potenciador del resveratrol sobre la enzima. Además, también reporta un decremento en los niveles de malondialdehído, principal producto de la peroxidación lipídica, esta ocurre cuando el radical $\cdot OH$ ataca los lípidos de membrana dando lugar a la formación de radicales libres, los cuales, junto con la entrada de O_2 producen la propagación del proceso con la formación de gran cantidad de radicales lipoperóxidos, lo que perpetúa el daño oxidativo en las membranas (Licea, 2003). También ha sido reportado como

supresor de la peroxidación lipídica (Chander y cols, 2005)

CONCLUSIONES

Por lo anterior, podemos concluir que:

1. La dosis más favorable para la inducción de la DM en ratas Wistar, es 50 mg/Kg de STZ, esto para conseguir niveles de glucosa en sangre que avalen el estado hiperglucémico de los animales y así obtener en los fetos la embriopatía cotidiana por esta enfermedad.
2. El desbalance REDOX y la producción de radicales libres a causa de la hiperglucemia materna está directamente relacionada con la embriotoxicidad.
3. La DM por STZ inducida a ratas Wistar gestantes, no provoca malformaciones en tejido óseo.
4. Se encontró una propensión del resveratrol a reducir el porcentaje de reabsorciones ocasionadas por DM materna en ratas Wistar.
5. El resveratrol tiene una tendencia a actuar como un protector ante los altos niveles de radicales libres presentes en el estado de estrés oxidativo, ocasionado por la hiperglucemia característica de la DM.
6. El resveratrol podría ser considerado como un potenciador de la actividad de las enzimas de defensa antioxidante endógena, que son CAT, SOD y GPx.

Aunque por los resultados obtenidos, se puede deducir que es un antioxidante que puede postularse a ser utilizado para combatir la teratogénesis inducida por la DM materna, aún hacen falta más estudios, y así dilucidar la acción exacta de este

compuesto a nivel bioquímico, además de determinar las dosis correctas a las que se debe someter a la madre, y para no producir un efecto prooxidante del mismo.

REFERENCIAS

Acevedo LC, López AF, Sepúlveda BS y Espinosa FV. 2007. Actividad de la glutatión reductasa en el embarazo diabético. *Rev Chil Obstet Ginecol*; 72(2):82-88.

Aebi HE. 1983. Oxidoreductases acting on groups other than CHOH. 3.9 Catalase: hydrogen-peroxidase: hydrogen-peroxidase oxidoreductase E. C. 1. 11. 1. 6. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. III. Weinheim: Verlag Chemie. 273-286.

Al-Dallen SM, Chávez Rodríguez T, Martínez Sánchez G, Ferreira Bega E y León Fernández OS. 2004. El Equilibrio Redox en la Diabetes y sus Complicaciones. *Acta Farm. Bonaerense*; 23 (2): 231-242.

Aribal-Kocaturk P, Kavas GO y Buyukkagnici DI. 2007. Pretreatment effect of resveratrol on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biol Trace Elem Res*; 118(3):244-9.

Barret- Connor E. 1985. Is insuin-dependent diabetes mellitus caused by coxsackie virus B infection? A review of the epidemiologic evidence. *Rev Infect Dis*; 7: 207-215.

Barrow MV y Taylor JW. 1969. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morphol.*; 127 (3):291-305.

Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Analyt Biochem.*; 44: 276-287.

Beaudoin AR. 1977. Teratogenicity of polybrominated biphenyls in rats. *Environ Res.*;14(1):81-86.

Bieg S. y Lernmark A.1999. Animal models for insulin-dependent diabetes mellitus. En Volpé R. *Contemporary endocrinology autoimmune endocrinopathies*. Human Press. Totowa, pp 113–139.

Bolant HB, Calvo BMA, Cejalvo LD, Gimeno FO, Gimeno FL y Lloris CJM. 1990. Hematología y bioquímica clínica de la rata. Parte 2. *Research In Surgery*. Suplemento 4, 12-20.

Bolzán DA y Bianchi SM. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research*; 512: 121–134.

Bravo A, Araujo S, Vargas ME, Mesa J, Souki A, Bermúdez V y Cano C. 2007. Actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa y niveles de cobre y zinc en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *AVFT*; 26(1):37-41

Carpenter M. 2007. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. *Diabetes Care*; 30: S 246-50.

Cederberg J, Eriksson UH. 2005. Antioxidative treatment of pregnant diabetic rats diminishes embryonic dysmorphogenesis. *Birth Def Res (Part A)* 73: 498-505.

Cederberg J, Simán CM, Eriksson UJ. 2001. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr Res* 49: 755-762.

Chander V, Tirkey N y Chopra K. 2005. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin protects against cyclosporine-induced nephrotoxicity through nitric oxide dependent mechanism. *Toxicology*; 210:55–64.

Craighead JE. 1975. The role of viruses in the pathogenesis of pancreatic disease and diabetes mellitus. *Prog Med Virol*; 19: 161-214.

Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic GA, Djordjevic R, Grubor LG. 2004. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern Fetal Neonatal Med.*; 16 (6): 367-372.

Fernández RT, Clapés HS, Suárez RG, Perera CA, Rodríguez SVM, Purón GC, Herrera AM, Antiguas PA y Castro MT. 2013. Embriopatía diabética en ratas y efecto de un suplemento nutricional de vitamina E durante la gestación. *Rev. Habanera de Ciencias Médicas*; 12(2)176-186.

Freinkel N, Cockcroft DL, Lewis NJ, Gorman L, Akazawa S, Phillips LS, Shambaugh. 1986. The 1986 McCollum award lecture. Fuel-mediated teratogenesis during early organogenesis: the effects of increased concentrations of glucose, ketones, or somatomedin inhibitor during rat embryo culture. *Am J Clin Nutr*; 44:986-95.

García E. 2002. Diabetes mellitus experimental: etiología de las malformaciones congénitas en descendientes de ratas diabéticas. *Rev Cubana Endocrinol*; 13(1):53-63.

García GD y García DR. 2009. Avances en la patogénesis de la embriopatía diabética. *Rev Méd Chile*; 137: 1627-1635.

García-Álvarez JL, Sánchez-Tobar M y García-Vigil JL. 2009. Uso de antioxidantes para prevenir enfermedad cardiovascular. Meta-análisis de ensayos clínicos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 47 (1): 7-16.

Goldman AS, Baker L, Piddington R, Max B, Herold R. 1985. Hiperglicemia induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc Natn Acad Sci USA*; 82: 8227-31.

González E, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Vela J, Xaus C, Peralta C. y Gimeno M. 2000. Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in early stages of streptozotocin diabetes mellitus in the rat. *Braz J Med Biol Res*; 33:1335-42.

González GA, González MY, Heredia RD, Fernández CD y Ballesteros HM. 2013. Enzimas antioxidantes en la hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas Wistar. *Rev. Med. Electrón.*; 35:(2).

Guney M, Erdemoglu E y Mungan T. 2011. Selenium–Vitamin E Combination and Melatonin Modulates Diabetes-Induced Blood Oxidative Damage and Fetal Outcomes in Pregnant Rats. *Biol Trace Elem Res*; 143:1091–1102.

Gutiérrez M A. 2002. Vino, polifenoles y protección a la salud. *Rev. Cub. Aliment. Nutr.*; 16: 134-141.

Gutiérrez PA, Cortés RC, Calderón CE, Manzo AS, Clemente GM, Godínez H D. y Saavedra MA. 2009. Efectos del resveratrol sobre el estrés oxidativo inducido por calcio en mitocondrias de corazón de rata. *Rev. Ciencia Nicolítica*.; 51: 105-122.

Guyton CG y Hall JE. 2011. Tratado de Fisiología Médica. 12ª Edición. Elsevier.

Guzmán-Juárez N y Madrigal-Bujaidar E. 2003. Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*; 28(2):14-23.

Hung HL, Heng, SN, Der, HY y Hsiung CW. 2007. Protective effects of resveratrol on ethanol-induced apoptosis in embryonic stem cells and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. *Toxicology*; 242: 109–122.

Hung LM, Su MJ, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK. 2002. The protective effect of resveratrol on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British J. Pharmacol.*; 135: 1627-1633.

Ingle DJ. 1948. The production of experimental glycosuria in the rat. *Recent Prog Horm Res*; 2: 229-253.

Junod A, Lambert A, Stauffacher W y Renold A. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest*; 48: 2129-39.

Licea PME. 2003. Concentraciones de malondialdehído en un grupo de diabéticos tipo 1 con retinopatía diabética. *Av Diabetol*; 19: 95-99.

Loeken MR. 2006. Advances in Understanding the Molecular Causes of Diabetes-Induced Birth Defects. *J Soc Gynecol Investig*; 13(1):1-10.

Lozada SM. y García L. 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes: como mantener el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol.*; 17:172-9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall JR. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193: 265-275.

Malacara, 1990. Fundamentos de endocrinología clínica. JCH Editores. México, D.F. Pp. 521 y 522.

Marklund SL. 1984. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J*; 220:269-72.

Mayor-Oxila R. 2010. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.*; 5(2):23-29.

Méndez DJ y Palomar-Morales M. 1999. Prevention by L-arginine and polyamines of delayed development and embryotoxicity caused by chemically-induced diabetes in rats. *Reproductive Toxicology*; 13:501–509.

Méndez DJ y Ramos HG. 1994. Animal models in diabetes research. *Arch. Med. Res.*; 25: 367-375.

Montero C, Cristescu SM, Jiménez JB, Orea JM, Hekkert SL, Harren FJM, González-Ureña A. 2003. trans-Resveratrol and grape disease resistance. A dynamical study by high-resolution laser-based techniques. *Plant Physiol.*; 131: 129-138.

Mora H, Ángela C, Aragón N, Diana M, Ospina G y Luis F. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Redalyc Vitae.*; 16:311-319.

Ozturk Y, Alan VM, Yildizoglu-Ari N. 1996. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle function. *Pharmacol Rev*; 48: 69-112.

Padilla FC, Ricón AM y Bou-Rached L. 2008. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58 (3): 303-308.

Paglia ED, Valentine NW. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*; 70: 158-168

Palomino, G.M.A., Revilla, M.M.A, Cárdenas, S.A., Polanco, P.A.C. e Islas, A.S. 1998. Efecto de la diabetes inducida sobre la reproducción y el desarrollo. *Ginecol Obstet Méx*; 66(10):403-6.

Pérez AC, Abilés J y Castaño P J. 2008. Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías. *Nutricion Clínica en Medicina*; 2 (2): 45-64.

Polanco A. 2001. 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.

Polanco PAC, Revilla MMC, Palomino GMA e Islas AS. 2005. Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas. *Ginecol Obstet Mex*; 73:544-52.

Ramos IML, Batista GCM, Gómez MBC y Zamora PAL. 2006. Diabetes etres oxidativo y antioxidantes. *Investigación es Salud*; 3 (1): 7-15.

Restrepo OO. 1992. Enfoque y manejo de la embarazada diabética. *Rev Colomb Obstet y Ginecol*; 43(2): 97-108.

Restrepo OO. 2000. Diabetes y embarazo. *Rev Colomb Obstet Ginecol*; 51(1):1-32.

Rosales, H.A.L. 1994. Determinación de hemoglobina glicada (HbA_1) en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. Tesina para obtener el grado de Licenciado en Biología Experimental. Unidad de investigación experimental Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran. México D.F. Pp. 29.

Salazar GM. 2010. Evaluación del efecto teratogénico de la diabetes inducida en rata sobre el desarrollo facial y de las extremidades. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.

Shenoy A. y Goyal R. 2002. Improvement of Insulin Sensitivity by Perindopril in Spontaneously Hypertensive and Streptozotocin-Diabetic Rats. *Indian J. Pharm*; 34: 156-164.

Siman CM, y Eriksson UJ. 1997. Vitamin C supplementation of the maternal diet reduces the rate of malformation in the offspring of diabetic rats. *Diabetologia*; 40: 1416-24.

Singh PN, Singh SU, Nagarkatti M. y Nagarkatti SP. 2011. Resveratrol (3, 5 ,40-trihydroxystilbene) protects pregnant mother and fetus from the immunotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol. Nutr. Food Res.*; 55, 209–219.

Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*; 50:536-546.

Tébar MFJ. y Escobar JF. 2009. La Diabetes Mellitus en la práctica clínica. Panamericana. España. Pp. 3 y 4.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 20 (7): 1183-1197.

Valdez-Penagos AG y Mendoza-Núñez. 2004. Estrés oxidativo, Diabetes mellitus y enfermedad periodontal. *Rev Esp Cien Quím-Biol*; 7(2):103-108.

Vaura JJ, Deboer C, Dietz L, Hanke LJ, Sokolski WT. 1959. Streptozotocin, a new antibacterial drug. *New York: Antibiotica, Inc*; 230:230-235.

Weisburger JH. 1999. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes, and tea. *Food Chem. Toxicol.*; 37, 943-948.

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

Wentzel P, Eriksson UJ. 2005. A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E2 in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Def Res (Part A)* 73: 506-511.

Wise LD, Beck SL, Beltrame D, Beyer BK, Chahoud I, Clark RL, Clark R, Druga MA, Feuston HM, Guittin P, Henwood MS, Kimmel C, Lindstrom P, Palmer KA, Petrere AJ, Solomon MH, Asuda M y York GR. 1997. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals (version 1). *Teratology*; 55:249–292.

Zabihi S, Eriksson UJ, Wentzel P. 2007. Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes, enhances Vegf-A, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats. *Reprod Toxicol* 23: 486-498.