



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

## **POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

### **FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Análisis de las Alteraciones Morfológicas y Funcionales por  
Peroxidación de Lípidos de la Membrana Mitocondrial de la  
Placenta en Ratas Gestantes inducidas a Diabetes Mellitus Tipo  
2 con STZ.**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO  
DE: DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**María del Consuelo Figueroa García**

**TUTOR**

**Dr. Ricardo Mejía Zepeda, FESI-UNAM**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dra. Rosa María Vigueras Villaseñor, INP**

**Dr. Federico Martínez Montes, FM-UNAM**

**México, D.F., JUNIO DE 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## AGRADECIMIENTOS

---

---

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Al **Proyecto PAPIIT No IN228610-3** otorgado al Dr. Ricardo Mejía Zepeda. UBIMED. FESI-UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca **25340** otorgada para realizar mis estudios de Doctorado.

A los miembros del comité tutorial

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor  
Dr. Federico Martínez Montes  
Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Por su valiosa colaboración y enseñanza a:

M en C. María Teresa Espinosa García. Lab. 5. Depto. Bioquímica. FM-UNAM.  
Dr. Armando Zepeda Rodríguez. Lab.ME-FM-UNAM.  
M en C. Francisco Pasos Nájera. Lab.ME-FM-UNAM.  
M en C. Martha Patricia Bizarro Nevares. Lab.ME-FM-UNAM.

Por el apoyo y colaboración en la realización del presente trabajo:

Dr. Carlos Gutiérrez Olvera. Depto Nutrición Animal y Bioquímica. FMVZ-UNAM  
M en C. Mario Alberto Aguilar Amaya. Bioterio. INPS-SSA "Juan Ramón de la Fuente"  
MVZ. María Leticia Olga Flores Sánchez. Bioterio FESI-UNAM.  
Biol. Tomas Villamar Duque. Bioterio FESI-UNAM.  
M en C. Fernando Barrón Moreno. Bioterio FESI-UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

---

---

A los miembros del jurado

Dr. Antonio Díaz Cruz

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Dra. Raquel Guinzberg Perrusquía

Dr. Martín Palomar Morales

Dr. Juan Carlos del Río García

Por sus valiosos comentarios en mejora del presente trabajo

A todas aquellas personas que de algún modo contribuyeron en la realización del presente trabajo.

A Pao, con amor  
, en recuerdo de ti... Madre

*Se dice que el viento más fuerte es el que más arrea las velas de un navío  
Sin embargo  
Yo creo que los vientos ligeros son los mejores  
Porque perduran y aun cuando el navío avanza despacio  
Siempre llegara a tierra  
Sin una sola de sus velas rota*

*Por Amor al más suave e intenso viento  
...Sirilo*

# Índice

---

---

Índice de Tablas	9
Índice de Figuras	10
Índice de anexos	11
Abreviaturas	12
<b>Resumen</b>	14
<b>Summary</b>	17
<b>Introducción</b>	20
Diabetes Mellitus	20
Generalidades de la Diabetes Mellitus	21
Tipos de Diabetes Mellitus	21
Diabetes Mellitus Tipo 2	22
Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2	22
Diabetes Mellitus Gestacional	24
Diagnóstico de Diabetes	24
Diabetes experimental	25
Panorama de la Diabetes en México	26
Fisiología de la Gestación durante la Diabetes	27
La placenta	28
Transporte a través de la placenta	30
Intercambio materno-fetal	30
Diferencias entre la placenta de la rata y la placenta humana	31
Estrés oxidante	33
Radicales libres	35
Fuentes de radicales	37
Radicales libres de oxígeno	37
Radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ )	39
Radical superóxido o anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ )	39
Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	40
Mitocondrias	40
Ácidos grasos de membrana	42
Lipoperoxidación	43
<b>Antecedentes</b>	45
Diabetes y radicales libres en gestación	45
Daño a la placenta por radicales libres en Diabetes Mellitus Tipo 2	46
Consecuencias de la Diabetes Mellitus Tipo 2 durante la gestación	48
Teorías del impacto de las condiciones de vida intrauterina sobre la aparición de enfermedades en la vida adulta	49
Hipótesis de Barker	49
Hipótesis de origen fetal de las enfermedades o de la programación fetal	50
<b>Justificación</b>	53
<b>Hipótesis</b>	53
<b>Objetivos</b>	54
<b>Material y métodos</b>	55
Animales de experimentación	55

Tratamiento	55
Obtención de muestras	59
Metodología para aislamiento de mitocondrias de tejido placentario	59
Control respiratorio	59
Análisis de la composición de ácidos grasos	60
Extracción de lípidos	60
Transesterificación de ácidos grasos	60
Análisis por cromatografía de gases	60
Determinación de malondialdehído (MDA) por método de TBARs	61
Análisis de la Fluorescencia del DPiP en mitocondrias de placenta	61
Determinación de proteína	62
Análisis histológico de las placentas	62
Técnica histológica para microscopía electrónica de transmisión	63
Análisis estadístico	63
<b>Resultados</b>	64
Desarrollo del modelo experimental	64
Concentración de glucosa a través del tiempo	64
Concentración de colesterol, triacilglicéridos y hemoglobina glicada	66
Curva de tolerancia a la glucosa	68
Ganancia de peso	68
Modelo de Diabetes Mellitus Tipo 2 en ratas durante la gestación	70
Características morfométricas de fetos de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación	71
Histología de la placenta	73
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	76
Composición de ácidos grasos en tejido de placenta	78
Composición de ácidos grasos en mitocondrias de placenta	80
Cuantificación de proteína y colesterol en mitocondrias de placenta	82
Lipoperoxidación medida por el método de TBARs	83
Características termotrópicas y fluidez de las membranas mitocondriales de ratas con 19 días de gestación	84
Control respiratorio de mitocondrias de placenta de rata los 19 días de gestación	86
<b>Análisis y discusión</b>	87
Desarrollo del modelo experimental	87
Análisis de los datos morfométricos de fetos de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación	91
Histología de la placenta	94
Microscopía electrónica de transmisión de mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación	96
Composición de ácidos grasos en tejido de placenta	98
Lipoperoxidación y fluidez de la membrana mitocondrial en placenta	101
<b>Discusión general</b>	111
<b>Conclusiones</b>	115
<b>Literatura citada</b>	117
<b>Anexos</b>	136



## *Índice de tablas*

---

---

Tabla 1	Factores que generan estrés oxidante.	34
Tabla 2	Especies oxidantes reactivas.	36
Tabla 3	Parámetros morfológicos y concentración de glucosa en sangre fetal y de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación.	72
Tabla 4	Composición de ácidos grasos (mol %) en placenta de ratas a los 19 días de gestación, DMT2 y NDMT2.	79
Tabla 5	Composición de ácidos grasos (mol %) en mitocondrias de placenta de ratas a los 19 días de gestación DMT2 y NDMT2.	81
Tabla 6	Concentración de proteína y colesterol en mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación.	82
Tabla 7	Características termotrópicas de las membranas mitocondriales de ratas a los 19 días de gestación.	84

## *Índice de figuras*

---

---

Figura 1	Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2.	22
Figura 2	Corte esquemático de la placenta con su componente fetal y materno y la circulación placentaria.	28
Figura 3	Distribución de las células de la membrana interhemal en la placenta hemocorial.	31
Figura 4	Desarrollo de estrés oxidante.	32
Figura 5	Lipoperoxidación.	43
Figura 6	Diseño del experimento Fase I.	<b>56</b>
Figura 7	Diseño del experimento Fase II.	<b>57</b>
Figura 8	Comportamiento Tiempo/tratamiento de la concentración de Glucosa sanguínea.	<b>64</b>
Figura 9	Concentración de Colesterol en ratas DMT2 y NDMT2.	65
Figura 10	Concentración de hemoglobina glicada en ratas DMT2 y NDMT2.	66
Figura 11	Curva de tolerancia a la glucosa en ratas DMT2 y NDMT2.	68
Figura 12	Ganancia de peso en ratas DMT2 y NDMT2.	68
Figura 13	Concentración de glucosa sanguínea en ratas DMT2 y NDMT2 durante la gestación.	69
Figura 14	Corte histológico de placenta de NDMT2 a los 19 días de gestación. Técnica HE.	73
Figura 15	Corte histológico de placenta de rata DMT2 a los 19 días de gestación. Técnica HE.	74
Figura 16	Microscopía Electrónica de Transmisión 6000 X de placenta de rata a los 19 días de gestación.	76
Figura 17	Concentración de MDA (nmol/mg proteína) en mitocondrias de placenta e hígado y tejido completo de placenta e hígado de ratas a los 19 días de gestación.	82
Figura 18	Cociente de emisión excímero/monómero a diferentes temperaturas de mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación.	84
Figura 19	Gráfica de Arrhenius de la fluorescencia del DPiP de mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación.	84
Figura 20	Control respiratorio y utilización de oxígeno en el Edo 3 y Edo 4 (nA°O <sub>2</sub> /min/mg P) de mitocondrias de placenta de ratas NDMT2 Y DMT2 a los 19 días de gestación.	85
Figura 21	Esquema de incorporación de las distintas sondas utilizadas como monitor de fluidez de las membranas.	102
Figura 22	Transformación Polinomial del gráfico de Arrhenius de membranas de mitocondrias de ratas NDMT2 y DMT2.	106

## *Índice de Anexos*

---

---

Anexo 1	Medio H para aislamiento de mitocondrias.	136
Anexo 2	Método de centrifugación para obtención de mitocondrias de placenta de rata.	136
Anexo 3	Medio de respiración para medir consumo de oxígeno en mitocondrias.	137
Anexo 4	Oximetría.	137
Anexo 5	Diferencia en % de la composición de ácidos grasos en tejido y mitocondrias de placenta en ratas NDMT2 Vs DMT2.	137
Anexo 6	Diferencia en % de la composición de ácidos grasos de ratas NDMT2 y DMT2 en tejido Vs mitocondrias.	138

## ***Abreviaturas***

---

---

Ácido Desoxiribonucleico	ADN
Ácido Araquidónico	AA
Ácido Docosahexaenoico	DHA
Ácido Eicosapentaenoico	EPA
Ácidos Grasos Libres	AGL
Ácidos Grasos Poli-insaturados	PUFAS
Adenosin trifosfato	ATP
Aloxana	Alx
American College of Obstetricians and Gynecologists	ACOG
Animales Inducidos a Diabetes con STZ	DMT2
Animales No Diabéticos	NDMT2
American Diabetes Association	ADA
Control Respiratorio	CR
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	HPLC
Diabetes Mellitus Gestacional	DMG
Diabetes Mellitus Idiopática	DMI
Diabetes Mellitus Tipo 1	DMT1
Diabetes Mellitus Tipo 2	DMT2
Días pos coito	dpc
Dipirenilpropano	DPiP
Dirección General de Epidemiología	DGE
Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	ENSANUT
Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico	TBARSs
Especies Reactivas de Oxígeno	EROs
Estado Respiratorio Mitocondrial 3	Edo 3
Estado Respiratorio Mitocondrial 4	Edo 4
Estreptozotocina	STZ
Ácido tetraacético del etilenglicol	EGTA
Glucotransportador 1	GLUT1
Hidroxitolueno Butilado	BTH
Instituto Mexicano del Seguro Social	IMSS
Lipohidroperóxidos	LOOH
Malondialdehído	MDA
Organización Mundial de la Salud	OMS
Óxido nítrico	NO
Prostaglandina	PG
Prostaglandina E2	PGE2
Prostaglandina F1 $\alpha$	PGF1 $\alpha$
Prostaglandina F2 $\alpha$	PGF2 $\alpha$
Proteínas Desacoplantes	UCP2 y UCP3
Radicales Libres	RL
Superóxido dismutasa	SOD
Superóxido dismutasa cobre-zinc Dependiente	SOD-CuZn
Superóxido dismutasa Manganeso Dependiente	SOD-Mn
Poros Transición de Permeabilidad	PTP
Transportador de Citrato	CiC

Tromboxano B2  
1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno  
1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno  
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

TXB2  
DPH  
TMA-DPH  
HEPES

## ***Resumen***

---

---

La diabetes es un síndrome crónico degenerativo, multifactorial que día a día aumenta la tasa de incidencia, prevalencia y defunción. El daño por esta patología está asociado al estrés oxidante y las complicaciones durante la gestación no están bien definidas ya que el diagnóstico de la enfermedad es tardío o el diferencial de la misma no es correcto. Por otra parte la gestación es un estado fisiológico que requiere de una adaptación metabólica, con una mayor demanda en el aporte de energía y oxígeno; para lograr esto, el metabolismo celular de la madre se incrementa, generando una gran cantidad de radicales libres; la sobreproducción de éstos juega un papel importante en la permanencia del estrés oxidante, lo que conduce a una peroxidación de los lípidos en las membranas celulares alterando la función en el transporte y/o transducción de señales. Durante la gestación, en apoyo a la nutrición fetal, se presenta un estado de resistencia a la insulina en la madre. Existe una relación directa entre la glicemia materna y la fetal, cuanto mayor es la glicemia materna mayor es la transferencia de glucosa al feto; por lo que durante la diabetes la unidad feto-placentaria recibe mayor aporte de glucosa. Si la madre es diabética, el feto se desarrollará en un medio hiperglucémico que estimula al páncreas fetal para una mayor secreción de insulina. El embarazo en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 se caracteriza por resistencia crónica a la insulina y deficiencia relativa de ésta. Los productos derivados de la oxidación de los lípidos pueden afectar la integridad de la membrana celular y causar daños en el material genético alterando el desarrollo embrionario y fetal, que ponen en riesgo la vida de la madre y el feto.

Para la realización del presente estudio se desarrolló un modelo de Diabetes Mellitus Tipo 2 en ratas hembras. Se partió de los datos de la literatura de modelos experimentales desarrollados en machos. Los animales del grupo tratado (denominados como DMT2) fueron inducidos a Diabetes Mellitus Tipo 2 mediante la administración vía intraperitoneal de una dosis única de estreptozotocina (STZ) 135 mg/kg de peso corporal, en un volumen de 50 µl de amortiguador de citratos, entre las 48 y 72 horas de edad, con la finalidad de causar toxicidad de las células β del páncreas e hiperglucemia. Se tuvo un grupo de animales control sin diabetes (denominados NDMT2) a los que sólo se les administró 50 µl del amortiguador de citratos. Se tomaron como parámetros indicativos de

alteraciones en el metabolismo de la glucosa su concentración en sangre a través del tiempo, los valores de colesterol, triacilglicéridos y hemoglobina glicada, así como curva de tolerancia a la glucosa.

Se evaluó el efecto de la hiperglucemia materna sobre la función mitocondrial, la composición de ácidos grasos, la generación de radicales libre, la fluidez de la membrana mitocondrial y las características termotrópicas de ésta en mitocondrias de placenta de ratas con 19 días de gestación inducidas a DMT2 y sin inducir (NDMT2).

Se encontró que los parámetros evaluados para la constatación del modelo de DMT2 son los característicos del síndrome en: glucosa sanguínea entre 8.32 y 15.54 mmol/L, colesterol  $172.8 \pm 6.1$  mg/dL, triacilglicéridos  $235 \pm 17$  mg/dL, hemoglobina glicada de  $5.4\% \pm 1.2$  y curva de tolerancia a la glucosa alterada con un tiempo de 240 minutos para alcanzar valores normales, además, la curva de crecimiento y ganancia de peso de los animales disminuye en comparación con el grupo NDMT2. Se realizaron mediciones de los parámetros morfométricos de fetos de ratas DMT2 (n=7) y NDMT2 (n=7). El análisis de los datos muestra que existe diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.003$  entre grupos para las variables de número de fetos por camada ( $12 \pm 1.6$  VS  $16 \pm 1.6$  neonatos), peso de los productos ( $1.7 \pm 0.17$  g) y sus placentas ( $0.5 \pm 0.03$  g), diámetro de la placenta y la concentración de glucosa fetal ( $53.7 \pm 7.6$  mg/dL) a los 19 días de gestación. La evaluación histopatológica de la placenta de animales DMT2 muestra alteraciones de la arquitectura del tejido. En el estudio por microscopía electrónica se encontró que las mitocondrias de células de placenta son considerablemente más grandes (degeneración hidrópica) y abundantes, con matriz menos electrodensa y crestas aplanadas. En algunas de ellas se puede apreciar interrupción de la continuidad de la membrana. Con relación a la composición de ácidos grasos (AG) se observó que los AG saturados en tejido de placenta es 24.8% mayor en los DMT2, siendo el mirístico el de mayor proporción (40 %);  $p < 0.003$ ; mientras que la concentración de AG insaturados es 36.5% menor ( $p < 0.003$ ). En las mitocondrias se encontró que la concentración de AG saturados es 7.9 % menor en los animales DMT2 ( $p < 0.003$ ); mientras que la concentración de AG insaturados es mayor en un 5.16 % ( $p < 0.05$ ). Es importante señalar que el AG que tiene mayor incremento a nivel mitocondrial es el araquidónico (160 %). Al analizar la concentración de colesterol y proteína no se encontró diferencia

significativa entre grupos. En el caso de la producción de MDA en mitocondrias de placenta ésta fue 5.1 veces mayor en animales DMT2 ( $p < 0.001$ ). Al estudiar los parámetros físico-químicos de la membrana de mitocondrias se encontró que la energía de activación es menor tanto en la fase gel ( $18.2 \pm 4.0$  VS  $13.9 \pm 1.3$  kcal/mol) como en la líquido cristal ( $12.0 \pm 0.4$  VS  $12.0 \pm 0.4$  kcal/mol) en los animales DMT2 ( $p < 0.05$ ); la temperatura de transición de fases se localizó a menor temperatura en los diabéticos ( $30 \pm 2.0$  °C),  $p < 0.05$ , también se encontró que la fluidez de la membrana mitocondrial está incrementada en éstos. La función mitocondrial medida a través del cociente de respiración se ve disminuida en los animales DMT2 ( $2.5 \pm 0.6$  CR)  $p < 0.002$ .

Con lo anterior se puede concluir que la hiperglucemia materna afecta las características morfológicas, funcionales y composición química de las membranas de mitocondrias de placenta de ratas con Diabetes Mellitus Tipo 2.



## Summary

---

---

Diabetes is a multifactorial chronic degenerative disease that increases every day its incidence, and deaths. Damage due to this pathology is associated to oxidative stress, and complications during gestation are not well defined because of the late diagnosis of the disease or the incorrect differential of the disease. Gestation is a physiologic state that requires metabolic adaptations, characterized by a higher demand of oxygen and energy; to accomplish this demand, the mother cellular metabolism increases, generating higher amounts of free radicals; the overproduction of free radicals plays an important role as stress keepers, which derive in lipid peroxidation in cellular membranes altering transport and cellular signal transduction. During the gestation it is developed in the mother an insulin resistant state and the fetus-placental unit receives until 50% of the maternal glucose concentration. If the mother is diabetic, the fetus will be developed in a hyperglycemic media that stimulates fetal pancreas for a higher secretion of insulin. The pregnancy in type 2 diabetic patients is characterized for chronic insulin resistance and relative deficiency of this hormone. The products derived from lipid oxidation may affect the cellular membrane integrity and produce damage to genetic material affecting embryonic and fetal development, and risking the life of the mother and the fetus.

For this study, a type 2 Diabetes Mellitus model was developed in Wistar female rats. Reported information from experimental diabetic models in males, were used as reference. The animals in the treated group (named DMT2) were induced to type 2 Diabetes Mellitus by a unique intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at 135 mg/kg of body weight, in 50  $\mu$ l of citrate buffer, between 48 to 72 hours-old in newborn females; the objective is to produce toxicity in pancreatic  $\beta$  cells and hyperglycemia. The control group (named NDMT2) was injected with 50  $\mu$ l of citrate buffer. Blood glucose concentration through time, cholesterol, triglycerides, glycated hemoglobin, and glucose tolerance curve, were taken as indicative parameters of the metabolic alterations.

It was evaluated the effect of maternal hyperglycemia on mitochondrial function, fatty acid composition, free radical generation, mitochondrial membrane fluidity, and its

thermotropic characteristics in placental mitochondria from rats with 19 days of gestation induced (DMT2) or not (NDMT2) to diabetes.

It was found that the parameters evaluated for confirmation of DMT2 model are typical the syndrome: blood glucose between 8.32 and 15.54 mmol/L, cholesterol in  $172.8 \pm 6.1$  mg/dL, triglycerides in  $235 \pm 17$  mg/dL, glycated hemoglobin  $5.4\% \pm 1.2$  and modified glucose tolerance curve which is 240 min delayed for reaching normal concentrations; besides, the growth curve of the animals is lower in comparison to NDMT2 group. Morphometric measurements of the fetus from rats DMT2 (n=7) and NDMT2 (n=7) were done. The analysis of data shows that there is statistical difference  $p < 0.003$  between groups for number of a newborn per litter ( $12 \pm 1.6$  VS  $16 \pm 1.6$  newborn), weight of products ( $1.7 \pm 0.17$  g) and their placentas ( $0.5 \pm 0.03$  g), diameter of placenta and fetal glucose concentration ( $53.77 \pm 7.6$  mg/dL) at 19 days of gestation. The histopathological evaluation of DMT2 placentas shows alterations in tissue structure. By electronic microscopy it was found that mitochondria from placental cells are bigger (hydropic degeneration) and more abundant, inner matrix less electrodense and flat crests. In some of them, interruption in membrane continuity can be seen. In relation to fatty acid composition (AG), it was observed that saturated AG in placental tissue is 24.8% bigger in DMT2, being the miristic acid the one with the highest proportion (40%)  $p < 0.003$ . The concentration of unsaturated AG is 36.5 lower ( $P < 0.003$ ). In mitochondria it was found that concentration of saturated AG is 7.9% lower in DMT2 animals ( $P < 0.003$ ); whereas the concentration of unsaturated AG is 5.16% higher ( $P < 0.05$ ). It is important to point out that the AG with the highest increment in mitochondria is the arachidonic acid (160%). Analyzing cholesterol and protein concentration there were not significant difference between groups. The MDA production in placental mitochondria was 5.1 times higher in DMT2 animals ( $p < 0.001$ ). On studying the physicochemical parameters of the mitochondrial membranes, it was found lower activation energies in gel ( $18.2 \pm 4.0$  VS  $13.9 \pm 1.3$  kcal/mol) and liquid-cristalline ( $12.0 \pm 0.4$  VS  $12.0 \pm 0.4$  kcal/mol) phases in the DMT2 group ( $p < 0.05$ ), compared to control group; the transition temperature was lower in diabetic ( $30 \pm 2.0$  °C),  $p < 0.05$ , and the membrane fluidity increased. The mitochondrial function, measured through the respiratory ratio, appears decreased in DMT2 animal ( $2.5 \pm 0.6$  CR)  $p < 0.002$ .

It can be concluded that maternal hyperglycemia affects the morphology, and functional characteristics of the placental mitochondrial membrane, as well as the chemical composition, in rats with type 2 diabetes Mellitus.

## ***Introducción***

---

---

### **DIABETES MELLITUS**

#### ***Generalidades de la Diabetes Mellitus***

La diabetes Mellitus es un síndrome multifactorial y multisistémico de curso crónico-degenerativo, con una elevada tasa de prevalencia e incidencia. Este síndrome engloba un conjunto de alteraciones metabólicas caracterizadas por un estado crónico de hiperglucemia (elevación de los niveles de glucosa en sangre) y cambios en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, que resultan de defectos en la secreción de la insulina, una resistencia a la acción de la misma o ambas. Este fenómeno es producido por numerosos factores genéticos y ambientales que frecuentemente actúan juntos (Maureen, 2003; Bennett, 2003).

A pesar de que los mamíferos experimentan períodos de ayuno y de alimentación (estado postprandial), la variación de la glucosa plasmática se mantiene en un intervalo estrecho entre 4 y 7 mM en individuos normales. Este intervalo tan estricto y constante se encuentra bajo el control y equilibrio entre la absorción de glucosa desde el intestino, la producción de glucosa hepática y su absorción y metabolismo en los tejidos periféricos y está regulado de manera directa por dos hormonas, la insulina y el glucagón (Bastarrachea et al, 2005).

La insulina incrementa el transporte de glucosa en músculo y en el tejido adiposo, e inhibe la producción hepática, actuando de esta manera como el regulador primario de la concentración de glucosa en la sangre. Esta hormona controla un gran número de procesos metabólicos que van desde la regulación de intermediarios del metabolismo hasta el control del transporte de iones a través de la membrana celular, la síntesis de proteínas, la transcripción de genes y el crecimiento y la diferenciación celular (Bastarrachea *et al.*, 2005).

La insulina estimula el transporte de glucosa y promueve el almacenamiento de sustratos, aminoácidos y ácidos grasos al interior de las células (en el adipocito, hígado y músculo) al estimular la lipogénesis, la síntesis de proteínas y glucógeno, e inhibiendo la lipólisis, la glucogenólisis y el catabolismo de proteínas. También incrementa la expresión o actividad de enzimas que catalizan la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas, inhibiendo al mismo tiempo la actividad o expresión de aquellas que catalizan su degradación (Slip *et al.*, 1990).

La insulina incrementa la captación de glucosa en las células al estimular la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde sitios intracelulares hasta la superficie celular. Prácticamente el 75% de la utilización de glucosa estimulada por insulina ocurre en el músculo esquelético, en tanto que el tejido adiposo es responsable de apenas una pequeña fracción del total utilizado. La acción de esta hormona sobre el hepatocito conduce a la reducción en la expresión de genes clave que codifican para las enzimas responsables de la gluconeogénesis. Existen numerosos factores que interfieren con el mecanismo de acción de la insulina que pueden conducir al desarrollo de resistencia a insulina (Voet y Voet, 1990).

### ***Tipos de Diabetes Mellitus***

Este síndrome se clasifica en las siguientes categorías: ***Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1)*** producida por una deficiencia absoluta en la secreción de insulina; ***Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)*** causada por una combinación de múltiples factores, como resistencia a la acción de la insulina y/o una inadecuada respuesta compensatoria del páncreas; ***Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)*** se presenta por alteraciones hormonales durante el embarazo; y ***Diabetes Mellitus Idiopática (transitoria) (DMI)***. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el mundo hay más de 285 millones de personas con diabetes, de las cuales el 90% de los pacientes son diagnosticados como Tipo 2, es probable que esta cifra aumente a más del doble en 2030 (Bennett, 2003; Castro *et al.*, 2002; Beck-Nielsen y Hother-Nielsen, 2003; Islas y Revilla, 2004).

## ***Diabetes Mellitus Tipo 2***

La Diabetes Mellitus Tipo 2 frecuentemente es diagnosticada 5 a 12 años después de iniciada ya que en sus primeras etapas es casi asintomática (Pratley *et al.*, 2003). Durante este período la hiperglucemia en combinación con diversos factores predisponentes (mala alimentación, inactividad física, alcohol, cigarrillo, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, hipertensión arterial), promueve el inicio y progresión de complicaciones micro y macro vasculares. Se ha observado que al momento del diagnóstico la enfermedad cardiovascular y la neuropatía se desarrollan en aproximadamente el 10% de los casos y la retinopatía y nefropatía entre el 15% y 20% (Fernández *et al.*, 2006).

### ***Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2***

La fisiopatología de la DMT2 es compleja e implica factores ambientales (dietas hipercalóricas, la obesidad, el sedentarismo, la edad y bajo peso al nacer) y genéticos (Figura 1). Existen tres características constantes en este padecimiento: resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos (músculo, tejido adiposo y especialmente hígado); secreción alterada de la insulina en respuesta al estímulo de glucosa y aumento en la producción de glucosa hepática (Lillioja *et al.*, 1998). La resistencia periférica a la insulina se presenta con una fase preclínica (en estadio de tolerancia alterada a la glucosa), además de una elevación moderada de la concentración de glucosa en sangre y elevadas concentraciones de colesterol y triacilglicéridos (Saad *et al.*, 1991; Pratley *et al.*, 2003).

La Diabetes Mellitus Tipo 2 está relacionada con obesidad y, por lo tanto, con la resistencia a la insulina (RI), pero se requiere adicionalmente de un deterioro de la función de la célula  $\beta$  pancreática. Para vencer la RI, la célula  $\beta$  inicia un proceso que termina en el aumento de la masa celular, produciendo mayor cantidad de insulina (hiperinsulinismo), que inicialmente logra compensar la RI, y mantener los niveles de glucemia normales; sin embargo, con el tiempo, la célula  $\beta$  pierde su capacidad para mantener la hiperinsulinemia compensatoria, produciéndose un déficit relativo de insulina con respecto a la RI. Aparece finalmente la hiperglucemia, inicialmente en los estados post-prandiales y luego en ayunas, a partir de lo cual se establece el diagnóstico de DMT2 (Lillioja *et al.*, 1998).

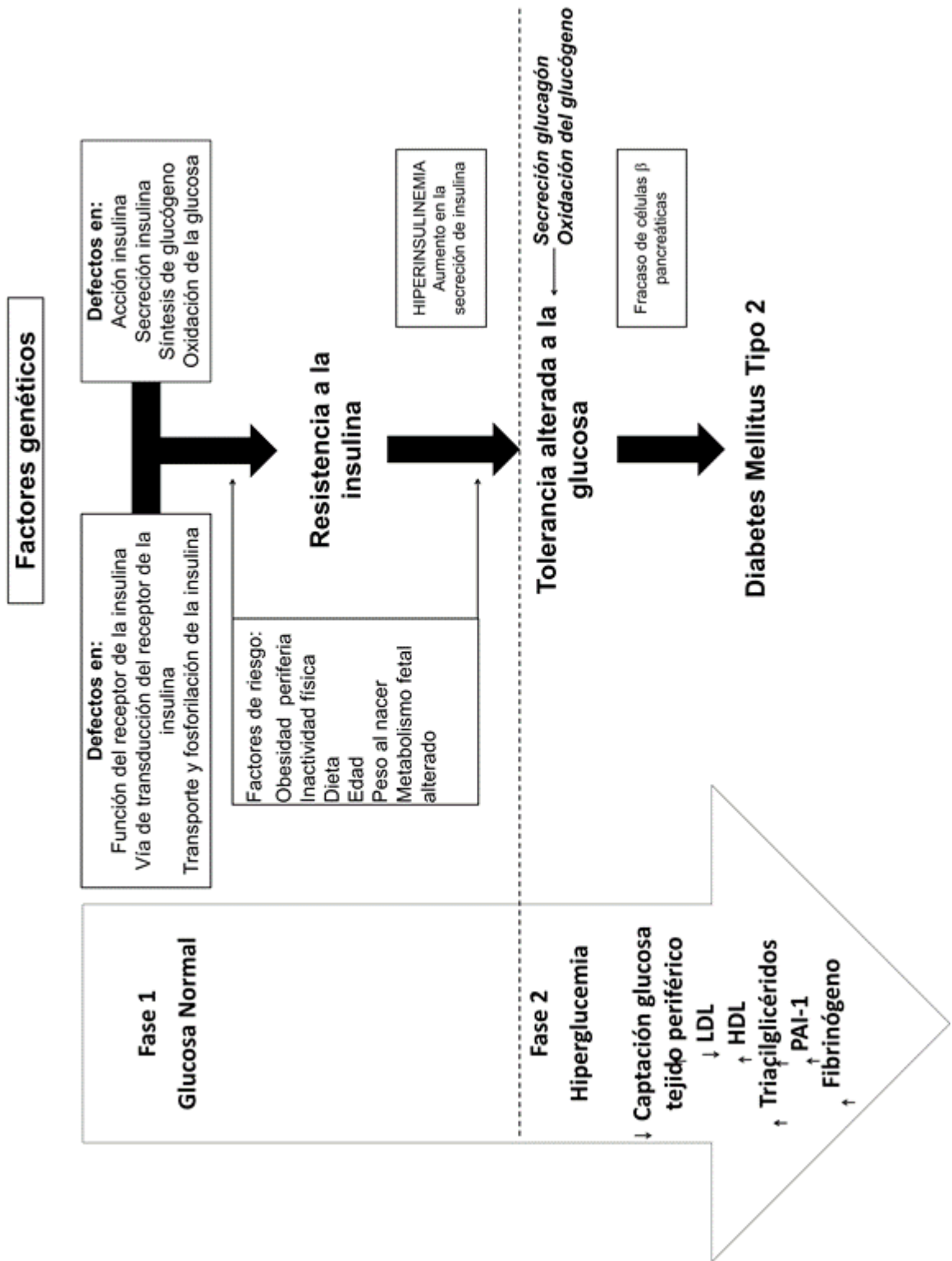


Figura 1. Fisiopatología de la Diabetes Mellitus Tipo 2

## ***Diabetes Mellitus Gestacional***

La diabetes Mellitus puede presentarse en dos situaciones durante el embarazo: 1) en mujeres que ya padecían Diabetes Tipo 1 o Tipo 2 antes del embarazo, y 2) mujeres que inician con diabetes durante el embarazo (Lucas, 2001). Éste último grupo corresponde a la definición de diabetes gestacional emitida por la Cuarta Conferencia Internacional sobre Diabetes Gestacional en 1998 (Metzger y Coustan, 1998), y avalada por el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG, por sus siglas en inglés) (ACOG, 2000).

Durante el embarazo se pueden presentar estados de hiperglucemia crónica que aparecen generalmente en el último trimestre del embarazo como consecuencia de la condición diabetogénica del mismo (Febres *et al.*, 2000; Baird, 1986). La diabetes Mellitus gestacional (DMG) se define como la alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, de severidad variable, que comienza o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Esta condición por ser generalmente asintomática, puede pasar con frecuencia desapercibida. Este tipo de diabetes desaparece al término del embarazo, pero está asociada a un incremento significativo de la morbilidad materna, fetal y neonatal (Goldman *et al.*, 1991) y es un importante factor de riesgo de Diabetes Mellitus Tipo 2 en los años siguientes, si no se implementan medidas preventivas adecuadas (Febres *et al.*, 2000).

### ***Diagnóstico de Diabetes***

De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) y la OMS, los criterios para el diagnóstico de la diabetes Mellitus son: a) la presencia de síntomas clásicos (polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso), con el hallazgo casual, sin considerar el tiempo pasado desde la última comida, de un nivel de glucosa en sangre (glucemia) por encima de 200 mg/dL (11.1 mmol/L); b) concentración de glucosa en ayunas superior a 126 mg/dL (7 mmol/L) y c) concentraciones de glucosa por encima de 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en un análisis de dos horas posterior a una sobrecarga oral de glucosa de 75 g (test realizado según los criterios de la OMS). El hallazgo aislado de cualquiera de estos criterios no es suficiente para establecer el diagnóstico (ADA, 2005; ADA, 2011). Además, se pueden evaluar algunos otros indicadores de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos que concuerdan con el desarrollo de la enfermedad



como son: concentraciones sanguíneas alteradas de colesterol, triacilglicéridos y hemoglobina glicada (Islas y Revilla, 2004).

### ***Diabetes Experimental***

Los modelos animales son usados para buscar posibles soluciones a las enfermedades en humanos. El uso de los animales como modelos de experimentación en el estudio de la fisiopatología de la diabetes ha permitido entender algunas de las causas y consecuencias, además de obtener avances en el tratamiento y control de este síndrome, aun cuando los signos y alteraciones no se reproducen con exactitud. En la literatura se encuentran modelos experimentales de diabetes en diferentes especies como son: perro, gato, conejo, cerdo, borrego, ratón y rata. En animales de laboratorio, específicamente rata, la diabetes se puede presentar de forma espontánea o ser inducida experimentalmente por distintos métodos (Ramos y Méndez, 1994; Andrés *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2006). Para la inducción experimental de diabetes se utilizan sustancias químicas que destruyen en forma selectiva las células  $\beta$  del páncreas como son la alloxana (Alx) y la estreptozotocina (STZ). La inducción de la DM1 se realiza en animales adultos con dosis de 40 mg de Alx / kg de peso corporal (Szkudelski, 2001) o de 50-60 mg de STZ / kg de peso (Hugues *et al.*, 2001). Para el desarrollo de la DMT2, se pueden utilizar neonatos de 48 horas de vida tratados con una dosis de STZ entre 100 y 200 mg / kg de peso corporal (Méndez y Ramos, 1994; González, 2002).

Existe abundante información acerca de las características y datos clínicos de la Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) en ratas de laboratorio (Ramos y Méndez, 1994; Andrés *et al.*, 2000; Fernández *et al.* 2006); sin embargo, casi todos ellos han sido desarrollados en machos. Por otra parte, existe menor información de modelos experimentales en animales para la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), y prácticamente no se encuentran datos de ninguna de las dos categorías en hembras. Así, en este trabajo se describen las características de un modelo animal con DMT2 en ratas hembras de la cepa wistar por inducción en neonatos con STZ, información que servirá como referencia para estudios posteriores.

## ***Panorama de la Diabetes en México***

La diabetes Mellitus es una epidemia mundial que afecta actualmente a más de 285 millones de personas y se espera que alcance los 438 millones en 2030. De acuerdo a la encuesta nacional de salud realizada en el 2006 la mayoría de los casos se presentan en países en vías de desarrollo (Villalpando *et al.*, 2010; Olaiz-Fernández *et al.*, 2007)

La mayoría de las enfermedades crónico–degenerativas resultan de la interacción de factores genéticos y ambientales (Bell *et al.* 2005). La predisposición para sufrir la enfermedad sólo se hace evidente cuando el individuo tiene un estilo de vida sedentario y una alimentación rica en carbohidratos y grasas. En las últimas décadas, la población mexicana se concentró en grandes centros urbanos, modificaron sus costumbres alimenticias (aumentando el consumo de calorías, azúcares simples y grasas) y disminuyó la actividad física (Aguilar y Gómez-Pérez, 2006).

La diabetes es un padecimiento creciente y la dinámica de la incidencia y la prevalencia de ésta en México ha cambiado de un padecimiento poco frecuente en los años 50's para convertirse en el principal problema de salud a partir del año 2000 (Rull *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2003; Aguilar *et al.*, 2005). El aumento del número de casos, el elevado porcentaje de pacientes que desarrollan complicaciones tardías y el costo del tratamiento, hacen insuficientes los esfuerzos para controlarla. De acuerdo a un estudio elaborado por el Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS), la diabetes es la principal causa de muerte en las mujeres y la segunda en los hombres, con un índice del 12 por ciento (Rodríguez *et al.*, 2010). La Secretaría de Salud reporta que en las dos últimas décadas la población de pacientes diabéticos aumentó siete veces con un estimado de 4.5 millones. La diabetes es un fenómeno decisivo en la calidad de vida del paciente, además de ser la causa más frecuente de ceguera, amputaciones no traumáticas, uremia e incapacidad prematura (Aguilar, 1999)

De acuerdo a la Federación Mexicana de Diabetes el número estimado de personas en México con la enfermedad fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones, es decir, el 10,7% de mexicanos entre 20 y 69 años la padecen. De todos ellos, 2 millones de personas no han sido diagnosticadas debido a que es una afección asintomática. La elevada tasa de

prevalencia e incidencia de alteraciones del metabolismo (resistencia a la insulina, resistencia a la glucosa y síndrome metabólico) que preceden a la enfermedad, así como el envejecimiento de la población, predice que el número de casos aumentará en las siguientes décadas (Aguilar *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2005). México ocupa el décimo lugar de DMT2 en el mundo y el primero por prevalencia de diabetes en América Latina (Olaiz-Fernandez *et al.*, 2007) y se estima que para el 2030 ocupará el séptimo puesto.

En América Latina el país que cuenta con la mayor incidencia y prevalencia de Diabetes Mellitus es México: registrándose una población de 4.4 millones en el año 2000 (FID, 2009); con 15 114 nuevos casos de DM1 y 404 770 DMT2 durante el 2007. En 2008 se presentaron 16,909 casos de DM1 y 396,374 casos de DMT2 (DGE (A), 2008). La prevalencia nacional de diabetes durante el 2009 fue de 10.1% con la presencia de 6, 826,800 casos de DMT2 (FID, 2009).

### ***Fisiología de la gestación durante la Diabetes***

Los productos hormonales de la unidad feto-placentaria modifican el metabolismo materno intermedio beneficiando a la madre y al feto, siempre y cuando el funcionamiento pancreático materno sea normal. Uno de los cambios metabólicos más notorios en la gestación es la resistencia a los efectos glucorreductores de la insulina, que se acentúa en el embarazo avanzado (último tercio de la gestación) y aún más en hembras diabéticas. Estos cambios se acompañan del incremento en la actividad lipolítica, por lo que llega al hígado mayor cantidad de sustratos para la síntesis de triacilglicéridos. La hipertrigliceridemia resulta de la combinación de tres factores: a) mayor concentración de lipoproteínas de baja densidad, b) mayor ingestión de alimentos y c) disminución de la actividad de la lipasa de lipoproteínas y lipasa hepática, esta última por el incremento en la cantidad de estrógeno circulantes (Gutiérrez, 2005; Sivan y Eriksson, 1997).

Los cambios hormonales durante la gestación también contribuyen a la presentación de resistencia fisiológica a la insulina. Dicha resistencia tiende a aumentar en paralelo con el aumento en la concentración de hormonas maternas circulantes como: lactógeno placentario, progesterona, prolactina y cortisona (Sivan y Eriksson, 1997; Powers y Lennon, 1999; Saran y Bors, 1990)

El metabolismo materno disminuye la utilización de sustratos para aumentar el aporte de éstos al feto. El ahorro de glucosa por los tejidos maternos disminuye la tolerancia a la glucosa y aumenta la relación insulina/glucagón en ayunas (Sivan y Eriksson, 1997).

El feto obtiene la glucosa que requiere para realizar su metabolismo directamente de la madre. Existe una relación directa entre la glicemia materna y la fetal, cuanto mayor es la glicemia materna mayor es la transferencia de glucosa al feto, por lo que si la madre padece diabetes la unidad feto-placentaria recibe mayor aporte de glucosa y el feto se desarrollará en un medio hiperglucémico, que estimula al páncreas fetal para una mayor secreción de insulina (Halliwell y Gutteridge, 1989 a).

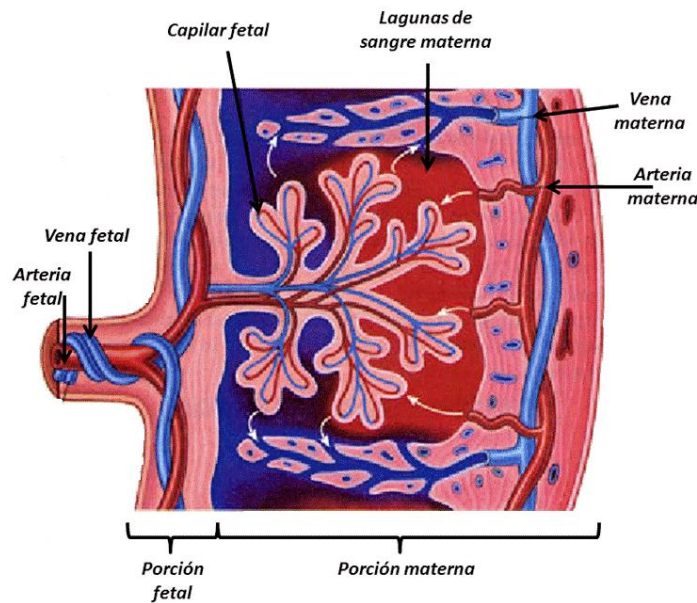
La gestación en hembras con Diabetes Mellitus Tipo 2 se caracteriza por resistencia crónica a la insulina y deficiencia relativa de esta. La deficiencia relativa o absoluta de insulina impide la compensación normal de la célula  $\beta$  pancreática con respecto a la resistencia a la insulina durante el embarazo. Las concentraciones de glucosa, triacilglicéridos y muchos aminoácidos aumentan en la circulación materna. Dichos metabolitos ocasionan un aumento en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, fracciones lipídicas y productos derivados de la oxidación de los lípidos como cuerpos cetónicos. Estos productos derivados de la oxidación de los lípidos pueden afectar la integridad de la membrana celular y causar daños en el material genético alterando el desarrollo embrionario y fetal, que ponen en riesgo la vida de la madre y el feto (Chappell *et al.*, 1999; Freeman y Crapo, 1982).

## **LA PLACENTA**

Un crecimiento fetal adecuado sólo es posible si desde la circulación materna se transfiere al feto, a lo largo de la gestación, una cantidad suficiente de nutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos), oxígeno, agua y electrolitos y se eliminan los desechos (Acevedo *et al.*, 2008).

La placenta es un órgano transitorio presente en la mayoría de los mamíferos, se comporta como un filtro permitiendo el intercambio entre la circulación materna y la fetal al mismo tiempo que evita el contacto directo entre éstas. La placenta realiza las funciones de intercambio materno-fetal como son: respiración, nutrición y excreción, además de almacén de nutrientes (carbohidratos, proteínas, lípidos), calcio y hierro, barrera inmunológica, síntesis de hormonas, barrera biológica y protección física, durante el desarrollo (Cross, 2005).

La placenta se desarrolla de las mismas células que dieron origen al feto y tiene dos componentes, una porción fetal que se desarrolla a partir del saco coriónico (corión frondoso) y una porción materna que deriva del endometrio (decidua basal) (Botella, 1993).



**Figura 2. Corte esquemático de la placenta con su componente fetal y materno y la circulación placentaria.**

Tomado de URL: <http://www.biog1105-1106.org/demos/105/unit8/>

La circulación placentaria tiene en cercana proximidad a dos sistemas circulatorios independientes (Figura 2), el materno y el fetal y su irrigación está influenciada por varios factores, en especial la presión arterial, contracciones uterinas, hormonas y enfermedades metabólicas de la madre como diabetes Mellitus (Burrows *et al.*, 1996; Meekins *et al.*, 1997).

El lecho vascular útero-placentario es el único espacio que está compuesto de estructuras fetales y maternas separadas por varias capas dependiendo de la especie. La circulación feto-materna en el humano es de tipo hemocorial (la sangre materna baña los capilares fetales) al igual que en los roedores como la rata. El lecho vascular de la unidad placentaria está compuesto por una porción basal de cara al endometrio llamada capa trofoblástica y una superficial de cara a la cavidad del blastocisto llamada placa coriónica. La barrera placentaria está compuesta por estructuras que separan la sangre materna de la fetal y su composición varía a lo largo de la gestación (Burrows *et al.*, 1996; Meekins *et al.*, 1997).

### ***Transporte a través de la placenta***

***Intercambio materno-fetal.*** El intercambio primario está controlado por factores de naturaleza fisicoquímica que dependen tanto de las características estructurales de la membrana placentaria y de su composición química, como del comportamiento molecular de las sustancias transferidas, además de la velocidad de perfusión en ambos lados de la placenta (Gowland *et al.*, 1998).

El aporte de sustratos y energía para la formación de tejido placentario depende de los fenómenos de hipertrofia e hiperplasia, y para ello se requiere de un eficiente transporte a través de la placenta. El transporte de sustancias a través de la placenta utiliza los mismos mecanismos empleados por la membrana celular (difusión simple, difusión facilitada, transporte activo y endocitosis). Existen factores específicos que influyen en el transporte a través de la membrana placentaria entre los que se encuentran:

- Superficie de intercambio. Es el tamaño de superficie entre las vellosidades coriales y los capilares placentarios, aumenta progresivamente a medida que avanza la gestación.
- Distancia de intercambio. Distancia que existe entre la sangre materna y fetal. Está dada por el grosor del estroma placentario (sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto); disminuye a medida que avanza la gestación.
- Permeabilidad. Corresponde a la cantidad de solutos transferidos por unidad de tiempo. Está dada por la presión hidrostática y oncótica y el gradiente de concentración. Para cada sustancia hay una constante de difusión. Este parámetro se ve afectado por edad gestacional y la tensión arterial materna.
- Flujo sanguíneo. Depende de la capacidad de la cámara hemática. El flujo es aproximadamente 80 - 100 mL/min.

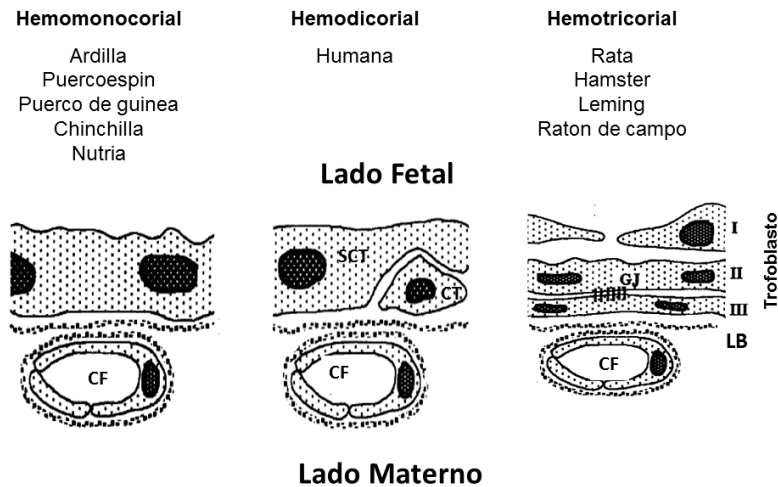
Existen características específicas de los solutos que influyen en el transporte a través de la membrana: a) tamaño de la molécula, b) Ionización, c) unión a proteínas, d) esteroespecificidad, e) desaminación y f) perfusión placentaria (Alvino, 2009).

### ***Diferencias entre la placenta de la rata y la placenta humana***

La placenta es un órgano transitorio característico de la mayoría de los mamíferos, guarda similitudes entre las diferentes especies. La placenta de los humanos y la de las ratas se clasifican; de acuerdo a la penetración del corion en la mucosa endometrial, como hemocoriales, de acuerdo al número de capas del trofoblasto en la zona laberíntica existe una subclasificación que ubica a la placenta humana como hemodicorial (con dos capa) y a la de la rata como hemotricorial (tres capas) (Figura 3). De acuerdo a la distribución del corion sobre la mucosa uterina, la placenta tanto de humanos como en roedores (disposición de las vellosidades coriales) es de tipo discoidal y la barrera materno-fetal está constituida por el tejido conjuntivo fetal, endometrio fetal y el trofoblasto (Takata *et al.*, 1997; Cross, 2005).

La implantación es el resultado de una serie de complejos procesos que se inician con la fijación del blastocisto y es además una condición indispensable para el desarrollo de la placenta en los mamíferos. Este proceso depende de un embrión metabólicamente activo y un endometrio adecuadamente estimulado. La implantación se inicia a los 6 días en el humano y a los 5 en la rata y concluye con la formación de la placenta definitiva. Los detalles de este proceso varían en las diferentes especies, pero los elementos fundamentales como son la adhesión del blastocisto y la penetración por medio de la invasión al endometrio, así como la formación de los tejidos deciduales por el útero, son características comunes de los roedores y los humanos (Palomino *et al.*, 2005).

En el humano la placenta comienza a formarse a los 13 días de gestación y se considera que ha adquirido su forma definitiva a las 12 semanas. En la rata la formación de la placenta comienza a los 7 días de gestación y se consolida al día 12. En el proceso, el trofoblasto invade el estroma endometrial, originando dos capas celulares, una externa: el sincitiotrofoblasto, encargada de erosionar el endometrio, y otra interna: el citotrofoblasto, con capacidad de división, ambas provenientes de la masa celular externa del trofoblasto. El tejido uterino materno implicado en el proceso de implantación recibe el nombre de decidua (Takata *et al.*, 1997).

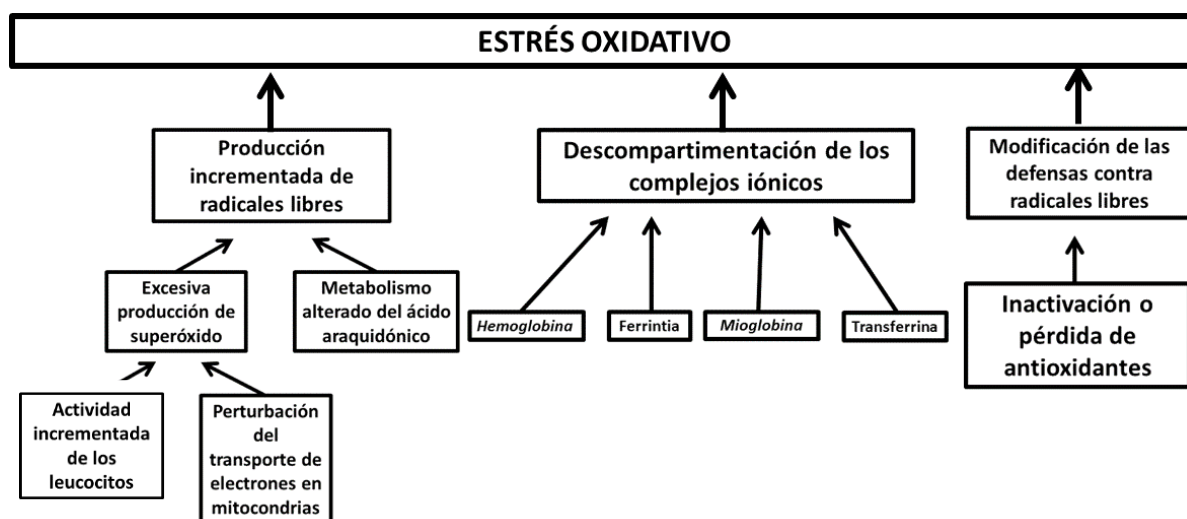


**Figura 3. Distribución de las células de la membrana interhemal en la placenta hemocorial.** LB; Lámina basal, SCT; sincitiotrofoblasto, CT; citotrofoblasto, CF; Capilar fetal. *Modificado de Takata, et al 1997.*



## ESTRÉS OXIDANTE

El término estrés oxidante hace referencia a condiciones en que las células están expuestas a niveles excesivos bien sea de oxígeno molecular o de derivados químicos del oxígeno llamados especies reactivas del oxígeno (EROs). Durante el estrés oxidante hay un aumento en la velocidad de generación de EROs y una disminución de los sistemas antioxidantes, lo que aumenta la concentración de éstos. Los radicales libres reaccionan químicamente con moléculas biológicas (lípidos, proteínas y ADN) al interior de las células y con componentes de la matriz extracelular, en las que se manifiestan las lesiones producidas por EROs, pudiendo desencadenar daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular (Downey, 1991; Halliwell, 1989 b; Halliwell, 1992).



**Figura 4. Desarrollo de estrés oxidante**

El estrés oxidante puede producirse por una disminución sustancial de antioxidantes, debido a deficiencias de vitaminas C, E, riboflavina y selenio o una excesiva producción de radicales libres (Figura 4). Éste se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades (Tabla 1) (Céspedes *et al.*, 1999; Downey, 1991; Freeman y Crapo, 1982; Hadju *et al.*, 1977; Halliwell *et al.*, 1992).

**Tabla 1. Factores que generan estrés oxidante.**

<b>Factores exógenos</b>	<b>Factores endógenos</b>
<b>Alimentos</b>	Vida sedentaria
Dietas hiperproteicas y hipercaloricas	Ejercicio fisico exhaustivo
Xenobioticos pro-oxidantes	Proceso inflamatorio (crónicos)
Dietas pobres en antioxidantes	Cáncer
Bebidas (café, alcohol)	Isquemia-reperfusión
	Muerte celular
<b>Contaminantes</b>	Estrés psicológico
Humo de cigarro	
O <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> , hidrocarburos	
Plaguicidas: paraquat, DDT, eldrin, lindano	
Exposición ocupacional (metales, asbestos)	
Fármacos anticarcinogenos	
Psoralenos (fluorocumarina)	
Radiaciones: ionizantes, ultravioleta, microondas	

El desbalance entre oxidantes y antioxidantes está asociado a la fisiopatología de diversas enfermedades como: aterosclerosis, cáncer, porfirias, cataratas, sobrecarga de hierro y cobre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, diabetes, malaria, artritis, enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas y otras. Así mismo, el proceso biológico del envejecimiento se acelera en relación directa con la magnitud del estrés oxidante (Céspedes *et al.*, 1999; Downey, 1991; Freeman y Crapo, 1982).

## ***Radicales libres***

Los radicales libres (RL) son fragmentos moleculares inestables y muy reactivos, generados por reacciones bioquímicas como consecuencia del metabolismo celular. Estas moléculas se producen en la totalidad de las células eucariontes, siendo diversas las fuentes intracelulares. A los radicales libres y otras moléculas no radicales que derivan del oxígeno se les denomina EROs (Cespedes *et al.*, 1999; Halliwell *et al.*, 1992).

Se define como RL a una especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Estos electrones generan un campo eléctrico que no es anulado, esto ocasiona que la especie química sea paramagnética, lo que les confiere gran inestabilidad y se vuelven altamente reactivos lo que los lleva a colisionar con otras moléculas a su alrededor a las cuales oxida al secuestrarles un electrón. La oxidación de estas moléculas altera su estructura y pierden su función e incluso pueden transformarse en nuevas fuentes de RL como sucede con los ácidos grasos (Halliwell y Gutteridge, 1986; Halliwell y Cross, 1991; Halliwell *et al.*, 1992).

Los radicales libres pueden ser derivados de muchos elementos químicos y los de mayor importancia desde el punto de vista de la biología son los derivados del hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno (Tabla 2), así como los formados por los metales de transición como el cobre y el hierro, entre otros (Halliwell *et al.*, 1992; Ferrer, 1999).

**Tabla 2. Especies oxidantes reactivas.**

**RADICALES**

Especies reactivas de oxígeno (EROs)		Especies reactivas de nitrógeno (ERNs)	
Anión superóxido	•O <sub>2</sub>	Radical de óxido nítrico	•NO
Radical hidroxilo	•OH	Radical de dióxido de nitrógeno	•N <sub>2</sub> O
Radical peroxilo	•OOR		
Radical perhidroxilo	•OOH		
Radical Aloxilo	•OR		
Radical ferrilo	FeO <sup>2+</sup>		

**NO RADICALES**

Especies reactivas de oxígeno (EROs)		Especies reactivas de nitrógeno (ERNs)	
Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ácido nitroso	HNO <sub>2</sub>
Ácido hipocloroso	HOCl	Catión nitronium	•N <sub>2</sub> O
Ozono	O <sub>3</sub>	Catión nitrosilo	•NO
Oxígeno singulete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Tetraóxido de dinitrógeno	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
		Trióxido de nitrógeno	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
		Peroxinitrito	•ONOO
		Alquilperoxinitritos	ROONO

Los RL pueden causar daño e incluso muerte celular, uno de los mecanismos que emplean es la peroxidación lipídica. La producción de RL se realiza constantemente en la mitocondria, se sabe que entre 2 a 5 % del oxígeno que entra en la cadena respiratoria se reduce de forma univalente para dar radical superóxido (Pryor, 1994; Borevis y Cadenas, 1975).

Los radicales libres producen daño a diferentes niveles en la célula:

- Dañan los lípidos y proteínas de la membrana celular por lo que la célula no puede realizar sus funciones vitales (transporte de nutrientes, eliminación de desechos, división celular). El radical superóxido,  $\bullet\text{O}_2^-$ , que se genera normalmente en el metabolismo provoca una reacción en cadena de la lipoperoxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular.
- Dañan el ADN impidiendo que tenga lugar la duplicación celular.

Los procesos normales del organismo como: el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio producen radicales libres. Otros radicales libres (la contaminación industrial, tabaco, radiación, medicamentos, aditivos químicos en los alimentos procesados y pesticidas) que afectan a los seres vivos se encuentran en el ambiente. No todos los radicales libres son peligrosos pues, por ejemplo, las células del sistema inmune crean radicales libres para matar bacterias y virus, pero si no hay un control suficiente por los antioxidantes, las células sanas pueden ser dañadas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

### ***Fuentes de radicales***

1. Metabolismo celular del oxígeno
2. Reacciones de óxido-reducción
  - Fagocitosis
  - Autoxidación de catecolaminas
  - Síntesis de prostaglandinas
  - Oxidación de hipoxantina y xantina

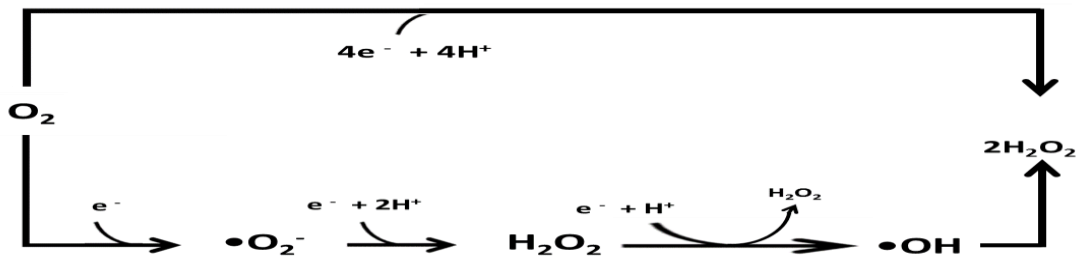
### ***Radicales libres de oxígeno***

La utilización del oxígeno a nivel celular permite que una pequeña fracción de éste sea convertida a radicales libres. El proceso de reducción del oxígeno molecular ocurre en cuatro etapas que involucran, cada una de ellas, la incorporación de un electrón a la

molécula. Así, se forma el radical libre anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), posteriormente se forma el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que aunque no es un radical libre, es de gran reactividad. Un nuevo proceso de reducción transforma el peróxido de hidrógeno en el radical libre hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), y finalmente se forma como producto final el agua (Halliwell y Gutteridge, 1986; Halliwell y Cross, 1991; Halliwell, 1992).

La producción de las Especies Reactivas del Oxígeno (EROs), entre ellas radicales libres, es un proceso natural, inevitable y constante; un continuo biológico. Todas las células, independientemente de su tipo, están permanentemente produciendo estas moléculas con electrones desapareados. El daño que éstos ocasionan en los diferentes tejidos depende del balance entre los EROs y las defensas antioxidantes de que disponen las células (Berlett y Stadtman, 1997; Henle y Linn, 1997, Steinberg, 1997).

Las principales especies reactivas del oxígeno son: el radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidrilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Una de las principales fuentes de EROs es la cadena respiratoria mitocondrial, donde pueden ocurrir las siguientes transferencias de electrones:



Harper, 1994

En la mitocondria, aproximadamente un 3 % de los electrones provenientes de NADH, por la incompleta reducción del oxígeno, se desvían hacia la formación de EROs. Por otra parte, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reaccionar con metales divalentes (libres o unidos a proteínas) y producir  $\text{HO}\bullet$ ; vía reacción de Fenton. El ejemplo tipo es la reacción con  $\text{Fe}^{++}$  libre, que ocurre según la siguiente reacción:



### ***Radical Hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ )***

El  $\bullet\text{O}_2^-$  reacciona con el peróxido de hidrogeno obteniéndose como producto un radical hidroxilo y un ion hidróxido. El  $\text{HO}\cdot$  puede reaccionar con el grupo prostético de metaloproteínas que contienen hierro (dihidroxiácido dehidrasa, la 6 fosfogluconato dehidrasa, las fumarasas A y B o la aconitasa), según la reacción de Haber Weis:



### ***Radical superóxido o anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ )***

Es el producto de la incorporación de un electrón en una molécula de oxígeno; se produce normalmente durante la fosforilación oxidativa.

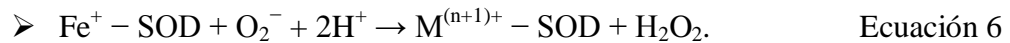


El radical superóxido es poco reactivo y tiende a reaccionar consigo mismo dando origen a un proceso conocido como “dismutación”, que lo transforma en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. El aspecto más relevante de esta reacción es que el radical superóxido puede además reaccionar con el producto de su propia dismutación (el peróxido de hidrógeno), formando, entre otros productos, el radical libre hidroxilo, considerado como uno de los productos más reactivos del oxígeno (Berlett y Stadtman, 1997; Henle y Linn, 1997).

La dismutación de anión superóxido catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) puede representarse como las siguientes semireacciones:



Donde M puede ser un metal de transición como: Cu (n=1), Mn (n=2), Fe (n=2) o Ni (n=2).



### ***Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)***

Esta molécula no es un radical pero, al ser un oxidante débil, puede formar radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>), por interacción con metales, en una reacción no enzimática (Reacción de Fenton)



### ***Mitocondrias***

La mitocondria es el organelo celular encargado de la producción de la energía que la célula requiere para su homeostasis a través de la fosforilación oxidativa. Aproximadamente el 80% del adenosín trifosfato (ATP) que la célula requiere es generado en este organelo, donde se consume del 80 al 90% de oxígeno disponible (Gitto *et al.*, 2002). En dicho organelo se realizan importantes procesos de óxido-reducción que generan cantidades considerables de radicales libres (RL), capaces de ocasionar alteraciones a la estructura de la membrana mitocondrial. Estos oxidantes son producidos continuamente a gran velocidad como producto del metabolismo aeróbico, donde el 96% del oxígeno molecular disuelto entra a la cadena respiratoria para ser reducido por la citocromo oxidasa a dos moléculas de agua con la ganancia de 4 electrones. La cadena respiratoria, constituye por lo tanto la mayor fuente de RL (Herrera, 1997).

En la mitocondria (a distintos niveles de la cadena respiratoria) se estima que del 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa, sino que se forma el anión semiquinona el que puede transferir un electrón al oxígeno molecular con la subsecuente formación del  $\bullet\text{O}_2^-$  o dos electrones convirtiéndose en  $\text{H}_2\bullet\text{O}_2^-$ , el  $\bullet\text{O}_2^-$  es convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  espontáneamente o por vía



enzimática y también puede generar otras especies reactivas; en exceso, reaccionan con toda clase de macromoléculas causando alteraciones metabólicas, citotoxicidad y daño mutagénico (Herrera, 1997).

La generación de RL por la mitocondria fue descrita por primera vez por Chance *et al.*, 1979. En la mitocondria el  $\bullet\text{O}_2^-$  se forma como producto secundario en la cadena respiratoria por la transferencia de un electrón al oxígeno molecular dentro del complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) y complejo III (ubiquinol Citocromo c Oxidasa). En contraste al complejo III donde se atribuye la donación del electrón a la ubiquinona, el sitio de acción en el complejo III aún se encuentra en discusión (Bandy y Davison, 1990; Arnheim y Cortopassi, 1992).

Los grupos Fe-S, la flavina mononucleótido y la región alrededor de sitios de unión ubisemiquinona se han señalado como los sitios donadores de electrones. Por otra parte,  $\bullet\text{O}_2^-$  se libera del complejo I hacia la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III libera  $\bullet\text{O}_2^-$  a ambos lados de la membrana interna (Cranfor y Davies, 1994).

Aproximadamente un 88% del  $\bullet\text{O}_2^-$  se transforma en peróxido de hidrógeno por acción de la enzima superóxido dismutasa manganeso dependiente (Mn-SOD), específica de la matriz mitocondrial, o por la superóxido dismutasa cobre-zinc dependiente (CuZn-SOD) en el espacio intermembrana y citosol de acuerdo con la reacción:



El 12% restante del  $\bullet\text{O}_2^-$  reacciona con el NO formando peroxinitrito ( $\bullet\text{ONOO}$ )

El óxido nítrico (NO), un radical libre de nitrógeno, ejerce una inhibición en la cadena respiratoria a nivel de los complejos III y IV. El NO inhibe (5 veces más de lo normal), la transferencia de electrones entre los citocromos b y c y aumenta la producción mitocondrial de  $\bullet\text{O}_2^-$ . Actúa además sobre la citocromo oxidasa y constituye un potente inhibidor del consumo de oxígeno. Las concentraciones de NO presentes en los tejidos,

permiten suponer que hay un 20 a 30% de inhibición producida por NO (Poderoso et al., 1996).

Otras estructuras celulares que generan radicales libres incluyen: lisosomas, peroxisomas, la membrana nuclear, la citoplasmática y la del retículo endoplásmico.

### ***Ácidos grasos de membrana***

Los lípidos forman parte de los tejidos de plantas y animales y son clasificados como esteroides, fosfolípidos, esfingomielinas, ceras y grasas (Carrero *et al.*, 2005). Los principales componentes de todas las grasas son los ácidos grasos, que pueden ser saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga, que generalmente contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 8 y 22. Esto se debe a que su síntesis biológica tiene lugar mediante la adición sucesiva de unidades de acetil CoA. Los ácidos grasos se pueden encontrar en su forma libre (en una menor proporción) esterificados, como triacilglicerol o formando parte de los fosfolípidos de las membranas celulares (Voet y Voet, 1990).

Diferentes investigaciones señalan que hay una interacción significativa entre la alteración de las membranas y el desarrollo de enfermedades, entre ellas la diabetes y la hipertensión (Delachambre *et al.*, 1998; Dorrance *et al.*, 2001). Por su parte los ácidos grasos son constituyentes importantes de las membranas. En específico los ácidos grasos esenciales que son precursores de los fosfolípidos de las prostaglandinas. La síntesis de los eicosanoides es regulada por la cantidad de ácido araquidónico disponible en los fosfolípidos membranales por lo que si la composición de ácidos grasos en la membrana se altera, esta puede tener repercusiones en la síntesis de eicosanoides y generar alteraciones fisiológicas importantes (Vance y Vance, 1985).

Cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana sugieren una participación de los fosfolípidos en el desarrollo de enfermedades. En ese sentido, los fosfolípidos no sólo juegan un papel esencial en el mantenimiento de la estructura y función normal de las células, sino que también dan origen a segundos mensajeros de señalización

celular, un mecanismo mediante el cual las hormonas y otras sustancias transmiten señales del exterior al interior de las células (Zeizel, 1993).

### ***Lipoperoxidación***

Los ácidos grasos mono son más resistentes al ataque oxidante, mientras que los ácidos grasos polinsaturados, presentes en muchas fosfolípidos, pueden dañarse por peroxidación lipídica ocasionando cambios en la composición química y deterioro en la organización ultraestructural de las membranas celulares disminuyendo la fluidez de las mismas, alterando su permeabilidad y la transducción de receptores hormonales y enzimas unidas a ellas (Bencheroun *et al.*, 1993; Goeth *et al.*, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1999).

El estrés oxidante causa daño en la estructura de las enzimas, a través de la oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH) de sus sitios activos, por modificación de la estructura de los aminoácidos o mediante la formación de bases de Schiff (Bulkley, 1983; Fridovich, 1978; Halliwell y Gutteridge, 1990 b; Halliwell *et al.*, 1992).

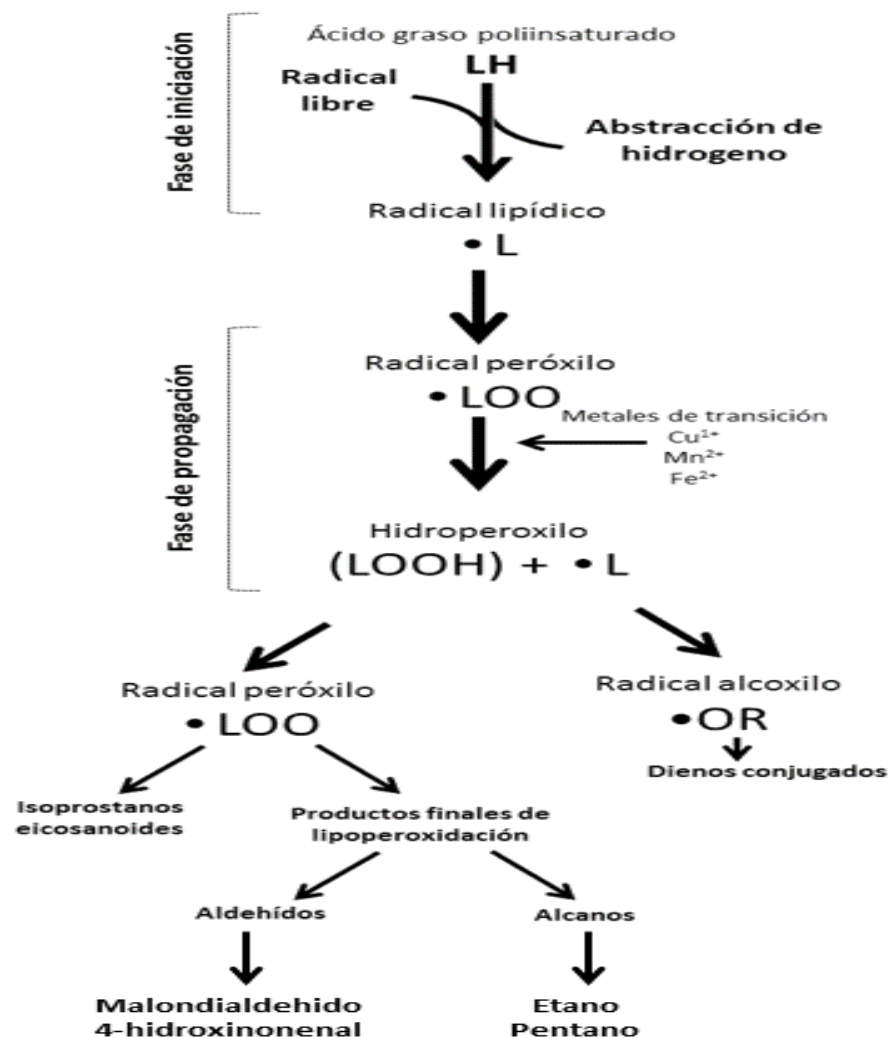
El daño celular que resulta de la producción excesiva de radicales libres de oxígeno, es consecuencia de una alteración en la membrana plasmática a través de la oxidación de los residuos de ácidos grasos de la bicapa lipídica, proceso que se denomina peroxidación lipídica (Aust *et al.*, 1985; Tappel, 1973).

La peroxidación lipídica es un proceso que ocurre normalmente a bajos niveles en todas las células y tejidos. Involucra la conversión oxidativa de ácidos grasos insaturados a productos primarios conocidos como hidroperóxidos, lo cual surge de un proceso de ataque por radicales libres (Aust *et al.*, 1985; Tappel, 1973).

La reacción se inicia, cuando el radical libre le quita un átomo de hidrógeno a un ácido graso poliinsaturado, lo cual deja un electrón desapareado sobre un átomo de carbono. A su vez, el radical carbono así formado reacciona con el oxígeno, con lo cual se crea el radical peróxilo, que es altamente reactivo y puede unirse a proteínas de membrana o a cadenas laterales de ácidos grasos adyacentes, originándose con todo ello una reacción en cadena. El proceso culmina cuando se agota el sustrato y se produce la liberación de

quantos de luz (Figura 5) (Halliwell y Gutteridge, 1986; Halliwell y Cross, 1991; Halliwell y Gutteridge, 1990 b; Halliwell y Gutteridge, 1999; Halliwell *et al.*, 1992; Ikeda *et al.*, 1999).

Se produce un estrés oxidante cuando la acción de los mecanismos antioxidantes es sobrepasada por el proceso de oxidación, siendo la peroxidación lipídica una importante manifestación del mismo. La peroxidación lipídica ha sido definida por Tappel, 1973 como el deterioro oxidante de lípidos poliinsaturados. Gershman *et al.*, 1954, propusieron que la mayoría de estos efectos dañinos causados por el oxígeno pueden ser atribuidos a la formación de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1985).



*Figura 5. Lipoperoxidación*

## ***Antecedentes***

---

---

El crecimiento y el desarrollo fetal están determinados por tres factores: el estado nutricional de la madre, la función placentaria y la capacidad del feto para utilizar los nutrientes (Moreno, 2001).

Una mala nutrición durante la gestación puede producir defectos persistentes, como la reducción del número de células de los tejidos, la modificación estructural de los órganos, la selección de ciertos clones de células y la modificación en el ajuste de ejes hormonales. El impacto a largo plazo dependerá del estadio en el que se produzca la mala nutrición, de su duración e intensidad (Becerra-Fernandez, 1999).

La hipoglucemia, la hiperglucemia y un deficiente aporte de proteínas al feto pueden causar bajo peso al nacer, tanto en ratas como en humanos y se asocian a hipertensión e intolerancia a la glucosa en el adulto (Snoeck *et al.*, 1990; Woodall *et al.*, 1996).

Uno de los mecanismos de adaptación de la placenta en situaciones de riesgo es la hipertrofia placentaria, que sirve para mantener el aporte adecuado de nutrientes al feto y se presenta en situaciones de malnutrición, pero también en patologías como diabetes, tabaquismo, mayor edad de la madre durante la gestación y obesidad materna (Moreno, 2001).

### **Diabetes y radicales libres en gestación**

La gestación es un estado fisiológico que requiere de una adaptación metabólica, que se acompaña de una demanda energética elevada y un incremento en los requerimientos de oxígeno. El aumento en la demanda de oxígeno provoca un estrés oxidante en la mayoría de las hembras durante la gestación, esta situación se debe al rápido crecimiento del feto y las membranas fetales (alantoides y amnios). Esta adaptación homeorrética requiere de una gran cantidad de energía y un aporte cuantioso de oxígeno. Para lograr esto el metabolismo celular se incrementa, produciéndose una gran cantidad de

radicales libres, lo cual conduce a una peroxidación de los lípidos en las membranas celulares ocasionando una alteración funcional en el transporte y/o transducción de señales (Sivan y Eriksson, 1997).

La gestación agrega demandas considerables a los mecanismos que normalmente regulan el anabolismo y el catabolismo. La futura madre debe ser capaz de almacenar nutrientes de manera eficaz durante los periodos de alimentación, para cubrir las demandas del feto durante el ayuno (Sivan y Eriksson, 1997).

En la gestación, la unidad feto-placentaria se desarrolla a expensas de la madre. Se puede dividir al embarazo en dos etapas metabólicas: a) anabólica, que se caracteriza por el desarrollo de la unidad feto-placentaria durante los 2 primeros tercios de la gestación y b) catabólica, se caracteriza por un aumento en la demanda de sustratos como glucosa y aminoácidos, esto lleva a que el metabolismo materno cambie (gluconeogénesis) para dar soporte a las demandas energéticas del feto en crecimiento (LeRoith, 2004).

Los mecanismos causantes de los efectos teratogénicos de la diabetes relacionados con el estrés oxidante son: glicación de proteínas, acumulación intracelular de productos de la vía del poliol como sorbitol (altera la diferenciación celular), descenso del mioinositol (precursor del fosfatidil inositol, implicado en el mecanismo de señalización celular) y alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico (Kondo *et al.*, 2002; Montelongo *et al.*, 1992).

### ***Daño a la placenta por radicales libres en Diabetes Mellitus Tipo 2***

Durante la DMT2 se producen cambios metabólicos que se manifiestan en alteraciones bioquímicas indicadoras de estrés oxidante como: disminución de la concentración plasmática de vitaminas antioxidantes (A y E), incremento en la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), aumento de la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad a la oxidación, menor capacidad antioxidante del plasma y daño al material genético (Baynes, 1991; Bucala *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que el crecimiento fetal y de la placenta está asociado a la concentración de glucosa materna. El descontrol glucémico produce cambios importantes de tipo crónico a nivel placentario como son:

- a) Aumento de la permeabilidad de la microvasculatura y disminución del flujo útero-placenta por alteración de la estructura.
- b) Estimula la expresión de receptores GLUT1
- c) Aumenta la captación de glucosa hasta en un 40% (aún sin cambios estructurales en la superficie)
- d) Regular la expresión a la baja del transportador GLUT3 como mecanismo de protección al feto.

La hiperglucemia materna también genera un estado de estrés oxidante en la placenta debido a: la glicación de la hemoglobina que promueve un estado de hipoxia al disminuir la capacidad de transporte de oxígeno y a la estimulación del receptor de insulina y/o aumento de la síntesis de los factores de crecimiento que tienen un efecto trófico sobre las microvellosidades, incrementando el grosor de la zona laberíntica por la incorporación de citotrofoblasto o sincitiotrofoblasto inmaduro a expensas de la superficie funcional de intercambio y disminuyendo el flujo sanguíneo a través del placentoma (Myatt y Cui, 1997).

La hipoxia asociada a estrés oxidante se ha comprobado en hijos de madres diabéticas, por la elevada concentración de eritropoyetina en líquido amniótico y la disminución del hierro corporal (Nishikawa *et al.*, 2000).

El estrés oxidante generado en la placenta causa disfunción vascular y compromiso fetal, además de promover hiperinsulinemia fetal asociada a la macrosomía y aumento del requerimiento de oxígeno por aumento en la tasa metabólica. La cronicidad de estos mecanismos disminuye la capacidad fetal de hacer frente a una situación de estrés (Bonet *et al.*, 1998; Herrera, 1997).

Existe un mecanismo de respuesta compensatorio para mantener la viabilidad del producto y está asociado a cambios metabólicos en el feto que hacen más eficiente la

utilización de la energía. Este mecanismo de respuesta compensatoria está asociado a la instauración de enfermedades de origen fetal en el adulto. El bajo peso al nacer se correlaciona positivamente con la aparición de hipertensión, hiperlipidemia y resistencia a la insulina en la edad adulta. Se sabe que la incidencia de anomalías en la prueba sin estrés, la acidosis sanguínea en el cordón umbilical y una calificación baja en la prueba Apgar es más frecuente en embarazos complicados con Diabetes, en especial en pacientes con pobre control glucémico (Law *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1994).

### ***Consecuencias de la Diabetes Mellitus Tipo 2 durante la gestación***

La diabetes Mellitus es un síndrome multifactorial y multisistémico de curso crónico-degenerativo, con una elevada tasa de prevalencia e incidencia, que se caracteriza por hiperglucemia. Diversos autores han reportado incremento de las especies reactivas de oxígeno (EROS) como parte de la fisiopatología de la diabetes Mellitus; en pacientes gestantes este proceso puede generar alteraciones en la composición química de la placenta, alterando así sus funciones de nutrición y síntesis de hormonas, poniendo en riesgo la viabilidad y/o desarrollo normal del producto (Hales, 1991; Hales, 1992).

La hiperglucemia es un factor de riesgo para la madre y el feto, las complicaciones maternas más importantes durante el embarazo incluyen hipertensión arterial, preclampsia y eclampsia. Sin embargo, el riesgo de complicaciones perinatales es mucho mayor en el producto y se ha demostrado que la presencia de hiperglucemia (glucemia en ayunas  $>105$  mg/dL o  $> 5.8$  mmol/L) se relaciona con un aumento en el riesgo de muerte fetal intrauterina en las últimas 4 a 8 semanas de gestación. Las principales complicaciones fetales por hiperglucemia incluyen macrosomía y sus consecuencias: traumatismos obstétricos, luxación de hombro, fracturas de clavícula, parálisis de los nervios del plexo braquial, anomalías congénitas, hipoglucemia, hipocalcemia e ictericia neonatal, enfermedad de membrana hialina con insuficiencia respiratoria secundaria, taquipnea y policitemia. El control estricto de la glucemia es indispensable para reducir el riesgo de estas complicaciones (Sweeney y Brown, 2001; Persson y Hanson, 1998).



## ***Teorías del impacto de las condiciones de vida intrauterina sobre la aparición de enfermedades en la vida adulta***

La hipótesis que adjudica origen fetal a enfermedades cardiovasculares y metabólicas en el adulto, involucra la existencia de adaptaciones en el desarrollo fetal y placentario, surgidas a consecuencia de una alteración en el entorno materno y en la calidad y cantidad de los nutrientes que deben satisfacer los requerimientos fetales (González 2006).

Las alteraciones del entorno fetal (endocrino y nutritivo) influyen en la expresión de genes que resultan en condiciones de tipo adaptativo durante el desarrollo para garantizar la supervivencia del individuo; sin embargo, estas modificaciones predisponen al desarrollo de enfermedades en la etapa postnatal y adulta (Snoeck *et al.*, 1990).

Datos epidemiológicos sugieren que la mala nutrición pre y postnatal puede ser un factor de riesgo importante en la etiopatología de muchas enfermedades en el adulto; principalmente las enfermedades metabólicas como son síndrome metabólico, Diabetes Mellitus Tipo 2, dislipidemia, hipertensión y enfermedad coronaria (Sweeney y Brown, 2001; Persson y Hanson, 1998).

***Hipótesis de Barker*** postula que la Diabetes Mellitus Tipo 2 se origina como mecanismo de adaptación del feto ante la mala nutrición. Una agresión *in útero* sería capaz de producir una programación anormal de diversos sistemas relacionados entre sí que se manifestaría durante la vida del individuo (Barker, 1989 a; Barker, 1989 b; Barker, 1992; Barker, 1994; Barker, 1995; Barker, 1999).

Otra teoría sostiene que los estímulos o agresiones que actúan en un periodo sensible o crítico del desarrollo producen cambios permanentes o mantenidos en la estructura o la función de un organismo (Lucas, 1991).

La mala nutrición fetal se ha postulado como asociada al desarrollo de resistencia a la insulina (Hales, 1991), mientras el bajo peso al nacimiento es un predictor más potente

de resistencia a la insulina en el adulto (Law et al., 1995; Phillips et al., 1994; Becerra-Fernandez, 1999).

***Hipótesis de origen fetal de la enfermedad o de la programación fetal.*** Establece que las enfermedades metabólicas (resistencia a la insulina, hiperlipidemia, síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa y Diabetes Mellitus Tipo 2) se originan por la adaptación del feto a la mala nutrición (Barker, 1990). La evidencia más sólida que apoya la hipótesis del origen fetal proviene de experimentos efectuados en animales, en muchos de los cuales se ha demostrado que la desnutrición conduce a enfermedades metabólicas en la fase adulta. Un ejemplo es el modelo donde se somete a un grupo de animales gestantes a restricción alimentaria y se alimenta con dietas hipercalóricas a los críos los cuales desarrollan características típicas de síndrome metabólico (Armitage *et al.*, 2004).

La influencia adversa de la diabetes durante la gestación se manifestará de tres maneras diferentes en el desarrollo embrionario y fetal: a) La hiperglucemia materna puede alterar moléculas involucradas en la estructura y en las vías de señalización; b) Se modifica drásticamente la disponibilidad de sustratos y c) Estos cambios también afectan al tejido placentario, por lo que se verá comprometida su estructura y funcionalidad (González, 2006).

A pesar de la falta de la acción de la insulina sobre el tejido placentario, existe una acumulación de glucógeno en la zona del laberinto trofoblástico, lo que puede explicarse por la activación secundaria de la sintasa de glucógeno y la inhibición de la glucógeno fosforilasa por el aumento de la glucosa-6-fosfato durante hiperglucemia. Lo anterior protege al feto de sobrepaso de glucosa y contribuye a un aporte continuo de ácido láctico al feto cuando la hiperglucemia cesa (Acevedo et al., 2008).

En un estudio realizado en ratas diabéticas se observó que la producción de lipoperóxidos se incrementa en la placenta durante la gestación. En animales DMT2 no se altera la concentración de la enzima superóxidodismutasa (SOD), pero sí su actividad. También reportan que la concentración de la prostaglandina y el AA es igual en animales sanos y diabético, pero aumenta la proporción de tromboxano B2 (TXB2)/6-ceto-prostaglandina F1 $\alpha$  (PGF1 $\alpha$ ) en el tejido de los diabéticos. Los autores también señalan que

la adición de SOD y glutatión *in vitro* no modifica los niveles de prostanoides en animales sanos, pero disminuye la conversión de AA a PGF2 $\alpha$ , PGE2 y TXB2 (P <0,05) en la placenta diabética. La generación de radicales superóxido por la adición de hipoxantina/xantina oxidasa o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio de incubación produce una disminución de 6-ceto-PGF1 $\alpha$  en tejidos de animales normales, mientras que la concentración de AA y la producción de PGE2, PGF2 $\alpha$  y TXB2 aumenta en ambos grupos (White *et al.*, 2002).

La diabetes Mellitus induce alteraciones en los niveles de leptina circulantes. White *et al* (2002) evaluó la relación de la concentración de leptina con la generación de óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG) E2 y la producción y el metabolismo de los lípidos en animales DMT2, encontrando que la adición de leptina a concentración 1 nM *in vitro* aumenta la producción de NO en animales DMT2 y normales mediante la estimulación de NO sintasa. También observaron que la leptina aumenta la producción de GPE (2) en la placenta en ambos grupos y disminuye la concentración de lípidos (fosfolípidos, triacilglicéridos, colesterol) en tejido placentario. Estos datos indican que la leptina aumenta la producción de NO y GPE<sub>2</sub> (agentes vasoactivos que modifican el flujo sanguíneo placentario) y estimula el metabolismo lipídico en la placenta, probablemente para la generación de más lípidos de transferencia para el feto. En la rata diabética, se redujo la leptina placentaria, probablemente como respuesta al medio ambiente materno, para regular la concentración y la transferencia de nutrientes al feto en desarrollo (Pustovrh *et al.*, 2000; Lyall *et al.*, 1998; Schonfelder *at al.*, 1996).

En tejido placentario, se han identificado numerosos marcadores que revelan la existencia de un estrés oxidante, como: disminución de la concentración de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), aumento de enzimas generadoras de radicales libres como la xantina oxidasa, aumento de los productos de la lipoperoxidación y de anticuerpos contra la LDL oxidada, así como una disminución de ácido ascórbico. Un hallazgo interesante es el aumento de nitrotirosina en el endotelio vascular de la placenta. La nitrotirosina es un metabolito del peroxinitrito, el cual a su vez es el producto de la reacción del óxido nítrico con el anión superóxido. Este hallazgo sugiere que existe un aumento de anión superóxido y por lo tanto la presencia de un estrés oxidante (Baynes, 1991; Chappell *et al.*, 1999).

Se ha observado que la producción y función de enzimas antioxidantes en placenta de animales inducidos a Diabetes Mellitus Tipo 2 se ve disminuida del lado materno de este órgano y aumenta del lado fetal. Así mismo la lipoperoxidación de la placenta en ambos lados es mayor en animales DMT2 en comparación con su control. Se ha observado que las metaloproteasas de matriz que intervienen en múltiples vías del desarrollo se encuentran elevadas en el feto y la placenta durante la diabetes (Pustovrh *et al.*, 2000).

## *Justificación*

---

---

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa, multifactorial que día a día aumenta la tasa de incidencia, prevalencia y defunción. Las complicaciones de este padecimiento durante la etapa de gestación no están bien definidas ya que el diagnóstico de la enfermedad es tardío o el diferencial de la misma no es correcto. Así mismo, las alteraciones que se generan por los cambios metabólicos a nivel estructural y funcional en las membranas celulares y en particular de la mitocondria no han sido estudiadas.

## *Hipótesis*

---

---

Las alteraciones morfológicas y funcionales de la membrana mitocondrial están asociadas al incremento de radicales libres en células de placenta de ratas diabéticas tipo 2.

## ***Objetivos***

---

---

### ***Objetivo general***

Analizar las alteraciones morfológicas y funcionales de la membrana mitocondrial ocasionadas por peroxidación de lípidos, en células de placenta de ratas con DMT2.

### ***Objetivos particulares***

- Analizar la composición de ácidos grasos en membrana mitocondrial de placenta de ratas con DMT2.
- Analizar la lipoperoxidación de membrana mitocondrial de placenta de ratas con DMT2.
- Analizar la fluidez membranal de mitocondrial de ratas DMT2.
- Analizar los cambios morfológicos de tejido de placenta de ratas con DMT2.
- Analizar los cambios morfológicos de las mitocondrias de placenta de ratas con DMT2.

## ***Material y métodos***

---

### ***Animales de experimentación***

Se utilizaron 10 ratas Wistar hembras (HW1) de 9 semanas de edad, con un peso promedio de 250 g, albergadas en forma individual en jaulas de polisulfonato con sistema de microaislamiento, con alimento y agua *ad libitum* y fotoperiodo de 12 horas. Se realizó frotis vaginal a los animales para diagnosticar el estro, aquellas que resultaron positivas se pusieron con machos sanos de la misma estirpe toda la noche para su apareo. Durante la mañana se realizó diagnóstico de apareo mediante frotis vaginal. Las hembras positivas a apareo se albergaron de forma individual, a los 12 días pos coito se confirmó la gestación mediante palpación abdominal (gravidez de los cuernos uterinos), aquellas que no fueron positivas a gestación fueron eliminadas. Las hembras positivas a gestación fueron mantenidas en forma individual y monitoreadas hasta el parto. Al parto se seleccionaron las hembras (HW2) formando pares por camada para obtener un animal control y un tratado de la misma madre. Los animales de cada grupo fueron elegidos en un sistema completamente aleatorizado para formar dos grupos de 10 individuos cada uno (Figura 6).

### ***Tratamiento***

De los animales HW2 a las 48 a 72 horas de edad, 10 fueron inducidas a Diabetes Mellitus Tipo 2 mediante la administración vía intraperitoneal de 135 mg de STZ / kg de peso corporal en 50 µl de amortiguador de citratos a pH de 4.5 y 10 fueron utilizadas como grupo testigo con la administración de 50 µl del mismo amortiguador. Los animales fueron mantenidos con la madre hasta el destete (cuatro semanas de edad) y posteriormente albergadas en grupos de 3 animales, en cajas de polisulfonato con microambiente y fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas obscuridad a 22 °C en promedio; con alimento (nutricubos/2040 de Harlan ®) y agua *ad libitum* (Figura 6). Se tomó como criterio de inclusión en el grupo tratado que los animales tuvieran una concentración de glucosa sanguínea mayor a 200 mg/dL (11.11 mmol/L) en ayuno de 8 horas y menor de 110 mg/dL (6.1 mmol/L) en el grupo testigo. Se consideró como concentración máxima de glucosa en sangre 200 mg/dL debido a que concentraciones por arriba de este valor son consideradas

como signo de insuficiencia total de insulina teniendo como resultado animales con Diabetes Mellitus Tipo 1.

En la semana 16 de edad las hembras de ambos grupos fueron separadas de forma individual y se les realizó frotis vaginal para diagnóstico de estro. Las hembras que resultaron positivas se pusieron con un macho sano en edad reproductiva toda la noche para su apareo, por la mañana se realizó diagnóstico de apareo por frotis vaginal y a los 12 días pos coito se realizó palpación abdominal para diagnóstico de gestación (Figura 7).

Los animales fueron mantenidos desde el inicio del estudio y hasta los 19 días de gestación, siguiendo los lineamientos de bioética marcados en la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) y al término del estudio los animales fueron eutanasiados con sobredosis de pentobarbital sódico, vía intraperitoneal como lo marca la NOM 062-ZOO-1999.

La concentración de glucosa sanguínea y el peso corporal se determinó (una vez por semana) a partir de la cuarta y hasta las 16 semanas de edad. Las cuantificaciones de las concentraciones de colesterol y triacilglicéridos en sangre se realizaron una vez por mes a partir de la cuarta semana hasta la semana 16. La prueba de tolerancia a la glucosa y concentración de hemoglobina glicada se realizaron a las 16 semanas de edad.

La glucosa, el colesterol y los triacilglicéridos se cuantificaron con un equipo Accutrend® de Roche. La hemoglobina glicada se evaluó con el equipo para medición instantánea A1CNow+ de Bayer®. La curva de tolerancia a la glucosa se realizó mediante la administración oral (con sonda esofágica) de 3 g de dextrosa/kg de peso en 3 mL de agua; previa medición de los niveles basales de glucosa sanguínea. Posterior a la administración de la dextrosa, se realizaron mediciones de las concentraciones de glucosa sanguínea, cada 30 minutos, hasta 240 minutos.

Durante la gestación se realizaron mediciones de peso, glucosa, colesterol y triacilglicéridos cada 4 días. Para la realización de las pruebas se mantuvo a los animales en ayuno durante 8 horas y las mediciones se realizaron a las 06:00 PM.



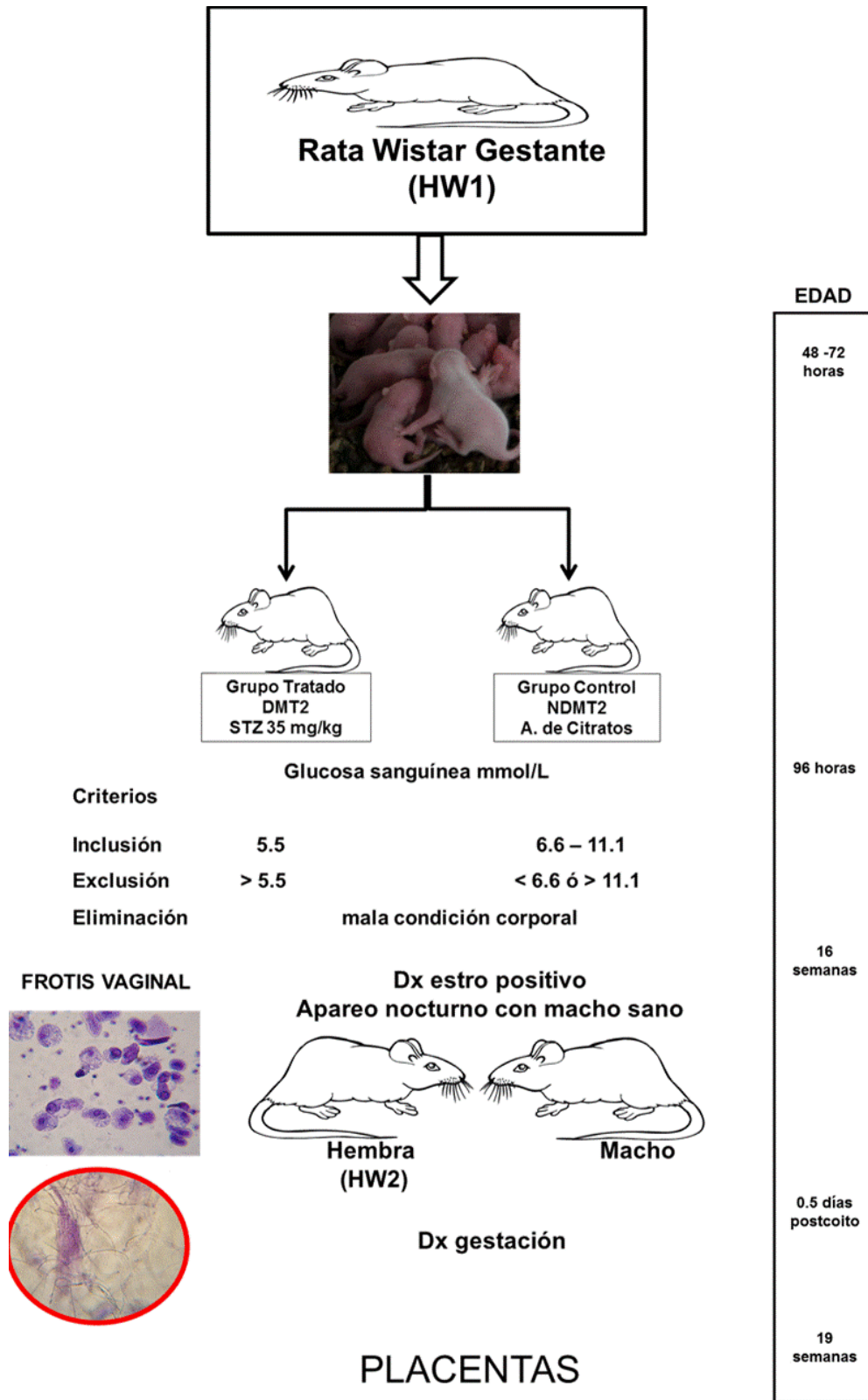
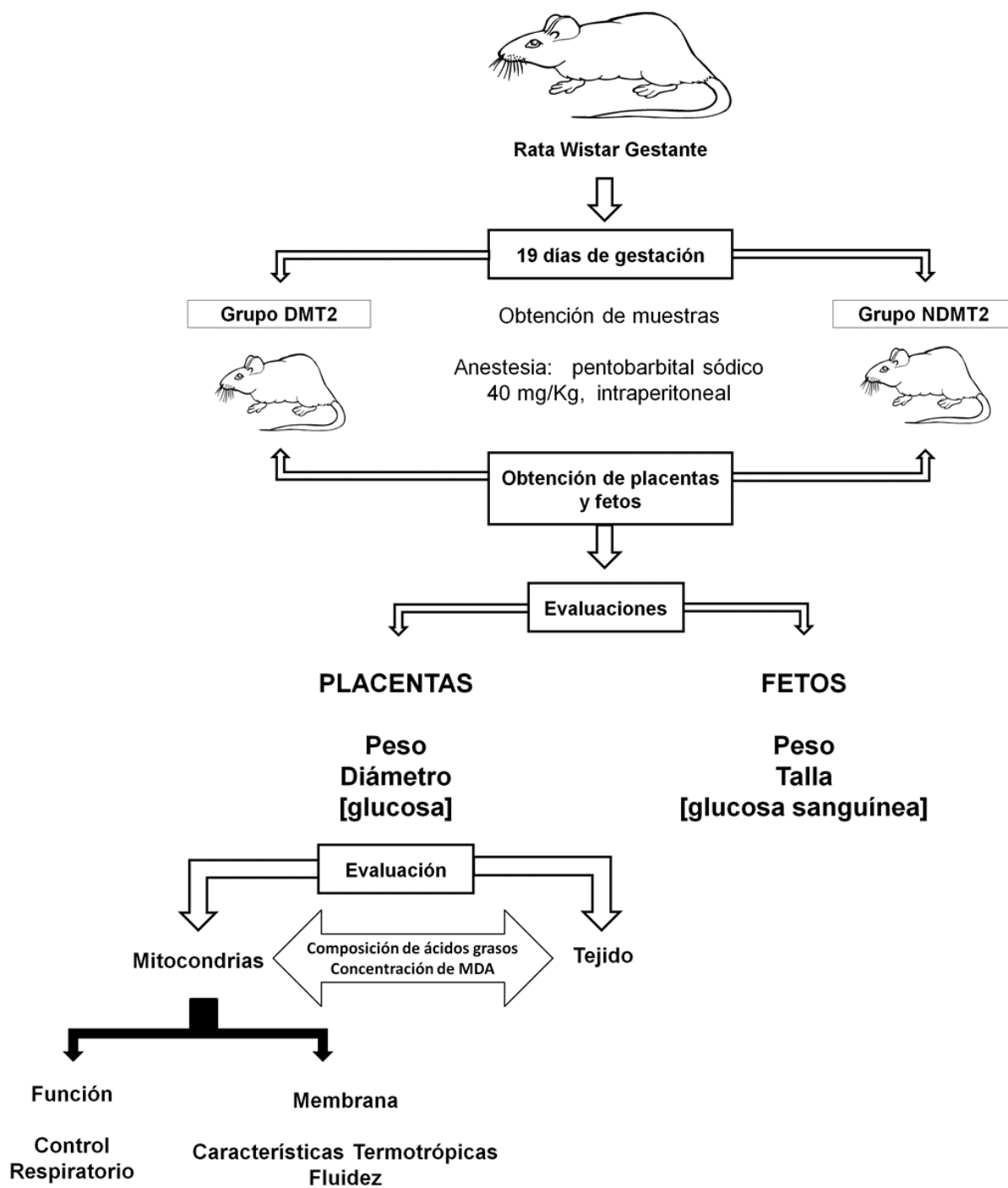


Figura 6. Diseño del experimento Fase I



**Figura 7. Diseño del experimento Fase II**

### ***Obtención de muestras***

Los animales fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/Kg de peso, vía intraperitoneal. Se realizó una incisión profunda en línea media abdominal, se extrajo el útero completo y se colocó en solución salina fisiológica para su lavado. Posteriormente se cortó longitudinalmente para dejar expuestos los *conceptus*, los cuales se disecaron del endometrio cuidadosamente por tensión de los tejidos. Las placentas se separaron del resto de las membranas fetales con tijeras y se lavaron nuevamente en solución fisiológica. La madre se sacrificó con sobredosis de pentobarbital sódico vía intracardiaca.

### ***Metodología para aislamiento de mitocondrias de tejido placentario***

Se homogenizó el tejido placentario en medio H (10 mL por gramo de tejido), el cual contiene 0.07 M de sacarosa, 0.21 M de manitol, 20 mM de HEPES, albúmina bovina libre de ácidos grasos al 0.05 %, con un pH final de 7.4. La obtención de las mitocondrias se hizo por gradiente mediante centrifugación del homogenado (Anexo 1).

### ***Control Respiratorio***

La velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial se determinó utilizando un electrodo de Clark, adosado a una cámara de incubación de 1.4 mL que contenía medio de respiración (Anexo 3) y cerrada con una tapa de vidrio esmerilada, en un baño termostatzado de circulación y con agitación constante.

La concentración de mitocondrias utilizada se calculó de acuerdo al Anexo 4.

Se registró consumo de oxígeno en un polarógrafo conectado al electrodo de Clark. La respiración mitocondrial se evaluó en los estados 3 (alto contenido de ADP y sustrato) y 4 (bajo contenido de ADP y alto de sustrato) para calcular el control respiratorio (Velocidad en estado 3/estado 4).

## ***Análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases (CG)***

### ***Extracción de lípidos*** (método de Folch *et al.*, 1957)

Se tomó 1 g de tejido (placenta) y se homogeniza en 19 mL de la mezcla cloroformo-metanol (2:1 v/v). Posteriormente se filtró en papel desengrasado, una vez filtrado se le agregaron 20% de agua bidestilada. Se mezcló y se centrifugó a 2000 rpm durante 2 min. Se retiró la fase superior mientras que la fase inferior se lavó 3 veces con una mezcla de cloroformo-metanol-agua (3:48:47). Finalmente se recuperó la fase lipídica y se colecta en viales de vidrio con capacidad de 20 mL. El solvente que contiene a los lípidos se evaporó con nitrógeno y los lípidos fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***Transesterificación de ácidos grasos*** (Morrison y Smith, 1964)

Los lípidos se resuspendieron en 1 mL de cloroformo-metanol (2:1 v/v), se tomaron 30  $\mu\text{l}$  de esta solución en viales de 4 mL. Se evaporaron los solventes con gas nitrógeno. Posteriormente se agregó 500  $\mu\text{l}$  de trifluoruro de boro al 14% en metanol y se puso en atmósfera de nitrógeno. Los viales se colocaron en baño maría a  $92^{\circ}\text{C}$  (punto de ebullición en la Cd. de México), dejándolos hervir durante 30 min. Al cabo de este tiempo, se atemperaron y se agregó 1000  $\mu\text{l}$  de hexano HPLC y 500  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada, se agitó fuertemente y se colectó la fase hexánica que contiene los metil ésteres. Finalmente se evaporó la muestra con gas nitrógeno y se almacenó protegida de la luz a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### ***Análisis por cromatografía de gases***

Los reactivos y solventes utilizados para este análisis fueron grado HPLC. Se resuspendieron los metil ésteres de ácidos grasos con 100  $\mu\text{l}$  de hexano HPLC y se inyectó 1  $\mu\text{l}$  en el cromatógrafo de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin Elmer controlado por computadora, equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar omegawax de Supelco de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y grosor de 0.25 mm. La flama se mantuvo con hidrógeno y aire, y como gas de arrastre se utilizó nitrógeno de alta pureza. El programa utilizado fue diseñado de la siguiente forma: inicio a  $180^{\circ}\text{C}$  por 5 min, con una rampa de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta  $240^{\circ}\text{C}$  es mantenido durante

18 minutos, para un tiempo total de 35 min. El flujo de nitrógeno para la columna fue de 14 mL/min. La identidad de los ácidos grasos se obtuvo por comparación de los tiempos de retención de metil ésteres estándares. Se integró el área de cada uno de los picos detectados para obtener las proporciones molares porcentuales.

### ***Determinación de Malondialdehído (MDA) por método de TBARS***

La determinación de la concentración de malondialdehído se realizó mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (Cow et al. 1984). Para la determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, a 1 mL de solución de mitocondrias se añadió 2 mL de solución de KCl 1,15% (pH 7,4). La solución se mezcló con una solución de dodecil sulfato de sodio a 0.4%, ácido acético al 7,5% de ajustado a pH 3.5 con NaOH, y una solución de ácido tiobarbitúrico. Al 0.3%. Se añadió a la mezcla de ensayo hidroxitolueno butilado (0.01%) para evitar la auto-oxidación de la muestra. La mezcla se calentó a 100 ° C durante 60 minutos. Después de enfriar la mezcla, se añadió 5 mL de una solución de n-butanol: piridina (15:1, vol / vol) en agua destilada, se centrifugó a 1600g durante 10 minutos. Se separó la fase de butanol con centrifugación ligera durante 5 minutos y se leyó en un espectrómetro a 535 nm. El resultado se expresó en nmoles de malondialdehído por miligramo de proteína mitocondrial.

### ***Medición de la fluorescencia del dipirenilpropano (DPiP) en mitocondrias de placenta***

A 500 µl de una solución de membranas mitocondriales en buffer de fosfatos se le adicionó el volumen apropiado de DPiP 89 mM en etanol y se sónico en baño ultrasónico a temperatura ambiente durante 1 minuto. Las membranas fueron incubadas en cuarto frío con agitación continua durante 24 horas. A continuación las membranas fueron diluidas en un volumen final de 3 mL de un tampón de fosfatos y sonicadas en baño durante 1 minuto. La concentración final de DPiP fue 0.15 mM y con una relación molar de fluoróforo/fosfolípido no menor de 1:2500. La fluorescencia del DPiP incorporado en las membranas fue medida en un espectrófluorómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS55. El fluoróforo fue excitado a 329 nm y las intensidades de fluorescencia de monómero y excímero se leyeron a 379 y 480 nm respectivamente. Antes de leer un valor fluorescente las muestras se estabilizaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La corrección de

la dispersión de la luz se aplicó a todos los valores de fluorescencia de las membranas sin DPiP.

***Determinación de proteína total por el método de Schacterle y Pollack (1973) modificado por Pugsley y Schnaitman (1978)***

Las muestras de membranas (de menos de 10 µL) se resuspendieron en 2.0 mL de solución acuosa de SDS al 5%, se agitó vigorosamente y se dejó en incubación a temperatura ambiente de 10 a 15 min, para permitir la solubilización de las membranas. Transcurrido este tiempo, se adicionó 1.0 mL del reactivo alcalino (solución de NaOH 2%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%, KNaC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O 0.1% CuSO<sub>4</sub> 0.078%) y finalmente 0.25 mL del reactivo de Fenol Folinciocalteau 2 N (Sigma). El desarrollo de color de esta reacción se llevó a cabo por incubación de las muestras a 56-57 °C por 5 min en baño María. Se midió la absorbancia de las muestras a 650 nm en un espectrofotómetro Utrospec 3300 Amersham.

Simultáneamente al procesamiento de las muestras se desarrolló una curva de calibración de seroalbúmina bovina en el rango de 0 a 40 µg a intervalos de 5 µg, para la cual se emplean los mismos reactivos y procedimientos que para las muestras de las membranas.

***Análisis Histológico de las placentas***

El tejido placentario se cortó en fragmentos de 1 x 1 cm y 3 mm de espesor, y se fijó en formol al 10%; luego se deshidrató empleando alcohol etílico en diferentes concentraciones, se aclaró con xilol y se incluyó en parafina, y se realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo de rotación. La parafina se eliminó con xilol, el tejido se rehidrató con soluciones decrecientes de alcohol etílico, para su posterior tinción con hematoxilina-eosina. La observación de los cortes se realizó con el microscopio óptico (Anexo 4).

### *Técnica histológica para microscopía electrónica de transmisión*

Las muestras obtenidas fueron lavadas con PBS, posteriormente se realizó perfusión de la placenta a través del cordón umbilical con solución de glutaraldehído al 4% en buffer de cocadilato de sodio, se realizaron cortes de 1mm, seguido por fijación del tejido con tetróxido de osmio, con ácido tánico, deshidratación de la muestra e inclusión en resina epoxi. Se obtuvieron secciones de 200 Å a 0,1 µm en ultramicrotomo de avance muy lento y cuchillas de vidrio.

### *Análisis estadístico*

Se realizó análisis de varianza con prueba de Tukey para diferencia de medias completamente aleatorizado, con 5 repeticiones por tratamiento, se tomó como unidad experimental a la hembra gestante, para los parámetros concentración de glucosa sanguínea, triglicéridos, colesterol y hemoglobina glicada; así como curva de tolerancia a la glucosa y curva de crecimiento y a la placenta para las determinaciones de composición de ácidos grasos, TBARS, fluidez y parámetros fisicoquímicos de las mitocondrias. Las pruebas fueron corridas en el programa estadístico JMP 7. Se realizó correlación de Pearson entre las variables.

## ***Resultados***

---

---

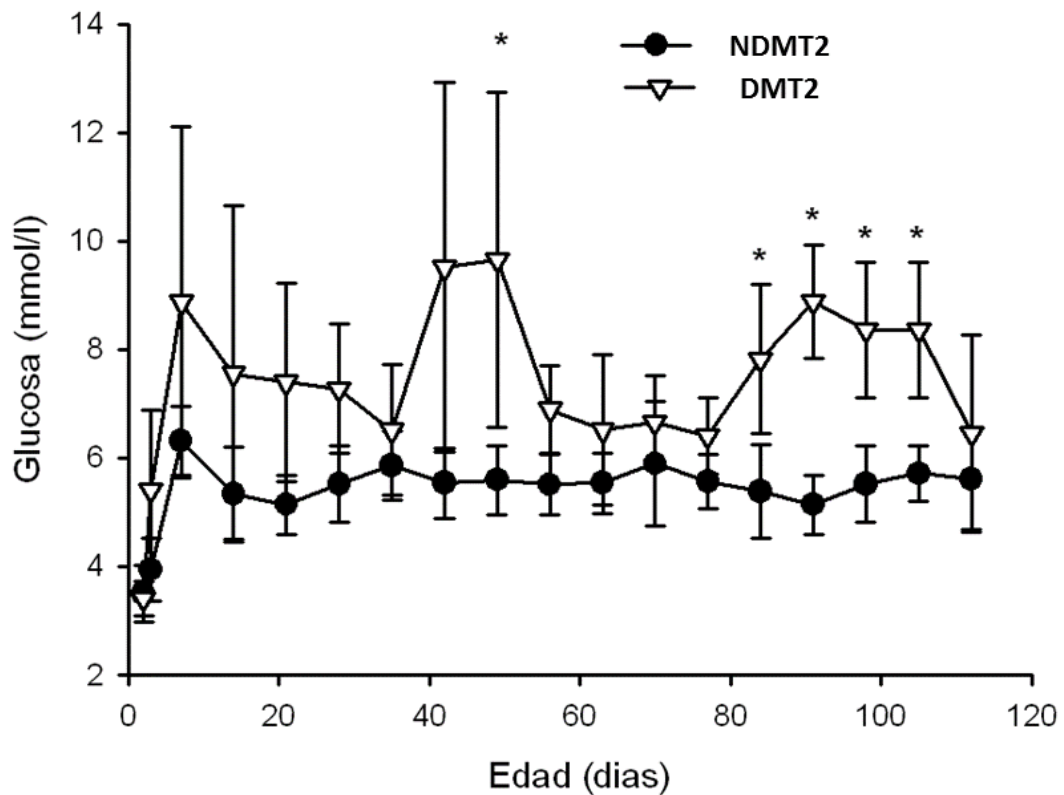
### **Desarrollo del modelo experimental**

Para la realización del presente estudio se desarrolló un modelo de Diabetes Mellitus Tipo 2 en ratas hembras. Se partió de los datos encontrados en la literatura de modelos experimentales desarrollados en machos. Los animales del grupo tratado (denominados como DMT2) fueron inducidos a Diabetes Mellitus Tipo 2 mediante la administración vía intraperitoneal de una dosis única de STZ de 135 mg/kg de peso en un volumen de 50  $\mu$ L de amortiguador de citratos, entre las 48 y 72 horas de edad, con la finalidad de causar toxicidad de las células  $\beta$  del páncreas e hiperglucemia. Se tuvo como grupo control animales a los que sólo se les administró 50  $\mu$ L del amortiguador de citratos (denominados como NDMT2). Se tomaron como parámetros indicativos de alteraciones en el metabolismo de la glucosa la concentración de ésta en sangre a través del tiempo, los valores de colesterol, triacilglicéridos y hemoglobina glicada, así como curva de tolerancia a la glucosa.

### ***Concentración de glucosa a través del tiempo***

En la Figura 8 se observa que la concentración de glucosa sanguínea promedio en neonatos de rata a las 48 horas de edad es de 61 mg/dL, en ambos grupos. Los datos obtenidos muestran un incremento de 260 % en la concentración de glucosa 24 horas después de la administración intraperitoneal de la STZ en los animales DMT2 ( $159 \pm 58.3$  mg/dL), mostrando un intervalo de valores de 84 a 357 mg/dL; en los animales NDMT2 también se observa un incremento de 180 % ( $113.9 \pm 11.04$  mg/dL) y un intervalo de valores de 97 a 120 mg/dL, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos con una  $p < 0.003$ .





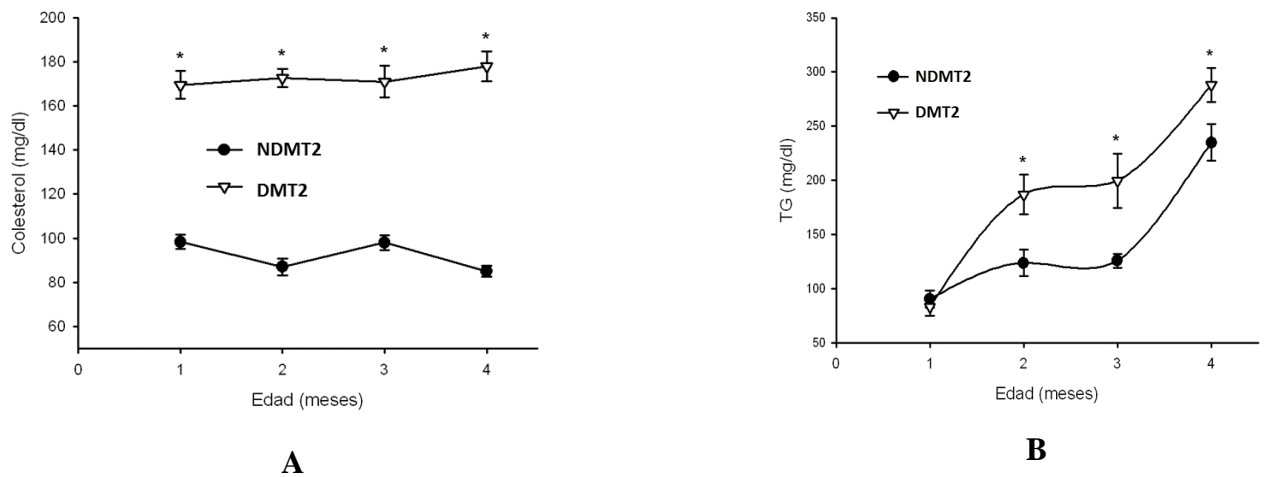
**Figura 8. Comportamiento Tiempo/tratamiento de la concentración de Glucosa sanguínea (mmol/L) en ratas inducidas a Diabetes Mellitus Tipo 2 (STZ 135 mg/kg) y su control no inducido. \*  $p < 0.003$ ,  $n=10$**

Durante el periodo experimental se observa que la concentración de glucosa a lo largo del tiempo en animales NDMT2 es uniforme con concentraciones  $< 5.27$  mmol/L en el 100 % de los muestreos; pero en los animales DMT2 existe una gran variabilidad presentando concentraciones de  $> 6.9$  mmol/L en ocho ocasiones (50% del total) de los 16 muestreos, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.003$ ) entre tiempo-tratamiento, ver Figura 8.

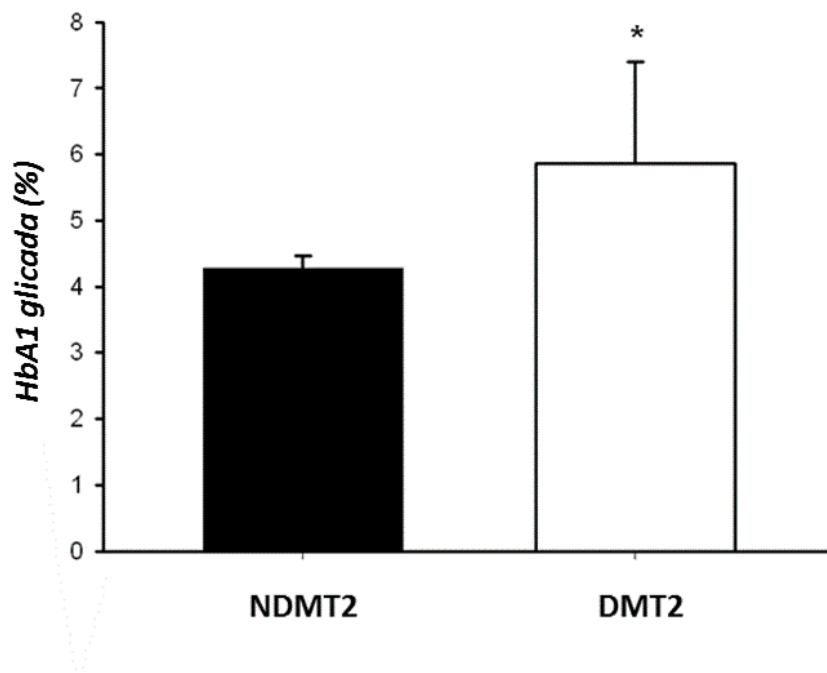
La administración de una dosis de STZ de 135 mg/kg de peso vía intraperitoneal en ratas Wistar hembras a las 48 - 72 horas de edad, genera glicemias sanguíneas de entre 8.32 y 15.54 mmol/L, teniendo un promedio muestral a lo largo del tiempo de  $7.82 \pm 1.45$  mmol/L. La dispersión de los valores obtenidos es consistente con el desarrollo de un modelo de Diabetes de Tipo 2 (Figura 8).

### *Concentración de Colesterol, triacilglicéridos y hemoglobina glicada.*

La concentración de colesterol entre el primer y cuarto mes de edad en los animales del grupo testigo (entre 85 y 98 mg/dL) fue 50% menor que en los inducidos a diabetes (entre 169 y 178 mg/dL), existiendo diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). (Figura 9A). En la figura 9B se presentan los resultados de la concentración de triacilglicéridos. Se puede observar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre grupos en el primer mes de vida ( $83.2 \pm 8.2$  mg/dL en testigos vs.  $90.3 \pm 7.7$  mg/dL en hembras inducidas). A partir del segundo mes de edad existe una tendencia a incrementar la concentración en ambos grupos, donde siempre es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) la concentración de triacilglicéridos en las ratas inducidas ( $123.8 \pm 12.1$ ,  $125.8 \pm 6.5$  y  $235 \pm 17$  mg/dL a 2, 3 y 4 meses respectivamente en el grupo testigo y de  $187 \pm 18.6$ ,  $199.8 \pm 25$  y  $288 \pm 15.8$  mg/dL a 2, 3 y 4 meses en el grupo inducido). En el presente estudio a los 4 meses se observaron concentraciones de hemoglobina glicada de 4.3 % en los animales testigo y de 5.4 % en animales inducidos a Diabetes Tipo 2, con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 10).



**Figura 9. Concentración de colesterol (A), triacilglicéridos (B) en ratas DMT2 y NDMT2. \*  $p < 0.05$ . n=10**



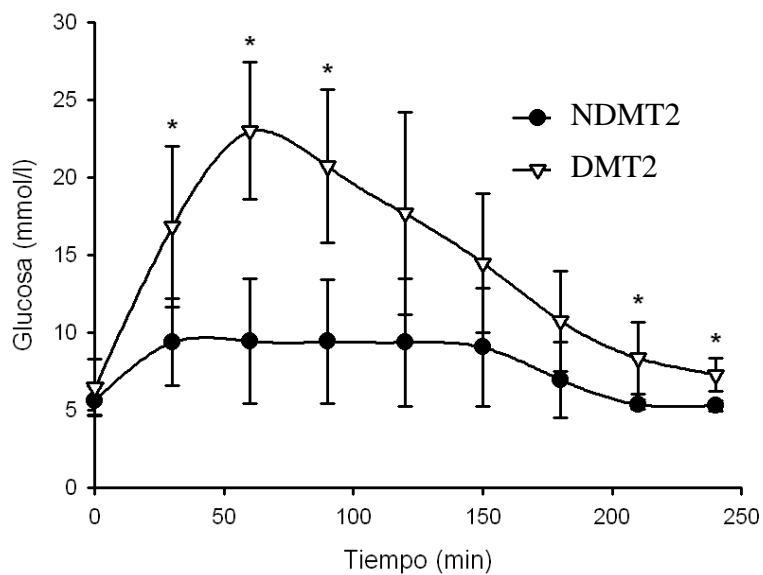
**Figura 10. Concentración de hemoglobina glicada en ratas DMT2 y NDMT2. \*  $p < 0.05$ .  $n=10$**

### ***Curva de tolerancia a la glucosa***

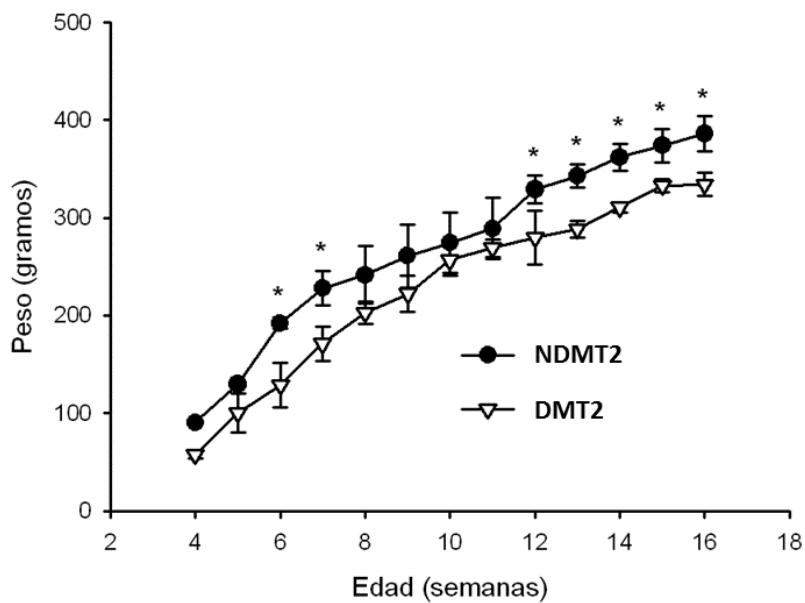
La curva de tolerancia a la glucosa es una prueba diagnóstica que mide la capacidad para metabolizar la glucosa; en el presente estudio se realizó en hembras de 16 semanas de edad mediante la administración de glucosa a dosis de 3 g/kg de peso disuelta en 3 mL de agua de beber administrados a través de sonda gástrica en dosis única (Lavigne et al., 2000). En la curva de tolerancia a la glucosa, el grupo NDMT2 mostró una concentración de 5.1 mmol/L al inicio de la prueba, llegó a valores máximos (9.7 mmol/L) a la media hora después de la descarga oral de dextrosa y regresó a niveles basales a los 60 minutos. Los animales inducidos a Diabetes alcanzaron concentraciones pico de 19.3 mmol/L a los 60 minutos y un retorno a 7.4 mmol/L hasta los 240 minutos, sin alcanzar el valor inicial de 6.6 mmol/L, como se observa en la Figura 11.

### ***Ganancia de peso***

En la Figura 12 se presentan las curvas de crecimiento del grupo inducido a diabetes y su testigo. Se puede observar que el peso de las ratas testigo ( $386 \pm 18$  g) es mayor que el de las ratas inducidas a DMT2 ( $334.4 \pm 12$  g) a las 16 semanas de edad. La ganancia diaria de peso de los animales DMT2 durante el estudio es menor que la del grupo testigo, encontrando que en el 60 % de los momentos estudiados existió diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ )



**Figura 11. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas DMT2 y NDMT2. \* p < 0.05, n=10**



**Figura 12. Ganancia de peso en ratas DMT2 y NDMT2. \* p < 0.05, n=10**

## Modelo de Diabetes Mellitus Tipo 2 en ratas durante la gestación

Durante la gestación la concentración de glucosa en ratas NDMT2 se mantuvo dentro de los parámetros normales (5.6 mmol/L), mientras que en los animales DMT2 la concentración de este valor siempre estuvo por arriba de los 6.5 mmol/L (Figura 13).

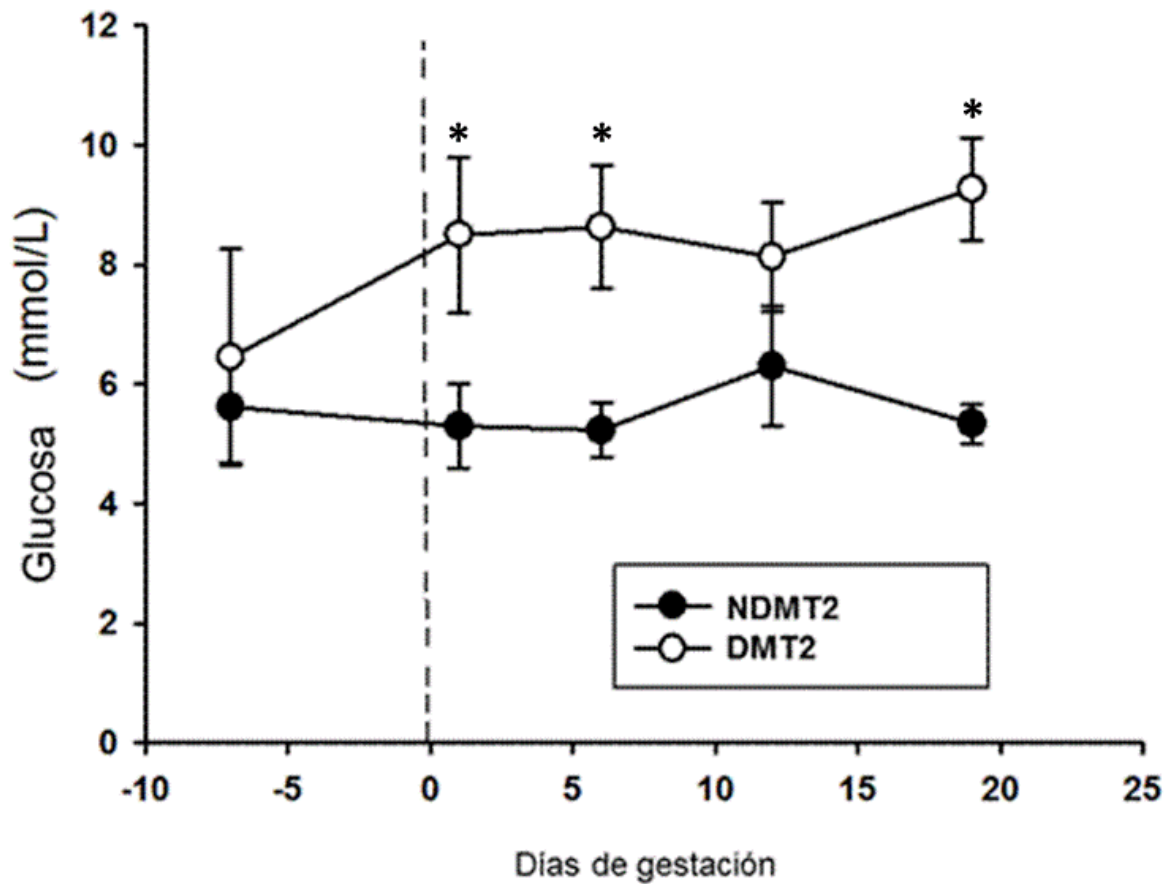


Figura 13. Concentración de glucosa sanguínea en ratas DMT2 y NDMT2 durante la gestación. \*  $p < 0.05$ .  $n=10$

## **Características morfométricas de fetos de ratas dmt2 y ndmt2 a los 19 días de gestación**

Se realizaron mediciones de los parámetros morfométricos de fetos de ratas DMT2 (n=7) y NDMT2 (n=7). El análisis de los datos muestra que existe diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.003$  entre grupos para las variables de número de fetos por camada, peso de los productos y sus placentas, diámetro de la placenta y concentración de glucosa fetal a los 19 días de gestación (Tabla 3).

El promedio de fetos por camada de las hembras diabéticas fue de  $12 \pm 1.6$ , mientras que los valores encontrados en el grupo de hembras normales fue de  $16 \pm 1.6$ , con una diferencia de 25% menos en las camadas diabéticas (Tabla 3).

Inmediatamente después de extraer a los fetos del útero se les determinó la concentración de glucosa sanguínea con equipo Accutrend. La obtención de la muestra fue mediante el corte de la punta de la cola de los animales. Los resultados muestran que existe una mayor concentración de glucosa sanguínea en los animales del grupo NDMT2 ( $53.7 \pm 7.6$  mg/dL) con una diferencia estadística significativa entre grupos. Tabla 3.

Se midió el peso de fetos de ratas diabéticas tipo 2 y su control con una báscula digital. Los fetos de ratas diabéticas (n=84) pesan en promedio  $2.1 \pm 0.3$  g, 24 % más que los normales (n= 113) que tuvieron un peso promedio de  $1.7 \pm 0.17$  g. La placenta de los fetos de ratas diabéticas tiene un peso promedio de  $0.7 \pm 0.1$  g, 40 % por arriba del promedio observado en placentas de animales normales  $0.5 \pm 0.03$  g (Tabla 3).

**Tabla 3. Parámetros morfológicos de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación, así como concentración de glucosa en sangre fetal.**

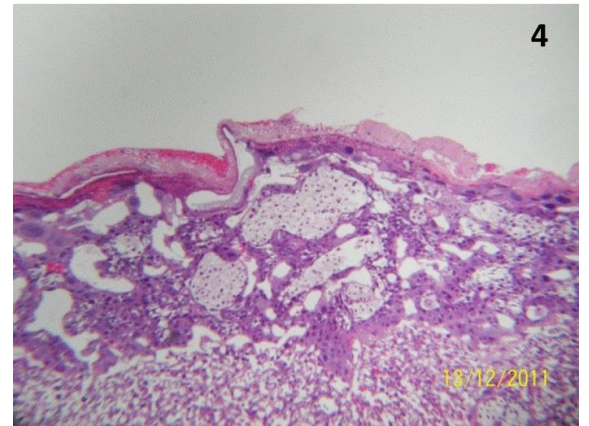
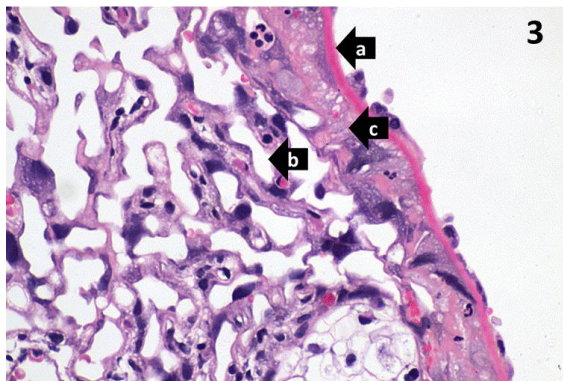
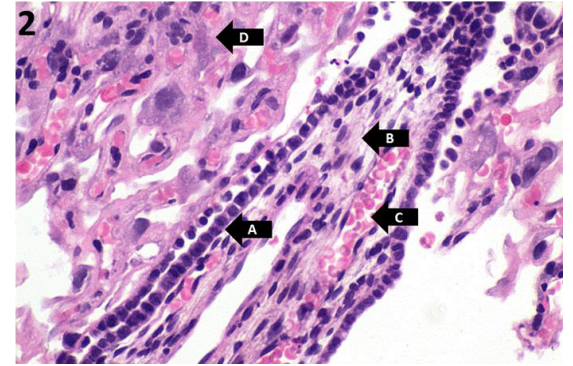
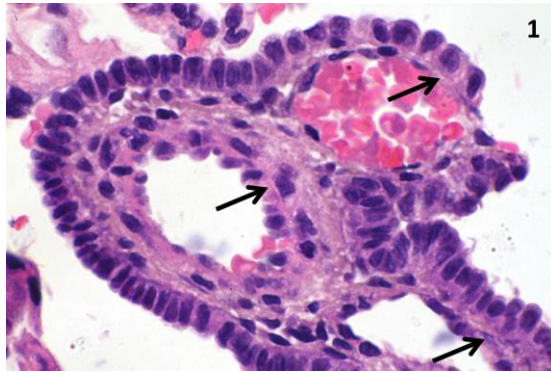
Parámetro medido	GRUPO	
	NDMT2 (n=113)	DMT2 (n=84)
Concentración de glucosa fetal (mg/dL)	2.98 ± 0.42	2.24 ± 0.5*
Número de fetos por camada	16 ± 1.6	12 ± 1.6*
Peso de los fetos (g)	1.7 ± 0.17	2.1 ± 0.3*
Peso de la placenta (g)	0.5 ± 0.03	0.7 ± 0.1*
Diámetro de la placenta (cm)	1.63 ± 0.05	1.44 ± 0.05*

Valores promedio ± DS, \* p < 0.003, n=10



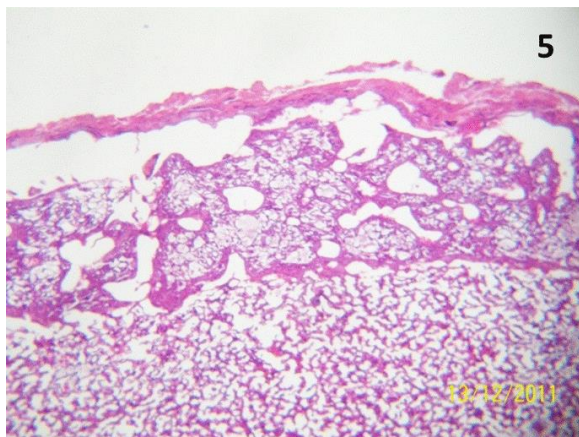
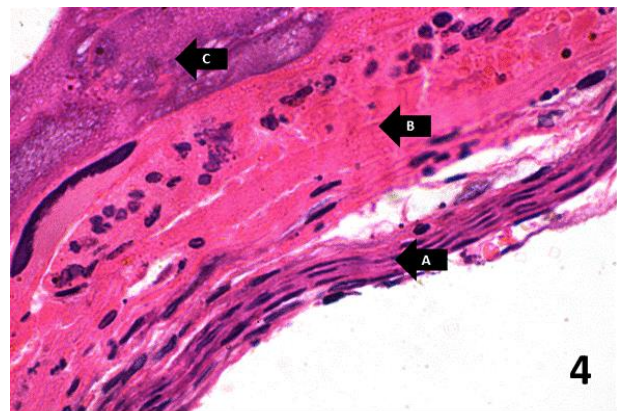
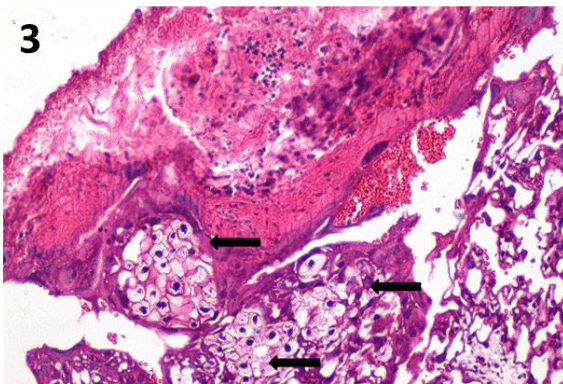
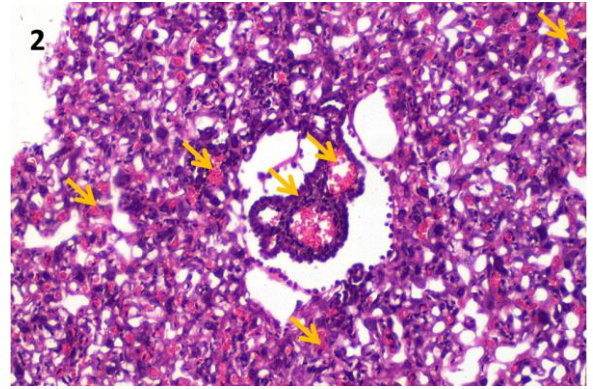
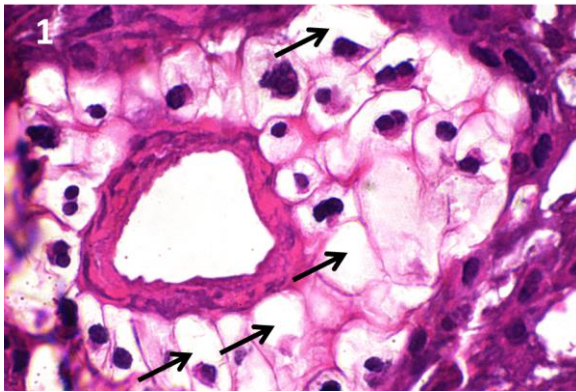
## **Histología de la placenta**

Se evaluó el tejido de la placenta de 6 ratas DMT2 y 6 NDMT2, a los 19 días de gestación (ambos grupos). En el grupo NDMT2 se encontró buena distribución de tejido conjuntivo, adecuado desarrollo de las vellosidades coriónicas con abundantes nodos sincitiales y células del citotrofoblasto, sin cambios en la organización celular en las placentas (Figura 14). En los cortes de placenta de animales DMT2 se observó alteraciones en la arquitectura celular como pérdida de la continuidad del epitelio, falta de continuidad en las áreas del sincitiotrofoblasto, así como pocas células del citotrofoblasto, además pocos nodos sincitiales, degeneración hidrópica, pobre desarrollo de las vellosidades coriales (característico en placentas inmaduras), degeneración quística, inmadurez, células fantasma (Figura 15).



**Figura 14. Corte histológico de placenta de rata NDMT2 a los 19 dpc. Técnica HE.**

**1) Nudo sincitial con vaso sanguíneo fetal con zona laberíntica bien definida (flecha) 40X. 2) A; sincitiotrofoblasto, B; citotrofoblasto, C; vaso sanguíneo fetal y D; decidua, 20X. 3) Vellosidades terminales: a; corión, b; placa coriónica, c; trofoblasto 20X. 4) Se observa buena distribución de las vellosidades coriónicas 5X.**



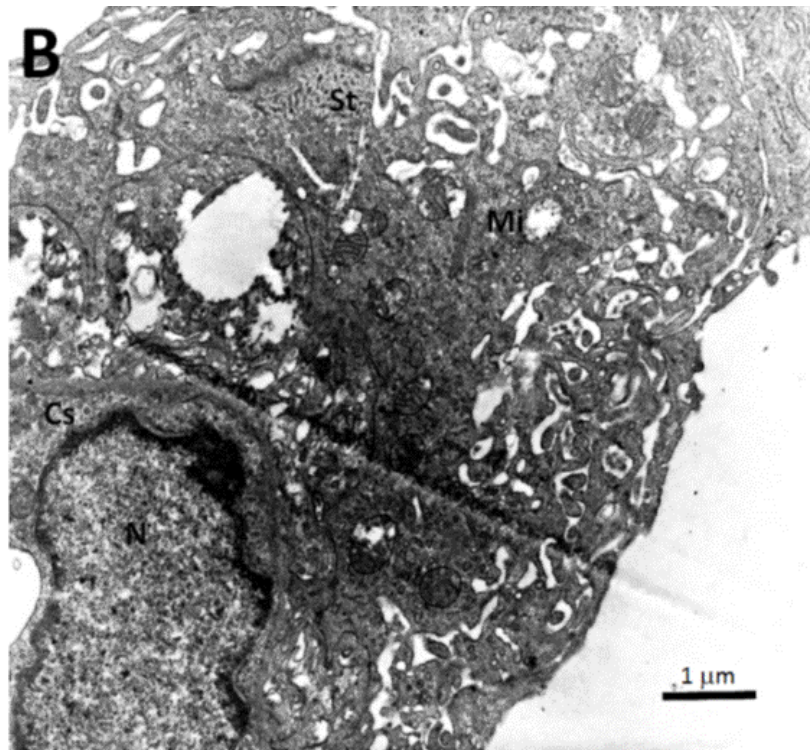
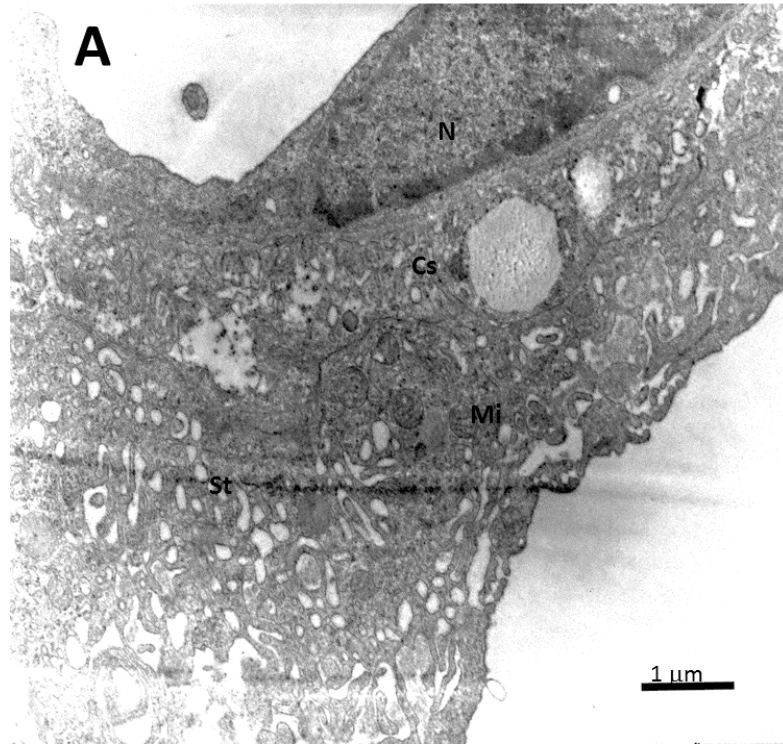
**Figura 15. Corte histológico de placenta de rata NDMT2 a los 19 dpc. Técnica HE.**

**1) Vaso sanguíneo fetal con engrosamiento del endotelio y degeneración hidrópica de las células del citotrofoblasto (flecha), 40X . 2) microangiopatía del trofoblasto (flechas), 5X. 3) Trofoblasto inmaduro con ausencia de vasos sanguíneos (flecha). 4) Zona corioalantoidea y placa corial engrosadas, con abundante fibrina y fibras de colágena. 5) Degeneración hidrópica del corión.**

## **Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Las mitocondrias en las células de placenta de ratas NDMT2 a los 19 días de gestación exhiben una morfología normal: forma esférica o alargada, matriz electrodensa, de tamaño pequeño y regular, con crestas definidas y amplias, y distribuidas alrededor del núcleo (Figura 16A).

Las mitocondrias de células de placenta de rata diabética son considerablemente más grandes (degeneración hidrópica), con matriz menos electrodensa y crestas aplanadas. En algunas de ellas se puede apreciar interrupción de la continuidad de la membrana (disrupción) (Figura 16B). Hay un mayor número de mitocondrias comparada con el grupo NDMT2 y la distribución de las mismas es en una zona más amplia, aunque permanecen alrededor del núcleo, conservando el patrón de distribución del grupo NDMT2.



*Figura 16. Placenta de rata con 19 días de gestación, (A) NDMT2 y (B) DMT2. Microscopía Electrónica de Transmisión. 6000 X. La barra equivale a una micra. St; sincitiotrofoblasto, Cs; citotrofoblasto, N; núcleo celular, Mi; mitocondrias. La barra equivale a un micrómetro.*

## **Composición de ácidos grasos en tejido de placenta**

En la tabla 4 se puede observar que la proporción de ácidos grasos saturados en tejido de placenta es 24.8% mayor en los animales DMT2, con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.003$ ; mientras que la proporción de ácidos grasos insaturados es 36.5% menor con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.003$ .

Al analizar los ácidos grasos saturados, en el tejido de la placenta, en forma individual encontramos que la concentración del mirístico se incrementa en un 40 %, la del palmítico en un 23.7 % y la del esteárico en un 24.4 % en los animales DMT2, existiendo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ . Para el caso de los ácidos grasos insaturados se encontró que existe un incremento del 16.6 % en el palmítico, 22.2 % en el oleico y 50 % en el EPA; mientras que en el caso del linoleico, araquidónico y DHA disminuye en un 29.3, 80.6, 106.6 % respectivamente, con diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ .

**Tabla 4. Composición de ácidos grasos (mol %) en placenta de ratas DMT2 Y NDMT2 a con 19 días de gestación.**

	NDMT2			DMT2			
Mirístico	0.5	±	0.1	0.7	±	0.2	*
Palmítico	23.2	±	1.02	28.7	±	7.8	*
Palmitoleico	1.2	±	0.11	1.4	±	0.1	
Estearico	21.3	±	1.8	26.5	±	3.8	*
Oleico	9.5	±	0.32	11.6	±	1.5	*
Linoleico	17.2	±	0.7	13.3	±	3.2	*
Araquidónico	16.8	±	1.21	9.3	±	5.8	*
EPA	0.4	±	0.17	0.6	±	0.4	
DHA	3.1	±	0.42	1.5	±	0.7	*
NI	6.9	±	1.76	5.8	±	2.5	
saturados	45	±	1.27	56.2	±	10.1	*
insaturados	48.2	±	1.13	35.3	±	9.3	*
I/S	1.1	±	0.04	0.7	±	0.3	*

PA: Ácido eicosapentaenoico, DHA: Docosahexaenoico, NI: no identificados, I/S Insaturados/saturados. \*  $p < 0.003$ .  $n=10$

## **Composición de ácidos grasos en mitocondrias de placenta**

En la tabla 5 se puede observar que la concentración de ácidos grasos saturados en mitocondrias de placenta es 7.9 % menor en los animales DMT2, con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.003$ ; mientras que la concentración de ácidos grasos insaturados es mayor en un 5.16 % con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ .

Al analizar los ácidos grasos saturados, en mitocondrias de la placenta, en forma individual encontramos que la concentración del mirístico se incrementa en un 40 %, la del palmítico en un 23.7 % y la del esteárico en un 24.4 % en los animales DMT2, existiendo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ . Para el caso de los ácidos grasos insaturados se encontró que existe un incremento del 16.7 % en el palmítico, 22.2 % en el oleico y 50 % en el EPA; mientras que en el caso del linoleico, araquidónico y DHA disminuyen en un 22.7, 44.6, 51.6 % respectivamente, con diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  (Anexo 5).

Para el caso de los ácidos grasos saturados, en tejido de la placenta, en forma individual encontramos que la concentración del mirístico disminuye en un 8 %, la del palmítico en un 2.7 % y la del esteárico en un 12.4 % en los animales DMT2, existiendo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ . Para el caso de los ácidos grasos insaturados se encontró que existe una disminución de 2.7 % en el caso del palmitoleico y de 7.2 % para el linoleico y un incremento del 22.2 % en el oleico, y 50 % en el EPA; mientras que en el caso del linoleico, araquidónico y DHA disminuyen en un 22.7, 44.6, 51.6 % respectivamente, con diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  (Anexo 6).



**Tabla 5. Composición de ácidos grasos (mol %) en mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 con 19 días de gestación.**

	NDMT2			DMT2		
Mirístico	0.31	±	0.013	0.29	±	0.010 *
Palmítico	23.84	±	0.110	23.17	±	0.320 *
Palmitoleico	1.59	±	0.011	1.55	±	0.143
Estearico	21.36	±	0.834	18.71	±	0.993 *
Oleico	9.02	±	0.015	11.75	±	0.530 *
Linoleico	18.39	±	0.231	17.07	±	0.492 *
Linoleico	18.39	±	0.231	17.07	±	0.492 *
γ-Linoleico	0.13	±	0.003	0.09	±	0.004 *
Araquidónico	16.60	±	0.089	17.25	±	0.400 *
EPA	0.05	±	0.006	0.13	±	0.010 *
DHA	2.36	±	0.011	2.82	±	0.148 *
NI	5.88	±	0.321	6.67	±	0.681
saturados	45.51	±	0.711	42.17	±	1.335
insaturados	48.57	±	0.323	51.08	±	0.754
I/S	1.07	±	0.024	1.21	±	0.057 *

EPA: Ácido eicosapentaenoico, DHA: Docosahexaenoico, NI: no identificados, I/S Insaturados/saturados. \*  $p < 0.05$ .  $n=10$

## Cuantificación de proteína y colesterol en mitocondrias de placenta

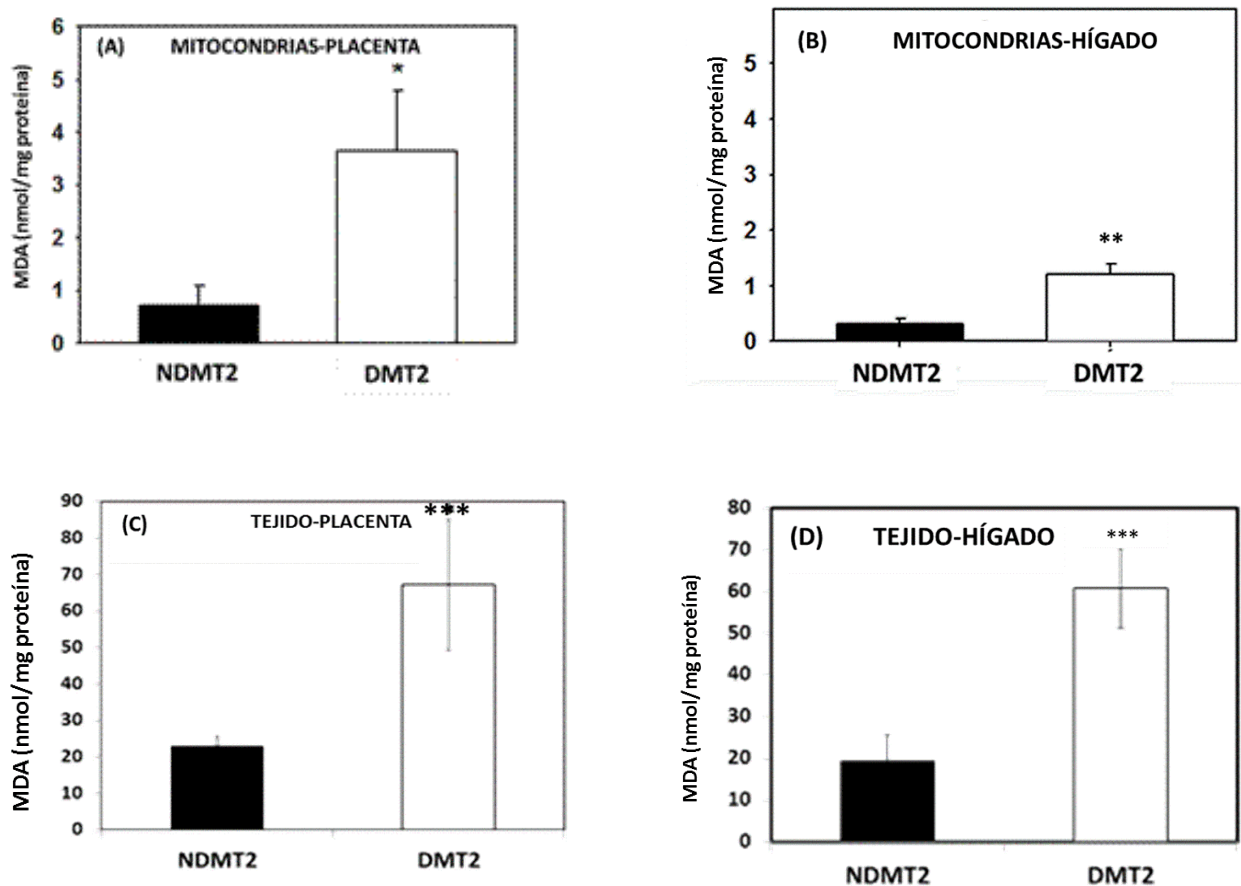
Se cuantificó la proteína y el colesterol en mitocondrias de placenta encontrando que la concentración de proteína es 9.4% menor en animales DMT2, mientras que la concentración de colesterol es 44.4% mayor, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los casos.

*Tabla 6. Concentración de proteína y colesterol en mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 con 19 días de gestación.*

	NDMT2			DMT2		
<b>Proteína (mg/mL)</b>	16.1	±	7.3	14.6	±	6.8
<b>Colesterol (mg/mL)</b>	0.6	±	0.2	0.9	±	0.4

## Lipoperoxidación medida por el método de tbars (mda nmol/mg de proteína)

En la figura 17 se puede observar que la producción de MDA en mitocondrias de placenta es 5.1 veces mayor en los animales DMT2 (Figura 17A), con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.001$ . También se aprecia el incremento de 3.7 veces en la concentración del MDA en el hígado de éstos animales (Figura 17B), con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.002$ . En el caso del tejido completo se puede ver que la concentración de MDA es mayor 2.9 (Figura 17C) veces en placenta y 3.5 (Figura 17D) veces en hígado en los animales DMT2, con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.004$ .



**Figura 17. Concentración de MDA (nmol/mg proteína) en mitocondrias: A; placenta y B; hígado, y tejido C; placenta y D; hígado, de ratas a los 19 días de gestación. \*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.002$  y \*\*\*  $p < 0.004$ .  $n=10$**

## Características termotrópicas y fluidez de las membranas mitocondriales de ratas a los 19 días de gestación.

Se estudiaron algunos de los parámetros físico-químicos de mitocondrias de placenta de ratas encontrando que la energía de activación es menor tanto en la fase gel ( $18.2 \pm 4.0$  VS  $13.9 \pm 1.3$  kcal/mol) como en la cristal líquido ( $12.0 \pm 0.4$  VS  $12.0 \pm 0.4$  kcal/mol) en los animales DMT2, con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  (Tabla 7). En el caso de la temperatura de transición de fases (Figura 18) se encontró que en los animales del grupo NDMT2 se presenta a los  $37.8 \pm 1.6$  °C, mientras que en el grupo de los animales DMT2 se lleva a cabo a una menor temperatura ( $30 \pm 2.0$  °C), con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ .

En la Figura 18 se puede apreciar que existe una correlación positiva entre el cociente de la fluidez ( $I_e/I_m$ ) de la membrana mitocondrial (medida con el monitor DPiP) y la temperatura, encontrando que a mayor temperatura mayor fluidez en ambos tratamientos. También se puede observar que la fluidez es siempre mayor en el grupo de los animales DMT2 aunque sólo se evidencia diferencia estadísticamente significativa de los 20 a los 40 °C, con una  $p < 0.05$ .

En la gráfica de Arrhenius (Figura 19) se puede apreciar que existen varios puntos de inflexión, lo que sugiere que la transición de fases tiene lugar en varias etapas.

**Tabla 7. Características termotrópicas de las membranas mitocondriales de ratas a los 19 días de gestación.**

<i>Grupo</i>	<i>Energía de Activación</i> (kcal/mol)		<i>Transición de fases</i> (°C)
	<i>Gel</i>	<i>Cristal-Líquido</i>	
<b>NDMT2</b>	$20.0 \pm 5.0$	$13.9 \pm 1.3$	$37.8 \pm 1.6$
<b>DMT2</b>	$18.2 \pm 4.0^*$	$12.0 \pm 0.4^{**}$	$30.0 \pm 2.0^{***}$

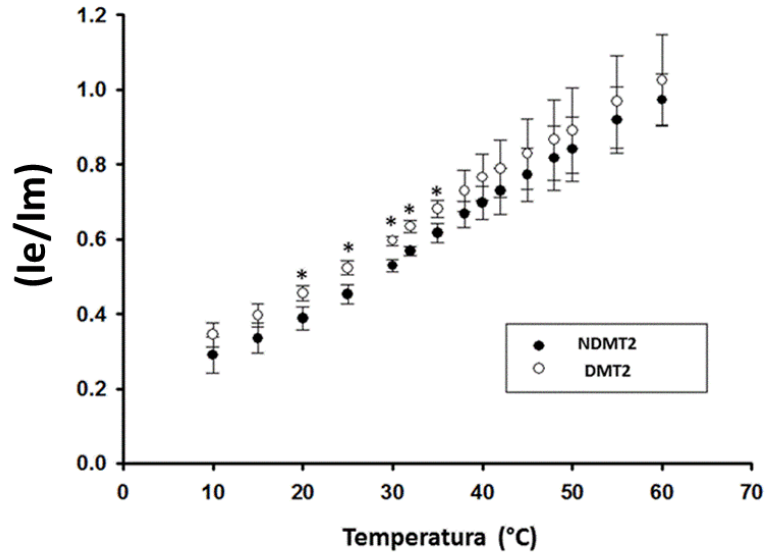


Figura 18. Cociente de emisión excímero/monómero a diferentes temperaturas de mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación. \*  $p < 0.05$ .

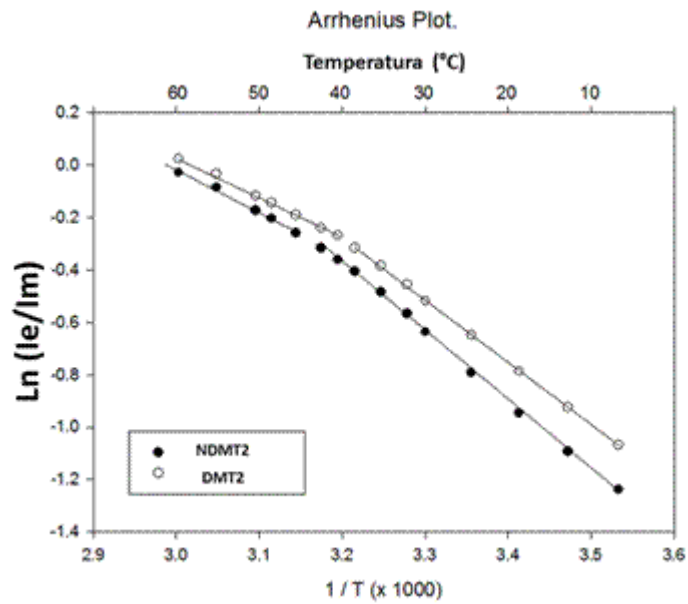
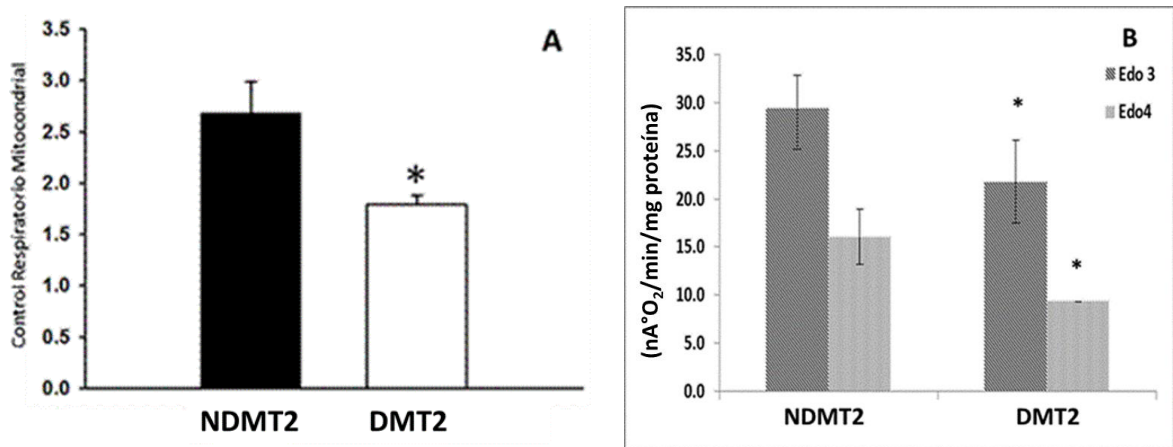


Figura 19. Gráfica de Arrhenius de la fluorescencia del DPiP de mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación. \*  $p < 0.05$ .

## Control respiratorio de mitocondrias de placenta de rata con 19 días de gestación

Se observa una disminución en el control respiratorio de animales DMT2 a los 19 días de gestación de un 16.4 % ( $2.1 \pm 0.6$  CR) con respecto al grupo NDMT2 ( $2.5 \pm 0.6$  CR) figura 20A. A 19 días se observa una disminución en el consumo de oxígeno del 16 % en el grupo diabético ( $21.8 \pm 4.3$  nA°O<sub>2</sub>/min/mg de proteína) con respecto al grupo NDMT2 ( $29.5 \pm 3.3$  nA°O<sub>2</sub>/min/mg de proteína) y de igual forma se observa una disminución en el consumo de oxígeno en el estado 4 del 41.9 % en el grupo diabético ( $9.3 \pm 0$  nA°O<sub>2</sub>/min/mg) grupo diabético y ( $21.8 \pm 4.3$  nA°O<sub>2</sub>/min/mg de proteína) grupo NDMT2 . Existiendo diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos para la variable estado 4  $p < 0.002$ , figura 20B.



*Figura 20. Control respiratorio y utilización de oxígeno en el Edo 3 y Edo 4 (nA°O<sub>2</sub>/min/mg de proteína) de mitocondrias de placenta de ratas DMT2 y NDMT2 a los 19 días de gestación.*

### **Desarrollo del Modelo Experimental**

El incremento en la concentración de glucosa sanguínea en un 260 % (de 61 a 159 mg/dL) en el grupo DMT2 está asociado a la administración de la STZ, la cual actúa específicamente sobre las células beta del páncreas utilizando al transportador de glucosa (GLUT 2) para entrar a la célula, causando daño y muerte de esta por la polirribosilación del DNA y la generación de radicales a través de la vía xantina-oxidasa (Szkudelsky, 2001). En el presente trabajo se utilizó una concentración de STZ de 135 mg/kg de peso corporal, suficiente para disminuir a casi su totalidad las células  $\beta$ -pancreáticas. Sin embargo, en animales neonatos el páncreas tiene la capacidad de regenerar y/o diferenciar parcialmente la población celular, lo que resulta en un animal adulto con hiperglucemias moderadas. Lo anterior ha sido demostrado por Orozco (2008) mediante la utilización de técnicas de inmunohistoquímica que evidencian la disminución de la población de células beta datos que fueron corroborados por la baja concentración de insulina en sangre y episodios de hiperglucemia característicos de DMT2 (ADA, 2011). La dispersión de los datos de las concentraciones de glucosa sanguínea observados en la figura 8, se relaciona con los procesos de homeorresis utilizados para mantener la glicemia en condiciones estables. Sin embargo, la glucotoxicidad y la lipotoxicidad permanentes continúan causando daño lo que lleva nuevamente al aumento de la glucemia. También se observó un incremento de 180% en la concentración de glucosa sanguínea (61 a 113 m/dl) en los animales NDMT2 que puede estar asociada al establecimiento de una normoglicemia la cual se presenta con el tiempo (entre los 0 y 8 días de edad) en ratas de forma normal. Es importante señalar que los neonatos de ratas presentan hipoglicemia la primera semana de vida, por lo que el incremento del valor de glucosa sanguínea en el grupo NDMT2 no está asociado a factores estresantes y no deben ser considerados como hiperglucemia.

Los animales inducidos a DMT2 en este estudio presentaron, por más de ocho ocasiones, glicemias por arriba de los parámetros marcados como normales (5.27 mmol/L), mientras que en los animales del grupo testigo, el 100 % de las ocasiones se mantuvieron por debajo del límite máximo (< 6.9 mmol/L) (Figura 8). El comportamiento

aparentemente errático de la concentración de glucosa sanguínea a través del tiempo en las ratas inducidas a DMT2 con STZ durante el estudio es una respuesta lógica a las necesidades de readaptación metabólica del individuo y los sistemas de contrarregulación hormonal de la glucosa (Fanelli et al, 2003). En pacientes humanos con Diabetes Mellitus Tipo 2 no controlada, son comunes los hallazgos de glicemias que pueden ir de valores tan bajos como 2.77 mmol/L a valores que sobrepasan los 22.2 mmol/L. Esta condición es una de las principales características que indican una mala utilización y/o síntesis de la insulina (Carvajal et al, 2007; Petersen et al, 2004; Zhang et al, 2008), aunque es necesaria la confirmación a través de pruebas como HOMA-IR, concentración de insulina y péptido C en plasma.

La DMT2 se diagnostica por la presencia de los signos y síntomas clásicos y elevada glucemia; por altas concentraciones plasmáticas de glucosa en ayunas o por la elevación de la glucemia dos horas después de la administración de 75 g de glucosa vía oral. La mayoría de los diagnósticos se establecen en pacientes con sintomatología, la ADA especifica que en estos individuos sólo se necesita una glicemia mayor a 6.1 mmol/L en ayuno de 8 horas, o de 11.1 mmol/L en forma aleatoria, para su confirmación y la OMS da como positivos a aquellos pacientes que en forma repetida dan como resultado una concentración de glucosa sanguínea mayor a 6.1 mmol/L en ayuno de 8 horas (ADA, 2011).

La literatura señala que la concentración de glucosa normal en ratas se encuentra entre 2.77 y 5.27 mmol/L (Portha et al., 1979; Kodama et al., 1993; Maloff y Boyd, 1986). El grupo NDMT2 mostró concentraciones promedio de  $5.1 \pm 0.88$  mmol/L, mientras que los animales inducidos a DMT2 alcanzaron concentraciones promedio de  $7.2 \pm 2$  mmol/L, con una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). La concentración de glucosa sanguínea en los animales con DMT2 es 52.9% más alta que la reportada en la literatura (5.27 mmol/L) (Portha et al., 1979; Kodama et al., 1993; Maloff y Boyd, 1986). Los valores promedio en ratas con DMT2 reportados por diversos autores van de 6.6 a 19.4 mmol/L, dependiendo el manejo nutricional y estado fisiológico de los animales. En humanos, una concentración de glucosa sanguínea mayor a 6.1 mmol/L es un indicador de la disminución de la sensibilidad del receptor de insulina y se reportan como pacientes pre-diabéticos, a los cuales hay que realizar una prueba de tolerancia a la glucosa



para confirmar o descartar DM2. La administración de una dosis de STZ de 135 mg/kg de peso de corporal vía intraperitoneal en ratas Wistar hembras a los 2 días de edad, genera glicemias de entre 5.4 y 10.6 mmol/L, teniendo un promedio muestral a lo largo del tiempo de  $7.2 \pm 2$  mmol/L, la dispersión de los valores obtenidos es consistente con el desarrollo de un modelo de Diabetes Mellitus Tipo 2 (Figura 8). En pacientes humanos con Diabetes Mellitus Tipo 2 son comunes los hallazgos de glicemias que pueden ir de valores tan bajos como 2.77 mmol/L a valores que sobrepasan los 22.2 mmol/L; esta condición es una de las principales características que indican una mala utilización y/o síntesis de la insulina (Maloff y Boyd, 1986; Flakoll *et al.*, 2003; Degenhardt *et al.*, 2002).

La insulina, además de regular la utilización de la glucosa, tiene como función la regulación del metabolismo del tejido adiposo (almacenamiento, movilización y utilización de triacilglicéridos). Una de las alteraciones metabólicas observada en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 es el incremento en el metabolismo de los lípidos, reflejada en la elevación de los triacilglicéridos y el colesterol en sangre. Los datos registrados en la literatura para la concentración de estas moléculas en suero de ratas normales es de 70 mg/dL para colesterol; esta concentración es cercana al que se observó en los animales del grupo testigo ( $85 \pm 3$  mg/dL). Los animales inducidos a Diabetes Mellitus Tipo 2 muestran valores incrementados ( $178 \pm 5.5$  mg/dL), Figura 9. Los valores de triacilglicéridos observados en el presente estudio fueron de  $267 \pm 54$  mg/dL en el grupo testigo y de  $290 \pm 54$  mg/dL en el grupo inducido (Figura 9B), observándose una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  en ambas variables. Este fenómeno puede estar relacionado con las alteraciones en la actividad y efectos de la insulina, entre los que se encuentran promover el almacenamiento de grasa e inhibir el catabolismo de ésta. Cuando las concentraciones de insulina sanguínea son bajas, se incrementa la actividad de la lipasa, encargada de promover la lipólisis, aumentando el transporte y oxidación de los lípidos (Maloff, 1986).

La hemoglobina es una proteína que se encuentra en los glóbulos rojos de la sangre y sirve para transportar y proveer de oxígeno a las células y tejidos. Esta proteína puede unirse a la glucosa sanguínea mediante la reacción de Schiff para formar la hemoglobina glicada, la cual pierde función. La glicación se da en forma espontánea en un cierto porcentaje del total de la hemoglobina en todos los individuos y es proporcional al tiempo y a la concentración de glucosa sanguínea, por lo que en fases de hiperglucemia crónica el

porcentaje se ve incrementado. La determinación de esta molécula es una de las pruebas que se sugieren para el seguimiento del correcto control de los niveles de glucosa a través del tiempo. En ratas normales se ha observado que la concentración de esta proteína es de 4.6 % en animales normales, de 5.3 % en animales DMT2 con tratamiento, y de 6 % en animales DMT2 Tipo 1 sin tratamiento. En el presente estudio se observaron concentraciones de 4.3 % en animales testigo y de 5.9 % en animales inducidos a Diabetes Tipo 2, Figura 10 (Fass y Carter, 1980).

La curva de tolerancia a la glucosa es una prueba diagnóstica que mide la capacidad para metabolizar la glucosa; se sugiere en pacientes que cursan con valores alterados de glucosa sanguínea y consiste en la administración oral de una dosis de 75 g de glucosa en ayuno. Los criterios utilizados para definir la condición de anormalidad en una prueba de tolerancia a la glucosa oral se basa en el nivel o pico elevado alcanzado por la glicemia a los 60 minutos, y la falta de retorno al nivel normal dos horas después de la ingestión, siendo esto último lo más importante. En ratas administradas con una dosis de 2 g de glucosa/kg peso vía intraperitoneal, se registran concentraciones pico de 7.32 mmol/L a los 30 minutos, con un regreso al nivel basal (4.9 mmol/L) a los 120 minutos en animales normales con valor inicial de 4.4 mmol/L (Bhandari et al., 2008; Unger y Grundy, 1985; Ramos y Domingo, 1994; Oré et al., 2000). En animales inducidos a Diabetes Mellitus Tipo 2 se reportan concentraciones pico de 27.3 mmol/L a los 30 minutos, con un retorno a niveles iniciales de 12.1 mmol/L a los 180 minutos (Portha et al., 1979; Kodama et al., 1993). Los datos anteriores corresponden a estudios realizados con machos, en el presente estudio realizado con hembras, el grupo testigo muestra una curva parecida a la registrada en la literatura, mientras que los animales inducidos a diabetes alcanzaron concentraciones pico de 27.15 mmol/L a los 60 minutos y un retorno al nivel inicial (7.8 mmol/L) hasta los 240 minutos, como se observa en la Figura 11.

Los valores de insulina y glucosa plasmáticos en ayuno y después de la ingestión de una carga de carbohidratos guardan relación mutua, por esta razón la respuesta de estas hormonas a la prueba de tolerancia a la glucosa pueden pronosticarse con base en los valores respectivos durante el ayuno, habiendo una mayor correlación con la insulina que con la glucosa. De acuerdo con el estado ayuno-ingesta la glucosa y la insulina guardan relación directa entre si; siendo el mejor estado de estimulación el ayuno. El incremento

agudo de insulina disminuye la concentración de glucosa plasmática, mientras que a largo plazo (hiperalimentación o insulinoresistencia hística) disminuye la acción de la hormona alterando la unión de ésta a sus receptores de membrana. La elevada concentración de glucosa sanguínea a largo plazo disminuye la secreción de la hormona glucoinducida, que es una de las manifestaciones del fenómeno de toxicosis por dicho carbohidrato. El resultado global de este sistema homeostático y sus circuitos es que las dos variables (concentración de insulina-glucosa sanguínea) varían siempre en proporción directa y mutua (salvo que disminuya la secreción de insulina), Figura 11 (Maureen, 2003).

Uno de los parámetros afectados en pacientes diabéticos es el peso corporal. La literatura señala que los pacientes, previo al desarrollo de la Diabetes Tipo 2, cursan con síndrome metabólico caracterizado por sobrepeso, intolerancia a la glucosa y alteración del metabolismo de los lípidos; sin embargo ya establecida la enfermedad los pacientes presentan pérdida progresiva de peso corporal (Druker y Pogorelova, 1996). En el presente estudio se puede observar en la figura 12, que el efecto de la diabetes sobre esta variable (pobre ganancia de peso) concuerda con los datos reportados en la literatura donde se han realizado estudios para evaluar el efecto de ciertos fármacos sobre la concentración de la glucosa en sangre y ganancia de peso corporal en ratas. Se debe considerar que en este estudio los animales utilizados se encuentran en la etapa de desarrollo, definiéndose la pobre ganancia de peso como un estado de desnutrición celular, ocasionado por el ineficiente aporte de glucosa, teniendo como resultado el aumento en el catabolismo y un bajo anabolismo (Stumvoll et al., 2005; Muoio y Newgard, 2008).

### **Análisis de los datos morfométricos de fetos de ratas inducidas a Diabetes Tipo 2, y su control no inducidas, a los 19 días de gestación**

La aparición de alteraciones en la morfogénesis y metabolismo de los hijos de hembras diabéticas dependen del grado de deficiencia de la acción de la insulina, grado de descontrol metabólico, de la participación de factores ambientales, del daño progresivo de diversos tejidos y la edad gestacional en el que se desarrolla la diabetes (Polanco et al., 2005). En el presente estudio se observó que en los parámetros morfométricos estudiados existen diferencias significativas entre las crías de los animales DMT2 y su control (Tabla 3). Es importante señalar que la fisiopatología de esta enfermedad está relacionada con la

síntesis de hormonas placentarias (somatotropina, gonadotropina coriónica, prolactina, cortisol y glucagón) las cuales tienen efectos antagonistas a la acción de la insulina, con lo cual aumenta la resistencia a esta hormona y disminuye la tolerancia a la glucosa, de ahí el estado diabetogénico del embarazo (Islas y Revilla, 2004).

Algunos de los cambios morfométricos y fisiológicos de los hijos de madres diabéticas están relacionados con cambios en el páncreas fetal. Se ha registrado que la exposición crónica de las células beta pancreáticas fetales a elevadas concentraciones de glucosa *in vitro* produce maduración temprana de los islotes de Langerhans y secreción de insulina, y la exposición crónica a concentraciones elevadas de glucosa o aminoácidos genera hiperplasia de los islotes fetales. Se cree que cambios similares *in vivo* contribuyen a una mayor secreción de la hormona estimulada por elevadas concentraciones de glucosa. El aumento en la secreción de la insulina fetal puede ocasionar hipoglicemia neonatal, en particular durante el primer día de vida extrauterina y sobrepesos en neonatos (LeRoith D, 2004). Aunque la macrosomía fetal (aumento de talla) y la hipoglicemia neonatal parecen ser el resultado del mismo proceso de sobre-nutrición fetal, los dos fenómenos no necesariamente ocurren juntos en hijos de diabéticas (Sosenko *et al.*, 1982).

La macrosomía ha sido reportada en hijos de pacientes con diabetes Mellitus, y se debe a que los fetos están expuestos a un medio metabólicamente diferente. La elevada concentración sanguínea de glucosa y ácidos grasos libres (FFA) en la madre propicia un aumento en la transferencia de estos al feto. El excesivo transporte de nutrientes de la circulación materna a la fetal acelera la maduración de los islotes de Langerhans en el feto provocando hiperinsulinismo fetal, lo que aumenta el potencial anabólico del feto y al mismo tiempo produce hipoglicemia en el neonato (García-Carrapato, 2003; Knopp *et al.*, 1992). Aunque la glucosa y las proteínas glucosiladas, incluida hemoglobina, se convierten en los parámetros que más claramente reflejan el estado metabólico materno, se ha registrado que la concentración de triacilglicéridos es el mejor parámetro para pronosticar sobrepeso al nacer (Schaefer *et al.*, 2008).

La placenta juega un importante papel en el desarrollo fetal en pacientes con diabetes, ya que en la mayoría de éstas presenta alteraciones estructurales y funcionales. En el presente estudio se observó que las placentas de ratas DMT2 son más pesadas ( $0.7 \pm 0.1$ )

que las de los animales NDMT2 ( $0.5 \pm 0.03$ )  $p > 0.05$ . En la literatura se señala que este fenómeno está asociado al incremento de la concentración de la insulina en pacientes con Diabetes Tipo 1 y el aumento en la síntesis del factor de crecimiento parecido a insulina, relacionado con neovascularización, de las pacientes con diabetes gestacional y tipo 2 (Ong *et al.*, 2004). También se ha reportado que las placentas de madres diabéticas tienen una mayor concentración de glucógeno y aumento en la actividad de la tirosinasa del receptor placentario de insulina lo que aumenta la captación de ésta en la placenta (Polanco *et al.*, 2005). Estudios realizados en ratas sugieren que el flujo sanguíneo placentario está disminuido en animales DMT2, esta disminución es compensada con un aumento en el tamaño de la placenta (Polanco *et al.*, 2005). En humanos se ha sugerido que este aumento en el tamaño y peso de la placenta es un mecanismo compensatorio que protege al feto de padecer hipoxia por disminución en el flujo ya que se aumenta la superficie de intercambio (Nikkels *et al.*, 2003). También se señala que a pesar de la disminución del flujo a través de la placenta en animales DMT2, la transferencia de nutrientes no se ve afectada y el transporte de glucosa es mucho mayor que en los animales del grupo NDMT2 (Paranhos, 1999).

Las complicaciones metabólicas son frecuentes en los hijos de madres diabéticas, siendo la hipoglicemia la más común. En el presente estudio las concentraciones de glucosa sanguínea tanto en fetos de ratas normales ( $53.7 \pm 7.6$  mg/dL) como diabéticas ( $40.4 \pm 9.7$  mg/dL) se encuentra por debajo de las concentraciones de referencia en neonatos (60 mg/dL), por lo que pudiera reportarse como hipoglicemia. La concentración de glucosa sanguínea en el feto depende del continuo aporte de nutrientes a través de la placenta, cuyas concentraciones de glucosa están controladas por el metabolismo materno con una mínima necesidad de regulación endocrina fetal. La hipoglicemia en neonatos ocurre generalmente cuando falla el proceso normal de adaptación metabólica después del nacimiento, hiperinsulinemia y disminución de las reservas de glucosa. Existe una disminución normal en la concentración de glucosa sanguínea en las primeras 3 a 4 horas pos nacimiento, la cual se asocia a un aumento en la concentración sanguínea de glucagón debido a la liberación de catecolaminas que estimulan la gluconeogénesis y lipólisis. La normoglicemia depende de las reservas de glucógeno, de un eficiente metabolismo (glucogenólisis y glucogenogénesis) y de los cambios endocrinos de adaptación (Fernández *et al.*, 2008). Además de lo anterior, un aumento en la secreción de insulina por cambios en el

metabolismo pancreático del feto puede ocasionar hipoglicemia neonatal. Las tasas de prevalencia de hipoglicemia neonatal se incrementan en mujeres con diabetes pregestacional. La hipoglicemia mediada por insulina puede ser el resultado de una menor producción hepática de glucosa en estado basal (Kalhan *et al.*, 1997; Sunebag *et al.*, 1997) y de la utilización excesiva del carbohidrato después de dosis masivas de nutrimentos (Phelps *et al.*, 1981). La inadecuada respuesta en la secreción de glucagón durante la disminución de la concentración de glucosa sanguínea puede incrementar la gravedad de la hipoglicemia en hijos de diabéticas (Hertel *et al.*, 1982).

El hecho de que los parámetros de secreción de insulina fetal y el riesgo de hipoglicemia neonatal están relacionados con las concentraciones sanguíneas de glucosa y aminoácidos en la madre durante la etapa intermedia y tardía del embarazo, apoya la hipótesis de que una excesiva ingesta materna de nutrimentos lleva a hiperinsulinemia fetal e hipoglicemia neonatal. La programación de este proceso puede iniciar en el segundo trimestre de la gestación (Cowett *et al.*, 1983).

### **Histología de la placenta**

Estudios realizados por diversos autores sugieren que los cambios histológicos de la placenta asociados a hiperglucemias pueden estar relacionados con alteraciones en el funcionamiento de la misma y los mecanismos de regulación metabólica intrauterina del feto, también a la muerte fetal, los abortos y la reabsorción embrionaria. Algunas de las alteraciones observadas en placentas de pacientes diabéticas son: eritrocitos nucleados, necrosis fibrinoide, vellosidades inmaduras y corangiosis. Estas anomalías pueden estar asociadas con problemas en el funcionamiento de la placenta (Nikkels *et al.*, 2003).

En el presente estudio se evaluaron placentas de animales inducidos a Diabetes Mellitus Tipo 2 y sus controles, encontrando que a los 14 días de gestación las placentas de ratas diabéticas exhiben alteraciones del tejido como: hiperplasia (núcleos que exhiben gran cantidad de nucléolos) e hipertrofia del sincitiotrofoblasto, reactividad celular, células espongiiformes y degeneración hidrópica. Estas alteraciones han sido asociadas a un incremento en el tamaño y peso de la placenta y la falla en la perfusión de esta. Además de

las alteraciones histológicas antes expuestas también se observó falta de desarrollo en las vellosidades y pérdida de la arquitectura del tejido (Figura 13).

El tamaño de la placenta está en proporción al tamaño del feto, las placentas en diabéticas tienden a ser más grandes. Los infartos en placentas diabéticas son más numerosos que en placentas normales, lo que se refleja en la hipoxia intrauterina de los hijos. El infarto placentario se incrementa no sólo en los casos graves de diabetes, sino también en diabetes moderada y mujeres con principios de diabetes. La hipoxia está asociada a cambios en la arquitectura del tejido placentario como son: un mayor número de nudos sincitiales, engrosamiento de las membranas basales, trofoblasto con microvellosidades aplanadas, ectasia de los capilares y edema del estroma vellositario, además de cambios en los organelos como mitocondrias alargadas, aumento de vesículas pignóticas y dilatación del retículo endoplásmico (Singer *et al.*, 1984).

Se evaluó el tejido de la placenta de 6 ratas DMT2 y 6 NDMT2, a los 19 días de gestación (ambos grupos), encontrando buena distribución de tejido conjuntivo, adecuado desarrollo de las vellosidades coriónicas con abundantes nodos sincitiales y células del citotrofoblasto, sin cambios en la organización celular en las placentas de animales no inducidos (Figura 14). En los cortes de placenta de animales inducidos se observó alteración en la arquitectura celular como pérdida de la continuidad del epitelio, falta de continuidad en las áreas del sincitiotrofoblasto, así como pocas células del citotrofoblasto, además pocos nodos sincitiales, degeneración hidrópica, pobre desarrollo de las vellosidades coriales (característico en placentas inmaduras), degeneración quística, inmadurez, células fantasma (Figura 15).

La unidad feto-placentaria en hembras diabéticas, se ve desafiada por altos niveles de glucosa presentes en el entorno materno, lo que produce múltiples alteraciones estructurales y funcionales que se reflejan en un inadecuado aporte de oxígeno y nutrientes al feto, que conlleva a una producción insuficiente de hormonas placentarias (Stoz *et al.*, 1988).

Las placentas de hembras diabéticas son hiperplasias y se caracterizan por un patrón de inmadurez placentaria. En los estudios histológicos de estas placentas se ha observado

un exceso de células citotrofoblásticas que indican actividad proliferativa, sin acompañarse de un proceso de diferenciación a sincitiotrofoblasto, lo que da origen a vellosidades terciarias inmaduras. Lo anterior es un sistema compensatorio que amplía la superficie de intercambio en la insuficiencia funcional (Stoz et al., 1988), así como el engrosamiento de la membrana basal trofoblástica se asocia a la insuficiencia placentaria, al incremento de colágeno tipo IV y la alta producción de glicaciones (Desoye y Shafrir, 1996)

### **Microscopia electrónica de transmisión de mitocondrias de placenta de ratas diabéticas y su control a los 19 días de gestación**

La forma característica de las mitocondrias en células sanas es de tipo tubular, alargadas y organizadas alrededor del núcleo. En el presente estudio se puede apreciar que la distribución, número y tamaño de las mitocondrias de placenta de ratas diabéticas con 19 días de gestación es diferente a las del grupo NDMT2. Las mitocondrias de los animales DMT2 (Figura 16B) exhiben una morfología anormal ya que su tamaño es considerablemente más grande, la matriz mitocondrial es menos electrodensa, se observa hinchazón, hay un mayor número y la distribución de las mismas es en una zona más amplia; aunque permanecen alrededor del núcleo, conservando el patrón de distribución, comparadas con las del grupo NDMT2 (Figura 16A). En algunas de las mitocondrias de las placentas de animales DMT2 se puede apreciar interrupción de la continuidad de la membrana (disrupción). Estos hallazgos concuerdan con los reportados por diversos autores en células con un aumento en la concentración de EROs en condiciones de hiperglucemia (Zweier y Hassan, 2006; Vendemiale *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1998).

Estudios realizados en embriones de rata de 9 días de gestación cultivados por 48 horas en diferentes concentraciones de glucosa; desde un medio normo glicémico (8 mmol / l de glucosa) hasta un medio hiperglicémico (30 mmol / l de glucosa), con y sin adición de hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante, muestran alteración de la morfología mitocondrial. Las mitocondrias de los embriones sometidos a medios hiperglicémicos se ven alteradas presentando matriz menos electrodensa, disrupción de la membrana y aplanamiento de las crestas. En el estudio se observa que los efectos de la hiperglucemia no se presentan cuando se adiciona el medio con BHT, sugiriendo que las alteraciones de la morfología mitocondrial están asociadas a la producción de EROs (Yang *et al.*, 1998).



La estructura y morfología de la mitocondria están relacionadas con el funcionamiento de esta. Una característica observada frecuentemente en humanos y animales con hiperglucemia es la deformidad de las mitocondrias (las cuales son más pequeñas que en los individuos sanos) presentan hinchazón, y se encuentran condensadas alrededor del núcleo. También se ha sugerido que los cambios en la morfología de las mitocondrias contribuyen a largo plazo a la generación de EROs en condiciones de hiperglucemia (Yang et al., 1998).

Un aumento en la fisión y fusión determina la morfología de las mitocondrias. Se ha observado que el incremento en las especies reactivas de oxígeno en células que se encuentran en condiciones de hiperglucemia, las proteínas implicadas en estos eventos se encuentran alteradas (Yu *et al.*, 2006), el mantenimiento de esta es fundamental para el funcionamiento celular.

Existe fuerte evidencia de que la disfunción mitocondrial es un evento temprano en la degeneración celular. Las mitocondrias son la principal fuente celular de especies reactivas de oxígeno y reguladores clave de la muerte celular. Por otra parte, las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que se dividen, se fusionan y se mueven en la célula para abastecer las demandas energéticas de esta, por lo tanto, el deterioro de cualquiera de estos procesos tendrá repercusiones directas en la viabilidad celular. La Diabetes Mellitus Tipo 2 puede afectar a la dinámica de la mitocondria y el reciclaje de las mitocondrias dañadas a través de la autofagia. La generación de EROs mediada por mitocondrias defectuosas se pueden acumular durante la DMT2 y contribuir a la progresión de la enfermedad (Fernández *et al.*, 2010).

Yang *et al.*, (1995) observaron que en el tejido de embriones de 9 días cultivados en condiciones de hiperglucemia por 48 horas la ultra-estructura de la mitocondria muestra hinchazón, con pérdida o aplanamiento de las crestas, disminución de la densidad de la matriz y disrupción. Los autores señalan que los cambios en la morfología mitocondrial observados están asociados a las malformaciones de embriones de madres diabéticas, lo que apoya la participación de la mitocondria en el proceso de teratogénesis.

En el presente trabajo se hace evidente que la generación de radicales libres en placenta de ratas diabéticas tipo 2, está asociada a los cambios en la composición de ácidos grasos; tanto en el tejido como en las mitocondrias, a los cambios morfológicos de la célula y al aumento en el consumo de oxígeno de las mitocondrias. Estas alteraciones han sido reportadas por diversos autores en otros tejidos, y las han asociado a los procesos de teratogénesis y disfunción placentaria (Sen y Mukherjea, 1998; Saldeen *et al.*, 2002; Jawerbaum y González, 2005)

En un estudio realizado en células de hígado de ratas se encontró que la morfología de las mitocondrias está alterada y presenta fragmentación y disrupción de la membrana. Estas alteraciones están asociadas a la sobreproducción de los EROs asociado a un incremento en el consumo de oxígeno por el desacoplamiento de la cadena de transporte (Yu *et al.*, 2006). Los autores sugieren que un aumento en la condensación de las mitocondrias y una disminución del tamaño se asocia a una disminución en el metabolismo.

Uno de los principales problemas en embarazos diabéticos es la disfunción placentaria, que ocasiona una disminución en el aporte de nutrientes al feto (mal nutrición) y adecuaciones en el metabolismo del mismo, que originan alteraciones metabólicas del adulto dando como resultado la presentación de enfermedades como síndrome metabólico y diabetes (Barker, 1992).

### **Composición de ácidos grasos en tejido de placenta**

No se encontró información en la literatura acerca de la composición de ácidos grasos en tejido de placenta de rata; sin embargo, estudios realizados por Drukker y Pogoreloya (1996), en placenta humana, sugieren que el palmítico, esteárico y oleico son los más abundantes, además de que existe una estrecha relación entre el aumento en la concentración del ácido araquidónico y los valores de las hormonas placentarias progesterona y lactógeno placentario. Estos autores también mencionan una disminución en la concentración del ácido linoleico (Drukker y Pogoreloya, 1996).

Los datos obtenidos en tejido de placenta muestran que existe una mayor concentración de los ácidos grasos saturados ( $56.2 \pm 10.1$  mol%) en los animales DMT2

comparados con el grupo NDMT2 ( $45.0 \pm 1.27$  mol%). Para el caso de los ácidos grasos insaturados el grupo de animales NDMT2 ( $48.2 \pm 1.13$  mol%) tiene una mayor concentración que el grupo diabético ( $35.3 \pm 9.3$  mol%).

Al analizar los ácidos grasos saturados, en el tejido de la placenta, en forma individual encontramos que la concentración del mirístico se incrementa en un 40 %, la del palmítico en un 23.7 % y la del esteárico en un 24.4 % en los animales DMT2, existiendo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ . Para el caso de los ácidos grasos insaturados se encontró que existe un incremento del 16.6 % en el palmítico, 22.2 % en el oleico y 50 % en el EPA; mientras que en el caso del linoleico, araquidónico y DHA disminuyen en un 29.3, 80.6, 106.6 % respectivamente, con diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ .

La concentración de ácidos grasos de cadena larga en placenta depende de la concentración de éstos en la sangre materna, ya que este tejido aparentemente no posee la actividad  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasa para convertir ácidos grasos esenciales en ácidos grasos poliinsaturados (Crawfor, 1993; Campbell *et al.*, 1996), es por eso que existe un mecanismo preferencial para síntesis y transferencia de estos ácidos grasos hacia la placenta y el feto. La disminución en la concentración de estos ácidos en los animales DMT2 podría estar asociada a las adaptaciones metabólicas de la madre debidas a la hiperglucemia. Estudios realizados en mujeres con diabetes Mellitus gestacional muestran una disminución de la concentración del ácido linoleico, araquidónico y el DHA en placenta y sangre fetal, estos ácidos son transferidos en forma selectiva desde la circulación materna al feto (Bitsanis *et al.*, 2006), nuestros resultados concuerdan con esto, ya que en animales DMT2 encontramos una disminución del 29.3 % en la concentración del ácido linoleico, del 80.6 % en el ácido araquidónico y del 106.6 % en el DHA. Percy *et al.*, (1991), señalan que la composición de ácidos grasos de los triglicéridos de las membranas (de la serie del ácido linoleico y el linoléico) es significativamente menor en placentas de madres diabéticas. Estos cambios en los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana de placenta pueden afectar el transporte de nutrientes importantes para el desarrollo y crecimiento fetal.

La disminución de la concentración del AA y DHA en placenta se ha asociado al aumento en la concentración de los eicosanoides en algunas patologías relacionadas con el incremento en la concentración de radicales libres como: preclampsia y diabetes (Sen y Mukherjea, 1998).

Es importante mencionar que la disminución en la concentración del ácido araquidónico (AA), precursor de los eicosanoides, en los animales DMT2, puede estar relacionada con un incremento en su metabolismo. Kuhn *et al.*, 1990, evaluaron el metabolismo del AA en placentas provenientes de embarazos normales y con diabetes Mellitus insulino-dependiente, encontrando que la concentración de eicosanoides se incrementa de 3 a 6 veces en el tejido placentario de madres diabéticas. Por otro lado Jawerbaum (1998) encontró que la transferencia de los metabolitos del AA de la circulación fetal a la materna está aumentada al doble.

En un modelo de ratas inducidas a diabetes con STZ fue evaluado el estrés oxidante en tejidos de placenta durante el embarazo tardío, así como la relación entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el ácido araquidónico (AA), encontrando que los niveles de lipoperóxidos se incrementan en los animales DMT2 a lo largo de la gestación. También reportan una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), una mayor conversión de AA a prostaciclina y una mayor relación tromboxanos B2/6-ceto prostaglandina con la prostaglandina F1 $\alpha$ . La producción de radicales de superóxido (hipoxantina/xantina oxidasa o peróxido de hidrógeno añadido al medio de incubación) disminuye la concentración de 6-ceto-PGF1 $\alpha$  en ambos grupos, mientras que aumenta la producción de PGF2 $\alpha$ , PGE2 y los niveles de tromboxano B2, y PGF2 $\alpha$  y TXB2. Estos efectos se reducen en ratas suplementadas con 400 mg día 1 de  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) en la dieta (White *et al.*, 2002). Nuestros datos muestran que el MDA incrementa en la placenta 2.9 veces en DMT2 respecto al grupo NDMT2 en tejido y 5.1 veces en mitocondrias (Figura 17 A y C).

Se han descrito cambios en la producción de PGE2, PGF2 $\alpha$ , TXB2 en placenta durante la diabetes, estos cambios se correlacionan con las altas concentraciones de glucosa en plasma materno. En tejido de placenta de animales normales incubado con

concentraciones elevadas de glucosa se observa un incremento en la producción de TXB<sub>2</sub> y una disminución del 6-ceto PGF<sub>1</sub>α. Sin embargo las altas concentraciones de glucosa no modifican la producción de prostanoïdes en la placenta de animales DMT2. El incremento en la concentración de prostanoïdes inducida por la administración de glucosa en animales normales es similares a los valores observados en tejido de animales con diabetes tipo 2 (Jawerbaum *et al.*, 1998).

Por otro lado no se encontraron datos en la literatura acerca de la concentración de ácidos grasos en mitocondrias de placenta. En los datos obtenidos en este estudio se observa una disminución del 7.9 % en los ácidos grasos saturados en mitocondrias de animales DMT2, un incremento de 5.16 % en los insaturados. Los ácidos grasos insaturados palmitoleico (2.58 %) y linoleico (7.7 %) disminuyen en mitocondria y hay un incremento del oleico (30.2 %).

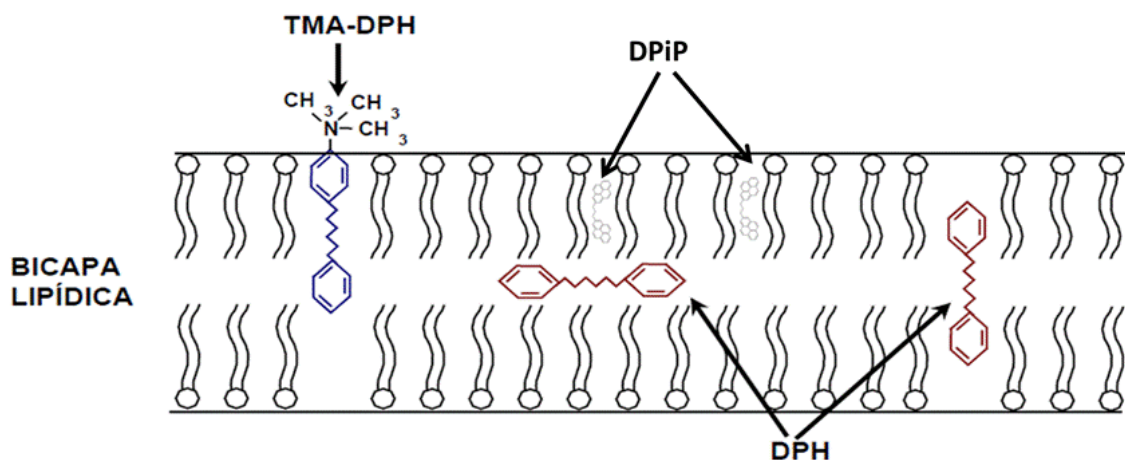
Al analizar los ácidos grasos poliinsaturados observamos que mientras que el AA (44. %) y el DHA (51.6 %) disminuye en tejido, en las mitocondrias se incrementa en 63.9 y 19.4 % respectivamente; mientras que el EPA se incrementan tanto en tejido (50 %) como en mitocondrias (137.7 %) en animales DMT2. Getz *et al.*, (1962) analizó la composición de ácidos grasos en mitocondrias de hígado de rata encontrando que existe una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados siendo el AA el más abundante (16.2 %), mientras que el EPA (0.2 %) y el DHA (4.9 %) son menos abundantes, lo que sugiere que las bajas concentraciones de estos ácidos grasos en la placenta se debe a la síntesis de eicosanoïdes en ésta etapa de la gestación, para el inicio del parto.

### **Lipoperoxidación y fluidez de la membrana mitocondrial en placenta**

La peroxidación de lípidos es un proceso autooxidante iniciado por radicales libres, a los que son susceptibles los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas celulares. Este proceso está caracterizado por la formación de lipoperóxidos e hidroperóxidos inestables capaces de propagar la reacción. Asociado a la lipoperoxidación varios autores han encontrado un aumento en la rigidez de los fosfolípidos de la membrana (Aust *et al.*, 1985; Tappel, 1973). La importancia fisiológica de las modificaciones en las

propiedades físicas de las membranas reside en su relación con numerosas funciones celulares, incluyendo la actividad de enzimas asociadas a ésta, transporte de solutos y procesos de transducción de señales inducidos por hormonas. Ambos, la peroxidación lipídica y la fluidez de membrana han sido implicados en procesos de enfermedad y la fisiología del envejecimiento (García *et al.*, 1997).

El estudio de la fluidez de la membrana en diversos tipos celulares para demostrar la influencia de la peroxidación de los lípidos sobre ésta en asociación con diversas patologías y los procesos de envejecimiento apunta a que existe un diferente comportamiento entre la membrana plasmática y la mitocondrial. Diversos autores refieren una disminución de la fluidez de la membrana plasmática asociada a lipoperoxidación en patologías como diabetes e hipertensión, en tejido extraído de distintos órganos. Sin embargo, hay que señalar que los monitores de fluorescencia (sondas) empleados en las distintas metodologías son uno de los principales factores a considerar al momento de hacer comparaciones, ya que estas sondas se localizan o insertan en distintos sitios de las membranas de acuerdo a su carácter lipofílico, por lo que el nivel de inserción varía con cada uno de ellos. El microambiente que percibe un monitor, puede ser diferente al que percibe otro (Figura 21). Se ha hecho uso de monitores con diferente grado de inserción en las membranas tales como el 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y el 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH). El primero se localiza preferencialmente en el núcleo de la bicapa, mientras que el último está más cercano a la región polar. La temperatura de medición afecta en mayor medida a la anisotropía del DPH que a la del TMA-DPH (Mataix AB, 2005).



**Figura 21. Esquema de la localización preferencial del DPH, DPiP y el TMA-DPH en las membranas biológicas. Modificado de Mataix, 2005.**

Diversos estudios señalan que existe un incremento de la fluidez de la membrana mitocondrial relacionado con la hiperglucemia, Cester *et al.* (1996). Al estudiar la dinámica de los lípidos y la morfología de células endoteliales de cordón umbilical, encontraron que en el tejido obtenido de madres diabéticas se incrementa la fluidez de la región superficial de la membrana plasmática (medida con TM-DPH), así como un aumento en el área mitocondrial y retículo con cisternas anchas y cuerpos de Weibel-Palade (MET), lo que sugiere la activación de las células endoteliales y la remodelación de la membrana plasmática durante la diabetes. Waczulikovac *et al* (2007), señalan un incremento en la fluidez de la membrana mitocondrial en corazón de rata diabética, estos datos son similares a los encontrados en este estudio donde al analizar la relación excímero/monómero del monitor fluorescente DPiP encontramos que existe un aumento en el cociente que demuestra un incremento en la fluidez (7.35%) en las mitocondrias de placenta de animales DMT2 (Tabla 5).

Los ensayos realizados en el presente trabajo se desarrollaron con el uso del 1,3-dipirenilpropano (DPiP), un fluoróforo formador de excímeros intramoleculares que tiene una eficiencia cuántica en el orden de  $1 \times 10^{-6}$  M. El cociente de emisión de fluorescencias de excímero a monómero ( $I_e/I_m$ ) del DPiP está directamente relacionado con la fluidez membranal, a diferencia del DPH y el TMA-DPH, en los cuales la

polarización de fluorescencia está inversamente relacionada con la fluidez. Así,  $I_e/I_m$  refleja directamente el comportamiento de la fluidez membranal. Por otro lado, gracias a la eficiencia cuántica del DPiP se puede utilizar en concentraciones micromolares (0.15  $\mu\text{M}$  en este trabajo) que minimizan la interferencia del monitor dentro de la membrana, a diferencia del DPH que se utiliza a concentraciones milimolares. El DPiP lo usamos a una relación mínima de fosfolípidos a DPiP de 5000:1, en tanto el DPH se utiliza entre 250 y 500:1. Pocos son los trabajos en los que se ha estudiado la fluidez de membranas mitocondriales y en la gran mayoría se ha utilizado la polarización de fluorescencia. Los resultados aquí mostrados (Figura 18) indican que la fluidez mitocondrial de células de placenta de ratas diabéticas con 19 días de gestación es mayor que la de ratas normoglicémicas por un 7.35% en promedio. Estos resultados son similares a los reportados para mitocondrias de células de corazón de ratas diabéticas utilizando el DPH, donde también se detectó aumento en fluidez membranal mitocondrial en ratas diabéticas. Sin embargo, cuando utilizaron el TMA-DPH, no encontraron diferencias entre los dos grupos, control y diabéticas (Waczulikovac *et al.*, 2007). Lo anterior significa que los cambios detectados, tienen lugar principalmente en el núcleo de la bicapa, pero no son importantes a nivel de la interfase. El DPiP detecta principalmente la fluidez de una región intermedia entre la detectada por el DPH y el TMA-DPH. Interesantemente, utilizando el TMA-DPH en membrana plasmática de células endoteliales de cordón umbilical, se reporta un aumento de la fluidez membranal (Cester *et al.*, 1996). Es claro que la diabetes afecta diferencialmente dependiendo del tipo de membrana u organelo, así por ejemplo, utilizando el DPiP se ha reportado que la diabetes y la hipertensión disminuyen la fluidez de fantasmas de eritrocitos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) conforme progresan las patologías (Pérez-Hernandez, *et al.*, 2010).

El incremento en la fluidez de la membrana está relacionado con cambios en la composición de los ácidos grasos; es así que entre mayor sea la proporción de ácidos grasos insaturados y/o menor la de saturados, la fluidez se hace mayor (McMurchie, 1988). En el presente estudio se puede observar que la proporción de ácidos grasos insaturados es mayor en las mitocondrias de los animales DMT2 (5.16 %), mientras que los saturados disminuyen en un 7.31% y el índice Insaturados/saturados incrementa en un 13.08 % con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  (Tabla 5). Estudios realizados en hembras con sobre peso y obesidad señalan una disminución de la fluidez de la membrana



en eritrocitos debida a una disminución en el índice de PUFAS, principalmente los de cadena larga de la serie 3-n, cabe señalar que dicho estudio fue realizado con la sonda fluorescente DPH. Los autores sugieren que estos hallazgos se asocian a estrés oxidante derivado de un metabolismo alterado de los lípidos, en el estudio también se señala una diferencia estadísticamente significativa para el parámetro glucosa, donde el grupo con sobrepeso tiene mayor concentración de ésta en sangre (Cazzola et al., 2004), Suzuki *et al.*, (1998), señalan una disminución en la microviscosidad de la membrana plasmática de células de tejido nervioso y un incremento en la concentración del ácido graso poliinsaturado DHA. Este ácido graso ha sido señalado como posible modulador de varias de las características termotrópicas de las membranas entre ellas la fluidez, la transición de fases, la elasticidad, la permeabilidad, la fusión, el flip-flop, y la actividad de las proteínas. Su interacción con otros lípidos de la membrana, en particular con el colesterol pueden tener un papel importante en la modulación de la estructura local y la función de las membranas (Stillwell y Wassall, 2003). En el presente estudio se encontró que la concentración del DHA (Anexo 6) es efectivamente mayor en el grupo de animales DMT2 con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.03$ .

Existen diversos factores intrínsecos de la membrana que afectan la fluidez de la misma. Algunos de ellos son la composición de ácidos grasos, la disposición e interacciones entre los mismos, así como la concentración de proteína y colesterol de la membrana. La membrana debe ser compatible con muchos de los procesos esenciales para la función celular, con excepción de ciertos lípidos, los productos del metabolismo del ácido araquidónico y poli-fosfatidilinositol, estos procesos se llevan a cabo por proteínas asociadas a la membrana. Las proteínas de membrana pueden ser modificadas por las propiedades fisicoquímicas, ya sea por los grupos de fosfolípidos con los que se asocian o por efectos de integración de los lípidos de la membrana (McMurchie, 1988). Se estudió la concentración de proteína y colesterol (Tabla 6) en la membrana mitocondrial para determinar su posible participación en el incremento de la fluidez sin encontrar diferencias estadísticamente significativa entre grupos.

Además, la fluidez de membrana se ve afectada por procesos tales como la adaptación homoviscosidad, regulación viscotrópica, las transiciones de fase de lípidos y las separaciones de fases laterales (McMurchie, 1988).

Otros parámetros importantes en el estudio fisicoquímico de las membranas, que demuestran alteración en la fluidez de esta son: la energía de activación de las fases gel y líquido cristal y la temperatura a la que se da la transición de las mismas. En nuestro estudio encontramos que la energía de activación en ambas fases es menor en el grupo diabético y la temperatura a la que se desarrolla el fenómeno de transición es 7.8 grados menor en este mismo grupo, con lo que se demuestra un incremento en la fluidez de la membrana (Tabla 7).

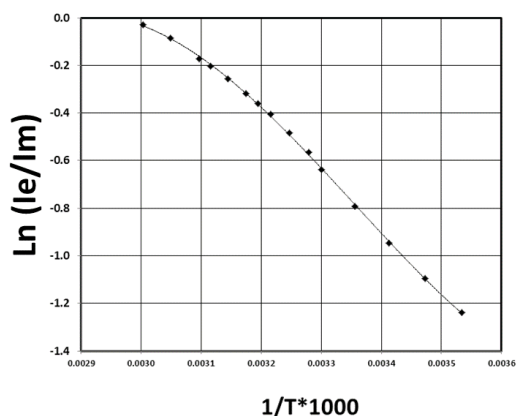
Es importante señalar que la transición de fases, uno de los factores que determinan la fluidez de las membranas se puede describir a través de las ecuaciones (1) para el caso de los animales del grupo NDMT2 y (2) en los animales DMT2 mostrando una mayor heterogeneidad de la composición de los ácidos grasos en los animales del grupo DMT2 donde el orden de la ecuación es de 5 (Figura 22A) mientras que el de los animales del grupo NDMT2 es de 4 (figura 22B).

Ecuaciones que describen la transición de fases de la membrana mitocondrial de células de placenta de rata.

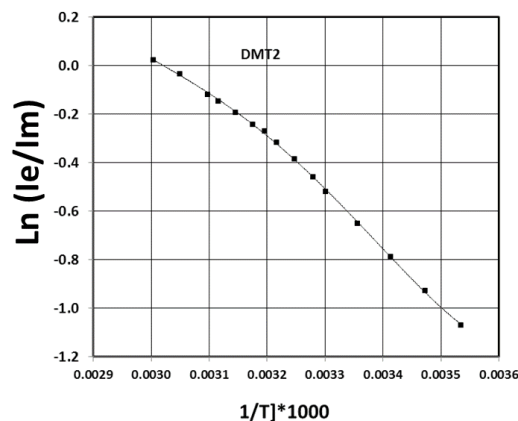
$$1) Y = 2E + 12x^4 - 2Ex^3 + 5E + 07x^2 - 54892x$$

$$2) Y = 3E + 15x^5 - 4E + 3x^4 + 2E + 1x^3 - 4E + 08x^2 + 299088x$$

A



B



**Figura 22. Transformación Polinomial del gráfico de Arrhenius de membranas de mitocondrias de ratas NDMT2 (A) y DMT2 (B).**

Un incremento en la fluidez de la membrana mitocondrial puede modificar la actividad de diversas enzimas y translocadores como: la carnitin-palmitoil transferasa y el translocador de citrato, esta alteración está relacionada con un incremento en el metabolismo mitocondrial y la producción de radicales libres y/o un desacoplamiento ligero de la cadena de transporte de electrones o bien con una cadena de transporte reversa (Brady et al., 1985; Desoye y Hauguel-de Mauzón, 2007). Sergent *et al* (2005), sugieren que el incremento en la concentración de radicales libres en mitocondrias está relacionado al aumento de la fluidez de la membrana mitocondrial. En el presente estudio se encontró que existe un incremento de 5.1 veces de la producción de MDA en los animales del grupo diabético con una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$  (figura 17 A), así mismo observamos que el índice respiratorio mitocondrial disminuye por un incremento en el consumo de oxígeno en el estado 4 (figura 20), lo que sugiere desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones.

La composición lipídica y la fluidez de la membrana basal del sincitiotrofoblasto placentario juegan papel importante en la transferencia de nutrientes de la madre al feto durante gestación. El sincitiotrofoblasto está expuesto constantemente a elevadas

concentraciones de oxígeno lo que lo hace un blanco fácil para los radicales libres. Investigaciones realizadas por Sen y Mukherjea (1998) acerca del efecto de la lipoperoxidación en la región de cepillo de la membrana basal del sincitiotrofoblasto, muestran una disminución de la anisotropía de fluorescencia del 1, 6-difenil-1, 3, 5-hexatrieno (DPH) en vesículas placentarias tratadas con concentraciones altas de MDA, lo que sugiere un incremento en la fluidez de la membrana, lo que pone en riesgo la gestación. También sugieren que los cambios en la fluidez de la membrana basal placentaria está relacionada a cambios en la composición de lípidos de la membrana e influye en la función de las proteínas de transporte durante el desarrollo de la gestación. Además de que la fluidez de la membrana basal aumenta conforme aumenta la edad de gestación y se correlaciona en forma positiva con la disminución en el contenido de colesterol e incremento de fosfolípidos, con una constante disminución en el cociente colesterol/fosfolípidos durante el desarrollo de la placenta.

Los cambios en la fluidez de la membrana mitocondrial en ratas diabéticas pueden estar asociados a los cambios ocurridos en el metabolismo intermedio de las madres con hiperglucemia. Uno de los más significativos es la incrementada resistencia a los efectos glucorreductores de la insulina, la cual tiende a incrementar en paralelo con el aumento en la concentración de las hormonas placentarias como: somatomamotropina, progesterona, prolactina y cortisona. Además, el aumento de citosinas y otros metabolitos que afectan a receptores, translocadores y enzimas de distintos tipos celulares en placenta. El daño producido por estos depende del periodo de gestación y la magnitud de la hiperglucemia (Desoye y Hauguel-de Mauzón, 2007).

Las hormonas placentarias estimulan la lipogénesis y el incremento en la concentración de ácidos grasos libres (AGL) en la circulación materna. Uno de los efectos de este incremento es la estimulación de la síntesis y liberación de la hormona tiroidea tiroxina (T<sub>3</sub>) que tiene como función incrementar el metabolismo basal en casi todos los tejidos (de 60 a 100%) e incrementa la actividad de la placenta (Guyton 2001). Tanto la T<sub>3</sub> como la insulina, incrementa su concentración durante la gestación y están implicadas en los cambios en la fluidez de la membrana mitocondrial. Una de las funciones de estas hormonas es regular la actividad del transportador de citrato (CiC) en la membrana mitocondrial interna. Estudios realizados por Paradies y Ruggiero (1990), en mitocondrias

de hepatocitos de rata con hipertiroidismo encontraron incremento en la fluidez de la membrana mitocondrial relacionado con alteraciones en la composición lipídica.

La hiperglucemia materna genera un estado de estrés oxidante en la placenta (Myatt y Cui, 1997), la medición de MDA en el presente estudio confirma este estado de estrés oxidante en placentas de ratas diabéticas, ya que la concentración de este se incrementó 5.1 veces respecto a los animales del grupo NDMT2. Los radicales libres están implicados en el daño a las membranas por lipoperoxidación, en la mayoría de los estudios realizados en membrana plasmática en tejidos que provienen de pacientes diabéticos se reporta una disminución de la fluidez relacionada con este fenómeno; sin embargo, como ya se vio en la membrana mitocondrial el efecto de la hiperglucemia es inverso. Estudios realizados en hepatocitos de rata con otras patologías que exhiben daño mitocondrial como la intoxicación por etanol han encontrado incremento en la fluidez de la membrana mitocondrial asociado al incremento de radicales libres (Sergent *et al.*, 2005). Sin embargo Mecocci *et al* (1997), en células de tejido nervioso y Chen y Yu, (1994), en hepatocitos de ratas, describe una disminución en la fluidez de la membrana mitocondrial asociada a la edad y la generación de radicales libres. La disminución de la concentración del AA y DHA en placenta se ha asociado al aumento en la concentración de los eicosanoides en algunas patologías relacionadas con el incremento en la concentración de radicales libres como: preclampsia y diabetes (Sen y Mukherjea, 1998). También se ha observado que un incremento en la actividad de la fosfolipasa A2, incrementa la generación de RL por acción de los ácidos grasos libres mediante la despolarización de la membrana interna (desacoplamiento) y al bloquear parcialmente la cadena de transporte de electrones (Ježek *et al.*, 2010). Sin embargo otros autores señalan que un suave desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones protege del daño por peroxidación de lípidos al disminuir la producción de radicales libres (Echtay *et al.*, 2003).

Lo anterior conduce a la disfunción mitocondrial relacionada con la resistencia crónica a la insulina, donde se incrementa el metabolismo de los ácidos grasos, reduciendo la utilización de la glucosa (Perseghin *et al.*, 2003). Este cambio provoca un incremento en la concentración de ácidos grasos libres circulantes y estimula el desacoplamiento mitocondrial a través de la estimulación de la proteínas desacoplantes (UCP2 y UCP3), reduciendo la actividad de la cadena respiratoria y la baja producción de ATP (Hagen y

Vidal-Puig, 2002). Por otro lado la administración de cantidades altas de T3 provoca hinchamiento mitocondrial, produciéndose desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, con producción de grandes cantidades de calor, pero con poca producción de ATP (Paradies y Ruggiero, 1990).

Es importante señalar que el incremento de MDA promueve entrecruzamiento de las proteínas de membrana y los fosfolípidos (Cazzola *et al.*, 2004), a su vez un incremento en la fluidez provocaría un incremento en la producción de sub productos de lipoperoxidación ya sea mediante la interacción con proteínas de membrana (Buko *et al.*, 1996) o por transposición de estas (Gabbita *et al.*, 1998). Los EROs son capaces, mediante la oxidación de la tubulina, de causar incremento en la fluidez de la membrana plasmática por daño a los microtubulos (Rémy-Kristensen et al 2010).

Son varios los mecanismos por los cuales se puede producir desacoplamiento mitocondrial, entre ellos se encuentran los ácidos grasos libres, las proteínas desacoplantes (UCPS), la lipoperoxidación, un aumento en la fluidez de las membranas (Page: 110 Rémy-Kristensen et al 2010).

Cuando la tasa de liberación de ácidos grasos en el citosol excede la capacidad de la  $\beta$ -oxidación, las concentraciones citosólicas de ácidos grasos pueden incrementarse e inducir toxicidad mitocondrial. Los ácidos grasos tienen efectos prominentes en el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mediante tres mecanismos: 1, incremento de la fuga de protones a través de la membrana interna de la mitocondria; 2, inhibición de la respiración y 3, apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP). Además de que los ácidos grasos interactúan con las membranas y poseen la capacidad de alterar su permeabilidad, también son un excelente sustrato que alimenta de electrones a la cadena respiratoria (Penzo *et al.*, 2002)

## ***Discusión General***

---

---

Los datos obtenidos muestran que las concentraciones elevadas de glucosa generadas por la Diabetes Mellitus Tipo 2 inducen una alteración en la función mitocondrial evidenciada por un incremento en el consumo de oxígeno tanto en el estado 3 (1.8 veces) como en el estado 4 (2.7 veces) con un menor cociente respiratorio (1.86), lo que sugiere desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones y daño a las mitocondrias. La disfunción mitocondrial ha sido señalada en diversas patologías como el resultado de procesos de peroxidación de lípidos en las membranas (Vamecq *et al.*, 2012) aunque algunos autores señalan como uno de los posibles mecanismos la alteración en la composición de ácidos grasos; incremento en los ácidos grasos saturados de cadena corta y disminución en los ácidos grasos de cadena larga con una o más insaturaciones, apuntando a que este fenómeno es más un mecanismo de protección que daño por radicales (García *et al.*, 1997).

Los componentes lipídicos de las membranas celulares son vulnerables a la oxidación debido a la presencia de dobles enlaces en sus estructuras. El ataque de radicales libres a estos compuestos forman lípidos hidroperóxidos (LOOH). Esto puede inducir cambios en la permeabilidad de las membranas y alterar las interacciones lípido-proteínas membranales (Aust *et al.*, 1985). Una de las consecuencias de la lipoperoxidación a nivel celular es la pérdida de ácidos grasos polinsaturados, disminución de la fluidez lipídica, permeabilidad alterada de la membrana, alteración de las proteínas de membrana, transporte iónico alterado, generación de metabolitos citotóxicos de hidroperóxidos lipídicos y liberación de material desde compartimentos subcelulares, ejemplo, enzimas lisosomales (Tappel, 1973).

Al ser las membranas uno de los blancos de los radicales libres, en el presente trabajo se estudió el efecto de estos sobre algunos parámetros fisicoquímicos en las mitocondrias. Por un lado al estudiar la composición de ácidos grasos se encontró diferencia estadística significativa entre grupos y el cociente entre los ácidos grasos insaturados-saturados evidencia una posible disminución en la fluidez de la membrana mitocondrial en los animales DMT2 (tabla 5).

Estudios realizados en hembras con sobrepeso y obesidad señalan que una posible causa de la alteración de la fluidez de la membrana en eritrocitos se debe a una disminución en el contenido de PUFAS y antioxidantes (Cazzola *et al.*, 2004) y el incremento en la producción de productos derivados de lipoperoxidación como (malondialdehído) MDA (Bagchi *et al.* 1989). Al analizar la relación excímero-monómero del monitor fluorescente DPiP encontramos que existe un aumento en el cociente de este que demuestra un incremento en la fluidez (7.35%) de la mitocondria en los animales DMT2 (gráfica 18). Estudios realizados en tejido cerebral de ratas inducidas a Diabetes Tipo 1 con la finalidad de dilucidar los efectos benéficos de la suplementación con Vit E sobre la fluidez de la membrana en células de tejido nervioso, encontraron un incremento en la fluidez de la membrana en células de los animales DMT2, relacionando este evento con la generación de radicales libres y la disminución de enzimas antioxidantes (Jung-Hee *et al.*, 2004).

Parámetros importantes en el estudio fisicoquímico de las membranas, que demuestran alteración en la fluidez de esta son: la energía de activación de las fases gel y líquido cristal y la temperatura a la que se da la transición de las mismas. En nuestro estudio encontramos que la energía de activación en ambas fases es menor en el grupo diabético y la temperatura a la que se desarrolla el fenómeno de transición es 7.8 grados menor en este mismo grupo, con lo que se demuestra un incremento en la fluidez de la membrana debido probablemente a la peroxidación de los lípidos. Los datos observados en el presente estudio demuestran un incremento (5.1 veces) en la generación de especies reactivas de oxígeno en el grupo de animales DMT2 (gráfica 17).

La hiperglucemia puede inducir daño celular mediante el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), al alterar el metabolismo del ácido araquidónico (lo que conduce a la producción alterada de prostaglandinas PGE2 y PGJ2, que participan en las vías de señalización y de desarrollo), y un aumento en la generación de óxido nítrico (mediador en muchas funciones celulares, incluyendo la muerte celular programada). En la diabetes materna estas alteraciones están presentes desde la etapa de ovocito, durante la implantación embrionaria, y durante la organogénesis del embrión (Jawerbaum y González, 2005).



Uno de los cambios más notorios en la gestación es la resistencia a los efectos glucorreductores de la insulina. Esta resistencia tiende a aumentar en paralelo con el aumento en la concentración de hormonas placentarias circulantes como: somatomamotropina, progesterona, prolactina y cortisona. Estas hormonas estimulan la lipólisis y el incremento en la concentración de ácidos grasos libres (AGL) en la circulación materna. Uno de los efectos del incremento en la concentración de AGL es la estimulación de la síntesis y liberación de la hormona tiroidea tiroxina o 3,3',5-triyodo-L-tironina (T3) que tiene como función incrementar el metabolismo basal en casi todos los tejidos (de 60 a 100%) e incrementa la actividad de diversas glándulas endocrinas entre ellas la placenta (Guyton, 2001).

La diabetes materna está asociada a cambios en la concentración de varias hormonas, citosinas y metabolitos, tanto en la circulación fetal como en la materna. Estos cambios pueden afectar el metabolismo de la placenta, ya que muchas de las enzimas, receptores y translocadores de los distintos tipos celulares de ésta, son blanco de estas moléculas. El daño producido depende del periodo de gestación y la magnitud de la enfermedad (Desoye y Hauguel-de Mauzón, 2007). Algunas hormonas como la T3; incrementa su concentración durante la gestación y están implicadas en los cambios en la fluidez de la membrana mitocondrial, al igual que la insulina. Se ha encontrado que la T3 al igual que la insulina regula la actividad del transportador de citrato (CiC) en la membrana mitocondrial interna. Estudios realizados por Paradies y Ruggiero (1990), en mitocondrias de hepatocitos de rata con hipertiroidismo encontraron que el incremento en la concentración de la T3 altera la composición lipídica de la mitocondria, dando como resultado una disminución en la concentración del colesterol total y un aumento en los fosfolípidos, en particular los de carga negativa (cardiolipinas 50%), asociados al incremento en la fluidez de la membrana. Estos cambios estimulan la actividad del translocador de citrato, incrementándose el metabolismo mitocondrial. Por otro lado la administración de cantidades altas de T3 provoca hinchamiento mitocondrial, produciéndose desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, con producción de grandes cantidades de calor, pero con poca producción de ATP. El cambio inducido por la hormona tiroidea en la actividad de CiC puede atribuirse tanto a una modificación de la composición lipídica de la membrana lo que aumenta la fluidez y a su vez la translocación de la CiC, o a un cambio más localizado de dominio lipídico (contenido de cardiolipina)

que rodea a la molécula transportadora en la membrana mitocondrial (Paradies y Ruggiero, 1990)

El incremento de la secreción de tiroxina aumenta la velocidad del metabolismo de la glucosa en todo el organismo, lo que provoca la correspondiente necesidad de una mayor secreción de insulina por parte del páncreas. Una de las principales funciones de la tiroxina pareciera consistir en aumentar el número y la actividad de las mitocondrias, las cuales aumentarían a su vez la tasa de formación de trifosfato de adenosina (ATP) para proporcionar energía a la función celular. Vale la pena considerar que el aumento en el número y en la actividad de las mitocondrias podría ser tanto el resultado del aumento de actividad de las células como la causa del mismo. Otra hormona que se incrementa durante la gestación y que está asociada al metabolismo de los carbohidratos es la insulina, la cual al igual que la T3 estimula la actividad del transportador de citratos gracias a que aumenta la fluidez de la membrana mitocondrial (Paradies y Ruggiero, 1990).

## *Conclusiones*

---

---

- De acuerdo a los parámetros tomados como referencia por la OMS y la ADA para el diagnóstico de Diabetes Mellitus Tipo 2 en humanos, los valores obtenidos de dichas pruebas mediante la administración de 135 mg/dL de STZ vía intraperitoneal a las 48 horas de edad en ratas hembra, convalidan el desarrollo de un modelo animal de esta patología para su uso en el estudio de las alteraciones de la membrana mitocondrial en tejido de placenta.
- La evaluación histológica de la placenta de ratas con Diabetes Mellitus Tipo 2 mostró cambios como pérdida de la continuidad del epitelio, falta de continuidad en las áreas del sincitiotrofoblasto, así como pocas células del citotrofoblasto, además pocos nodos sincitiales, degeneración hidrópica, pobre desarrollo de las vellosidades coriales (característico en placentas inmaduras), degeneración quística, inmadurez, células fantasma lo que sugiere insuficiencia placentaria asociada a un pobre desarrollo en los productos, comprobado éste en el estudio de algunos parámetros morfológicos.
- La Diabetes Tipo 2 indujo cambios en la estructura de las mitocondrias en la placenta de rata a los 19 días de gestación, evidenciada por un aumento el tamaño (degeneración hidrópica) y número, matriz menos electrodensa y crestas aplanadas e interrupción de la continuidad de la membrana (disrupción).
- En términos generales, en tejido de placenta de ratas con Diabetes Tipo 2, hay un aumento en la concentración de ácidos grasos saturados y una disminución de los insaturados.
- A diferencia del tejido, en mitocondrias de placenta de ratas con Diabetes Tipo 2, se genera una disminución de ácidos grasos saturados y un aumento de los insaturados.

- No existe diferencia en el contenido de proteína y colesterol en mitocondrias de placenta de ratas diabéticas tipo 2 a los 19 días de edad con respecto al grupo testigo.
- La concentración de MDA se incrementa en placenta, tanto en tejido como en mitocondrias de animales con Diabetes Tipo 2.
- Las características termotrópicas de las membranas de mitocondrias de placenta de rata se ven afectadas por la Diabetes Tipo 2, disminuyendo la energía de activación y la temperatura de transición de fase.
- La fluidez de la membrana mitocondrial medida con el DPiP aumenta en condiciones de hiperglucemia en membranas de mitocondria de animales DMT2.
- Existe una correlación positiva entre el cociente de la fluidez ( $I_e/I_m$ ), medida con el monitor DPiP, y la temperatura en mitocondrias de placenta.
- Se observa disminución del cociente respiratorio lo que sugiere alteración de la función mitocondrial en placenta de ratas diabéticas asociada a hiperglucemia.

## *Literatura citada*

---

---

- Acevedo GS, Espino SS, Gallardo GJM, Velazquez, TB, Camargo ML y Guzmán HME. La placenta Humana: Revisión. *Perinatol Reprod Hum.* 2008; 22:230-245.
- Aguilar SCA. Promoción de la salud para la prevención de las enfermedades crónico degenerativas vinculadas con la alimentación y el estilo de vida. En: *Salud Comunitaria y promoción de la salud.* Editor. Mariano García Viveros. 1999. ICEPSS Editores ISBN. 84-89151-17-2. España.
- Aguilar SCA, Rojas R, Gómez PFJ, Garcia E, Valles V, Ríos TJM, Franco A, Olaiz G, Sepúlveda J, Rull JA. Early onset type 2 diabetes in a Mexican, population-based, nation-wide survey: *Am J Med.* 2002; 113:569-74.
- Aguilar SCA, Velazquez M O, Gómez PFJ, Gonzalez CA, Lara E A, Molina CV, Rull RJ, Tapia CR. Characteristics of the patients with type 2 diabetes in Mexico: results from a large population-based, nation-wide survey. *Diabetes Care.* 2003; 26:2021-6.
- Aguilar SCA, Mehta R, Rojas R, Gómez PFJ, Olaiz G, Rull JA. Management of the metabolic syndrome as a strategy for preventing the macrovascular complications of type 2 diabetes: controversial issues. *Current Diabetes Reviews.* 2005; 1:145-58.
- Aguilar SCA y Gómez-Pérez FJ. Declaración de Acapulco: propuesta para la reducción de la incidencia de la diabetes en México. *Revista de Investigación Clínica.* 2006; 58(1):71-77.
- Alvino G. Intrauterine Growth Restriction: Implications for Placental Metabolism and Transport. A Review. *Placenta.* 2009; 30:77-82.
- American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG): Shoulder dystocia. En *2000 Compendium of Selected Publications, ACOG Technical Practice Patterns.* Washington DC. 1997; 7:1055.
- American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2005; 28:S37-S42.
- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2011; 34(1):S62-S69.

- Andrés S. Fleitas EAS, Simón CR, Almeida G, Quintela PAM y Alfonso M. Modelo experimental de diabetes en conejos. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 2000; 1(1):10-4.
- Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW and Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol.* 2004; 561(2):355-377.
- Arnheim N and Cortopassi G. Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mutat. Res.* 1992; 275:157-167.
- Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Rad. Biol. Med.* 1985; 1:3-25.
- Bagchi M, Prasad MR, Engelman RM, Das DK. Effects of free radicals on the fluidity of myocardial membranes. *Free Radic Res Commun,* 1989; 7(3-6):375-380.
- Baird JD. Some aspect of the metabolic and hormonal adaptation to pregnancy. *Acta Endocrinol.* 1986; 147(277):11-17.
- Bandy B and Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radical Biol. Med.* 1990; 8:523-539.
- Barker DJP, Osmond C, Goldings J et al. Growth *in utero*, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 1989; 298:564-567. **a**
- Barker DJP, Winter PD, Osmond C y cols. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989; 2:577-580. **b**
- Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ.* 1990; 301:259-263.
- Barker DJP. Fetal and infant origins of adult disease. London. BMJ Publishing Group, 1992.
- Barker DJP. Fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest.* 1995; 25:457-463.
- Barker DJP. Mothers, babies and disease in later life. London. BMJ Publishing Group, 1994.
- Barker DJP. Early growth and cardiovascular disease. *Arch Dis Child.* 1999; 80:305-310.

- Bastarrachea RA, Laviada-Molina H, Machado-Domínguez I, Kent Jr J, López-Alvarenga JC, Comuzzie AG. El receptor de insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización intracelular. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2005; 13(4):180-189.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991; 40:405-412.
- Becerra Fernández A. Malnutrición fetal y enfermedad metabólica en la vida adulta. *Nutrición y Obesidad*. 1999; 5:243-251.
- Beckman, Kenneth B., and Bruce N. Ames. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev*. 1998; 78:547-581.
- Beck-Nielsen H., Hother-Nielsen O. “Obesidad en la Diabetes Mellitus de Tipo 2”. En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. “Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp 702-712.
- Bell C, Walley A, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nature Reviews*. 2005; 6:221-35.
- Bencheroun MN, Pourquier P, Schott B, Robert J. Dexorubicin- induced lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in tumor cell lines selected for resistance to doxorubicin. *Eur J Biochem*. 1993; 211:141-6.
- Bennett, H. “Aspectos epidemiológicos de la Diabetes Mellitus de Tipo 2”. En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. “Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp 1331.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem*. 1997; 272:20313-20316.
- Bhandari U, Jain N, KK Pillai. Further Studies on Antioxidant Potential and Protection of Pancreatic  $\beta$ -Cells by *Embelia ribes* in Experimental Diabetes. *Experimental Diabetes Research. Indian Pharmacol*. 2008; 40 (5):215-220.
- Bitsanis D, Ghebremeskel K, Moodley T, Crawford MA and Djahanbakhch O. Gestational Diabetes Mellitus enhances arachidonic and docosahexaenoic acids in placental phospholipids. *Lipids*. 2006; 41(4):341-346.
- Bonet B, Viana M, Herrera E. Efectos teratogénicos de la diabetes; papel de los radicales libres. *Endocrinología*. 1998; 45:832-7.
- Borevis A and Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. *FEBS Lett*. 1975; 54:311-314.

- Botella IJ. La placenta: fisiología y patología. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. 1993. Ppg 27-78.
- Brady J, Silverstein LJ, Hoppel CL, and Brady PS. Hepatic mitochondrial inner membrane properties and carnitine palmitoyltransferase A and B. Effect of diabetes and starvation. *Biochem J.* 1985; 232(2):445-450.
- Bucala R, Makita Z, Korschinsky T. Lipid advanced glycosylations; pathway for lipid oxidations in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90:6434-8.
- Buko WV, Artsukevich A, Zavodnik I, Maltsev A, Sushko L, Zimmermann T and Dianzani MU. Interactions of Malondialdehyde and 4-Hydroxynonenal with Rat Liver Plasma Membranes and their Effect on Binding of Prostaglandin E<sub>2</sub> by Specific Receptors. *Free Radical Research.* 1996; 25(5):415-420.
- Bulkley GB. The role of free radicals in human disease processes. *Surgery,* 1983; 94:407-411.
- Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update.* 1996; 2(4):307-321.
- Campbell FM, Gordon MJ, Dutta-Roy AK. Preferential uptake of long chain polyunsaturated fatty acids by isolated human placental membranes. *Mol. Cell. Biochem.* 1996; 155:77-83.
- Carrero J, Bautista L, Baró J, Fonolla J, Jimenez J, Boza J, López E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr. Hosp.* 2005; 20:63-69.
- Carvajal SG, Zamudio CP, Carvajal JME, Juárez CE. Prevención de los daños producidos por la diabetes Mellitus y la senescencia. *Gac Méd Méx.* 2007; 143 (1):51-59.
- Carvajal, SG; Zamudio, CP; Carvajal, JME y Juárez, CE. V. Prevención de los daños producidos por la diabetes Mellitus y la senescencia. *Gac Méd Méx.* 2007; 143 (1):51-59.
- Castro, M., Liceaga, G. “Obesidad y Diabetes Mellitus”. En Islas, S. y Igal, R.A., Wang, S., González-Baro, M., Coleman, R.A. “Mitochondrial glycerol phosphate acetyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol”. *JBC.* 2002; 276:42205-42212.
- Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, and Cestaro B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition



in overweight and obese female erythrocytes. *Journal of Lipid Research*. 2004; 45:1846-1851.

- Céspedes MEM, Hernández LI., Llopiz JN. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cubana Invest Biomed*. 1999; 15:23-28.
- Cester N, Rabini RA, Salvolini E, Staffolani R., Curatola A, Pugnaroni A, Brunelli MA, Biagini G, Mazzanti L. Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes Mellitus: a biochemical and morphological study. *European Journal of Clinical Investigation*. 1996; 26(7):569-573. RESUMEN.
- Chappell LC, Seed PT, Briley AL, et al. Effect of antioxidants on the occurrence of preeclampsia in women at increased risk: a randomized trial. *Lancet*. 1999; 354:810-816.
- Chen JJ, Yu BP. Alterations In mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med*. 1994; 17(5):411-8.
- Coen AH. Effect of Dietary carbohydrate on the glucose tolerance curve in the normal and the carbohydrate-induced hyperglycemia subject. *AJCN*. 1967; 20(2):126-130.
- Cow, P. B., Gross, R. W., and Sobel, B. E. Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circ. Res*. 1984; 55:135-54.
- Cowett RM, Susa JB, Giletti B, Oh W, Scawartz R. Glucose kinetics in infants of diabetic mothers. *Am J Obstet Gynecol*. 1983; 146(7):781-6.
- Cranfor DR, Davies K JA. Adaptative response and oxidative stress. *Enviñ. Health Perspect*. 1994; 102:25-28.
- Crawford MA. The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. *Am. J. Clin. Nut*. 1993; 57(Suppl):793S-710S.
- Cross JC. How to make a placenta: mechanism of trophoblast cell differentiation in mice a reviw. *Placenta*. 2005; 26(A):S3-9.
- Dandrow RV, O'Sullivan JB. Obstetric hazards of gestational Diabetes. *Am J Obstet Gynecol*. 1966; 96:1144-1147.
- Degenhardt, TP; Alderson, NL; Arrington, DD; Beattie, BJ; Basgen, JM; Steffes, MW; Thorpe, SR And Baynes, JW. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney International*. 2002; 61:939-950.

- Delachambre M, Narce M, Aldrúbal P, Poisson. Changes in the tissue polyunsaturade Fatty acids with age, in spontaneously hypertensive rats. *Lipids*. 1998; 33:795-801.
- Desoye G, Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes Mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care*, 2007; 30 (2):S120-S126
- Desoye G, Shafrir E. The human placenta in diabetic pregnancy. *Diabetes Rev*. 1996; 4:70-89 3.
- Dirección General de Epidemiología DGE (A), Morbilidad Nacional, SSA. 2008.
- Dorrance A, Graham D, Webb R, Fraser R, Dominiczak A. Increase membrane sphingomyelin and arachidonic acid in stroke-prone in spontaneously hypertensive rats. *Am. J, Hypertens*. 2001; 14:1149-1153.
- Downey JM. Superoxide dismutase therapy for miocardial ischemia. *Free Rad Res Commun*. 1991; 2:703-20.
- Drukker NA and Pogorelova TN. Fatty acid composition of placental membrane phospholipids in women with a history of hypofunctional ovaries. *Vopr Med Khim*. 1996; 42(1):54-58.
- Dufour, E., and Larsson, N. G. Understanding aging: revealing order out of chaos. *BBA*. 2004; 1658:122-132.
- Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otín M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ and Brand MD. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *The EMBO Journal*. 2003; 22:4103-4110.
- Fanelli C, Pampanelli S, Porcellati F, Bartocci L, Scionti L, Rossetti P, Bolli G. Rate of fall of blood glucose and physiological responses of counterregulatory hormones, clinical symptoms and cognitive function to hypoglycaemia in Type I diabetes Mellitus in the postprandial state. *Diabetologia*. 2003; 46(Issue 1):53-64.
- Fass FH and Carter WJ. Altered fatty acid desaturation and microsomal fatty acid composition in the streptozotocin diabetic rat. *Lipids*. 1980; 15(11):953-961.
- Febres BF, Zimmer CGC, Zimmer E, Gil J. Nuevos conceptos en diabetes Mellitus gestacional: evaluación prospectiva de 3 070 mujeres embarazadas. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2000; 60(4):229-237.
- Federación Internacional de Diabetes (FID). *Diabetes Atlas* tercera edición. FID. Bruselas, Obtenida el 17 de abril de 2009.

- Fernandez CJC, Fernandez A, Morales A, Mari M, Garcia Ruiz C, Colell A. Oxidative Stress and Altered Mitochondrial Function in Neurodegenerative Diseases: Lessons from Mouse Models. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 2010; 9(4):439-454.
- Fernandez LJR, Couce PM y Fraga BJM. El Recién Nacido de la Madre Diabética: Hipoglicemia neonatal. *Asociación Española de Pediatría*. 2008; 85-90.
- Fernández SG, Jardón DA y Figueroa HJL. Modelos experimentales utilizados para el estudio e investigación de la diabetes Mellitus. 2º Congreso Nacional de Química Médica. Querétaro, Qro., México; 4 al 8 de Septiembre de 2006.
- Ferrer VD, Jorge FC, Cutiño CI, García RRE, Arce GDL. Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal. *MEDISAN*. 1999; 3(3):5-11.
- Flakoll, P.J., Carlson, M.G., Cherrington, A.D. “Acción fisiológica de la insulina”. En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. 2003. “Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp 1331.
- Folch J, Lees M, and Sloane SGH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Ch.* 1957; 226:497-509.
- Freeman LM, Brown DJ, Rush JE. Assessment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dog with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc*. 1999; 215:644-646.
- Fridovich J. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978; 201:875-880.
- Gaál t, Speake BK, Mezes M, Noble RC, Surai PF, Vajdovich P. Antioxidant parameters and ageing in some animal species. *Comp. Haematol Int*. 1996; 6:208-213.
- Gabbita SP, Subramaniam R, Allouch F, Carney JM and Butterfield DA. Effects of mitochondrial respiratory stimulation on membrane lipids and proteins: an electron paramagnetic resonance investigation. *BBA-Biomembranes*. 1998; 1372(2):163-173.
- Gaither K, Quaraishi A, Ilsey N. Diabetes alters the expression and activity of the human placental GLUT1 glucose transporter. *J Clin Endocrin Metab*. 1999; 84:695-701.
- García JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Byung BP, Chang Oh CS, Muñoz AH. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Letters*. 1997; 408:297-300.

- García-Carrapato MR. The offspring of gestational diabetes. *J Perinat Med.* 2003; 31:5-11.
- Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P and Fenn WO. Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science.* 1954; 119:623-626.
- Getz GS, Bartley W, Stirpet F, Notton BM and Renshaw A. The Lipid Composition of Rat-Liver Mitochondria, Fluffy Layer and Microsomes. *Biochem. J.* 1962; 83:181-191.
- Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan D, Gitto P, Barberi S, et al. Causes of oxidative stress in the pre- and postnatal period. *Biol Neonate.* 2002; 81(3):146-57.
- Goeth ME, Freyberger A, Riederer P. Oxidative stress: A role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 1990; 29:241-9.
- Goldman M, Kitzmiller JL, Abrams B, Cowan RM, Laros RK. Obstetrics complications with gestational diabetes Mellitus. *Diabetes.* 1991; 40(2):79-82.
- González E. Diabetes mellitus experimental: etiología de las malformaciones congénitas en descendientes de ratas diabéticas. *Rev Cubana Endocrinol.* 2002; 13(1):3-63.
- Gonzalez E. La placenta en la gestante diabética. *Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva.* 2006; Vol XIII (2):16-22.
- Gowland PA, Francis ST, Duncan KR, Freeman AJ, Issa B, Moore RJ, Bowtell RW, Baker PN, Johnson IR, Worthington BS. In vivo perfusion measurements in the human placenta using echo planar imaging at 0.5 T. *Magn Reson Med.* 1998; 40(3):467-473.
- Gutiérrez MA. Estrés oxidativo en la gestación: ¿Una nueva óptica en la atención a la embarazada? *Rev Cubana Obstet Ginecol.* 2005; 31:1-9.
- Guyton A, Hall J. *Tratado de fisiología médica.* 10ª Ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 2001:1005-1015,1031-1043.
- Hadju J, Wyss SR, Aebi H. Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Eur J Biochem.* 1977; 80:199-207.
- Hagen T, Vidal-Puig A. Mitochondrial uncoupling proteins in human physiology and disease. *Minerva Med.* 2002; 93(1):41-57.
- Hales CN, Barker DJP, Clark PMS et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 1991; 303:1019-1022.

- Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulindependent) Diabetes Mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992; 35:595-601.
- Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986; 246:501-514.
- Halliwell B, Gutteridge JML. Oxygen radicals and the nervous systems. *Trends Neurosc.* 1985; 8:22-6.
- Halliwell B, Hoult JRS, Blake DR. Oxidants, inflammation and the anti-inflammatory drugs. *Faseb J.* 1988; 2:2867-2873.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical and metal ions in human diseases. En: *Free radicals in biology and medicine*. 2 ed. Oxford: University. 1989; 156-210. **(a)**
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2a ed. Clarendon Press, Oxford. 1989, pag 188. **(b)**
- Halliwell B, Gutteridge J. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. *Tibs.* 1990; 15: 129-135. **(a)**
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview *Methods Enzimol.* 1990; 186:1-85. **(b)**
- Halliwell B, Cross CE. Reactive oxygen species, antioxidants and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Intern. Med.* 1991; 157:29-31.
- Halliwell B, Gutteridge J, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 119 (6):598-620.
- Halliwell B, Gutteridge J. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York. 1999, pp 188-266.
- Henle E S, Linn S, 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by Iron/Hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272 (31):19095-19098.
- Henry OA, Beischer NA. Long term implications of gestational diabetes for the mother. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1991; 2:461-483.
- Hernández SC. Diabetes Mellitus, estrés oxidativo y embarazo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2000; 19(3):191-5.
- *Bioquímica de Harper*. pp708, 1994
-

- Herrera E. Metabolismo lipídico durante la gestación. *Aliment Nutr Salud*. 1997; 42:43-9.
- Hertel J, Andersen GE, Brandt NJ, Christensen E, Kühl C Molsted-Pedersen L. Metabolic events in infants of diabetic mothers during first 24 hours after birth. III. Changes in plasma amino acids. *Acta Paediatr Scand*. 1982; 71(1):33-7.
- Hod M, Merlob P, Friedman S, Schoenfeld A, Ovadia J. Gestational Diabetes Mellitus. A survey of perinatal complications in the 1980s. *Diabetes*. 1991; 40(Suppl2):74-78.
- Hugues, HB; Rodríguez, GJC y Rodríguez, GJC Animales de laboratorio en la endocrinología: biomodelos de la diabetes mellitas tipo 1. *Rev Cubana Endocrinol*. 2001; 12(3):168-177.
- Ikeda T, Choi BH, Yee S, Murata Y, Quilligan EJ. Oxidative stress, brain white matter damage and intrauterine asphyxia in fetal lambs. *Int J Dev Neurosci*. 1999; 17(1):1-14.
- Impellizeri JA, Lau RE, Azzara Fa. Fourteen week clinical evaluation of an oral antioxidant as a treatment for osteoarthritis secondary to canine dysplasia. *Vet quarterly*. 1998; 20(Suppl 1):S107-S108.
- Islas 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; pp 3-20.
- Jawerbaum A, Novaro V, Gimeno M, González E. High glucose levels modulate eicosanoid production in uterine and placental tissue from non-insulin-dependent diabetic rats during late pregnancy. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 1998; 53(Issue 6): 389-393.
- Jawerbaum A and Gonzalez E. The Role of Alterations in Arachidonic Acid Metabolism and Nitric Oxide Homeostasis in Rat Models of Diabetes During Early Pregnancy. *Current Pharmaceutical Desing*. 2005; 11(10):1327-1342.
- Jawerbaum A, Capobianco E, Martínez N, White V, Pustovrh MC, Higa R, González E. Ligandos de receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (ppars) modulan el metabolismo lipídico en el tejido placentario sano y diabético. *Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*. 2006; XIII:33-48.

- Ježek J, Jabůrek M, Zelenka J, Ježek P. Mitochondrial phospholipase A2 activated by reactive oxygen species in heart mitochondria induces mild uncoupling. *Physiol Res.* 2010; 59(5):737-47.
- Jung-Hee H, Mi-Ji K, Mo-Ra P, Oh-gye k, In-Seon L, Boo HB, Soo-Chun L, Kyung-Bok L, Soon-Jae R. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica Chimica Acta.* 2004; 340(Issues 1-2):107-115.
- Kalhan SC, Savin SM, Adam PAJ. Attenuated glucose production rate in newborn infants of insulin dependent diabetic mothers. *N Engl J Med.* 1997; 296:375-376.
- Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 1990; 13: 228-243.
- Knopp, RH, MS Magee, Walden, CE, B Bonet, and Benedetti, JT. *Diabetes Care.* 1992; 15:1605.
- Kodama T, Iwase M, Nuno K, Maki Y, Yoshinari M, Fujishima M. A new Diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 1993; 20(3):183-189.
- Kondo M, Itoh S, Kusuka T, Imai T, Isobe K, Onishi S. The ability of neonatal and maternal erythrocytes to produce reactive oxygen species in response to oxidative stress. *Early Hum Dev.* 2002; 66(2):81-8.
- Kuhn DC, Crawford MA, Stuart MJ, Botti JJ, Demers LM. Alterations in transfer and lipid distribution of arachidonic acid in placentas of diabetic pregnancies. *Diabetes.* 1990; 39:914-918.
- Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. Free Radical-Generated Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry.* 1995; 64(4):1703-1707.
- Lavigne C, Marette and A Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 278: E491–E500.
- Law CM, Gordon GS, Shiell AW y cols. Thinness at birth and glucose tolerance in seven-year-old children. *Diabet Med.* 1995; 12:24-29.
- LeRoith D., Taylor SI., Olefsky JM. *Diabetes Mellitus Fundamentos y clínica.* 2da ed. Mc Graw Hill. México. 2004. Pp: 164-174.

- Lillioja S, Mott DM, Howard Bv, et al. "Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action: longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians". *N. Engl. J. Med.* 1998; 318:1217.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. En: Bock GR, Whelan J, eds. *The childhood environment and adult disease. CIBA Foundation Symposium 156.* Chichester: John Wiley and Sons. 1991:38-55.
- Lucas MJ. Diabetes complicating pregnancy. *Obstet Gynecology Clin NA.* 2001; 28:513-536.
- Lyall F, Gibson J, Greer I, Brockman D, Eis A, Myatt L. Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta. Evidence for oxidative stress. *Diabetes Care.* 1998; 21:1753-8.
- Maloff BF, Boyd BK. Physiologic and cellular insulin action in a glucose-intolerant model of type 2 (non-insulin-dependent) Diabetes in rats. *Diabetologia.* 1986; 29(5):295-300.
- Maureen I. Harris. "Definición y clasificación de la diabetes Mellitus y criterios actuales para el diagnóstico". En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. "Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico". Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp 406-416.
- McMurchie, E.J. Dietary lipids and the regulation of membrane fluidity and function. Invited Review Chapter in "Physiological Regulation of Membrane Fluidity". Aloia, R.C., Curtain, C.C. and Gordon, L.M., editors. *Advances in Membrane Fluidity*, 1988; 3:189-237. Alan R. Liss Inc., New York.
- Mecocci P, Beal MF, Cecchetti R, Polidori MC, Cherubini A, Chione F, Avellini L, Romano G and Senin U. Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human Brain. *Molecular and Chemical Neuropathology.* 1997; 31(1):53-64.
- Meekins JW, Luckas MJM, Pijnenborg R, McFadyen IR. Histological study of decidual spiral arteries and the presence of maternal erythrocytes in the intervillous space during the first trimester of normal human pregnancy. *Placenta.* 1997;18:459-464.
- Méndez, JD y Ramos, HG. Animal model in diabetes research. *Archives of Medical Research.* 1994; 25(4):367-375.



- Montelongo A, Lasunción MA, Pallardo LF, Herrera E. Longitudinal study of plasma LP and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes*. 1992; 41:1651-9.
- Moreno, VJM. Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿algo más que una hipótesis? *Acta Pediátrica Española*. 2001; 59(10):573-580.
- Morrison WR and Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Lipid. Res*. 1964; 5:600-608.
- Muoio DM and Newgard CB. Molecular and Metabolic Mechanisms of Insulin Resistance and  $\beta$ -cell Failure in Type 2 Diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; (3):193-205.
- Myatt L and Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and Cell Biology*. 1997; 122(4):24-25.
- Nikkels PGJ, Sikkema JM, Visser GHA. Placental Pathology in Women with Type 1 Diabetes and in a Control Group with Normal and Large-for-Gestational-Age Infants. *Placenta*. 2003; 24(8):819-825.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000; 404:787-790.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. *Diario Oficial*. Miércoles 22 de Agosto de 2001.
- Olaiz-Fernández G, MC, Rojas R, MC, Aguilar-Salinas CA, Rauda J, Villalpando S. Diabetes Mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud Pública de México*. 2007; 49(3):S331-337.
- Ong CYT, Lao TT, Spencer K, Nicolaidis KH. Maternal serum level of placental growth factor in diabetic pregnancies. *J Reprod Med*. 2004; 49(6):477-80.
- Oré, R. Valdivieso Y D. Huerta. Capacidad Antioxidante en Ratas Diabéticas Rol de la Vitamina E. *Revista Peruana De Biología*. 2000; 7(2). Disponible en URL: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v07\\_n2/capaci\\_antioxi.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v07_n2/capaci_antioxi.htm)
- Organización Mundial de la Salud 2011. <http://www.who.int/es/>.

- Orozco-Tapia, R.I. Efecto de los ácidos grasos omega-3 (FA  $\omega$ -3) y linoleico conjugado (CLA) en la Diabetes Mellitus 2 (DMT2) en ratas wistar. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2008. Pp.
- Palomino GMA; Revilla MMC; Sánchez GC; Loredó NE; Contreras RAI; Islas AS. Desarrollo de la Placenta de Rata Diabética. Estudio con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB); 2005. Disponible en URL: [http://www.ciasem.com/PSD/Havana%202005/Abstracts\\_Post\\_Biol/Palomino%20Caribay.pdf](http://www.ciasem.com/PSD/Havana%202005/Abstracts_Post_Biol/Palomino%20Caribay.pdf)
- Paradies G and Ruggiero FM. Enhanced activity of the tricarboxylate carrier and modification of lipids in hepatic mitochondria from hyperthyroid rats. Arch. Biochem. Biophys. 1990; 278:425-430.
- Paranhos Calderon IM, Vieira Cunha Rudge M, Delgi Ramos M, Peraçoli JC. Biochemical and Histochemical Longitudinal Analysis of Placentas of Diabetic Rats: Relationship with Macrosomatia and Intrauterine Growth Retardation. RBGO, 1999; 21 (2):91-98.
- Penzo D, Tagliapietra C, Colonna R, Petronilli V, and Bernardi P. Effects of fattyacids on mitochondria: implications for cell death. BBA-Bioenergetics. 2002; 1555 (1-3):160-165.
- Percy P, Vilbersson G, Percy A, Mánsson Je, Wennwrgen M, svennerholm L. The fatty acid composition of placenta in intrauterine growth retardation. Biochim Biophys Acta. 1991 Jul 9; 1084(2):173-7.
- Pérez-Hernández IH, Avendaño-Flores YS, Mejía-Zepeda R. Analysis of the membrane fluidity of erythrocyte ghosts in diabetic, spontaneously hypertensive rats. Acta Diabetol. 2010; 1(47):47-55.
- Perseghin G, Petersen K, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003; 27(3):S6-11.
- Persson B and U Hanson. Neonatal morbidities in gestational diabetes Mellitus. Diabetes Care.1998; 21(supl 2):B79-84.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 diabetes. N Engl J Med. 2004; 350(7):664-671.

- Phelps RL, Metzger BE, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. XVII. Diurnal profiles of plasma glucose, insulin, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, and individual amino acids in late normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 140(7):730-6.
- Phillips DIW, Barker DJP, Hales CN, et al. Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetologia.* 1994; 37:150-154.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F and Boveris A. Nitric Oxide Inhibits Electron Transfer and Increases Superoxide Radical Production in Rat Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1996; 328(Issue 1):85-92.
- Polanco PAC, Revilla MMC, Palomino GMA E islas AS, Efecto de la Diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas, *Ginecol Obstet Mex.* 2005; 73:544-52.
- Portha B, Picon L, Rosselin G. Chemical Diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia.* 1979; 17(6):371-7.
- Powers SK, Lennon SI. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings Nutr Soc.* 1999; 49:345-361.
- Pratley, RE; Weyer C; Bogardus, C. Anormalidades Metabólicas en la Génesis de la diabetes tipo 2. En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. “Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp 680-689.
- Pryor WA. Free radical and lipid peroxidation. En: frei B editor. *Natural antioxidant in human health and disease.* Nueva York: Academic Press. 1994; 1-24.
- Pugsley AP y Schnaitman CA. Identification of tree genes controlling production of new outer membrane pore proteins in *Echerichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 1978; 135:1118-1129.
- Pustovrh C, Jawerbaum A, Sinner D, Pesaresi M, Baier M, Gimeno M, Gonzalez E. Membrane-type matrix Metalloproteinase-9 Activity in placental tissue from patients with pregestational and gestational diabetes Mellitus. *Reprod Fertil Dev.* 2000; 12:269-75
- Ramos RHG y Domingo MJ. Diabetes Mellitus Experimental. *Ciencia Veterinaria.* 1994; 6:347-377.

- Rémy-Kristensen A, Duportail G, Jean-Georges K. The influence of microtubule integrity on plasma membrane fluidity in L929 cells. *Molecular Membrane Biology*. 2000; 17(2):95-100.
- Rodriguez BRA et al. Costos directos de atención médica en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 en México: análisis de microcosteo. *Rev Panam Salud Pública*. 2010; 28(6):412-420.
- Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Rios-Torres JM, Gómez-Pérez FJ, Olaiz G. Epidemiology of type 2dDiabetes in Mexico. *Arch Med Res*. 2005; 36:188-96.
- Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Charles MA, Bennett PH. “A two-step model for development of non-insulin-dependent diabetes”. *Am. J. Med*. 1991; 90:229-235.
- Saldeen P, Olofsson P, Laurini RN. Structural, functional and circulatory placental changes associated with impaired glucose metabolism. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2002; 105(2):136-142.
- Saran M, Bors W. Radical reactions in vivo- An overview. *Radiation Environ. Biophys*. 1990; 29:249-262.
- Sivan C, Eriksson UJ. Vitamin E decreased the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes*. 1997; 46:1054-61.
- Schacterle GR and Pollack RL. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Analytical Biochemistry*. 1973; 10:2106-2113.
- Schaefer GUM, Graf K, Kulbacka I, Kjos SL, Dudenhausen J, Vetter K, Herrera E. Maternal lipids as strong determinants of fetal environment and growth in pregnancies with gestational diabetes Mellitus. schaefer-graf um, raf k, kulbacka i, kjos sl, udenhausen j, vetter v, herrera e. *Diabetes Care*. 2008; 31(9):1858-1863.
- Schonfelder G, John M, Hopp H, Fuhr N, Van Der Giet M, Paul M. Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of woman with gestational diabetes. *FASEB J*. 1996; 10:777-84.
- Sen A, Mukherjea M. Modulation of bilayer fluidity by lipid peroxidation of human placental syncytiotrophoblast membranes during embryogenesis. *Indian J Biochem Biophys*. 1998; 35(4):216-23.

- Sergent O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, And Lagadic-Gossman D. Role for Membrane Fluidity in Ethanol-Induced Oxidative Stress of Primary Rat Hepatocytes. *J. Phar. Exp. Therap.* 2005; 313(1):104-111.
- Singer DB, Widness JA, Liu CT, Ellis RA. Placentas in pregnancies complicated by maternal diabetes. *Surgery Synth Pathol Res.* 1984; 3(4):333-41.
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate.* 1990; 57:107-118.
- Sosenko JM, Kitzmiller JL, Fluckiger R, et al. Umbilical Cord Glycosylated Hemoglobin in Infants of Diabetic Mothers: Relationships to Neonatal Hypoglycemia, Macrosomia, and Cord Serum C. *Diabetes Care.* 1982; 5:566-570.
- Stillwell W and Wassall SR. Docosahexanoic acid: membrane properties of fatty acid. *Chemestry and Physics of Lipids.* 2003; 126(1):1-27.
- Stoz F, Schuhmann RA, Haas B. Morphohistometric investigations in placentas of gestational diabetes. *J Perinat Med.* 1988; 16:205-209.
- Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B, Baron AD: Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest.* 1997; 100:1230-1239.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, Haefen TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet.* 2005; 365(Issue 9467):1333-1346.
- Sunehag A, Ewald U, Larsson A and Gustafsson J. Attenuated Hepatic Glucose Production but Unimpaired Lipolysis in Newborn Infants of Mothers with diabetes. *Pediatric Research.* 1997; 42:492-497.
- Suzuki H, Park SJ, Tamura M, Ando S. Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membranefluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mechanisms of Ageing and Development.* 1998; 101(1-2):119-128.
- Szkudelski, T. The Mechanism of alloxana and streptozotocin action in B cells of rat páncreas. *Physiol. Res.* 2001; 50:536-544.
- Takata K, Fujikura K, Bo-Chul S. Ultrastructure of rodent placental labyrinth: A site barrier and transport. *J Rep and Develop.* 1997; 43(1):13-24.
- Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 1973; 32: 415-438.

- Unger RH, Grundy S. Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 1985; 28:119.
- Vamecq J, Dessein AF, Fontaine M, Briand G, Porchet N, Latruffe N, Andreolotti P, Cherkaoui-Malki M. Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis. *Curr Drug Metab.* 2012; 13(10):1388-1400.
- Vance ED and Vance EJ. *Biochemistry of Lipids and Membranes.* The Benjamin/Cummings publishing Company. INC. California. 1985. Pp: 593.
- Villalpando S, Shamah-Levy T, Rojas R, Aguilar-Salinas CA., Tendencia en la prevalencia de Diabetes Mellitus Tipo 2 y otros indicadores de riesgo cardiovascular en México entre 1993-2006. *Salud Publica. Mex* 2010; 52(suppl 1): S72-S79.
- Voet, D., Voet, J. "Biochemistry". Ed. John Wiley & Sons, Inc. United States. 1990. Pp 1223.
- Waczulikova I, Habodaszova D, Cagalinec M, Ferko M, Ulicna O, Mateasik A, Sikurova L, Ziegelhöffer A. Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007; 85(3-4):372-81.
- White V, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Capobianco E and Gonzalez E. Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Reproduction, Fertility and Development*, 2002; 14(2):117-123.
- Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann Clin Biochem.* 1991; 18:158-62.
- Woodall SM, Johnston BM, Breier BH y cols. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res.* 1996; 40:438-443.
- Yang X, Håkan BLA, Eriksson UFJ. Altered mitochondrial morphology of rat embryos in diabetic pregnancy. *The Anatomical Record.* 1995; 241(1):255-267.
- Yang X, Håkan BLA, Eriksson UFJ. Maternal Antioxidant Treatments Prevent Diabetes-Induced Alterations of Mitochondrial Morphology in Rat Embryos. *The Anatomical Record.* 1998; 251:303-315.

- Yu T, Robotham JL and Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. PNAS. 2006; 103 (8):2653-2658.
- Zeisel SH. Choline fosfolipids: signal trasduction and carcinogenesis. Faseb J. 1993; 7:551-557.
- Zhang Y, Li X, Zou D, Liu W, Yang J, Zhu N, Huo L, Wang M, Hong J, Wu P, Ren G, Ning G. Treatment of Type 2 Diabetes and Dyslipidemia with the Natural Plant Alkaloid Berberine. JCEM. 2008; 93 (7):2559-2565.
- Zweier JL, Hassan TMA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. Cardiovascular Research. 2006; 70:181-190.

### Anexo1. Medio H para aislamiento de mitocondrias

Sacarosa	0.07 M
Manitol	0.21 M
HEPES	2.0 mM
Albúmina	0.05 %
BTH	0.001%

\*Por cada gramo de tejido agregar de 1 a 10 ml de solución. Ajustar pH a 7.4 con HCl o KOH

Ajustar pH 7.4 con TRIS 0.5 M

### Anexo 2. Método de Centrifugación para obtención de mitocondrias de placenta de rata.

	rpm	min	Indicaciones
1	3000	10	Obtener sobrenadante
2	7500	10	Obtener pastilla Incubar 15 min con albumina 0.5%
3	9000	10	Obtener pastilla Resuspender en el menor volumen posible
4			Determinación de proteína (Bradford)

Se utilizó un rotor 36, la temperatura de centrifugado fue de 4 °C



### Anexo 3. Medio de respiración para medir consumo de oxígeno en mitocondrias

#### (solución 2X)

Succinato	10 mM	
Sacarosa	250 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
Fosfato H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM	pH 7.4
EGTA	1 mM	
Albúmina	0.1 %	pH 7.4

<p><b>Succinato</b> Producción de FAD sitio II. Mantiene la osmolaridad.</p>
--

1 M	Succinato	1 mL
1 M	Sacarosa	1 mL
1 M	MgCl <sub>2</sub>	1 mL
1 M	Fosfato H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	25 mL
0.2 M	EGTA	0.5 mL
	Albumina	100 mg

<p>Aforar a 50 ml con H<sub>2</sub>O Ajustar pH a 7.4 TRIS 0.10 mM</p>
--

### Anexo 4. Oximetría

Cámara con capacidad 1.4 mL

Concentración de proteína 250 µg /mL

H<sub>2</sub>O 700 µl de muestra

Medio 700 µl

### Anexo 5. Diferencia en % de la composición de ácidos grasos en tejido y mitocondrias de placenta en ratas NDMT2 Vs DMT2.

	TEJIDO NDMT2 Vs DMT2	MITOCONDRIAS NDMT2 Vs DMT2
<b>Mirístico</b>	40.0	-8.0
<b>Palmítico</b>	23.7	-2.8
<b>Palmitoleico</b>	16.7	-2.7
<b>Esteárico</b>	24.4	-12.4
<b>Oleico</b>	22.1	30.2
<b>Linoleico</b>	-22.7	-7.2
<b>Araquidónico</b>	-44.6	3.9
<b>EPA</b>	50.0	137.7
<b>DHA</b>	-51.6	19.7
<b>NI</b>	-15.9	13.5
<b>saturados</b>	24.9	-7.4
<b>insaturados</b>	-26.8	5.2
<b>I/S</b>	40.0	-8.0

**Anexo 6. Diferencia en % de la composición de ácidos grasos de ratas NDMT2 y DMT2 en tejido Vs mitocondrias.**

	<b>NDMT2 T Vs M</b>	<b>DMT2 T Vs M</b>
<b>Mirístico</b>	-37.4	-58.9
<b>Palmítico</b>	2.8	-19.3
<b>Palmitoleico</b>	32.7	10.6
<b>Esteárico</b>	0.3	-29.4
<b>Oleico</b>	-5.0	1.3
<b>Linoleico</b>	6.9	28.3
<b>Araquidónico</b>	-1.2	85.5
<b>EPA</b>	-86.7	-78.9
<b>DHA</b>	-24.0	88.2
<b>NI</b>	-14.8	15.1
<b>saturados</b>	1.1	-25.0
<b>insaturados</b>	0.8	44.7
<b>I/S</b>	-3.0	73.2