

UNIVERSIDAD CEU-CARDENAL HERRERA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, FARMACOLOGÍA Y
TOXICOLOGÍA.



IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DIABETES GESTACIONAL

TESIS DOCTORAL

Presentada por Luis Domingo Arribas Palomar

Dirigida por D^a María Miranda Sanz y D. Javier Romero Gómez

Moncada, Valencia
2008

**D^a MARÍA MIRANDA SANZ Y D. JAVIER ROMERO GÓMEZ,
PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA,
FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
CEU-CARDENAL HERRERA**

INFORMAN

Que la tesis titulada “**IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DIABETES GESTACIONAL**” de la que es autor D. Luis Domingo Arribas Palomar, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de FISIOLOGÍA, FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA en el marco del programa de Ciencias de la Salud y que reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada ante el tribunal correspondiente a fin de obtener el grado de Doctor

Y para que conste firmamos la presente en Moncada a 5 de noviembre de 2008.

Fdo. María Miranda Sanz

Fdo. Javier Romero Gómez

A Ana Rosalía

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral empezó su andadura hace años en Mallorca, *viajó* por Valencia, Denia y finalmente Moncada, y en todos los lugares ha encontrado buenos *compañeros de viajes*, buenas personas. Mis agradecimientos a todos, deseo que mis acciones pasadas y futuras sean muestra de mi afecto y respeto por vosotros. Quiero reconocer personalmente a algunas personas su apoyo, orientación y confianza en mí.

- María Muriach, Siv Johnsen-Soriano, Javier Romero, Maria Miranda, Paco Bosch, Inma Almansa y Emma, Sara, Victoria, y Pepa.
- Personal del Laboratorio del Hospital Marina Alta, y del ya desaparecido Centro de Especialidades de Denia, dirigido por Rosa Arrese, y atendido por muchas personas, Marisa, Sole, Fernando, Pepa, Maite. Comadronas del Area 12, de la comarca La Marina Alta. Pacientes y sus familias
- José Aznar, matemático, en su memoria
- La familia, Ana, Rafa y Carmen, Maxi y M^a Luisa, Arturo, Vir, Mateo, Javi, Mabel, Mabelita y Luis.

Y que me perdonen todos aquellos que me dejo en el tintero, pero que han permitido que esta tesis llegue a buen término.

A todos ellos, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. DIABETES MELLITUS.....	2
1.1. DEFINICIÓN.....	2
1.2. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES.....	4
1.3. DIAGNÓSTICO.....	8
1.4. DESCRIPCIÓN TIPOS ETIOLÓGICOS DE DIABETES MELLITUS.....	9
1.4.1. Diabetes tipo 1.....	10
1.4.2. Diabetes tipo 2.....	11
1.4.3. Otros tipos específicos de diabetes.....	11
2. DIABETES GESTACIONAL.....	12
2.1. METABOLISMO HIDROCARBONADO EN EL EMBARAZO SANO.....	14
2.1.1. Secreción de insulina.....	16
2.1.2. Sensibilidad a la insulina.....	17
2.1.3. Unión de la insulina a su receptor.....	18
2.1.4. Acción periférica de la insulina.....	18
2.2. DIABETES GESTACIONAL.....	19
2.2.1. Secreción de insulina.....	20
2.2.2. Sensibilidad a la insulina.....	21
2.2.3. Unión de la insulina a su receptor.....	22
2.2.4. Acción periférica de la insulina.....	23
3. FISIOPATOLOGIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	24
3.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES.....	24
3.1.1. Papel fisiológico.....	27
3.1.2. Papel patogénico.....	28
3.1.3. ORIGEN DE LOS RADICALES LIBRES.....	28
3.2. PEROXIDACION LIPIDICA.....	29
3.2.1. Concepto.....	29
3.2.2. Productos de la peroxidación de lípidos.....	31
3.2.3. Malondialdehído.....	33
3.3. DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	35
3.3.1. Sistemas antioxidantes de importancia biológica.....	35
3.3.2. Sistema Glutación.....	36
3.3.3. Actividades enzimáticas relacionadas con el glutati6n....	40
4. DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	43

4.1. ¿ESTÁ EL ESTRÉS OXIDATIVO AUMENTADO EN LA DIABETES?.....	43
4.2. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS COMPLICACIONES DE LA DIABETES.....	48
5. GESTACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	53
5.1. GESTACIÓN NORMAL: ESTRES OXIDATIVO Y ESTADO ANTIOXIDANTE.....	53
5.2. DIABETES GESTACIONAL: ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTADO ANTIOXIDANTE.....	56
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	60
III. MATERIAL Y MÉTODOS	64
1. PROTOCOLO DEL ESTUDIO.....	65
1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	65
1.2. CONTROLES: GESTANTES SANAS.....	68
1.3. CASOS: GESTANTES CON DG.....	68
1.3.1. Despistaje y diagnostico.....	68
1.3.1.1. Despistaje.....	69
1.3.1.2. Diagnostico.....	70
1.3.2. Control durante el embarazo.....	73
1.3.2.1. Tratamiento dietético.....	73
1.3.2.2. Ejercicio físico.....	74
1.3.2.3. Automonitorización.....	74
1.3.2.4. Tratamiento adicional.....	75
1.3.3. Control en parto y posparto.....	76
2. APARATOS Y MÉTODOS.....	77
2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS.....	77
2.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS CONVENCIONALES.....	78
2.2.1. Glucosa.....	79
2.2.2. Colesterol total.....	79
2.2.3. Triglicéridos.....	80
2.2.4. HDL colesterol.....	81
2.2.5. LDL colesterol.....	82
2.2.6. Ácido úrico.....	82
2.2.7. Fosfatasa alcalina.....	83
2.2.8. GPT (ALT, alanina-aminotransferasa).....	83
2.2.9. GOT (AST, aspartato-aminotransferasa).....	84
2.2.10. GGT (γ -glutamyl-transferasa).....	85
2.2.11. Bilirrubina total.....	85
2.2.12. Creatinina.....	86
2.2.13. Urea.....	86
2.2.14. Hierro.....	87
2.2.15. Ferritina.....	87
2.2.16. Sodio y potasio.....	88

2.2.17. Hemoglobina glicosilada.....	89
2.2.18. Hemograma.....	89
2.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EMERGENTES: ESTRÉS OXIDATIVO.....	90
2.3.1. Aparatos y reactivos.....	90
2.3.2. Determinación de glutatión peroxidasa.....	93
2.3.2.1. Fundamento teórico.....	93
2.3.2.2. Soluciones.....	94
2.3.2.3. Preparación de las muestras.....	94
2.3.2.4. Procedimiento.....	94
2.3.3. Determinación de Malondialdehído.....	96
2.3.3.1. Fundamento teórico.....	96
2.3.3.2. Obtención de las muestras.....	97
2.3.3.3. Equipo y soluciones utilizadas.....	97
2.3.3.4. Procedimiento.....	98
3. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	100
IV. RESULTADOS.....	103
1. VARIABLES DESCRIPTIVAS GENERALES.....	105
2. VARIABLES BIOQUÍMICAS.....	107
2.1. HEMOGLOBINA.....	107
2.2. MDA.....	111
2.3. GPx.....	115
2.4. PERFIL LIPÍDICO.....	119
2.5. GLUCEMIA BASAL.....	127
3. ESTUDIO DE CORRELACIÓN.....	131
3.1. VALOR MEDIO GESTACIONAL de MDA, GPx Y HbA1C.....	131
3.1.1. Conjunto global.....	133
3.1.2. Grupo Diabetes Gestacional.....	137
3.1.3. Grupo Control.....	137
3.2. VALORES TRIMESTRALES EN GRUPO DG.....	139
3.3. VALORES TRIMESTRALES EN GRUPO CONTROL.....	147
4. ESTUDIO DE REGRESION LINEAL.....	154
V. DISCUSIÓN.....	156
1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y BIOQUÍMICAS CLÁSICAS.....	159
2. ESTRÉS OXIDATIVO EN GESTACIÓN.....	162
3. ESTRÉS OXIDATIVO EN DIABETES GESTACIONAL.....	166
VI. CONCLUSIONES.....	181
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	184

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGE	Productos avanzados de la glicación
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DE	Desviación estandar
DG	Diabetes Gestacional
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes tipo 1
DM2	Diabetes tipo 2
EO	Estrés Oxidativo
GPx	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
IR	Insulinresistencia
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MDA	Malondialdehído
ns	No significativo
•OH	Radical hidroxilo
•O₂⁻	Anión superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PTOG	Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa
RAGE	Receptores para productos avanzados de la glicación
RL	Radicales Libres
ROOHs	Hidroperóxidos lipídicos
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SOD	Superóxido Dismutasa
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
TD	Test de Despistaje
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitas.....	5
Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de la diabetes gestacional con PTOG 100g.....	72
Tabla 3. Características de la población estudiada.....	106
Tabla 4: Valores trimestrales de Hemoglobina Glicosilada (%) en ambos grupos.....	108
Tabla 5. Valores trimestrales de MDA (μM) en ambos grupos.....	112
Tabla 6. Valores trimestrales de GPx (mmol/litro x min)en ambos grupos.....	116
Tabla 7. Valores trimestrales de Colesterol total (mg/dl) en ambos grupos.....	120
Tabla 8. Valores trimestrales de Triglicéridos (mg/dl) en ambos grupos.....	120
Tabla 9. Valores trimestrales de LDL-Colesterol (mg/dl) en ambos grupos.....	121
Tabla 10. Valores trimestrales de HDL-Colesterol (mg/dl) en ambos grupos.....	121
Tabla 11. Valores trimestrales de Glucemia basal (mg/dl) en ambos grupos.....	128
Tabla 12. Valor medio gestacional de MDA (μM), GPx (mmol/mg prot x min) y HbA1c (%) en cada grupo por separado y en el conjunto global de gestantes.....	132
Tabla 13. Resumen de publicaciones acerca de marcadores de estrés oxidativo en gestantes sanas comparadas con no gestantes.....	178
Tabla 14. Resumen de publicaciones acerca de marcadores de estrés oxidativo en mujeres con DG comparadas con gestantes sanas.....	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de mecanismos implicados en la lipoperoxidación.....	32
Figura 2. Estructura química del MDA.....	34
Figura 3. Representación del sistema glutatión.....	37
Figura 4. Estructura química del glutatión.....	38
Figura 5. Hipótesis acerca del desarrollo de la diabetes.....	45
Figura 6. Papel del estrés oxidativo en la patogénesis de la diabetes y en el síndrome cardiometabólico.....	46
Figura 7. Efectos del estrés oxidativo en la célula beta pancreática	48
Figura 8. Posibles mecanismos que conducen al estrés oxidativo.....	52
Figura 9. Estrategia diagnóstica de DG en el embarazo.....	72
Figura 10. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico.....	96
Figura 11. Curva patrón de MDA obtenida por HPLC.....	100
Figura 12. Hemoglobina Glicosilada (%): comparativa trimestral de ambos grupos	109
Figura 13. Hemoglobina Glicosilada (%): comparativa evolutiva entre los 2 grupos.....	110
Figura 14. MDA (μM): comparativa trimestral de ambos grupos.....	113
Figura 15. MDA (μM): comparativa evolutiva entre los 2 grupos.....	114
Figura 16. GPx (mmol/mg prot x min): comparativa trimestral de ambos grupos.....	117
Figura 17. GPx (mmol/mg prot x min): comparativa evolutiva entre los 2 grupos.....	118
Figura 18. Colesterol (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos..	122

Figura 19. Triglicéridos (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos.....	123
Figura 20. LDL-Colesterol (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos.....	124
Figura 21. HDL-Colesterol (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos.....	125
Figura 22. Lípidos (mg/dl): comparativa evolutiva entre los 2 grupos....	126
Figura 23. Glucemia basal (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos.....	129
Figura 24. Glucemia basal (mg/dl): comparativa evolutiva entre los 2 grupos.....	130
Figura 25. Análisis de correlación entre MDA y HbA1c en el conjunto de todas las pacientes.....	134
Figura 26. Análisis de correlación entre GPx y HbA1c en el conjunto de todas las pacientes.....	135
Figura 27. Análisis de correlación entre MDA y GPx en el conjunto de todas las pacientes.....	136
Figura 28. Análisis de correlación entre MDA y GPx en el grupo DG...	138
Figura 29. Valores de los coeficientes de correlación lineal del MDA con Glucosa, GPx y HbA1c, por trimestres, en el grupo DG	140
Figura 30. Correlación del MDA con HbA1c en 1º trimestre en el grupo DG.....	141
Figura 31. Correlación trimestral del MDA con GPx en 2º trimestre en el grupo DG.....	142
Figura 32. Correlación trimestral del MDA con GPx en 3º trimestre en el grupo DG.....	143

Figura 33. Valores de los coeficientes de correlación lineal del GPx con Glucosa, MDA y HbA1c, por trimestres, en el grupo DG.....	144
Figura 34. Valores de los coeficientes de correlación lineal de la HbA1c con Glucosa, MDA y GPx, por trimestres, en el grupo DG.....	145
Figura 35. Valores de los coeficientes de correlación lineal de Glucosa con, MDA, GPx y HbA1c, por trimestres, en el grupo DG	146
Figura 36. Valores de los coeficientes de correlación lineal de MDA con Glucosa, HbA1c y GPx , por trimestres, en el grupo control	148
Figura 37. Correlación trimestral del MDA con HbA1c en 2º trimestre en el grupo control.....	149
Figura 38. Valores de los coeficientes de correlación lineal de GPx con Glucosa, MDA y HbA1c, por trimestres, en el grupo control.....	150
Figura 39. Correlación trimestral de GPx con HbA1c en 2º trimestre en el grupo control.....	151
Figura 40. Valores de los coeficientes de correlación lineal de Glucosa con MDA, GPx y HbA1c, por trimestres, en el grupo control.....	152
Figura 41. Valores de los coeficientes de correlación lineal de HbA1c con Glucosa, MDA y GPx, por trimestres, en el grupo control	153

I.- INTRODUCCIÓN

1 DIABETES MELLITUS

1.1 DEFINICIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es un trastorno metabólico de carácter crónico y etiología múltiple que afecta al metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, que se caracteriza por la hiperglucemia que se produce por un déficit en la secreción de insulina, en su acción, o una combinación de ambas cosas. La DM engloba un grupo de trastornos genética y clínicamente heterogéneos que tienen en común una tolerancia disminuida a la glucosa expresada por la existencia de hiperglucemia. Cualquiera que sea la causa, la hiperglucemia crónica, en relación con el tiempo de evolución, se asocia con afectación micro y macrovascular que termina por producir daño, disfunción y fracaso de diversos órganos, especialmente en ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 180 millones de personas por todo el mundo tienen diabetes, y este número se doblará en el año 2030. La OMS calcula que las muertes atribuidas a la diabetes pueden aumentar en un 50 % en los próximos 10 años si no se aplican estrategias preventivas eficaces¹. Esta enfermedad está alcanzando proporciones epidémicas en todo el mundo, lo que representa un problema de salud por los elevados costos de su tratamiento y sus complicaciones asociadas, y por el impacto social en la calidad de vida de los pacientes afectados.

La estrategia para combatir la diabetes actualmente se centra en que los pacientes consigan un estricto control glucémico, y en prevenir y/o retrasar en lo posible la aparición de nuevos casos de diabetes.

Varios mecanismos patogénicos están implicados en el desarrollo de la DM. El espectro abarca desde la destrucción autoinmune de la célula β pancreática, con el consecuente déficit de insulina, hasta las alteraciones que provocan una resistencia a la acción de la insulina. La pérdida en la secreción de insulina y la inadecuada acción de la misma coexisten frecuentemente en el mismo paciente, y con frecuencia se desconoce que anormalidad es la causa primaria de la hiperglucemia, si es que hay una sola causa.

Los síntomas clásicos de la hiperglucemia mantenida incluyen poliuria, polidipsia y pérdida de peso de causa no justificada, algunas veces polifagia, astenia y visión borrosa; a menudo los síntomas de la hiperglucemia son ligeros o pueden estar ausentes por lo que el diagnóstico de la DM puede permanecer ignorado, incluso durante años; sin embargo, la hiperglucemia puede ser de un grado suficiente como para producir alteraciones patológicas y funcionales en diferentes órganos durante este periodo asintomático y estar ya presentes en el momento del diagnóstico de la diabetes.

La DM incontrolada de forma aguda y severa, que a veces es la forma de presentación clínica de la enfermedad, puede amenazar la vida con complicaciones como la cetoacidosis diabética y el síndrome hiperosmolar no cetósico.

Las complicaciones a largo plazo incluyen retinopatía con potencial pérdida de visión; nefropatía que conduce al fracaso renal; neuropatía diabética con riesgo de úlceras plantares, amputaciones y artropatía de Charcot; y neuropatía autonómica causante de síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares y disfunción sexual. Los pacientes con DM presentan un aumento de la incidencia de aterosclerosis cardiovascular, arteriopatía periférica y enfermedad cerebrovascular. Hipertensión arterial y alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas son frecuentes en la población con diabetes.

1.2 CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES

Ya que la DM incluye una variedad de procesos y mecanismos patológicos, se hace necesario disponer de un sistema apropiado de clasificación. La clasificación actualmente utilizada ha sido propuesta en base a los trabajos del Comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes² y asumida por la Organización Mundial de la Salud (OMS)³. Esta clasificación combina los estadios clínicos y los tipos etiológicos conocidos de DM y otras categorías de hiperglucemia, incorporando la evidencia actual de que la DM es un grupo de trastornos etiológica y clínicamente heterogéneo que tienen en común la hiperglucemia.

Asignar un tipo de diabetes a un individuo frecuentemente depende de las circunstancias presentes en el momento del diagnóstico, y en algunos casos no es fácil asignarlos a un grupo. En la tabla 1 se recoge la clasificación etiológica de la DM actualmente aceptada; esta clasificación incluye cuatro tipos de diabetes: Diabetes Mellitus tipo 1

(DM1), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), otros tipos específicos de diabetes y Diabetes Mellitus gestacional (DG).

Tabla 1. Clasificación etiológica de la Diabetes Mellitus³.

<p>I. Diabetes tipo 1 (destrucción de células β, habitualmente conduce a la deficiencia absoluta de insulina).</p> <p>A. Autoinmune</p> <p>B. <i>Idiopática</i></p>
<p>II. Diabetes tipo 2 (que puede ir desde una predominante resistencia a la insulina con una deficiencia relativa de insulina hasta un predominante defecto secretor con resistencia a la insulina)</p>
<p>III. Otros tipos específicos</p> <p>A. <u>Defectos genéticos de la función de la célula β</u></p> <ol style="list-style-type: none">1. Cromosoma 12, HNF-1-α (MODY 3)2. Cromosoma 7, glucokinasa (MODY 2)3. Cromosoma 20, HNF-4-α (MODY 1)4. Cromosoma 13, factor promotor de insulina-1 (IPF-1; MODY 4)5. Cromosoma 17, HNF-1-β (MODY 5)6. Cromosoma 2, <i>NeuroDI</i> (MODY 69)7. DNA mitocondrial8. Otros <p>B. <u>Defectos genéticos de la acción de la insulina</u></p> <ol style="list-style-type: none">1. Resistencia a la insulina Tipo A2. Leprechaunismo3. Síndrome de Rabson-Mendenhall4. Diabetes lipoatrófica5. Otros <p>C. <u>Enfermedades del páncreas exocrino</u></p> <ol style="list-style-type: none">1. Pancreatitis2. Traumatismo/Pancreatectomía3. Neoplasia4. Fibrosis quística5. Hemocromatosis

6. Pancreopatía fibrocalculosa
7. Otros
- D. Enfermedades endocrinas
 1. Acromegalia
 2. Síndrome de Cushing
 3. Glucagonoma
 4. Feocromocitoma
 5. Hipertiroidismo
 6. Somatostatina
 7. Aldosteronoma
 8. Otros
- E. Inducida por fármacos o sustancias químicas
 1. Vacor
 2. Pentamidina
 3. Acido nicotínico
 4. Glucocorticoides
 5. Hormonas tiroideas
 6. Diazóxido
 7. Agonistas adrenérgicos β
 8. Tiazidas
 9. Dillantin
 10. Interferón α
 11. Otros
- F. Infecciones
 1. Rubéola congénita
 2. Citomegalovirus
 3. Otros
- G. Formas poco comunes de diabetes mediada por alteraciones inmunológicas
 1. Síndrome del “hombre tieso”
 2. Anticuerpos antirreceptor de insulina
 3. Otros
- H. Otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados con diabetes
 1. Síndrome de Down
 2. Síndrome de Klinefelter
 3. Síndrome de Turner
 4. Síndrome de Wolfram
 5. Ataxia de Friedreich
 6. Corea de Huntington
 7. Síndrome de Lawrence-Moon-Beidl
 8. Distrofia miotónica
 9. Porfiria

10. Síndrome de Prader-Willi
11. Otros

IV. Diabetes Mellitus gestacional (DG)

Los pacientes con cualquier forma de diabetes pueden necesitar tratamiento con insulina en algún estadio de su enfermedad. Tal uso de insulina no clasifica, en si misma, al paciente.

Esta clasificación incluye un concepto importante que es la consideración de estadios clínicos que reflejan los diferentes grados de hiperglucemia que el individuo puede recorrer en cualquiera de los procesos patológicos específicos que conducen a la DM, sin que su clasificación venga determinada por el nivel o tratamiento de la hiperglucemia. Los estadios variables de hiperglucemia dentro de un mismo tipo de diabetes pueden dificultar, en un momento determinado, la clasificación de un paciente concreto sólo por las características clínicas y sin la utilización de otros marcadores bioquímicos o inmunológicos. Sin embargo, todos los sujetos con diabetes pueden ser clasificados, en cualquier circunstancia, de acuerdo al estadio clínico que puede modificarse a lo largo del tiempo dependiendo de la severidad y evolución del proceso subyacente que a su vez puede permanecer estable, progresar o incluso remitir.

Por otra parte, el trastorno que conduce a la DM puede estar presente en un individuo pero su intensidad no ser suficiente para haber producido hiperglucemia; sin embargo, este trastorno puede ser identificable en cualquier estadio del desarrollo de la diabetes, incluso en el de normoglucemia. Esto es lo que sucede con la detección de anticuerpos relacionados con la diabetes tipo 1 en individuos

normoglucémicos, evidenciando la existencia de un proceso autoinmune que les convierte en sujetos de riesgo para desarrollar este tipo de diabetes. En cuanto a la diabetes tipo 2, no hay marcadores altamente específicos de este tipo de diabetes.

El grado de hiperglucemia refleja la severidad del trastorno metabólico subyacente y el tipo de tratamiento necesario más que la naturaleza del proceso mismo. La DG se desarrolla a lo largo de la gestación, habitualmente al inicio del 2º trimestre, y generalmente desaparece tras el parto.

1.3 DIAGNÓSTICO

Hay tres formas posibles de establecer el diagnóstico de diabetes⁴:

- Síntomas de diabetes y determinación ocasional de una concentración de glucosa en plasma ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l). Ocasionalmente se define como a cualquier hora del día, sin tener en cuenta el tiempo transcurrido tras la última comida. Los síntomas clásicos son poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicada
- Glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l). En ayunas se define como la ausencia de consumo de calorías durante un mínimo de 8 horas.
- Glucosa plasmática a las 2 horas ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTOG). La prueba debe realizarse tal como describe la

OMS, con una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

En ausencia de hiperglucemia inequívoca, estos criterios deben ser confirmados en un día diferente repitiendo el test. El 3º criterio, la prueba de tolerancia a la glucosa oral, no se recomienda de uso clínico rutinario, no es necesario si se cumple cualquiera de los otros dos criterios diagnósticos en más de una ocasión.

Se reconoce a un grupo de individuos que por su concentración de glucosa no cumplen los criterios para el diagnóstico de diabetes, pero cuyos valores de glucemia son demasiado elevados para considerarlos normales: glucemia en ayunas igual o mayor de 100 mg/dl pero menor de 126 mg/dl (este rango se denomina Glucemia Basal Alterada) o glucemia igual o mayor de 140 mg/dl, pero menor de 200 mg/dl 2 horas después de administrar 75 g de glucosa por vía oral (denominado Tolerancia Alterada a la Glucosa).

1.4 DESCRIPCIÓN DE TIPOS ETIOLÓGICOS DE DIABETES MELLITUS

El reconocimiento de los tipos etiológico de diabetes permite incluir defectos, trastornos y procesos que pueden dar lugar a Diabetes Mellitus. La posibilidad de asignar a un individuo a uno u otro tipo de diabetes en el momento del diagnóstico depende de algunas circunstancias, como la disponibilidad de medir ciertos marcadores; esto hace que a veces sea difícil incluir a un paciente en una clase única y no

es infrecuente que sea necesario modificar el tipo de diabetes al que pertenece a la vista de la evolución clínica o el conocimiento de determinados marcadores, especialmente los inmunológicos, es importante entender la patogénesis del proceso subyacente que produce la hiperglucemia, para conocer el tipo de diabetes, y así tratarlo eficazmente.

1.4.1 DIABETES TIPO 1

Previamente denominada diabetes insulín dependiente o tipo I o diabetes infanto-juvenil, se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas que normalmente da lugar a una deficiencia absoluta de insulina. Habitualmente, la destrucción es de origen autoinmune y puede identificarse por la presencia de marcadores inmunológicos, mientras que en algunos individuos no es posible evidenciar este trastorno autoinmune.

En la diabetes tipo 1 se hace necesaria la administración de insulina, no sólo para el control de la glucemia sino también para asegurar la supervivencia al prevenir la cetoacidosis y la muerte.

Esta forma representa aproximadamente el 10 % de todos los casos de diabetes con una prevalencia variable de unas zonas geográficas a otras. La diabetes tipo 1 puede aparecer a cualquier edad, pero su incidencia máxima se produce en torno a la adolescencia, y preferentemente antes de los 40 años.

1.4.2 DIABETES TIPO 2

Previamente se le denominaba con los términos de Diabetes Mellitus no insulino dependiente, diabetes tipo II o diabetes del adulto.

El trastorno fundamental de la diabetes tipo 2 parece ser un defecto en la acción periférica (resistencia a la insulina), al que se añade una deficiencia, habitualmente relativa en la secreción de insulina, no debida a destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. Probablemente existen diferentes mecanismos implicados en esta forma de diabetes. La resistencia insulínica en los tejidos es un proceso complejo no completamente conocido que afecta a las vías intracelulares de señalización de la insulina, tras la activación de su receptor en la membrana celular. La resistencia insulínica viene determinada genéticamente y se acentúa en ciertas condiciones como la obesidad y el sedentarismo.

1.4.3 OTROS TIPOS ESPECÍFICOS DE DIABETES

En esta categoría se incluyen aproximadamente el 3 % de las personas con diabetes, por lo que supone un pequeño subgrupo pero es importante por su significación patogénica, como sucede en el grupo de trastornos genéticos de la célula β , y porque su tratamiento y manejo puede ser distinto de un tipo a otros.

2 DIABETES GESTACIONAL

El concepto de DG como lo entendemos actualmente data de 1979. Las primeras referencias que nos constan son del siglo XIX⁵, y antes de 1979 ya se habían publicado estudios de cribaje, diagnóstico y mortalidad perinatal^{6,7}.

En la actualidad la DG se define como la alteración de tolerancia a la glucosa que es detectada por primera vez durante el embarazo, y que puede tener una gravedad diversa^{8,9}. La definición es independiente del tratamiento empleado (necesidad o no de insulina), y de que la enfermedad persista o no tras el parto. No excluye la posibilidad de una intolerancia a la glucemia previa a la gestación no reconocida hasta la fecha, o de su inicio concomitante con la gestación. No se aplica a mujeres con diabetes antes de la gestación. Los criterios utilizados para el diagnóstico son específicos del embarazo y difieren de los que se emplean para el diagnóstico de la DM o la intolerancia a la glucosa fuera del embarazo. Generalmente se pone de manifiesto en el 2º trimestre y suele desaparecer después del alumbramiento del recién nacido. Cerca del 10% de las mujeres con Diabetes Gestacional tienen anticuerpos anti-células de los islotes; ellas podrían tener una forma latente de diabetes tipo 1, aunque su riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 es desconocido.

Aproximadamente el 7 % de todos los embarazos se complican con DG. La prevalencia varía en un rango entre el 1 y el 14 % de todos los embarazos, dependiendo de la población estudiada y del test diagnóstico utilizado¹⁰. El riesgo de DG aumenta con la edad materna, el sobrepeso, la paridad, los antecedentes familiares de diabetes y el

antecedente de resultados adversos en embarazos previos, observándose además un aumento de prevalencia en los últimos años¹⁰.

Esta entidad se asocia a un aumento de la morbilidad materna y fetal tanto en el periodo perinatal como a largo plazo. Se ha descrito un mayor riesgo de preclampsia, hidramnios y parto por cesárea, además de un mayor riesgo en el feto de macrosomía, traumatismo obstétrico, síndrome de distrés respiratorio y alteraciones bioquímicas transitorias¹¹.¹². La DG también se acompaña de un mayor riesgo de diabetes tipo 2 a largo plazo en la madre (a los diez años de seguimiento el 50 % de estas mujeres desarrollan Diabetes Mellitus)¹³ y de diabetes, obesidad y alteración del desarrollo intelectual y psicomotor en sus hijos^{14, 15}. A pesar de la morbimortalidad asociada a la DG, hace pocos años, la US Preventive Task Force¹⁶ no se pronunciaba sobre el beneficio de su despistaje y diagnóstico, debido a la falta de estudios controlados ya que, en algunos ámbitos, el diagnóstico y tratamiento de la DG podrían ser contraproducentes, ya que aumentaban injustificadamente la tasa de cesáreas¹⁷. En 2005, la publicación de un ensayo clínico que comparaba tratamiento específico frente a seguimiento obstétrico convencional, demostraba que, con la primera opción, las complicaciones perinatales graves se reducían en un 33%¹⁸.

Dado que tanto las repercusiones perinatales como las consecuencias a largo plazo se han asociado a un ambiente metabólico intrauterino adverso^{15, 19} es importante el diagnóstico y tratamiento precoz para poder prevenirlas.

El tratamiento de la DG tiene como objetivo corregir las alteraciones metabólicas imitando la regulación glucémica fisiológica, por lo que es preciso conocer las bases fisiopatológicas para su diagnóstico y tratamiento.

2.1 METABOLISMO HIDROCARBONADO EN EL EMBARAZO SANO

Las demandas fisiológicas del embarazo actúan como una auténtica prueba de esfuerzo para la madre²⁰. Para cubrir las necesidades energéticas del feto, durante la gestación se producen cambios en el metabolismo de la glucosa materna que pueden resumirse en:

1. Reducción de los valores de glucemia en ayunas junto a la aceleración de las reacciones bioquímicas de la fase de ayuno (ayuno acelerado)²¹.

2. Reducción de la sensibilidad a la insulina en la segunda mitad del embarazo (semana gestacional 20) y que condiciona un incremento en la secreción de insulina²². La tolerancia a la glucosa mejora durante la primera fase de la gestación, lo que se ha atribuido a un aumento del consumo fetoplacentario cuando las hormonas contrainsulares no han aumentado mucho²³, mientras desciende progresivamente a partir de la semana 20 por la acción de las hormonas contrainsulares, que aumentan como consecuencia de la acción placentaria²⁴.

El consumo fetal de glucosa, y la disminución de la neoglucogénesis hepática por falta de sustratos son los mecanismos implicados en el ayuno acelerado. Los factores que condicionan la

resistencia insulínica están relacionados con la acción de distintas hormonas y citoquinas que se encuentran elevadas durante el embarazo (lactógeno placentario, progesterona, prolactina, cortisol, estradiol, factor de necrosis tumoral α placentario) y también con la acción de los ácidos grasos libres²⁵.

La resistencia a la insulina durante la gestación permite un aumento de los valores de glucosa y ácidos grasos libres maternos para cubrir las demandas fetales, que a su vez se acompaña de un notable incremento en la función de la célula β pancreática de la madre.

En la gestante sana, como ya se ha citado antes, la tolerancia oral a la glucosa disminuye progresivamente, pero sin que la glucemia supere los límites de la normalidad de la situación de no gestante²⁶. Los niveles de glucemia basal descienden a 60-70 mg/dl (10-20%)^{21, 27}, lo que ya es detectable a partir de la semana 10²¹, y se atribuye a una mayor utilización periférica de glucosa y al consumo por parte de la unidad fetoplacentaria^{23, 24}. Estos valores han demostrado ser superiores en mujeres obesas²⁸. En cambio, la glucemia postprandial se eleva a 100-140 mg/dl o incluso más dependiendo de la dieta administrada^{21, 27, 29}, con una amplitud media alrededor de 45 mg/dl³⁰, lo cual se atribuye a la acción de las hormonas placentarias con acción contrainsulínica²⁴. La glucemia media se sitúa alrededor de 90-100 mg/dl, cifra similar a la situación de no embarazo²⁴.

En síntesis, la glucemia en la gestante está alrededor de 75 mg/dl en ayunas, 115 mg/dl a la hora posprandial y 107 mg/dl 2 horas posprandial.

En la mujer con DG, la glucemia basal puede oscilar entre 70-110 mg/dl²⁴. Los niveles posprandiales se elevan a 130-140 mg/dl, habiéndose descrito incluso glucemias superiores a 200 mg/dl una hora después del consumo de 50 g de glucosa³¹. Las excursiones glucémicas están en torno a 60 mg/dl, y las glucemias medias son de 100 mg/dl o más²⁴.

2.1.1 SECRECIÓN DE INSULINA

La función de la célula β puede valorarse por distintos métodos como la concentración de insulina en circulación general en ayunas o tras la administración de secretagogos, la dinámica de la secreción de insulina, y el estudio de los productos de la secreción de la célula β . La secreción de insulina varía en función de la sensibilidad a la misma, y la relación entre ambas, es una hipérbola (el producto entre la secreción y sensibilidad a la insulina en individuos sanos es aproximadamente constante)³². Tanto en la gestación con tolerancia normal a la glucosa como en la DG, la secreción de insulina aumenta desde el primer trimestre siendo más alta en el tercero³³.

Al final de la gestación, la insulinemia basal es casi el doble que en el postparto^{34, 35}. En la gestante sana, el índice insulogénico, que expresa la respuesta a la secreción de insulina por unidad de estímulo glucémico, está incrementado en un 90%³⁵, gracias a la hiperplasia e hipertrofia de las células β pancreáticas^{36, 37}. En mujeres obesas se ha observado una menor respuesta en la primera y segunda fases de secreción de insulina durante una test de tolerancia endovenoso a la glucemia, lo que sugeriría una disfunción relativa de la célula β ³⁸.

2.1.2 SENSIBILIDAD A LA INSULINA

El desarrollo de resistencia a la insulina es una característica normal de la segunda mitad del embarazo³⁹. Sin embargo, en la primera mitad del embarazo, los cambios observados indican un aumento de la sensibilidad a la insulina (descenso de la glucemia basal, aumento de la tolerancia a la glucosa endovenosa, y la demostración en animales de experimentación de un aumento del glucógeno hepático)⁴⁰. Ello podría atribuirse a un aumento proporcionalmente mayor de los estrógenos que de los gestágenos⁴¹.

En cambio, en la segunda mitad del embarazo, se produce una disminución del efecto hipoglucemiante de la insulina⁴², una reducción de la reserva hepática de glucógeno y un aumento de la capacidad neoglucogénica del hígado⁴⁰. La disminución de la sensibilidad a la insulina en el tercer trimestre de gestación se ha estimado en un 33-65% en estudios que utilizan el clamp euglucémico hiperinsulinémico, y en un 70% en los que utilizan el MinMod²². Los estudios de Catalano y de Cousins describen una progresiva disminución de la sensibilidad que se detecta en el segundo trimestre y que desaparece rápidamente después del parto^{22, 43}.

Las causas de esta insulínresistencia (IR) se atribuyen a los cambios hormonales de la gestación por diferentes razones:

- La IR aumenta durante el embarazo en paralelo con el aumento gestacional de las hormonas maternas (lactógeno placentario, progesterona, prolactina y cortisol)¹⁴

- La administración de estas hormonas en ausencia de gestación induce IR⁴¹
- Estas hormonas, in vitro, inducen disminución de la captación de glucosa mediada por insulina en el tejido adiposo y muscular⁴⁴
- El aumento de necesidades insulínicas que presenta las pacientes con diabetes pregestacional²⁸ y la IR en la gestante no diabética revierten rápidamente después del parto⁴⁵

2.1.3 UNIÓN DE LA INSULINA A SU RECEPTOR

No hay datos concluyentes acerca de posibles alteraciones de la unión de la insulina al receptor, pero la mayoría de datos apuntan a que tampoco sería ésta la razón de la menor sensibilidad insulínica. Se han publicado datos sobre una disminución de la unión de la insulina a los adipocitos en gestantes comparados con no gestantes⁴⁶, lo que no corroboran otros estudios⁴⁷. En hepatocitos y en tejido muscular, tejidos en los que la captación de glucosa mediada por insulina es cuantitativamente más importante, tampoco se observan diferencias respecto a la situación de no embarazo⁴⁸.

Las modificaciones hormonales propias de la gestación no parecen tener un efecto significativo en esta unión⁴⁹.

2.1.4 ACCIÓN PERIFÉRICA DE LA INSULINA

Durante la gestación hay evidencia de resistencia a la acción de la insulina en el músculo. Así, en estudios experimentales en animales al

final del embarazo, se observa una reducción de la utilización de glucosa mediada por insulina superior al 40%⁵⁰, y las actividades enzimáticas implicadas en la glucólisis muscular están disminuidas⁵¹. La inhibición de la glucólisis muscular durante la gestación se ha atribuido a un aumento de ácidos grasos libres⁵².

No hay datos claros acerca de la sensibilidad hepática a la insulina durante la gestación. Algunos estudios muestran que, en términos absolutos, durante la gestación el hígado produce, en situación basal, mayor cantidad de glucosa que en pregestación, a pesar de una concentración de insulina basal ligeramente más elevada⁵³. Ello puede interpretarse tanto como una respuesta apropiada al aumento de la masa corporal como una disminución a la sensibilidad hepática a la insulina⁵⁰.

En cuanto al tejido adiposo, estudios en animales han mostrado una disminución de la captación de glucosa mediada por insulina en los adipocitos durante la gestación^{44, 54}.

2.2 DIABETES GESTACIONAL

La DG aparece como el resultado de una combinación de resistencia a la insulina y déficit relativo de secreción. Debido a que durante el embarazo la función de la célula β pancreática debe incrementarse, la DG aparece cuando la secreción de insulina no es suficiente para mantener la normoglucemia. En un pequeño porcentaje de casos, menos del 5%, la capacidad insuficiente de la célula β tiene un origen autoinmune⁵⁵ o se debe a una diabetes monogénica⁵⁶, pero en la mayoría de los casos existe una menor sensibilidad a la insulina, que ya

puede estar presente antes del embarazo, junto con una menor respuesta de la célula β , situación patogénica que es equiparable a la de la diabetes tipo 2.

Para contrarrestar la resistencia, el páncreas produce un aumento significativo de la secreción de insulina basal y estimulada con alimentos. En algunas ocasiones, la producción de insulina no es suficiente para contrarrestar el efecto bloqueador de las hormonas producidas por la placenta, en estos casos aparece DG. Esta situación se hace más evidente alrededor de la semana vigésimocuarta de embarazo.

2.2.1 SECRECIÓN DE INSULINA

En la DG no existe un déficit absoluto en la secreción de insulina, pero sí alteraciones cualitativas de la misma, habiéndose descrito los siguientes cambios:

- Insulinemia en ayuno casi el doble al final de la gestación en la gestante con normopeso^{34, 35}, incluso más alta en la DG acompañada de obesidad⁵⁷.
- Niveles de insulina tras sobrecarga oral de glucosa superiores al final del embarazo respecto al postparto^{35, 58}.
- Disminución de la secreción precoz tras la administración de glucosa oral: niveles inferiores en los primeros 15 minutos⁵⁹ y un pico de insulina tardío⁶⁰.
- Respuesta de insulina triplicada tras la administración de glucosa endovenosa en gestantes con DG⁶¹ mientras que se cuadruplica en gestantes no diabéticas⁶².

- Disminución de la secreción precoz de insulina tras la administración de glucosa endovenosa⁶³ sin encontrarse diferencias en la 2ª fase⁴⁹.
- Índice insulinogénico aumentado en el embarazo pero significativamente menor respecto a las gestantes sanas (40% vs 90% de incremento, respectivamente)³⁵.
- Respecto a las mujeres control, las mujeres con DG no presentan diferencias tras la administración de lípidos⁶⁴ o aminoácidos⁶⁵, pero sí se produce una respuesta inferior en la secreción de insulina tras la administración de proteínas^{57, 66}.

Buchanan describe un 25% de mujeres con DG sin alteraciones en la secreción o sensibilidad, lo que según el autor predice que no todas las mujeres tendrán alteraciones de la regulación de la glucosa en el futuro, formando ello parte de la heterogeneidad de esta enfermedad^{63,67}.

2.2.2 SENSIBILIDAD A LA INSULINA

En las mujeres con DG hay resultados controvertidos respecto a la sensibilidad a la insulina durante la gestación, con autores que describen una menor sensibilidad^{38, 68-70}, y otros que no encuentran diferencias⁶³, aunque ello depende del trimestre de la gestación en el que se realiza el estudio y probablemente del método utilizado. En el primer trimestre (12-14 semanas) el grupo de Catalano no observa diferencias respecto al grupo control, utilizando el clamp euglicémico-hiperinsulinémico; en el 2º trimestre, han descrito diferencias varios grupos^{39, 68}. En el tercer

trimestre, algunos autores no encuentran diferencias respecto a la población control⁶³, lo que contrasta con otros grupos³⁹.

Con la utilización de marcadores isotópicos se ha observado que las mujeres con DG recién diagnosticadas, tienen concentraciones de insulina 3-5 veces superiores a los controles, lo que sugiere una resistencia a la insulina significativa para el metabolismo de la glucosa y las proteínas⁷⁰.

En general, podemos considerar que no hay marcadas diferencias en la sensibilidad a la insulina durante el embarazo, lo que contrasta con los estudios realizados fuera de la gestación en que la mayoría describen diferencias respecto al grupo control.

Las diferencias de sensibilidad en las mujeres con DG no pueden atribuirse a diferentes concentraciones en los niveles de hormonas gestacionales ya que no se han encontrado diferencias en las concentraciones de prolactina, lactógeno placentario, estradiol, progesterona y HCG, ni en los de ACTH, cortisol, GH y IGF-1⁷¹ respecto al grupo control.

2.2.3 UNIÓN DE LA INSULINA A SU RECEPTOR

En las mujeres con DG no se encuentran diferencias respecto al grupo control: estudios en células hemáticas no encontraron diferencias en la unión insulina-receptor, ni siquiera en las mujeres con alteración de la tolerancia a la glucosa en el posparto^{72, 73}. En músculo esquelético de

mujeres con DG se ha descrito una disminución de la unión de la insulina a su receptor similar a la que presentan las gestantes control⁴⁸.

Posiblemente la causa de la IR en la gestación se encuentre a nivel posreceptor^{33, 68, 74}. Así, apoyando esta hipótesis, se han descrito eventos posreceptor alterados, como el descenso de la actividad tirosinquinasa⁷⁵ y disminución del número de transportadores de GLUT4 en adipocitos⁷⁶, y de la actividad tirosinquinasa en el músculo esquelético⁷⁷ de mujeres con DG.

2.2.4 ACCIÓN PERIFÉRICA DE LA INSULINA

En el músculo, en pacientes con DG, no se ha observado una disminución del contenido de GLUT4 muscular que justificara una mayor resistencia a la insulina en dicho tejido⁷⁶.

Se ha descrito resistencia hepática a la insulina, pero con poco impacto sobre la sensibilidad global a la insulina⁷⁸.

En adipocitos hay descrita una reducción del 60% del transporte de glucosa mediado por insulina⁷⁶.

Finalmente, y como resumen de estos resultados, podemos deducir que la gestación supone una situación de resistencia a la insulina (hepática y en tejido adiposo), probablemente causada por alteraciones postreceptor, debido a un aumento de las hormona asociadas a la gestación⁷⁹. Esta resistencia aumenta las demandas de insulina y puede resultar en una alteración de la tolerancia a la glucosa que en aquellas mujeres en que la respuesta de insulina no sea adecuada, dará lugar a

DG. Ambas alteraciones, IR y déficit relativo de insulina, se hallan presentes en sujetos con DM2⁸⁰, y ello concuerda con el hecho de que parte de estas mujeres desarrollen en un futuro una DM2.

3 FISIOPATOLOGIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

3.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

La aparición del oxígeno en la atmósfera constituyó un prerequisite para el desarrollo de las especies animales del mundo, incluido el hombre. La vida aeróbica depende de la combustión controlada para el suministro de energía, regulada por la maquinaria metabólica que puede ser dañada por reacciones oxidativas incontroladas asociadas con la producción de energía. A causa de la amenaza extrema de tal oxidación incontrolada, la vida aeróbica desarrolló un mecanismo complejo de sistemas antioxidantes para controlar estas reacciones y reparar o sustituir la maquinaria dañada. Al mismo tiempo, se desarrollan sistemas de enzimas que producen especies reactivas implicadas en la señalización biológica, reacciones de síntesis, defensa química, y funciones de desintoxicación, generando consecuencias beneficiosas y otras tóxicas.

Se define el estrés oxidativo (EO) como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros⁸¹, provocando una alteración del sistema redox y/o daño molecular⁸². La vida aerobia se caracteriza por una formación constante de prooxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a

los antioxidantes. En condiciones fisiológicas, las defensas antioxidantes son capaces de proteger contra los efectos deletéreos de los agentes oxidantes, pero en condiciones donde la formación de dichas sustancias está aumentada, o la defensa de antioxidante es ineficaz, se produce su acumulación, provocando daños a nivel tisular o incluso la muerte celular.

Se denominan radicales libres (RL) a todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, el cual necesita de otro electrón para poseer una configuración bioquímica y electromagnéticamente estable. Los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para eliminar este orbital incompleto, pero desestabilizan la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo desencadenar reacciones químicas en cadena en las células y tejidos.

Los radicales libres provienen e intervienen tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Tales reacciones pueden alterar la estructura y funcionamiento de moléculas biológicas importantes, como enzimas, fosfolípidos, proteínas ácidos nucleicos, etc., a veces irreversiblemente. Se ha calculado que un 2-5% del oxígeno consumido en el metabolismo normal se transforma en radicales libres, pero son normalmente inactivados por los mecanismos enzimáticos tisulares. Surge así la paradoja que el oxígeno, vital para la vida, puede generar metabolitos potencialmente tóxicos. Los radicales libres pueden ganar o entregar electrones con mayor facilidad y velocidad que los sistemas de óxido-reducción normales de los tejidos biológicos.

La terminología empleada para designar estas especies químicas presenta cierta confusión. En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno, (como el anión superóxido - $\cdot\text{O}_2^-$ - y el radical hidroxilo - $\cdot\text{OH}$ -) por este motivo muchos autores los llaman “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Estas dos denominaciones (RL y ROS) no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ROS no son radicales (como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso). Otros autores hablan de oxidantes. Por todas estas razones lo habitual es referirse indistintamente a los radicales libres, las especies reactivas de oxígeno o los oxidantes.

Existen también las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que derivan del metabolismo del óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). El óxido nítrico, debido al electrón desapareado que presenta en su orbital mas externo es por sí mismo un radical, pero además, en su metabolismo tienen lugar reacciones con el oxígeno molecular, ROS, metales de transición o tioles que darán lugar a la producción de RNS como el peroxinitrito (ONOO^-), trióxido dinitrógeno (N_2O_3), dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-), destacando entre ellas el primero por su alta reactividad. Por lo tanto, también existe el concepto de estrés nitrosativo, que se produce cuando existe una producción excesiva o desregulada de óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno que de él derivan. Esta situación puede ocurrir in vivo en distintas patologías, entre ellas las asociadas a procesos inflamatorios, neurotoxicidad, isquemia o durante la neurotransmisión que tiene lugar mediante la activación de receptores NMDA.

No se ha alcanzado un consenso respecto a cuál es el método más conveniente para el estudio clínico rutinario del estrés oxidativo. Una dificultad importante radica en que la mayoría no determina el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, pues se centran en los oxidantes y sus derivados o en los sistemas antioxidantes.

Por otro lado, a pesar de esta abundante evidencia científica, los grandes estudios de intervención con antioxidantes, no han conseguido a menudo demostrar mejoría en las enfermedades⁸³⁻⁸⁶.

Una clasificación simple divide los métodos de análisis en cinco tipos⁸². Éstos incluyen: enzimas antioxidantes, pequeñas moléculas antioxidantes, productos del balance antioxidante/ oxidante, los oxidantes (ROS y otros), y los productos resultantes del daño oxidativo. La investigación orientada hacia la enfermedad utiliza con más frecuencia el análisis del lado del oxidante, mientras que la investigación en nutrición se centra más a menudo en el lado antioxidante.

Además, el elevado número de sistemas antioxidante limitan la utilidad de los análisis antioxidantes para el estudio del estrés oxidativo bajo condiciones clínicas.

3.1.1 PAPEL FISIOLÓGICO

Los ROS son una importante herramienta defensiva antimicrobiana y antitumoral, también pueden actuar como mensajeros e inductores genéticos⁸⁷. El superóxido es capaz de interactuar con el factor de regulación derivado del endotelio, óxido nítrico^{88, 89}. Estos

radicales pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas, como por ejemplo las colagenasas⁹⁰. Todos estos procesos tienen un profundo efecto sobre la degradación de la matriz celular y parecen contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio⁹¹. También se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede intervenir en el proceso de la apoptosis⁹².

3.1.2 PAPEL PATOGENICO

Numerosas evidencias indican que las reacciones oxidativas contribuyen al envejecimiento y participan en procesos importantes de diversas enfermedades, incluyendo enfermedad cardiovascular⁹³, enfermedades pulmonares⁹⁴, diabetes⁹⁵, enfermedades neurodegenerativas⁹⁶, y cáncer⁹⁷. Estos radicales pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, pudiendo conducir a alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas DNA (provocando mutaciones) o lípidos de membrana (provocando su peroxidación) o proteínas (alterando actividades enzimáticas).

3.1.3 ORIGEN DE LOS RADICALES LIBRES

Los radicales libres y otras especies oxigenadas reactivas proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

- La cadena del transporte electrónico⁹⁸.
- Una excesiva actividad de la NADPH fagocitaria⁹⁹.
- La activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios¹⁰⁰.
- La deslocalización de metales de transición (Fe²⁺ y Cu⁺) de sus sitios de depósito¹⁰¹.
- La hiperactividad de la xantina oxidasa¹⁰².
- La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa¹⁰³.
- Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes¹⁰⁴.

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

- Radiaciones ionizantes¹⁰⁵.
- Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorios¹⁰¹.
- Acción de contaminantes ambientales (o xenobióticos) y fármacos¹⁰⁶.
- El exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en los que hay fenómenos de isquemia-reperfusion¹⁰⁷.

3.2 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

3.2.1 CONCEPTO

Este proceso consiste en el deterioro oxidativo de grasas, oxígeno dependiente, y sobre todo de los ácidos grasos insaturados.

Generalmente ocurre cuando el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es generado en la proximidad de las membranas celulares y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico o el docosaheptaenoico; dicho proceso está implicado en la patogénesis del daño hepático, en anemias hemolíticas y en lesiones pulmonares debidas a sustancias químicas terapéuticas y ambientales¹⁰⁸.

La reacción entre el radical hidroxilo y el lípido extrae el átomo de hidrógeno del doble enlace entre carbonos del lípido, y a la vez que se destruye el $\cdot\text{OH}$ se genera un carbono de tipo radical en el seno de la membrana, un radical. El O_2 reacciona con el radical lípido y origina radicales peroxilo y peróxidos lipídicos, propagándose la reacción. Los radicales peroxilo y peróxidos lipídicos se degradan originando malondialdehído, etano y pentano. El proceso finaliza cuando los radicales peroxilo y peróxidos lipídicos se reducen totalmente, bien reaccionando entre si, bien en presencia de antioxidantes.

Un $\cdot\text{OH}$ puede convertir cientos de ácidos grasos de la membrana en lípidos hidroperoxidados. Estos compuestos son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden a su vez iniciar nuevas cadenas de peroxidación. Es precisamente en la propagación del daño oxidativo donde radica la mayor importancia de los radicales libres.

Los mecanismos por los cuales la peroxidación de lípidos causa alteración celular son, básicamente, tres:

- La alteración de los lípidos de membrana puede hacer perder la función de esta y alterar los enzimas de la misma¹⁰⁹.

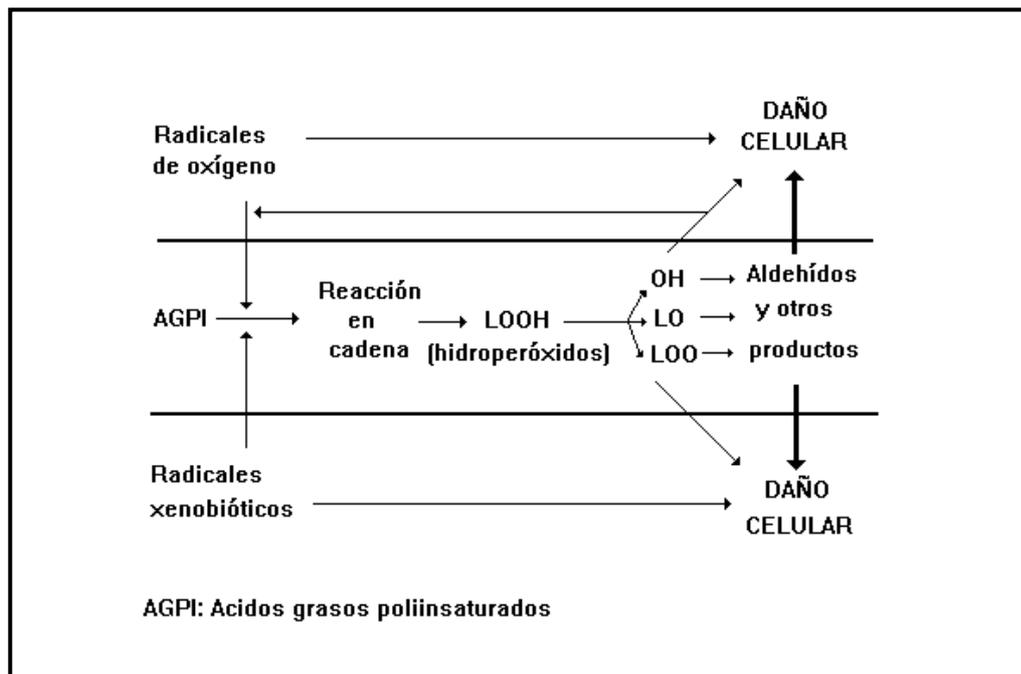
- Los radicales libres altamente reactivos que se generan en el proceso de peroxidación, pueden atacar e inactivar enzimas y otros constituyentes celulares.
- Por la degradación de los lípidos de la membrana, se pueden formar aldehídos reactivos y otros compuestos que son tóxicos por si mismos. Estos aldehídos tienen una vida media relativamente larga en comparación con los radicales libres reactivos, y pueden ser responsables de algunos efectos a larga distancia promovidos por la peroxidación de lípidos¹¹⁰.

La peroxidación de lípidos es un fenómeno que puede conducir a la muerte celular, pero también puede inducir la formación de intermediarios derivados de los lípidos.

3.2.2 PRODUCTOS DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Los efectos biológicos de estos derivados de la peroxidación de lípidos son muy variados, un ejemplo de esta variedad son los mediadores de la inflamación derivados del ácido araquidónico¹¹¹.

Figura 1. Esquema de mecanismos implicados en la lipoperoxidación¹¹²



Otro grupo de productos de la peroxidación lipídica, presentan efectos tóxicos en diferentes componentes de la célula, y son eliminados del tejido donde se han formado a través del torrente sanguíneo o por conjugación. Dentro de este grupo se incluyen una serie de aldehídos que actúan como “mensajeros tóxicos secundarios” modificando la acción de los radicales libres iniciales, ya que, estos aldehídos, al contrario de lo que le ocurre a los radicales libres, poseen una vida media mucho mayor y pueden por tanto difundir desde su lugar de producción y alcanzar y dañar células o tejidos situados a cierta distancia del punto donde se originó la situación de estrés oxidativo. El vehículo por el que circulan es la sangre. Además, estos aldehídos generados endógenamente pueden ser expresión de la magnitud del daño celular (figura 1).

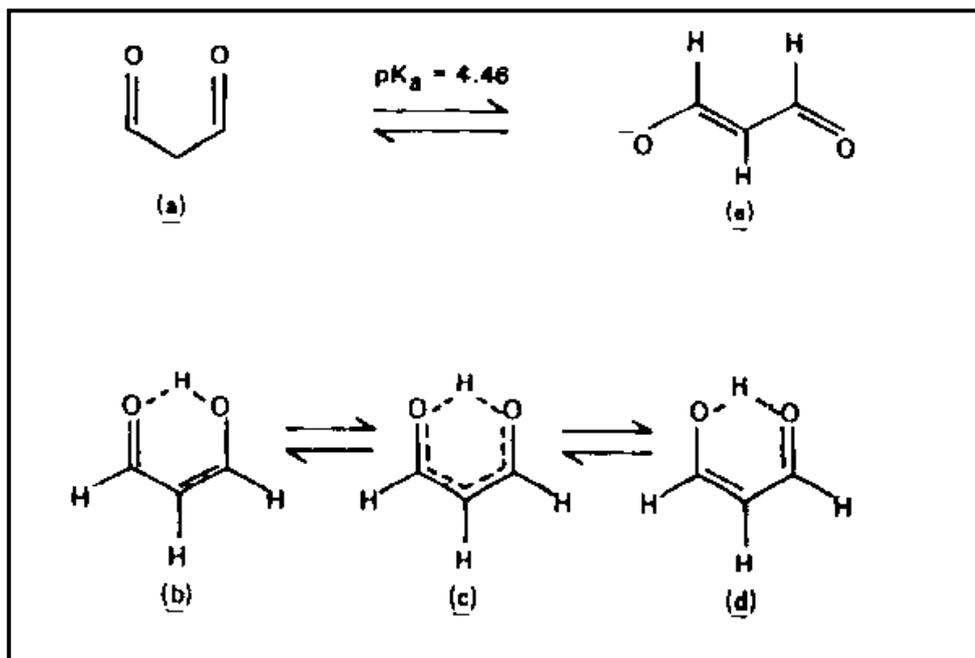
Entre los diferentes aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos, los más intensamente estudiados han sido el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos, en particular el 4-hidroxinonanal (HNE) y el 4-hidroxihexenal¹¹³.

3.2.3 MALONDIALDEHÍDO

El malondialdehído (MDA) es una molécula volátil, de bajo peso molecular (PM = 72,07), con un grupo 1,3-dicarbonilo siendo moderadamente ácido (figura 2). En solución y en fase gaseosa, el MDA está enteramente enolizado manteniéndose a través de un enlace de hidrógeno intramolecular un equilibrio entre dos formas asimétricas.

Resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del ácido araquidónico y el ácido docosaheptaenoico. Han sido varias las rutas hipotetizadas para esta formación^{114, 115}, pero todas implican una primera ciclación del ácido graso poliinsaturado originario, que tras sucesivos intermediarios, se rompe para formar, entre otros productos de degradación, el MDA. Dado que este compuesto es un producto final común de la peroxidación lipídica independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado, su determinación ha sido aceptada ampliamente como marcador de este proceso¹¹⁶.

Figura 2. Estructura química del MDA¹¹².



Desde que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos han sido implicadas causalmente en la patogénesis de algunas enfermedades humanas, la determinación de remanentes de la peroxidación de lípidos, como el MDA, en tejidos o fluidos humanos, ha recibido considerable atención. Hasta ahora se han utilizado diferentes técnicas que se basan en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico, al conjugado que se obtiene se le denomina TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). Sin embargo, en la determinación de este producto hay que tener en cuenta la técnica empleada. En un estudio de Esterbauer¹¹³ se puede observar como el nivel de remanentes de la peroxidación de lípidos (MDA o TBARS) en plasma de sujetos sanos puede variar según la técnica empleada desde 0 (indetectable) a 47,2 nmol/ml. El problema estriba en que el nivel de MDA o TBARS detectado por algunas técnicas proviene, además de la degradación de ácidos grasos

poliinsaturados, de la degradación de otros productos (como azúcares, aminoácidos, aldehídos, ácidos orgánicos...) ¹¹². La literatura señala a la determinación de MDA por HPLC como una de las más adecuadas para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica.

3.3 DEFENSA ANTIOXIDANTE

3.3.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA.

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato ¹¹⁷. El término “sustrato oxidable” incluye casi todo lo que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA.

La acción neutralizante de las enzimas o de los compuestos antioxidantes se debe a su capacidad de absorber la energía de los RL sin desencadenar efectos nocivos para los tejidos. Así, los aniones superóxido son normalmente neutralizados por la enzima superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la reacción que lleva a la formación de $O_2 + H_2O_2$. Este puede ser luego inactivado por acción de la catalasa y de la glutatión peroxidasa.

En algunas condiciones patológicas (isquemia, inflamación), la generación de RL puede estar incrementada, pudiendo sobrepasar la capacidad neutralizante de las enzimas habituales (SOD y catalasa), con

lo que el O_2 y el H_2O_2 pueden interactuar y generar radicales hidroxilo de alta reactividad y peligro.

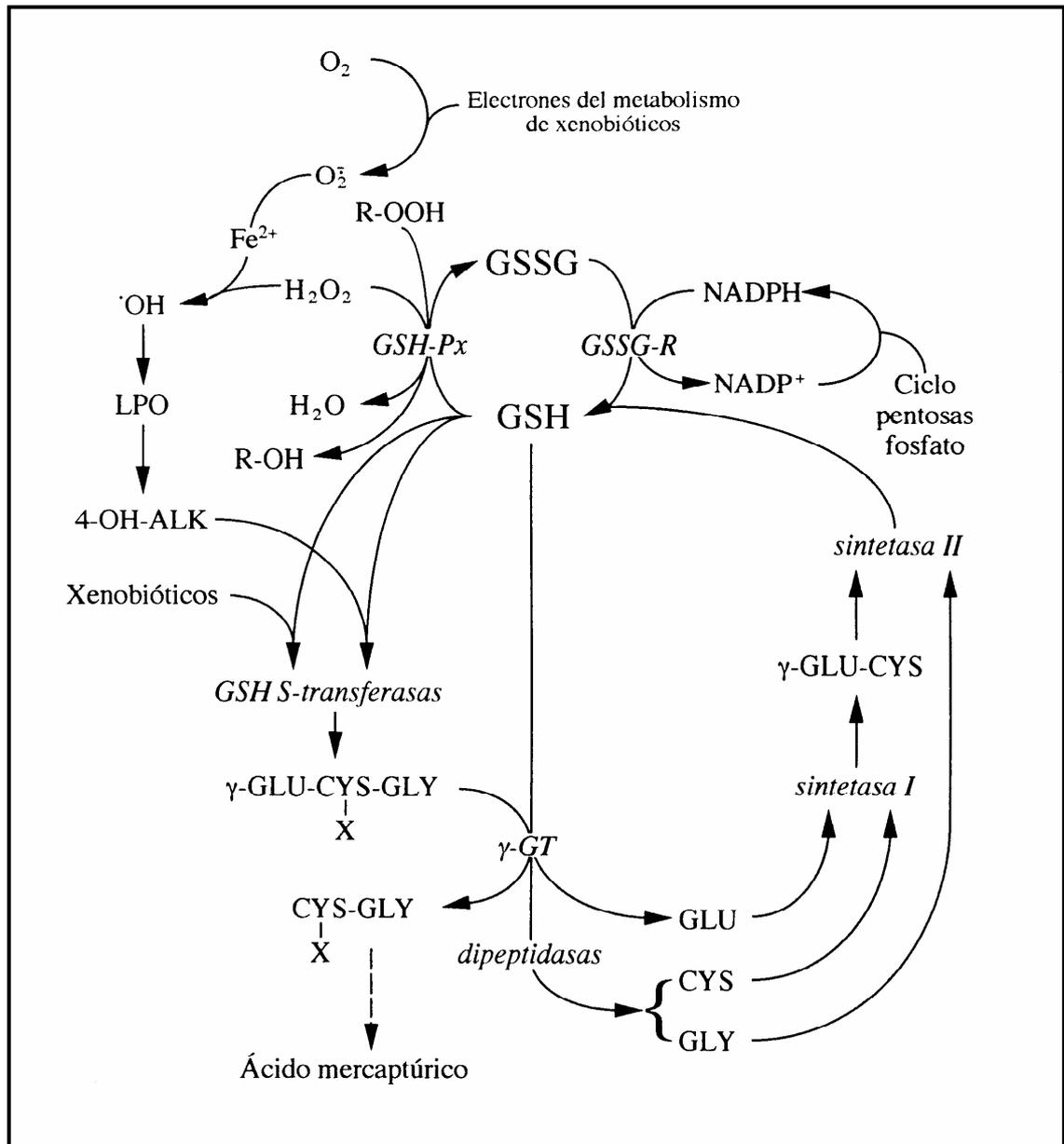
La desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno es uno de los requisitos para la vida aerobia, por lo que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante formado por recolectores y neutralizadores no enzimáticos que se llaman antioxidantes, proporcionados o no por la dieta (vitaminas C y E, glutatión, etc.), por las enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamadas así por inactivar directamente especies activadas de oxígeno (catalasa, SOD, GPx, etc.), y por las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, glutatión S-transferasa, etc)⁸¹.

Los procesos normales de defensa contra los radicales libres pueden ser incrementados con suplementación de antioxidantes exógenos, que pueden ser de diversa naturaleza química: enzimas, vitaminas, oligoelementos, proteínas, sustancias sintéticas como el alopurinol, etc.

3.3.2 SISTEMA GLUTATIÓN

Se denomina sistema glutatión (figura 3) al conjunto formado por el glutatión y los enzimas relacionados con su metabolismo, que son además responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas¹¹⁸.

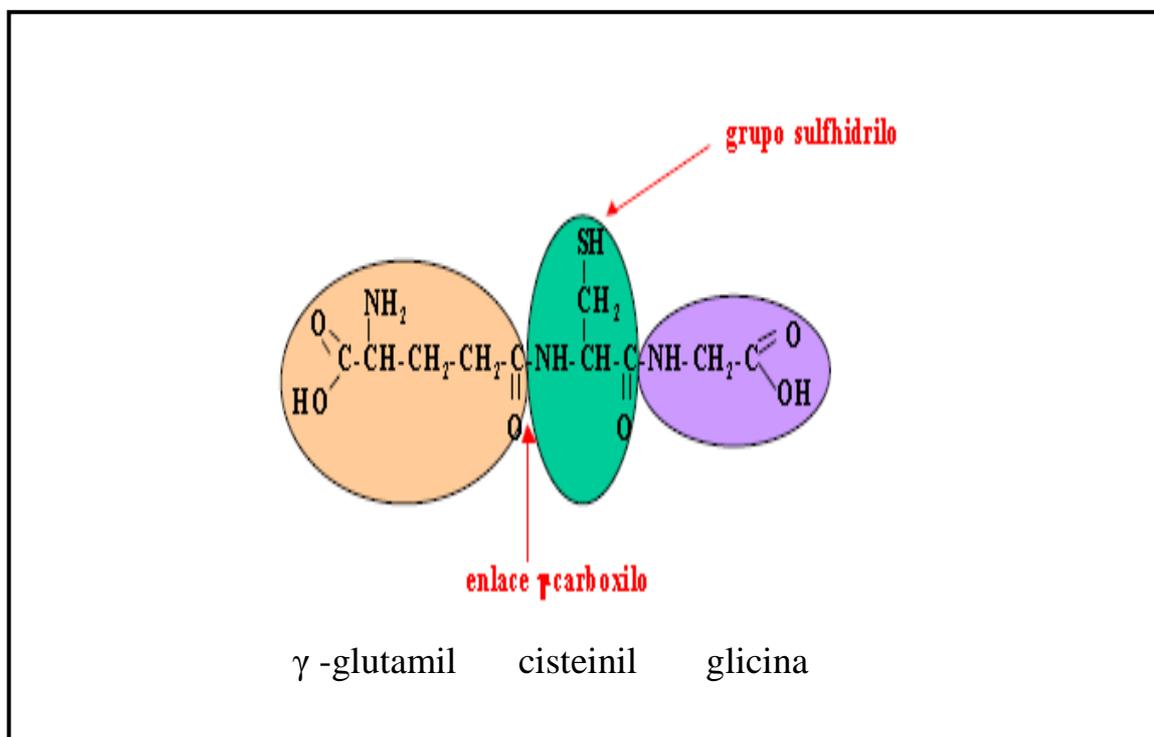
Figura 3. Representación del sistema glutatión



El glutatión es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina, figura 4), descubierto por Hopkins en 1921, de interesantes propiedades biológicas debido a dos de sus características estructurales:

- el enlace γ -glutamilo, que lo protege de la acción de las peptidasas y sólo puede ser degradado por la gamma-glutamyl-transpeptidasa
- la presencia de un grupo tiol libre (-SH) perteneciente a la cisteína. Gracias a éste, el glutatión es extraordinariamente reactivo para con las sustancias tóxicas o no, naturales o exógenas a la célula e incluso para consigo mismo¹¹⁸.

Figura 4. Estructura química del glutatión.



Aunque es un antioxidante muy extendido, la mayor parte del glutatión es sintetizado en el hígado. Es el tiol no proteico más abundante de prácticamente todas las células animales y juega un papel central en la defensa antioxidante: su presencia se puede explicar en función de su protección frente a la toxicidad del oxígeno¹¹⁹.

Se considera estado del glutatión al equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar¹²⁰. Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma disulfuro u oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. El término “estado” no implica unos valores constantes para el glutatión, sino que estos quedan supeditados a las alteraciones del sistema.

Las células eucariotas poseen tres reservorios principales para el GSH. Casi el 90% del GSH celular está en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplasmático. Mientras que en este último compartimento la proporción GSH/GSSG es de 3:1, en el citoplasma y la mitocondria este cociente sobrepasa la proporción 10:1^{118, 121}.

El GSH posee varias funciones vitales incluyendo la desintoxicación de electrófilos, el mantenimiento de los niveles esenciales de los tioles de las proteínas, inactivación de radicales libres, el mantenimiento de la integridad celular, protección frente a la peroxidación de lípidos, reservorio de cisterna y modulador de procesos celulares críticos como son la síntesis de DNA, los procesos relacionados con los microtúbulos, y la función inmune¹²². Centrándonos en su función antioxidante, el GSH en presencia de una GSH peroxidasa selenio-dependiente, reduce a los peróxidos producidos de manera endógena. Como resultado de esto, el GSH se oxida a GSSG, que es nuevamente reducido a GSH por la GSSG reductasa, a expensas del NADPH, formando así un ciclo redox.

En la mitocondria, que es un orgánulo especialmente susceptible al daño oxidativo, el GSH es particularmente importante debido a que en este compartimento no hay catalasa. Varios estudios han mostrado que el GSH mitocondrial es crítico en la defensa contra el estrés oxidativo generado tanto fisiológicamente como de forma patológica¹²³⁻¹²⁶. Se ha observado una reducción selectiva del reservorio de GSH mitocondrial en ratas alcohólicas y deficientes en vitamina A y este hecho puede jugar un papel patogénico importante en el desarrollo de alteraciones hepáticas^{125, 127}.

El estrés oxidativo severo puede superar la capacidad de la célula de reducir el GSSG a GSH, lo que conduce a una acumulación de GSSG en el citosol. Para proteger a la célula de un trastorno en el equilibrio redox, el GSSG puede exportarse activamente fuera de la célula o reaccionar con un grupo sulfhidrilo proteico, formándose un puente disulfuro entre estas dos moléculas. El estrés oxidativo intenso depleciona a la célula de GSH^{118, 124}.

3.3.3 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS RELACIONADAS CON EL GLUTATIÓN

El glutatión está relacionado con la actividad de algunas enzimas como:

A) Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa está representada por tres enzimas

1. Glutatió peroxidasa (GPx): es una enzima que contiene selenio, capaz de reducir el peróxido de hidrógeno a agua, y los peróxidos lipídicos a alcoholes no tóxicos. Es la forma más común de actividad

peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos.

La función de este enzima es proteger a las membranas celulares del daño oxidativo. El hígado por ejemplo, que es uno de los principales lugares para la detoxificación y está expuesto a altos niveles de oxidantes, posee una actividad elevada de glutatión peroxidasa. Los animales con deficiencias en selenio, presentan un descenso de la actividad de esta enzima¹²⁸.

2. Glutatión transferasa con acción peroxidasa: algunos isoenzimas de la glutatión S-transferasa también tienen actividad frente a hidroperóxidos orgánicos, mientras que no la tienen frente al peróxido de hidrógeno. Bajo condiciones de deficiencia de selenio en la rata, la glutatión peroxidasa está disminuida mientras que la actividad glutatión transferasa está aumentada¹²⁹.

3. Glutatión peroxidasa frente a fosfolípidos peroxidados: actúa sobre fosfolípidos peroxidados de membranas biológicas. Este enzima es una GPx de fosfolípidos hidroperóxidos, llamada PHGPx. Es un monómero y ha sido descubierta como una selenoenzima distinta de la clásica GPx basándose en su cDNA y secuencia aminoácida¹³⁰.

B) Actividad glutatión S-transferasa

Representa la actividad de un conjunto de enzimas muy versátiles que están envueltos en la detoxificación de multitud de compuestos, productos del metabolismo oxidativo¹³¹.

Las GSH S-Transferasas tienen actividad, entre otras, frente a:

- 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB): éste es un sustrato de amplio espectro para las transferasas, ya que presenta una actividad alta cuando para otros sustratos esta es mínima o inexistente.
- 4-hidroxinonenal (HNE): producto de la peroxidación de los lípidos y un sustrato natural de las GSH S-Transferasas, tal y como se mencionó anteriormente.

Las reacciones que catalizan este grupo de enzimas, suponen la inactivación de aquellas sustancias electrófilas que hayan podido acceder a las células desde el exterior (xenobióticos) o que aparecen como metabolitos finales o intermediarios de otros procesos celulares (endobióticos). Uno de estos xenobióticos es el paracetamol, cuya intoxicación puede producir un cuadro de fallo hepatocelular mortal y que está mediado por radicales libres. El único tratamiento eficaz contra este grave proceso es N-acetilcisteína, un derivado más estable del aminoácido cisteína que recarga las reservas de GSH. Esta familia de enzimas es muy versátil y presenta una afinidad muy grande para el glutatión, y en menor medida para los otros sustratos de la reacción.

C) Actividad glutatión disulfuro reductasa

El glutatión disulfuro formado en las reacciones de peroxidación se reduce por acción del NADPH mediante una reacción catalizada por la glutatión reductasa. Por tanto esta enzima mantiene el estado reducido del glutatión, necesario a su vez para muchos procesos de detoxificación celular.

D) Actividad gamma glutamil transpeptidasa

Es una enzima del catabolismo del glutatión que cataliza la transferencia del grupo gamma glutamilo. Normalmente está asociada a la membrana celular y orientada con su sitio activo hacia el exterior. Constituye el paso extracelular del ciclo del gamma-glutamilo¹¹⁸.

Además, supone el siguiente paso de la vía de degradación de los conjugados formados por la reacción de las glutatión S-transferasas, y que conduce a la formación de compuestos más hidrosolubles: los ácidos mercaptúricos.

4 DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO.

4.1 ¿ESTÁ EL ESTRÉS OXIDATIVO AUMENTADO EN LA DIABETES?

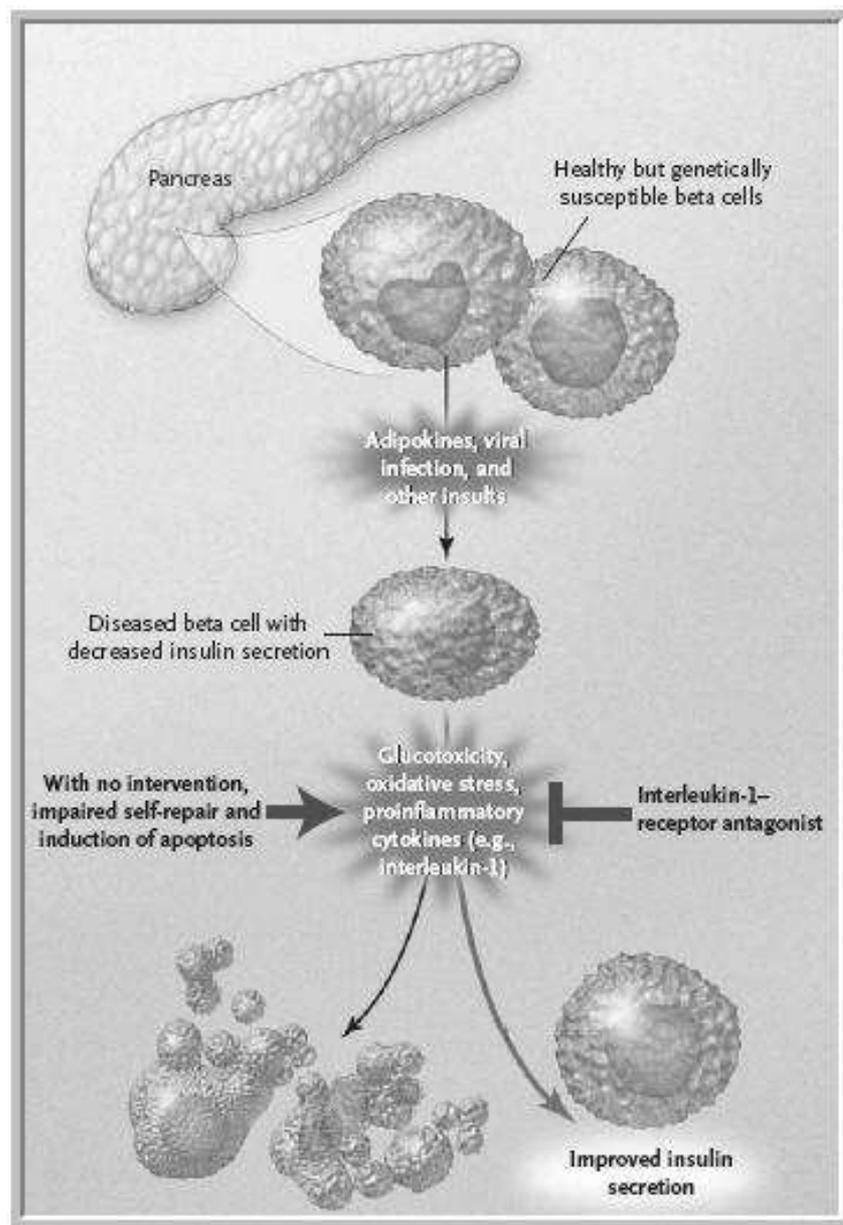
Las evidencias que relacionan el estrés oxidativo y la Diabetes Mellitus tienen más de 30 años¹³²⁻¹³⁴. El papel del estrés oxidativo en la etiología de la diabetes fue reconocido en los años 80, cuando estreptozocina y aloxana fueron utilizados en animales para inducir la diabetes^{135, 136}. En la década siguiente se sugiere que un aumento en la producción de radicales libres o una disminución de defensas antioxidantes está implicado en la patogénesis de la diabetes¹³⁴.

Para dilucidar estas y otras cuestiones son necesarios estudios que revelen si el estrés oxidativo ocurre antes de la aparición de la diabetes y sus complicaciones, y que la terapia antioxidante no sólo disminuye los

indicadores de estrés oxidativo sino que también disminuye las complicaciones de la diabetes.

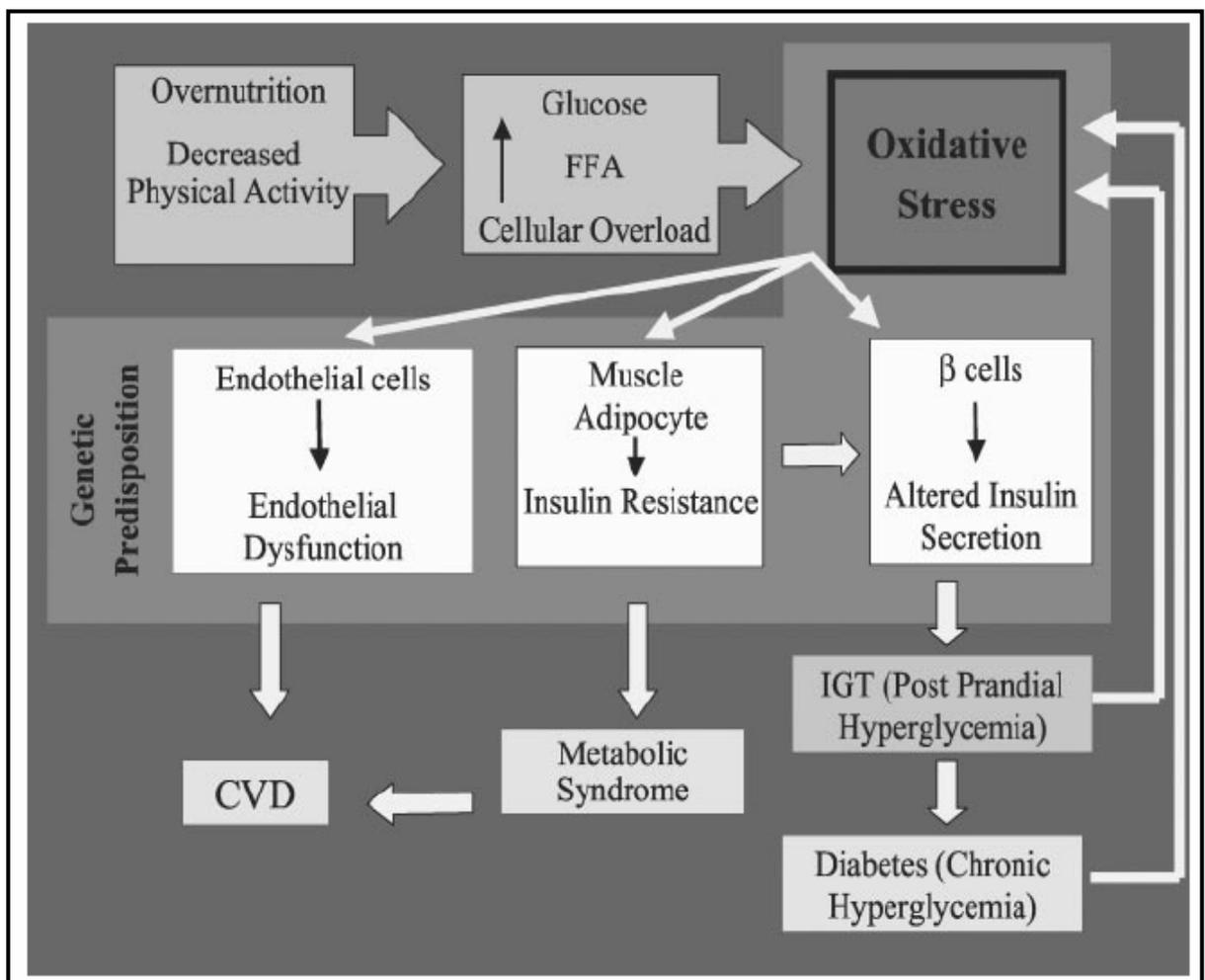
Recientemente se ha propuesto la siguiente hipótesis para explicar el desarrollo de la diabetes (figura 5): la célula beta recibe una agresión de tipo desconocido hasta la fecha (¿infección viral, citoquinas...?), se desconoce si esta agresión es la misma para la diabetes tipo 1 y 2, pero conduce a diferentes respuestas posiblemente debido a variaciones en la susceptibilidad genética. Se acepta actualmente que una lesión de tipo inmune contra la célula beta pancreática conduce a la DM1, mientras que una agresión diferente y no filiada conduce a la DM2. Una vez que las células beta están dañadas, tienen lugar unos procesos similares en los dos tipos de DM: glucotoxicidad, estrés oxidativo y citoquinas citotóxicas provocan más daño, que puede acabar en la muerte de la célula beta si el proceso no es reparado por el organismo o mediante intervenciones terapéuticas¹³⁷.

Figura 5. Hipótesis a cerca del desarrollo de la diabetes¹³⁷



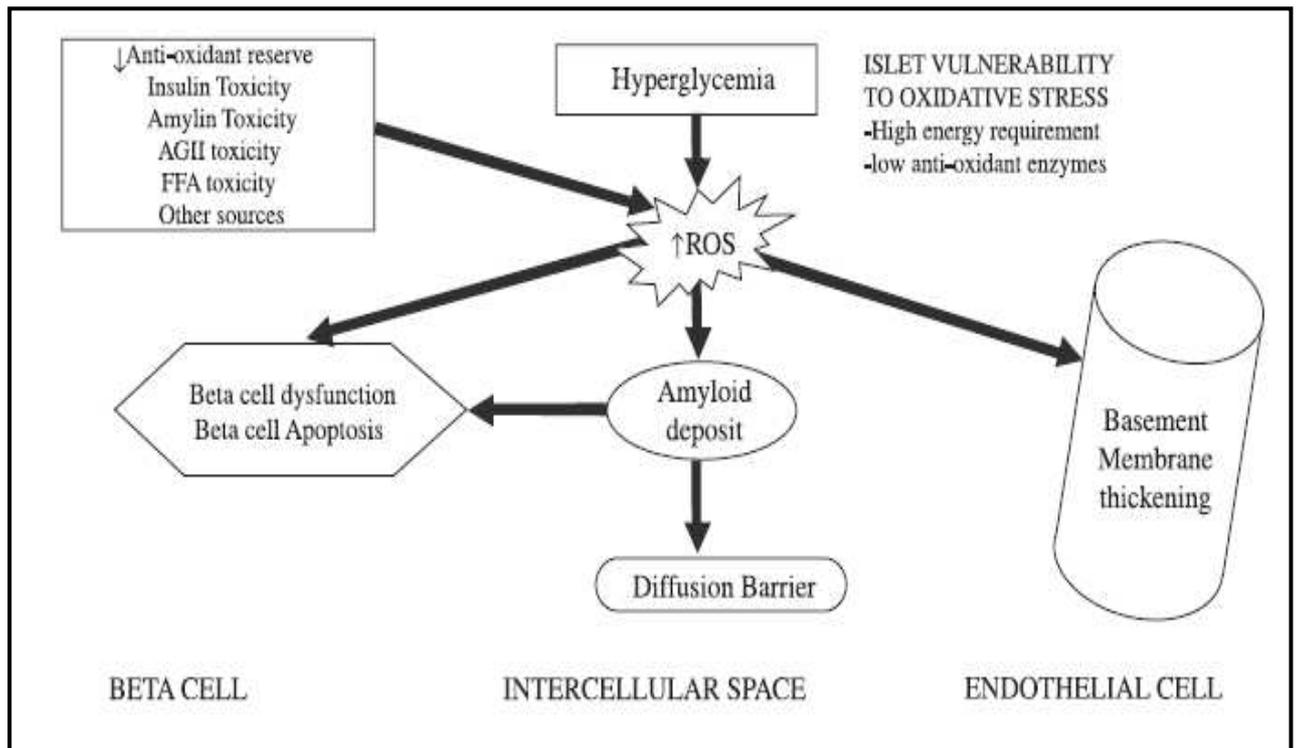
Otra hipótesis actual refiere que el estrés oxidativo, a través de un mecanismo de producción de superóxido, es el factor patógeno común que conduce a la resistencia de insulina, disfunción de la célula beta, tolerancia alterada a la glucosa y en última instancia a la diabetes tipo 2 (figura 6) ¹³⁸. Además este mecanismo se ha implicado en el origen de las complicaciones micro-y macrovasculares de la DM¹³⁹. Es posible que las terapias que ayuden a reducir el EO puedan beneficiar a los pacientes con DM2 y a los sujetos con riesgo para desarrollar esta enfermedad.

Figura 6. Papel del estrés oxidativo en la patogénesis de la diabetes, el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares ¹³⁸



Simoneau y otros, en 1995, demostraron la relación entre disfunción mitocondrial y diabetes¹⁴⁰. Desde entonces, las investigaciones han sugerido el papel del estrés oxidativo y de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la diabetes tipo 2, asociándola con el retraso del crecimiento intrauterino^{141, 142}. En el retraso del crecimiento intrauterino, los bajos niveles de oxígeno disminuyen la actividad de la cadena transportadora de electrones, generando la producción de los radicales libres¹⁴³, provocadores de daño de DNA, proteína, y mitocondrias, y disminuyendo la producción energética¹⁴². Esta disfunción mitocondrial tiene efectos nocivos en la célula beta, que tiene una alta necesidad energética y depende de la producción normal del adenosín trifosfato (ATP) para su proliferación y secreción de la insulina¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Otra razón para la elevada vulnerabilidad de la célula beta se debe a la baja expresión de enzimas antioxidante en islotes pancreáticos^{149, 150}. Además, hay muchas evidencias que señalan como los radicales libres inducen inhibición de la liberación de insulina mediada por glucosa, apoptosis, y disminuyen la expresión de genes en la célula beta¹⁵¹⁻¹⁵⁴ (figura 7).

Las evidencias sugieren que la disfunción mitocondrial puede conducir al estrés oxidativo por varias vías o mecanismos¹⁴². Los estudios en animales con Retraso del Crecimiento Intrauterino han demostrado que las mitocondrias del músculo presentan descenso crónico de la producción del ATP, causando compromiso en el transportador GLUT-4 de la glucosa, alterando la captación de glucosa en la superficie de la célula, el transporte de la glucosa, y la síntesis del glucógeno. Todo esto conduce a la resistencia a la insulina y a la hiperglucemia propias de la diabetes tipo 2¹⁵⁵.

Figura 7. Efectos del estrés oxidativo en la célula beta pancreática¹⁵⁴

4.2 EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS COMPLICACIONES DE LA DIABETES.

Aunque hoy en día se sabe que la hiperglucemia es una causa principal de las complicaciones de la diabetes y que un estricto control de la glucemia está firmemente relacionado con la prevención y/o mejoría de estas complicaciones, no se sabe cual es el mecanismo por el que este exceso de glucosa acaba produciendo daño en los tejidos.

En el origen de estas complicaciones se implican diversos mecanismos, y se ha sugerido que el estrés oxidativo puede ser el nexo

común que liga estos mecanismos a la patogénesis de las complicaciones diabéticas¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ .

Hay distintos mecanismos que conducen al estrés oxidativo como consecuencia de la hiperglucemia, como son la disminución de los niveles de antioxidantes, la síntesis de prostanoïdes, la vía poliol, la autooxidación de la glucosa, la glicación proteica, las interacciones entre los productos avanzados de la glicación (AGE) y sus receptores (RAGE), la producción de radicales libre, descenso de las defensas antioxidantes^{159, 160}, activación de la proteínquinasa C, y la vía de la hexosamina¹³⁹ . En la figura 8 se presenta la posible relación entre el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia, la consecuente activación del factor NF-κB y el desarrollo de complicaciones en los pacientes con Diabetes Mellitus¹⁶¹ .

Además, todos estos posibles mecanismos están relacionados unos con otros, dando lugar a un “circulo vicioso”. La autooxidación de la glucosa, catalizada por ciertos metales, como el hierro y el cobre, genera radicales libres. La formación de radicales libres acelera la formación de los AGEs, que a su vez produce más radicales libres¹⁶² . La unión de los AGEs a sus receptores está asociada a la activación y traslocación nuclear del factor κB^{163, 164} . La reducción de la glucosa a sorbitol por la aldosa reductasa oxida NADPH, afectando directamente a la defensa antioxidante¹⁶⁴ . La acumulación de sorbitol produce estrés osmótico que conduce al estrés oxidativo a través de la disminución de glutatión y otros antioxidantes.

El tratamiento con inhibidores de la aldosa reductasa corrige la disminución de glutatión^{163, 165}. En algunos tejidos diabéticos, pero no en todos, la activación de la vía de la aldosa reductasa conduce a la activación de la PKC¹⁶⁵.

Se ha visto que la GPx está disminuida en neuropatía diabética experimental en ratones tratados con aloxana 7-21 días después de la inducción de la diabetes¹⁶⁶. El ácido lipóico se ha usado en el tratamiento de la neuropatía diabética tanto en modelos animales como en modelos humanos en ensayos clínicos¹⁶⁷.

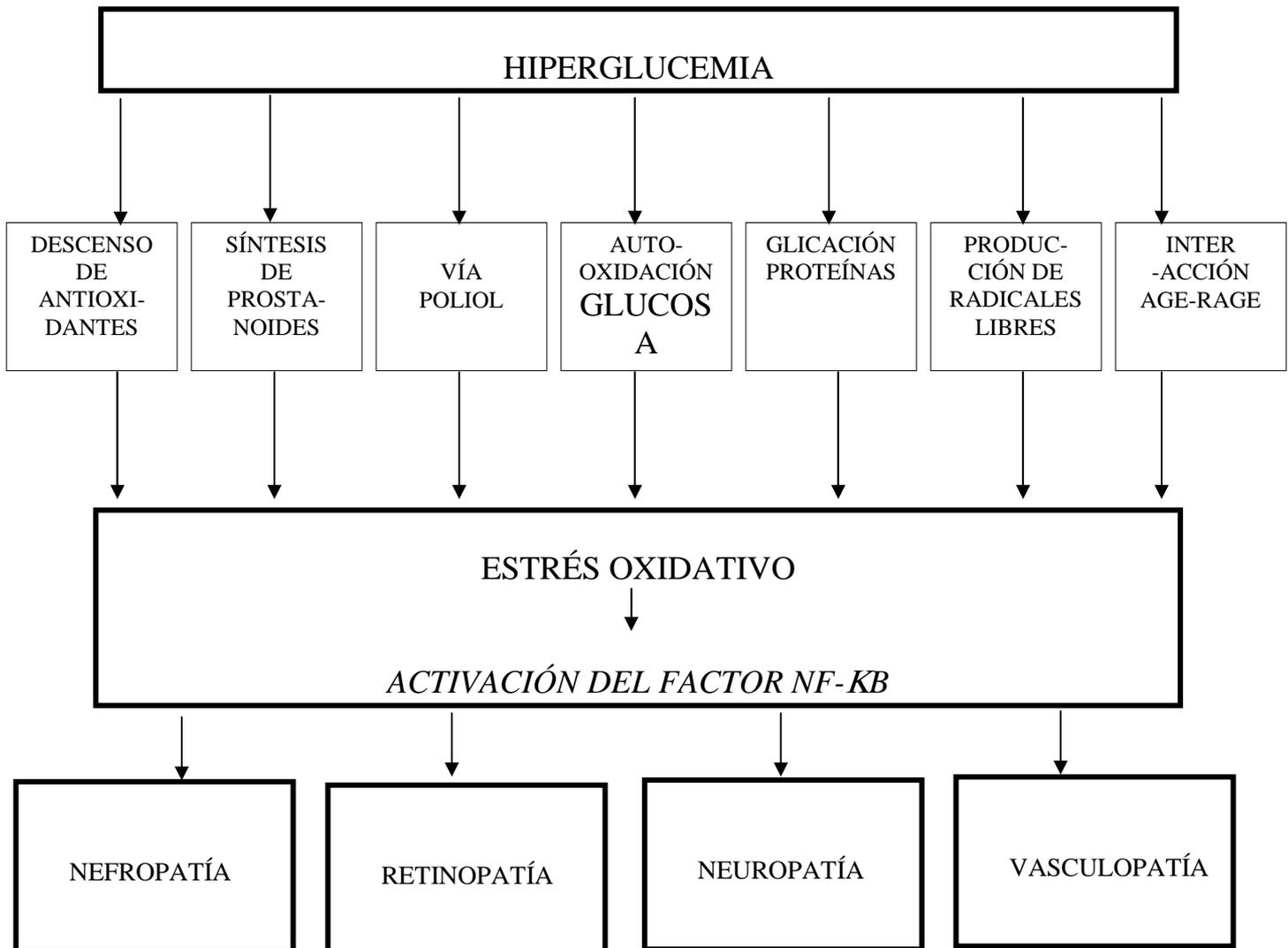
Otros estudios han señalado que el tratamiento con vitamina E puede tener efectos beneficiosos en la protección frente a las complicaciones vasculares de pacientes diabéticos¹⁶⁸. Haffner¹⁶⁹ ha sugerido que uno de los factores de riesgo que puede explicar la mayor tasa de enfermedad coronaria en pacientes diabéticos tipo 2 es el aumento en el estrés oxidativo que presentan estos pacientes.

Estos procesos oxidativos también causan disfunción endotelial que realza el desarrollo y la progresión de las complicaciones diabéticas^{154, 170}. Además, hay una relación establecida entre la diabetes y la enfermedad vascular¹⁷¹. Varios ensayos clínicos han establecido que el control glucémico a largo plazo es un predictor independiente de las complicaciones vasculares diabéticas (DCCT, UKPDS y otros).¹⁷²⁻¹⁷⁴

El conjunto de estos datos resalta la relación entre la diabetes y el desequilibrio entre la producción de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidante. Hay necesidad de continuar explorando la relación entre los radicales libres, la diabetes, y sus complicaciones, y aclarar los

mecanismos por las cuales el aumento del estrés oxidativo acelera el desarrollo de complicaciones diabéticas, en un esfuerzo por conseguir nuevas moléculas terapéuticas y para racionalizar el uso de los actuales fármacos ¹⁷⁵ (figura 8).

Figura 8. Posibles mecanismos que conducen al estrés oxidativo¹⁶¹



5 GESTACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

5.1 GESTACIÓN NORMAL: ESTRES OXIDATIVO Y ESTADO ANTIOXIDANTE

El embarazo se caracteriza por cambios dinámicos en múltiples sistemas provocando una alta demanda de energía, un aumento en los requerimientos de oxígeno y cambios en los sustratos energéticos de los diversos tejidos, incluida la unidad feto-placentaria. La fase anabólica del inicio de la gestación produce cambios metabólicos que favorecen la lipogénesis con almacenamiento de grasas, preparándose para la fase catabólica del final del embarazo, en el cual se da un rápido crecimiento fetal¹⁷⁶. El embarazo se caracteriza por un LDL-colesterol normal o incluso bajo al inicio de la gestación, y presencia de hipertrigliceridemia hacia el final del embarazo^{177, 178}. La insulínresistencia fisiológica de la segunda mitad del embarazo incrementa la lipólisis en el tejido adiposo, aumentando el flujo de ácidos grasos hacia el hígado, promoviendo la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y aumentando la trigliceridemia. Al mismo tiempo, la insulínresistencia reduce la actividad de la lipoprotein-lipasa, enzima responsable del aclaramiento plasmático de VLDL. Además, los remanentes de VLDL en el plasma finalmente conducen al acúmulo de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La elevación de LDL se asocia con el incremento de los hidroperóxidos de lípidos en gestación normal^{179, 180}. Así, al igual que la diabetes tipo 2, puede ocurrir un aumento de la susceptibilidad de las partículas LDL a sufrir peroxidación, y originar un desequilibrio entre LDL-oxidadas y defensas antioxidantes (como la vitamina E).

Además, la placenta es rica en mitocondrias, hemomonocorial (una única capa de células coriónicas separan circulación materna y fetal, favoreciendo el intercambio de gases, nutrientes y productos metabólicos), y muy vascularizada, con una alta tasa metabólica: cuando está completamente desarrollada consume un 1% del metabolismo basal de la gestante. Así, con el aumento del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial se produce un aumento de la generación de ROS en el embarazo normal. Esta respuesta fisiológica, en presencia de metales de transición, contribuye al daño de DNA, lípidos y proteínas por la acción de ROS. De esta forma, el embarazo es una condición en la que aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo.

Aunque el papel fisiológico del estrés oxidativo durante el embarazo sano está aún poco investigado, los estudios de marcadores de circulación materna sugieren que en el embarazo hay más estrés oxidativo, y que la placenta es la fuente de éste^{181, 182}. En el embarazo sano, es posible que el sistema antioxidante sea capaz de compensar mediante inducción y aumento de actividad de las enzimas antioxidantes la protección contra los radicales libres y su eliminación^{179, 183-185}, no obstante es posible que un desequilibrio favorezca el desarrollo de hipertensión gestacional o mayor resistencia a la insulina que conduzca al desarrollo de Diabetes Gestacional.

Muchos estudios han comparado los marcadores del estrés oxidativo en mujeres gestantes sanas y en mujeres no gestantes. La mayoría indican más estrés oxidativo en gestación que en mujeres no embarazadas^{179, 183, 186, 187}. Los resultados sugieren que los niveles de

MDA y peroxidación lipídica en eritrocitos o plasma son generalmente mayores durante el segundo trimestre y al final de la gestación^{183, 188-190}, aunque en ocasiones se han descrito descensos hacia el tercer trimestre¹⁸⁸; también se han encontrado elevadas concentraciones de 8-isoprostano salivar (pero no en plasma) en el segundo trimestre¹⁹¹. Inversamente, los niveles de actividad antioxidante (SOD y GPx en eritrocitos o plasma) y sus sustratos (selenio, glutatión) están habitualmente disminuidos^{189, 190, 192}.

Durante el final de la gestación, se han descrito valores muy variables de las actividades de SOD y GPx en eritrocitos y plasma, aumentados, disminuidos o sin cambios^{184, 185, 192, 193}. En un estudio prospectivo epidemiológico con 408 gestantes no diabéticas y normotensas, la actividad GPx eritrocitaria había aumentado un 15% entre el primer y tercer trimestre¹⁹³, confirmando estudios previos¹⁸⁸, posiblemente en respuesta al aumento de O_2^- . Pero otros dos estudios^{189, 192} encuentran que la actividad GPx en plasma y eritrocitos desciende gradualmente con la gestación.

Numerosos estudios han comparado marcadores de peroxidación lipídica en mujeres con embarazos sanos frente a gestaciones complicadas por diversas enfermedades, por lo general con una única muestra^{183, 194, 195}. Los estudios observacionales longitudinales durante el embarazo son escasos y los resultados conflictivos^{184, 185, 192, 196}. Por ejemplo, Patrick¹⁹⁶ no ha encontrado cambios a lo largo de la gestación en niveles de MDA plasmático con cinco muestras durante el embarazo, mientras que Carone¹⁸⁴ y Loverro¹⁸⁵ describen aumentos de TBARS eritrocitario en el tercer trimestre comparado con el primer trimestre.

Varios factores potenciales pueden contribuir a los resultados contradictorios. Primero, es posible que haya un aumento insuficiente del sistema antioxidante para compensar el aumento del estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, esto puede explicar los niveles reducidos de antioxidantes detectados en algunos estudios^{189, 192}. Segundo, las concentraciones de lípidos circulantes maternos y el volumen plasmático pueden influir en el valor de los marcadores^{179, 196, 197}. Por ejemplo el aumento de los lípidos maternos puede potencialmente inducir peroxidación lipídica; la expansión del volumen plasmático puede disminuir la concentración de enzimas antioxidantes y de otros elementos, pero la contracción del volumen puede tener efecto contrario. Tercero, muchos estudios se realizaron con muestras pequeñas (n=10-20) y con sangre de diferentes etapas de la gestación, y en diferentes condiciones (ayuno o postprandial). Son necesarios estudios longitudinales con muestras grandes para recoger información del inicio y los cambios a lo largo la gestación.

5.2 DIABETES GESTACIONAL: ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTADO ANTIOXIDANTE.

En pacientes con diversas enfermedades que complican el embarazo se han encontrado marcadores elevados de estrés oxidativo^{191, 194}. Chen¹⁹³ en un estudio prospectivo de 408 gestantes sanas encuentra que la actividad GPx en eritrocitos en la semana 16 y 30 se correlaciona positivamente con marcadores de insulínresistencia, sugiriendo una relación entre resistencia de insulina y defensa antioxidante en mujer gestante no diabética¹⁹³. No obstante, aunque la correlación está

presente, aún está por aclarar si la relación entre diabetes y estrés oxidativo es causal^{159, 198, 199}.

En cambio, la relación de la Diabetes Gestacional y el estrés oxidativo es un área poco habitual investigación. Varios estudios *in vitro* han usado tejido placentario para medir estrés oxidativo después del diagnóstico de Diabetes Gestacional^{182, 200-202}. Coughlan et al¹⁸² encontraron que la liberación de 8-isoprostano por la placenta es dos veces mayor en mujeres con Diabetes Gestacional (n=12) que en gestantes sanas. El mismo autor también describe que la placenta de mujeres con Diabetes Gestacional expuesta a sustancias generadoras de superóxido (xantina y xantino oxidasa), tiene una respuesta reducida al estrés oxidativo²⁰⁰. De forma semejante, Lappas²⁰¹, muestra de la placenta, grasa y tejido muscular incubados liberan más 8-isoprostano en mujeres con Diabetes Gestacional (n=8) que en gestantes control sanas (n=6).

Algunas evidencias sugieren que el estrés oxidativo en la Diabetes Gestacional se acompaña de alteraciones en la capacidad antioxidante^{180, 192, 203, 204}. Kamath²⁰³ recoge eritrocitos maternos inmediatamente después del parto y encuentra que la actividad proteolítica, un indicador de oxidación proteica, está aumentado en mujeres con Diabetes Gestacional (n=20), y el MDA eritrocitario es mayor en Diabetes Gestacional pero sin diferencia significativa. Peuchant²⁰³ describe, entre la semana 26 y 32 de gestación, que el MDA eritrocitario y plasmático materno está aumentado y la actividad GPx disminuida en Diabetes Gestacional (n=16) así como también en diabetes tipo uno. No obstante no hay diferencia en GPx eritrocitario y plasmático, actividad catalasa, o

TBARS durante el tercer trimestre (n= 3)¹⁹⁴. Toescu¹⁸⁰ presenta un estudio longitudinal por trimestres, y encuentra que los lípidos plasmáticos y los lípidos hidroperoxidados están elevados en cada trimestre en mujeres con DM1, DM2, y DMG comparado con gestantes control, mientras la capacidad antioxidante está significativamente descendida. Datos epidemiológicos también apoyan la relación entre el descenso plasmático de vitamina C y el aumento del riesgo de presentar Diabetes Gestacional²⁰⁵.

El nivel de control glucémico materno se ha correlacionado con diversos marcadores de estrés oxidativo en Diabetes Gestacional: MDA eritrocitario con Hemoglobina A1c²⁰³, y 8-isoprostano en placenta con glucemia materna a las dos horas del test de tolerancia oral a la glucosa¹⁸².

El descenso de la defensa antioxidante señalado en los pocos estudios amplios de mujeres con Diabetes Gestacional puede reflejar una respuesta protectora frente al estrés oxidativo existente²⁰³. No está claro si el nivel de control glucémico en Diabetes Gestacional se asocia con la severidad del estrés oxidativo como ocurre en diabetes tipo dos²⁰⁶.

Se desconoce si los suplementos antioxidantes o la comida rica en antioxidantes pueden mejorar el estrés oxidativo en Diabetes Gestacional. Basándonos en los efectos positivos de datos preliminares en DM2, es posible que la suplementación con vitamina C v E pueda aumentar la capacidad antioxidante y reducir la inflamación

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

Las evidencias basadas en marcadores circulantes y en muestras de placenta indican que durante la gestación normal hay un aumento de estrés oxidativo; los cambios descritos en actividades de enzimas antioxidantes son contradictorios, y pueden estar influenciados por la semana gestacional, por el método empleado, o por el reducido tamaño de la muestra.

Los datos disponibles en Diabetes Gestacional sugieren que hay un aumento del estrés oxidativo, generalmente acompañado por una respuesta antioxidante insuficiente, apuntando la implicación del estrés oxidativo en la patogénesis de la Diabetes Gestacional.

Se desconoce si los suplementos antioxidantes pueden mejorar el estrés oxidativo en diabetes y aunque los resultados preliminares son controvertidos, los suplementos antioxidantes podrían mejorar la acción de la insulina y reducir el nivel de peroxidación lipídica en diabetes.

La hipótesis principal de este estudio es que el EO está implicado en el inicio y progresión de la Diabetes Gestacional, por lo que llevamos a cabo un estudio longitudinal en gestantes.

OBJETIVOS:

1. Valorar los niveles de MDA en suero de gestantes sanas y gestantes con DG. Estudiar el papel del daño oxidativo en la patogénesis y desarrollo de la DG.
2. Valorar los niveles de GPx en suero de gestantes sanas y gestantes con DG. Estudiar la posible implicación en la patogénesis y desarrollo de la DG.
3. Valorar el control glucémico y lipídico en suero de gestantes sanas y gestantes con DG mediante la determinación bioquímica de elementos clásicos. Analizar su relación con los marcadores de estrés oxidativo.
4. Valorar la capacidad predictiva en la DG de los marcadores de estrés oxidativo.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

1 PROTOCOLO DEL ESTUDIO

1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se planteó un estudio observacional, prospectivo, de dos cohortes: gestantes sanas sin DG (controles) y gestantes con DG sin otras enfermedades asociadas (casos), de edades entre 18-45 años.

Para obtener la población necesaria se contó con la colaboración del personal (comadronas y médicos) del Servicio de Ginecología y Obstetricia, y de los laboratorios del Centro de Especialidades y Hospital Marina Alta de Denia, correspondiente al Área 12 de la Consellería de Sanitat, comarca Marina Alta (Alicante).

Se obtuvieron muestras de sangre del 1º trimestre de gestación de un total de 808 embarazadas: 126 mujeres (15,5%) completaron el seguimiento durante toda la gestación, y 72 no presentaron ninguna enfermedad asociada (HTA, asma... etc), distribuyéndose del siguiente modo: 36 mujeres en el grupo control y 36 pacientes en el grupo con DG. Se descartaron pacientes con cualquier enfermedad así como fumadoras (solo se incluyeron 2 casos con consumo de 1-2 cigarros ocasionalmente). Ninguna de las mujeres tiene antecedentes de hiperglucemia pregestacional ni durante el 1º trimestre de gestación. Todas pertenecían a la raza caucásica.

Todas las mujeres fueron atendidas en el Servicio de Obstetricia del mismo área, y firmaron un consentimiento informado.

Las pacientes con DG fueron remitidas a la Unidad de Diabetes (Servicio Medicina Interna) del Hospital Marina Alta (Denia, Alicante) El periodo de estudio abarca desde noviembre 2001 hasta julio 2004.

Todas las mujeres recibieron el mismo tratamiento farmacológico según el protocolo vigente en aquellas fechas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia:

- ACFOL Comp. 5 mg® (Italfarmaco S.A., Alcobendas, España,): 1 comprimido al día durante el 1º trimestre

Composición por comprimido	
Acido fólico 5 mg	Lactosa 60 mg

- FERRO-GRADUMET Comp. filmtab 325 mg®, (Teofarma Ibérica S.A., Barcelona, España): 1 comprimido al día durante el 1º trimestre

Composición por comprimido	
Sulfato ferroso 525 mg	E124 y otros excipientes c.s.

- Calcinatal comprimidos®, (Pfizer Consumer Healthcare, Alcobendas, España): 1 comprimido al día durante toda la gestación.

Composición por comprimido	
Retinol acetato (Vitamina A), 1.250 UI	Colecalciferol (Vitamina D), 400 UI
Tiamina clorhidrato (Vitamina B1), 5 mg	Riboflavina (Vitamina B2), 2 mg
Piridoxina, clorhidrato (Vitamina B6), 10 mg	Nicotinamida (Vitamina PP), 15 mg
Cianocobalamina (Vitamina B12), 5 mcg.	Acetato de alfa tocoferol (Vitamina E), 5 mg
Ácido fólico, 75 mcg	Ácido ascórbico (Vitamina C), 50 mg
Pantotenato de calcio, 3 mg	Calcio, 100 mg
Fósforo, 30 mg	Hierro, 1,83 mg
Cobre, 0,19 mg	Manganeso, 0,02 mg
Estroncio, 0,14 mg	Zinc, 0,02 mg
Iodo, 0,21 mg	Magnesio, 4,52 mg
Molibdeno, 0,04 mg	Flúor, 0,12 mg
Excipientes: Sacarosa, 108,30 mg. Almidón, goma arábiga, azúcar, gelatina, esencia de fresa, esperma de ballena, carbonato cálcico, talco, color rosa, etanol al 96%, eter etílico, polietilenglicol 4.000, ibergum.	

Se extrajo, al menos, una muestra para analítica cada trimestre, que se utilizó para las determinaciones bioquímicas de esta tesis.

La confidencialidad de los datos se garantizó mediante el número de historia clínica del Hospital y las iniciales de las pacientes, para facilitar el nuevo acceso a la historia en caso de ser necesaria una revisión.

1.2 CONTROLES: GESTANTES SANAS

Estas mujeres siguieron el protocolo habitual de Control Básico del Embarazo en la Comunitat Valenciana (Consellería de Sanitat)²⁰⁹. Se inicia el control por la comadrona desde que se conoce el test de gestación positivo, generalmente antes de la 12ª semana gestacional; se realizan visitas programadas mensuales y a demanda. Para el seguimiento por el obstetra se programa una visita trimestral.

Se pauta dieta normocalórica para gestante y ejercicio regularmente (pasear 30 minutos, 7 días a la semana), de forma similar a la gestante con DG.

La finalización y la asistencia al parto de las gestantes sanas se adapta a las circunstancias particulares de cada caso, siguiendo los criterios generales para gestante sana.

1.3 CASOS: GESTANTES CON DG.

Todas las pacientes con DG se diagnosticaron en la semana gestacional 24-28, de acuerdo con los criterios citados que se explican a continuación. Además acudieron a los controles obstétricos indicados en protocolo de Control Básico del Embarazo en la Comunitat Valenciana (Consellería de Sanitat)²⁰⁹.

1.3.1 DESPISTAJE Y DIAGNÓSTICO

Todavía persisten controversias acerca del despistaje y diagnóstico de la DG; en la mayoría de los casos esta enfermedad es asintomática, y solo puede ser detectada por estudios bioquímicos. La estrategia

diagnóstica aplicada es “en 2 pasos”: se debe realizar test diagnóstico a las mujeres con despistaje positivo.

1.3.1.1 DESPISTAJE

El protocolo de despistaje de DG en las mujeres gestantes utilizado en el hospital durante el periodo de estudio se basa en las recomendaciones del Grupo Español de Diabetes y Embarazo²¹⁰ (constituido por la Sociedad Española de Diabetes, Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, y Asociación Española de Pediatría) que recomiendan aplicar el 3º Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus⁸ y los criterios de la National Diabetes Data Group²¹¹, no habiéndose adoptado los del 4º Workshop⁹ a raíz de los estudios realizados por el grupo español²¹²: con los criterios del 4º Workshop puede haber un incremento en la prevalencia del 31,8 % pero sin incremento sustancial de resultados adversos por DG, por lo que en España no es necesario cambiar los criterios diagnósticos. Cuando se redacta esta tesis ya se ha celebrado el 5º Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus²¹³.

Los participantes en el 3º Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus⁸ recomiendan que toda mujer gestante se someta a un test de despistaje (TD) inicial para clasificar su tolerancia a la glucosa, y si es patológico se continúa el estudio con un test diagnóstico mediante la práctica de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) de 100 g (estrategia en 2 pasos).

El estudio del riesgo de DG debe valorarse desde la primera visita prenatal. Las mujeres de alto riesgo para DG deben someterse al TD (ver abajo) tan pronto como sea posible. Este grupo de mujeres incluye a las siguientes:

- edad ≥ 35 años,
- obesidad (índice masa corporal ≥ 30 kg/m²),
- antecedentes personales de DG u otras alteraciones del metabolismo de la glucosa,
- antecedentes familiares de DM en familiares de primer grado,
- resultados obstétricos previos que hagan sospechar una DG no diagnosticada (por ejemplo, macrosomía).

Si el estudio es negativo, debe repetirse entre la semana 24 y 28 de gestación. Las mujeres no incluidas en el grupo de alto riesgo, deben realizar el TD en la 24-28 semana gestacional (despistaje universal).

Las gestantes que no han sido estudiadas en el 2º trimestres, deben realizarlo en el 3º trimestre y actuar en consecuencia; y aquellas gestantes en las que el estudio resultó negativo en el 2º trimestres pero posteriormente desarrollan complicaciones que característicamente se asocian a DG (macrosomía fetal o polihidramnios) deben someterse a una PTOG de 100 g; en estos casos se obvia la prueba de despistaje.

1.3.1.2 DIAGNOSTICO

Los criterios diagnósticos para la población general también son de aplicación en las mujeres gestantes: dos glucemias plasmáticas en

ayunas ≥ 126 mg/dl, en días diferentes, o al azar ≥ 200 mg/dl, ratifican el diagnóstica de DG, y eliminan la necesidad de realizar una PTOG.

En ausencia de estos grados de hiperglucemia, la evaluación de la DG se realiza con la estrategia explicada anteriormente y recomendada por el 3° Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus y el Grupo Español de Diabetes y Embarazo (figura 9): realizar un test de despistaje inicial determinando la glucemia plasmática 1 hora después de una sobrecarga oral de glucosa con 50g. Este despistaje se realiza a cualquier hora del día y sin tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la última comida. Si la concentración de glucosa en plasma es ≥ 140 mg/dl, debe efectuarse una prueba diagnóstica: PTOG con 100g de glucosa y determinación de glucemias horaria hasta 3 horas (tabla 2). La PTOG se realiza después de una noche en ayuno de 8-14 horas y tras 3 días de una dieta no restrictiva en hidratos de carbono (aporte diario carbohidratos superior a 150 g, y un total de 2000 kcal/día), la mujer permanece sentada y sin fumar. La determinación de glucosa con tiras reactivas y reflectómetros no se recomienda para el test de despistaje de 50g ni para la PTOG de 100g, ya que la precisión de este método es relativamente baja en comparación con los análisis estándares de laboratorio.

Los criterios diagnósticos de la prueba con 100g se basan en el trabajo original de O'Sullivan y Mahan⁷, modificados por Carpenter y Constan²¹⁴, y que se muestran en la tabla 2. Alternativamente, puede realizarse con una sobrecarga de 75g, midiendo la glucemia basal, y tras

1 y 2 horas; no obstante, este test no ha sido bien validado para la detección de los riesgos de la descendencia o de la madre.

Figura 9. Estrategia diagnóstica de DG.

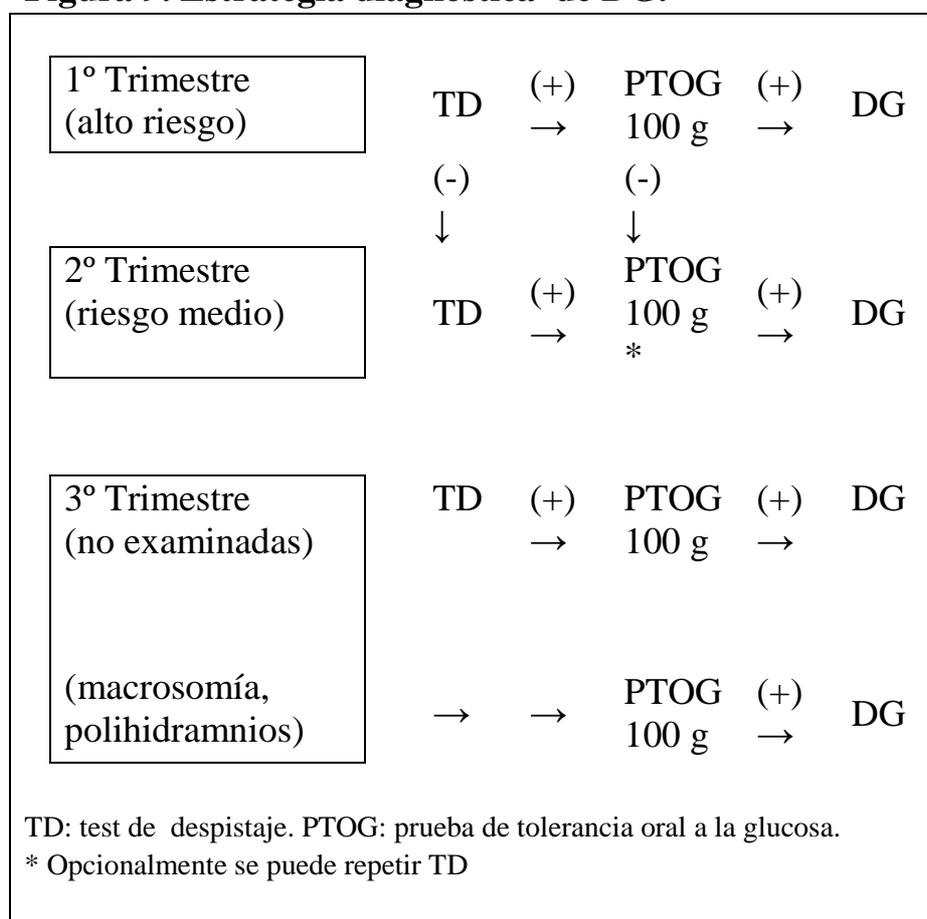


Tabla 2. Criterios para el diagnóstico de DG con PTOG 100 g²¹¹

	Momento del análisis			
	En ayunas	1 h	2 h	3 h
Glucosa plasmática (mg/dl)	105	190	165	145

La Diabetes Gestacional se diagnostica si se alcanza o supera el umbral en un número de parámetros ≥ 2 . Una PTOG con un valor alterado, se repetirá a las 3 semanas.

1.3.2 CONTROL DURANTE EL EMBARAZO

Todas las pacientes con DG acudieron a clases de educación diabetológica, impartidas por la misma enfermera, con el objetivo de informar sobre su diagnóstico, el manejo terapéutico, las posibles consecuencias sobre la salud fetal, y el seguimiento posparto.

Se sometieron a autocontroles glucémicos cada 2 días inicialmente (4 veces al día: en ayunas, y 1 hora tras desayuno, comida y cena), seguido de controles cada 3 días cuando se verificaba un buen control. Se realizaron visitas quincenales para monitorizar el control metabólico.

Una vez efectuado el diagnóstico de DG las pacientes iniciaron el tratamiento lo antes posible.

1.3.2.1 TRATAMIENTO DIETÉTICO

La dieta es el pilar fundamental del tratamiento²¹⁵. Las recomendaciones dietéticas son similares a las establecidas para la diabetes en general, adecuando la dieta a las necesidades de la gestación y al peso de la paciente, dividiéndola en 6 comidas/día. La dieta pautaada fue normocalórica²¹⁶ (30 kcal/kg/día, habitualmente 1800-2000 Kcal.), excepto en las embarazadas con obesidad (índice masa corporal > 30 kg/m²) en las que se puede indicar una cierta restricción calórica²¹⁷ (24 kcal/kg/día, y en gestantes con obesidad mórbida 12 kcal/kg/día), evitando la aparición de cetonuria. El reparto de los diversos principios

inmediatos, en cuanto al aporte calórico global, guarda las siguientes proporciones: carbohidratos 40-50 % (con un mínimo de 200 g al día); proteínas 20 %; grasas 30-40 %. Debe asegurarse un adecuado aporte de fibra (1 g por 100 kcal), hierro (18 mg/día), ácido fólico (800 mg/día), calcio (1200 mg/día) y yodo (100-200 µg/día). Es conveniente distribuir el aporte calórico en diferentes comidas a lo largo del día, aproximadamente de la siguiente forma: desayuno 15%, a media mañana 5%, comida 35%, merienda 10%, cena 30% y al acostarse, el 5%; de esta manera se evitan periodos largos de ayuno durante el día.

1.3.2.2 EJERCICIO FÍSICO

Se recomienda la práctica de ejercicio físico moderado de forma regular, habitualmente un paseo de 30 minutos diarios, 7 días a la semana. Se recomienda comenzar lentamente y detenerse ante la primera señal de cansancio.

1.3.2.3 AUTOMONITORIZACIÓN

Los objetivos del control metabólico, mediante glucemia capilar (reflectómetro Glucometer Ascensia Elite), son:

- Glucemia basal: 95 mg/dl
- Glucemia postprandial (1 hora): 140 mg/dl
- Glucemia postprandial (2 horas): 120 mg/dl

1.3.2.4 TRATAMIENTO ADICIONAL

Cuando a pesar del establecimiento de la dieta y el ejercicio no se consiguen los objetivos del control metabólico, será necesario añadir tratamiento adicional. También podrá valorarse en el caso de macrosomía fetal o polihidramnios sugestiva de hiperinsulinismo intraútero. Por otra parte, puesto que la glucemia materna no es un predictor impecable de la macrosomía fetal, se ha propuesto la utilización de la circunferencia abdominal fetal entre las semanas 29 y 33 de gestación para iniciar el tratamiento con insulina²¹⁵.

Aunque hay estudios que describen resultados perinatales satisfactorios en gestantes con DG tratadas con glibenclamida²¹⁸, la insulina es el fármaco que ha demostrado de forma más consistente la reducción de la morbilidad materno-fetal cuando se añade al tratamiento nutricional. Respecto al tipo de insulina a utilizar, es de elección la insulina humana. Sin embargo, varios estudios apoyan tanto la seguridad como la eficacia del análogo de insulina aspart y lispro en la gestación. La administración de insulina está indicada en aquellas gestantes que presentan en una semana, en 2 o más determinaciones, glucemias por encima de los objetivos arriba citados. La posología se ajusta a las necesidades de la paciente, usándose un programa insulínico funcional (bolus-basal) con insulina regular preingestas y/o insulina NPH nocturna, con una dosis inicial de 0,1-0,2 UI/kg/día. Posteriormente según el perfil de las glucemias, se ajusta la pauta insulínica en dosis, número de inyecciones, zona de inyección o intervalo de administración-ingesta; solo hubo un caso con indicación, usándose insulina NPH (0,10 UI/kg/día) en la cena desde la semana 32 hasta el parto.

1.3.3 CONTROL EN PARTO Y POSPARTO

La finalización y la asistencia al parto no difiere de las gestantes sin DG. La DG no es por si misma una indicación de cesárea ni de parto provocado antes de la semana gestacional 38. Los objetivos de control glucémico intraparto son los de mantener la glucemia entre 70 y 100 mg/dl, para lo que es necesario determinar la glucemia capilar, y ocasionalmente el uso de insulina intravenosa. En general, la vía vaginal es la recomendada para el parto, sea espontáneo o inducido, siempre que no existan contraindicaciones absolutas, pues se ha comprobado que el trabajo del parto acelera la maduración pulmonar. Los cuidados del recién nacido difieren de los establecidos en las gestantes sin DG, en la necesidad de prevenir, detectar y tratar la hipoglucemia neonatal.

Tras el parto se suspende el tratamiento y se realizan controles glucémicos iniciales para confirmar la situación metabólica. Es necesario conocer si la alteración metabólica se ha resuelto, para ello debe realizarse una PTOG con 75 g, al menos 6 semanas tras el parto, tras 3 días de dieta no restringida en hidratos de carbono². Se recomienda revisión anual en los casos de glucemia basal alterada o de intolerancia a la glucosa, y cada 3 años en las situaciones de tolerancia normal. La recurrencia de la DG en embarazos posteriores se cifra en un 35-55%. La DG constituye un marcador de prediabetes para la madre, dada la frecuencia de desarrollo posterior de DM tipo 2 y síndrome metabólico. En los niños que han sido gestados intraútero en un ambiente metabólico hiperglucémico, existe a largo plazo una mayor propensión al desarrollo de obesidad, alteraciones del metabolismo hidrocarbonado e incluso síndrome metabólico en el adulto.

2 APARATOS Y MÉTODOS

A las mujeres participantes se les realizaron dos tipos de determinaciones bioquímicas en sangre periférica:

- Determinaciones convencionales para la valoración del estado metabólico llevadas a cabo en los Laboratorios del Centro de Especialidades y Hospital Marina Alta, utilizando los mismo aparatos.
- Determinaciones emergentes para la valoración del estado oxidativo. Estas pruebas bioquímicas se realizan mediante técnicas especiales que en la actualidad sólo se utilizan con fines experimentales. Fueron protocolizadas, puestas a punto y realizadas por personal del Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Universidad Cardenal Herrera-CEU, que posee el equipamiento necesario para todas estas determinaciones.

2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS

Se obtuvieron muestras de sangre antecubital por enfermeras especializadas en los centros de salud, en cada trimestre, a las 8:00 horas, mediante tubos Vacuum, estando las mujeres en condiciones de ayuno de un mínimo de 8 horas.

Los tubos fueron manipulados cuidadosamente y procesados el mismo día en los laboratorios de análisis clínicos de los centros

participantes, para determinar en muestras de suero la bioquímica convencional y los valores del estado oxidativo, y en muestras de sangre total la hemoglobina glicosilada y el hemograma.

La bioquímica convencional y el hemograma se determinaban a diario. El resto de la muestra individualizada fue almacenada en forma de suero a 4°C para ser transportada en nevera portátil para muestras biológicas hasta el laboratorio de investigación, donde se depositaron en criotubos identificados individualmente para cada paciente y trimestre, y éstos a su vez en cajas especiales para almacenamiento a -70° C, hasta realizar los ensayos del estado oxidativo y antioxidante.

2.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS CONVENCIONALES

Las determinaciones bioquímicas se realizaron con el sistema Multicalibrador OLYMPUS AV2700 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH (Irish Branch), Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland).

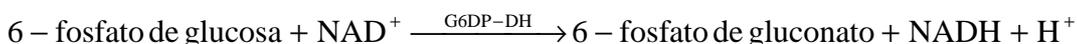
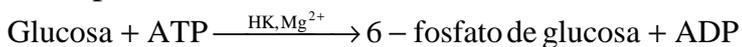
La Hemoglobina glicosilada se determinó por el sistema MENARINI ADAMS A1C-HA-8160, ARKRAY, Kyoto, Japón.

El hemograma se determinó con el sistema Analizador de Hematología ADVIA 2120 (Bayer Health Care)

2.2.1 GLUCOSA

El analizador OLYMPUS AU2700 determina la concentración de glucosa mediante el método de la hexocinasa²¹⁹: la glucosa se fosforila con hexocinasa en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) e iones de magnesio para producir glucosa-6-fosfato y difosfato de adenosina (ADP). La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) oxida específicamente el 6-fosfato de glucosa y produce 6-fosfato de gluconato con la correspondiente reducción de NAD⁺ a NADH. El aumento de la absorbancia hasta 340 nm es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Principio de la reacción:



2.2.2 COLESTEROL TOTAL

El reactivo Olympus Colesterol utiliza un método enzimático para cuantificar el colesterol en plasma y sueros humanos²²⁰. En dicho procedimiento, los ésteres de colesterol de una muestra se hidrolizan con colesterol esterasa (CHE). El colesterol libre resultante se oxida con oxidasa de colesterol (CHO) y se transforma en colesterol-3-uno, produciéndose simultáneamente peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que se combina oxidativamente con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de peroxidasa (POD), para dar lugar a un cromóforo. El colorante de quinoneimina roja que se forma puede cuantificarse

espectrofotométricamente a 540/600 nm como un incremento de la absorbancia.

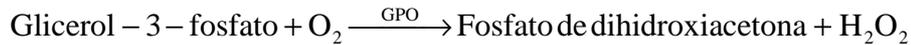
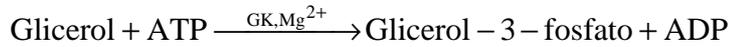
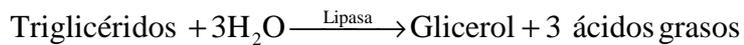
Principio de la reacción:



2.2.3 TRIGLICÉRIDOS

Este procedimiento se basa en una serie de reacciones enzimáticas combinadas²²¹. Los triglicéridos de la muestra se hidrolizan combinando lipasas microbianas para obtener glicerol y ácidos grasos. El glicerol se fosforilara con trifosfato de adenosina (ATP) en presencia de glicerolcinasasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato. Este glicerol-3-fosfato se oxida mediante oxígeno molecular en presencia de oxidasa de glicerolfosfato (GPO) para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y fosfato de dihidroxiacetona. El H₂O₂ permite combinar oxidativamente el p-clorofenol y 4-aminoantipirina (4-AAP) catalizada con peroxidasa (POD) para obtener un colorante rojo con una absorbancia máxima de 500 nm. El aumento de la absorbancia hasta 520/600 nm es proporcional al triglicérido contenido en la muestra.

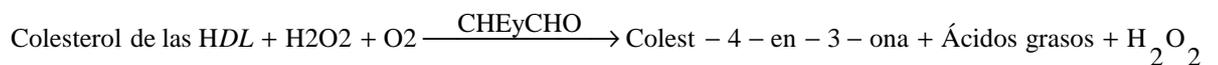
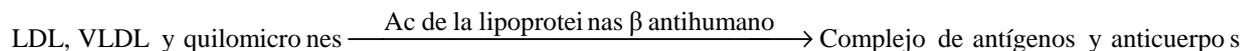
Principio de la reacción:



2.2.4 HDL COLESTEROL

Principio de la prueba: el anticuerpo de la lipoproteína β antihumano en R1 se enlaza con lipoproteínas diferentes de las HDL (LDL, VLDL y quilomicrones). Los complejos de antígenos y anticuerpos que se forman bloquean las reacciones enzimáticas cuando se añade R2. El colesterol de las HDL se cuantifica mediante la presencia de un sistema cromógeno enzimático.

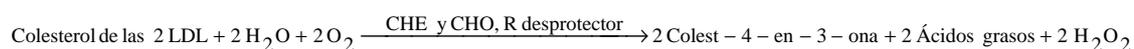
Principio de la reacción:



2.2.5 LDL COLESTEROL

Principio de la prueba²²²: un agente protector incorporado al R1 impide que las reacciones enzimáticas afecten a las LDL. Todas las lipoproteínas que no sean de baja densidad (HDL, VLDL, CM) se degradan por reacción con la esterasa de colesterol (CHE) y con la oxidasa de colesterol (CHO). El peróxido de hidrógeno resultante (PDO) de esta reacción se descompone por efecto de la catalasa del R1. Al agregarse el R2 se libera el reactivo protector contenido en las LDL y la ácido sódica desactiva la catalasa. Con ello ya es posible utilizar el sistema CHO/PAP para cuantificar las LDL.

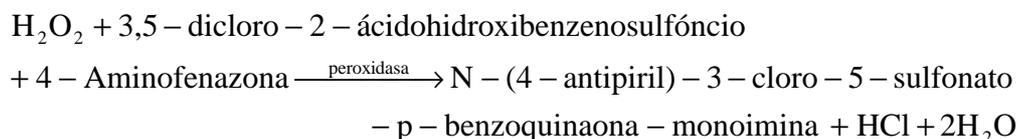
Principio de la reacción Fase R2:



2.2.6 ÁCIDO ÚRICO

Principio de la reacción²²³: la uricasa transforma el ácido úrico en alantoina y en agua oxigenada. La reacción de Trinder permite cuantificar el H₂O₂. El H₂O₂ que se obtiene reacciona con el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico y con el 4-aminofenazone en presencia de peroxidasa, para producir una quinona-imina de coloración rojo-violácea que da una lectura dicromática de 520/660 nm. La cantidad de colorante producido es proporcional a la concentración del ácido úrico de la muestra.

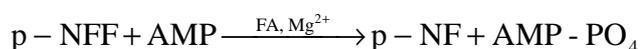
Principio de la reacción:



2.2.7 FOSFATASA ALCALINA

Método basado en las recomendaciones de la Federación Internacional de Bioquímica Clínica²²⁴: la actividad de la fosfatasa alcalina se calcula mediante la medida de la velocidad de transformación del p-nitrofenilfosfato (p-NFF) en p-nitrofenol (p-NF) en presencia de iones magnesio y zinc, y de 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) como aceptor de fosfatos con pH 10,4. La velocidad de aumento de la absorbancia como consecuencia de la formación de p-NF se mide a 410/480 nm y es directamente proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina en la muestra.

Principio de la reacción:

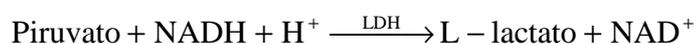
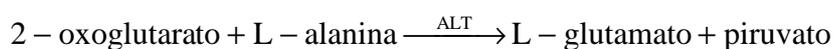


2.2.8 GPT (ALT, alanina-aminotransferasa)

Método basado en las recomendaciones de la Federación Internacional de Bioquímica Clínica²²⁵. La ALT transfiere el grupo amino desde la alanina al 2-oxoglutarato, para formar piruvato y glutamato. La adición del fosfato de piridoxal a la mezcla reactiva

garantiza la máxima actividad catalítica de la ALT. La reacción del piruvato con el NADH, catalizada por la lactato deshidrogenada (LDH), produce lactato y NAD^+ . La pérdida de absorbancia atribuible al consumo de NADH, cuantificada en 340 nm, es proporcional a la actividad ALT de la muestra. El piruvato endógeno se elimina durante el periodo de incubación.

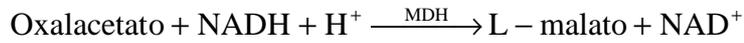
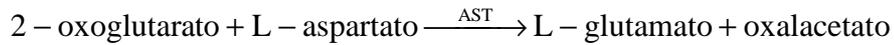
Principio de la reacción:



2.2.9 GOT (AST, aspartato-aminotransferasa)

Método basado en las recomendaciones de la Federación Internacional de Bioquímica Clínica²²⁶. En este método, la AST cataliza la transaminación del aspartato y del 2-oxoglutarato, formando L-glutamato y oxalacetato. La adición del fosfato de piridoxal a la mezcla reactiva garantiza la máxima actividad catalítica de la AST. La malato-deshidrogenasa (MDH) reduce el oxalacetato a L-malato, en tanto que el NADH se transforma en NAD^+ . La pérdida de absorbancia atribuible al consumo de NADH, cuantificada en 340 nm, es proporcional a la actividad AST de la muestra. El piruvato endógeno se elimina, mediante la reacción de la LDH, durante el periodo de incubación.

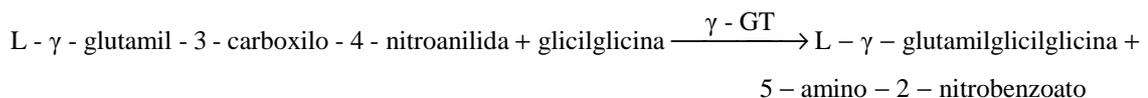
Principio de la reacción:



2.2.10 GGT (γ -glutamyl-transferasa)

Método basado en las recomendaciones de la Federación Internacional de Bioquímica Clínica²²⁷. La GGT cataliza la transferencia del grupo γ -glutamilo, entre el sustrato (γ -glutamyl-3-carboxilo-4-nitroanilida) y la glicilglicina, 5-amino-2-nitrobenzoato. El cambio de absorbancia de 410/480 nm, debido a la formación de 5-amino-2-benzoato, es directamente proporcional a la actividad de la GGT de la muestra.

Principio de la reacción:



2.2.11 BILIRRUBINA TOTAL

Principio de la prueba²²⁸: una sal de diazonio estabilizada, el 3,5-tetrafluoroborato (DPD), reacciona directamente ante la bilirrubina conjugada; y ante la bilirrubina sin conjugar, en presencia de un catalizador para formar azobilirrubina. La absorbancia a 540 nm es

proporcional a la concentración total de bilirrubina. Se realiza a parte un preliminar de la prueba, para reducir la interferencia del suero endógeno.

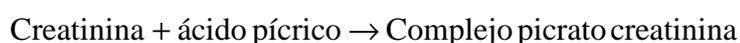
Principio de la reacción:



2.2.12 CREATININA

Prueba colorimétrica cinética (método de Jaffé). Principio de la prueba²²⁹: en un medio alcalino, la creatinina forma con el ácido pícrico un compuesto de coloración amarillo-anaranjada. La velocidad de cambio de la absorbancia a 520/800 nm es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

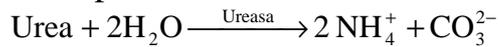
Principio de la reacción:



2.2.13 UREA

Principio de la prueba²³⁰: la urea se hidroliza en presencia de agua y ureasa para producir amoniaco y dióxido de carbono. El amoniaco resultante de la primera reacción se combina con 2-oxoglutarato y NADH en presencia de glutamato-deshidrogenasa (GLDH) para producir glutamato y NAD⁺. La disminución de la absorbancia de NADH por unidad de tiempo es proporcional a la concentración de urea.

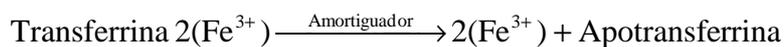
Principio de la reacción:



2.2.14 HIERRO

Principio de la prueba²³¹: el método Olympus utiliza TPTZ [2,4,6-Tri-(2-piridil)-5-triacina] como cromógeno. En un medio ácido, el hierro fijado a la transferrina se disocia en iones férricos libres y apotransferrina. El ácido clorhídrico y el ascorbato sódico reducen los iones férricos al estado ferroso. Los iones ferrosos reaccionan entonces con la TPTZ para formar un complejo de coloración azul, cuantificable bicromáticamente a 600/800 nm. El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad presente de hierro.

Principio de la reacción:



2.2.15 FERRITINA

Principio de la prueba²³²: las reacciones aglutinantes del látex se deben a la agregación de gotas de látex revestidas de anticuerpos, siempre que haya una cantidad suficiente de antígeno. Los

inmunocomplejos formados en disolución dispersan la luz proporcionalmente a su tamaño, forma y concentración, Si hay exceso de anticuerpos, el incremento de la cantidad de antígeno aumenta la dispersión. Los turbidímetros miden la reducción de la luz incidente por reflexión, absorción o dispersión.

En el procedimiento Olympus, la base de este análisis es la cuantificación de la pérdida de intensidad lumínica transmitida (aumento de la absorbancia) a través de las partículas suspendidas en la disolución, como consecuencia de complejos formados durante la reacción antígeno-anticuerpo. El reactivo Olympus Ferritin es una suspensión de partículas de látex de poliestireno, de tamaño uniforme, revestidas con anticuerpos antiferritínico policlonal de conejo. La combinación del suero (que contiene ferritina) con el reactivo Olympus Ferritin produce una mezcla aglutinante. Esta mezcla se cuantifica espectrofotométricamente en los analizadores bioquímicos Olympus.

2.2.16 SODIO Y POTASIO

Principio de la prueba: se determina mediante un proceso indirecto que utiliza Olympus para desarrollar un potencial eléctrico proporcional a la actividad de cada ión en la muestra.

2.2.17 HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c)

La HbA1c se determina mediante Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Estas técnicas fueron descritas por primera vez en 1979^{233, 234}.

Se realizaron con un sistema automático computerizado que integra la realización de la cromatografía de alta presión como método de separación de los compuestos de la muestra y de colorimetría a doble longitud de onda (415-500 nm) como método de detección (MENARINI ADAMS A1C-HA-8160, ARKRAY, Kyoto, Japón). En un estudio multicéntrico, esta técnica se ha demostrado rápida (2 minutos) y altamente efectiva²³⁵.

Las muestras biológicas analizadas corresponden a 3,5 ml de sangre total periférica almacenadas en tubo de EDTA, procesadas de forma inmediata, a diario.

2.2.18 HEMOGRAMA

El Analizador de Hematología ADVIA 2120 (Bayer Health Care) utiliza muestras de sangre total para ofrecer los siguientes resultados: hemoglobina, recuentos celulares y recuento diferencial leucocitario.

1. Para la determinación de hemoglobina utiliza la lectura mediante fotolorimetría de cianmetahemoglobina originada a partir de la reacción de la hemoglobina procedente de los hematíes lisados con ferrocianuro y cianuro potásico.

2.- Para la realización de los recuentos celulares de hematias, leucocitos y plaquetas utiliza el método de dispersión de la luz de un haz de láser.

A partir de los histogramas construídos durante el recuento se obtienen los parámetros de VCM, CHCM y de RDW.

A partir de la determinación de los recuentos celulares y del valor de hemoglobina obtiene los resultados calculados de hematocrito, HCM.

3.- Recuento diferencial leucocitario: la tipificación de cinco poblaciones (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos) así como de células no identificadas se consigue a partir de la combinación de la determinación de la actividad peroxidasa, tamaño y lobularidad celular

2.3 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EMERGENTES: ESTRÉS OXIDATIVO

2.3.1 APARATOS Y REACTIVOS

A continuación se detallan los aparatos utilizados en el presente trabajo:

- Balanza (FY-300, AND, Japón)
- Balanza de precisión modelo Recator 6110.
- Centrífuga de mesa marca ALC, modelo 4206.
- Centrífuga de mesa marca ALC, modelo 4214.
- Congelador de -80°C , marca Sanyo, modelo Ultra Low.
- Espectrofotómetro de doble haz marca Kontron, modelo Uvikon 810.
- Impresora Hewlet & Packard, modelo Deskjet 920C.

- Impresora láser marca Hewlett & Packard, modelo Laserjet 4L.
- Medidor de pH marca Crison, modelo micropH 2002.
- Ordenador personal marca Apple, modelo Power Macintosh 6100.
- Ordenador personal marca AOC, modelo 486-50 mHz.
- Ordenador portátil marca Toshiba, modelo 1640CDT.
- Sistema de cromatografía líquida de alta presión compuesto por bombas e inyectores marca Kontron Instruments.
- Sistema de filtración de agua marca Millipore, modelos Milli-Ro plus, Milli-Q plus.
- Termostato para baño marca Heto Birker model 02DBT623.
- Termostato para baño marca Heto Birker model 02PG623.
- Trazador marca Kontron, modelo Plotter 800.

Se han utilizado otros pequeños aparatos propios de un laboratorio experimental como micropipetas, agitadores magnéticos, homogenizadores, etc que no se detallan puesto que son numerosos los laboratorios que los comercializan y existe una gran variedad de modelos.

A continuación se describen los productos utilizados, así como los laboratorios que los fabrican:

- Ácido cítrico (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Ácido clorhídrico (Sigma, St. Louis, Mo).

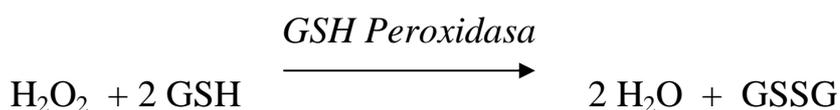
- Ácido perclórico, purísimo (Pancreac, Barcelona, España).
- Ácido 2 – tiobarbitúrico, purísimo (Sigma, St. Louis, Mo).
- Ácido tricloroacético (Sigma, St. Louis, Mo).
- Agua, purísimo (Riedel de Häen, Seelze, Germany).
- Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, Mo).
- Azida sódica, purísima (Merck, NY, USA)
- Bicarbonato potásico (Sigma, St. Louis, Mo).
- Bicarbonato sódico, puro (Pancreac, Barcelona, España).
- Carbonato sódico, puro (Pancreac, Barcelona, España).
- Citrato sódico (Fluka, Buchs, Switzerland).
- EDTA, sal disódica, purísimo (Boehringer Mannheim, Germany).
- Etanol (Riedel de Häen, Seelze, Germany).
- Etanol 100%, purísimo (Riedel de Häen, Seelze, Germany).
- Fosfato de dihidrógeno dipotásico, purísimo (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Fosfato de dihidrógeno monopotásico, purísimo (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Glutación, puro (Boehringer Mannheim, Germany).
- Glutación disulfuroreductasa (EC 1.6.4.2) de levadura 120 U/mg (Boehringer Mannheim, Germany).
- Hidróxido potásico, puro (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Hidróxido sódico (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Metanol, purísimo (Riedel de Häen, Seelze, Germany).
- NADPH sal tetrasódico, puro (Boehringer Mannheim, Germany).

- Peróxido de hidrógeno, 30%, purísimo (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma, St. Louis, Mo).
- Sulfato cúprico anhidro, purísimo (Fluka, Buchs, Switzerland).
- Tartrato sódico potásico tetrahidratado, purísimo (Sigma, St. Louis, Mo).
- 1,1,3,3 – tetraetoxipropano, puro (Sigma, St. Louis, Mo).

2.3.2 DETERMINACION DE GLUTATIÓNPEROXIDASA

2.3.2.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

La actividad glutatión peroxidasa (GPx; E.C.1.11.1.9.) se determinó según el método propuesto por Lawrence²³⁶.(1978) frente a peróxido de hidrógeno. Está basado en las siguientes reacciones:



La formación del glutatión disulfuro está catalizada por la actividad glutatión peroxidasa de la muestra, que es, a su vez, reducido de forma continua por un exceso de la actividad glutatión disulfuro reductasa presente en el medio. Esta reducción requiere la oxidación de

NADPH, cuya desaparición se registra espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340 nm.

2.3.2.2 SOLUCIONES

Solución A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, que contiene EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM.

Solución B. Glutación Disulfuro reductasa 2.4 U/mL

Solución C. GSH 10 mM

Solución D. NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO₃ al 0.1%

Solución E. Peróxido de hidrógeno 1.5 mM

2.3.2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

El suero, previamente separado en alícuotas, se descongela y se procede a su análisis.

2.3.2.4 PROCEDIMIENTO

El procedimiento analítico consiste en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

500 µL de la solución A (tampón fosfato potásico).

25, 50 ó 75 μL de muestra.

100 μL de la solución de glutatión reductasa (solución B).

100 μL de la solución C.

Se preincuba esta muestra durante 5 min a 37 °C, tras lo cual se añaden 100 μL de la solución D. Se monitoriza durante 3 min el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos.

Por último se añaden 100 μL de la solución E precalentada, y se registra de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 min, que es resultado del consumo de NADPH.

El cálculo se realiza por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido.

$$c = \frac{V_f}{\varepsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \left(\text{mmol} \times \text{l}^{-1} \times \text{min}^{-1} \right)$$

Donde:

V_f = volumen final en ml

V_m = volumen de muestra en ml

ε = coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de 6.22 $\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso)

ΔA = disminución de la absorbancia a 340 nm

Δt = intervalo de tiempo considerado.

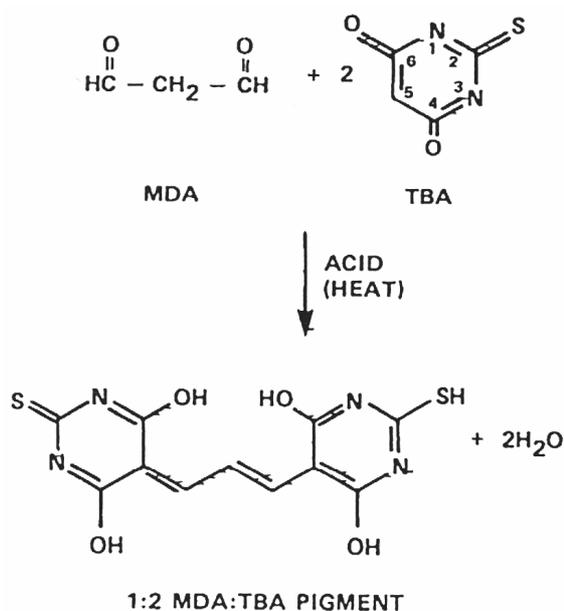
Los valores se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

2.3.3 DETERMINACION DE MALONDIALDEHIDO

2.3.3.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO.

Para la cuantificación del malondialdehído de las distintas muestras se ha utilizado una modificación del método de Richard²³⁷, modificado por Romero y cols.²³⁸, en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en base a la siguiente reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA (figura 10):

Figura 10. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico.



2.3.3.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de la concentración de MDA en el suero la sangre se obtiene como se ha indicado antes y se procede a su descongelación

2.3.3.3 EQUIPO Y SOLUCIONES UTILIZADAS

Se ha utilizado un equipo de CLAR (Kontron Instruments) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: HPLC PUMP 422 MASTER.
- Detector de fluorescencia SFM-25.
- Inyector: Rheodyne modelo 7125 con *loop* de 50 μ l.
- Mezclador dinámico modelo M-491.
- Controlador Multiport modelo RS-232.
- Ordenador 486/50 Hz.
- Software: Data System MT2.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Spheryc-5, ODS 5 μ m de 250 x 4,6 mm (Brownlee-Colums). El flujo de la fase móvil es de 1.0 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2 seg. La inyección de cada muestra se hace con una jeringuilla de 100 μ l tipo Hamilton (Reno, Nevada).

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45 µm de poro y 47 mm de diámetro. Dicha mezcla se gasea correctamente con helio desde media hora antes de realizar el experimento y durante el mismo.

La solución madre de calibración se prepara diariamente y se conserva en nevera a 4°C. Dicha solución madre consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

2.3.3.4 PROCEDIMIENTO.

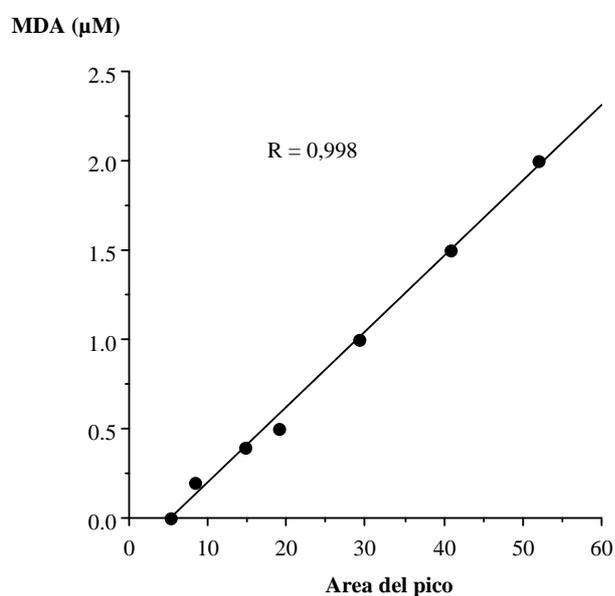
En tubos eppendorf de 2 ml se pipetea 0,1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen 60 min en un baño de agua a 95°C. Pasado este tiempo se enfrían los tubos en baño de agua-hielo (4°C) durante 10 min con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 min a 12.000 rpm.

Hasta su inyección en el equipo CLAR los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4°C.

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza 10 min antes de la inyección en el equipo de CLAR. Se añaden aproximadamente 0,1 ml de hidróxido potásico 0,7 M a 0,2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar centrifugamos durante 1 min para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de CLAR. La cantidad de muestra inyectada fue de 100 μ l para tener la seguridad de llenar el *loop* de 50 μ l.

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,2; 0,4; 0,5; 1; 1,5 y 2 μ M). Un ejemplo de estas curvas se muestra en la figura 11. El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

Figura 11. Curva patrón de MDA obtenida por HPLC



3 ESTUDIO ESTADISTICO

Las pruebas estadísticas se realizaron dependiendo de la naturaleza de las variables. El estudio de la relación de variables categóricas se realizó mediante el test de Chi-Cuadrado de Pearson (en el caso de que más del 20% de las celdas tuvieran una frecuencia esperada menor a 5 se utilizó el test exacto de Fisher). La comparación de variables continuas entre grupos de pacientes se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney (en caso de ser más de 2 grupos se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis). El análisis de relaciones entre variables cuantitativas en cada uno de los tiempos se realizó utilizando la prueba de correlación lineal de Pearson. El diseño de la base de datos estuvo sometido a reglas de coherencia internas y rangos para controlar las

incoherencias y/o incorrecciones en la recogida y la tabulación de los datos (SPSS versión 12.0.1). El nivel de significatividad empleado en todos los análisis ha sido el habitual del 5% ($\alpha=0,05$).

IV.- RESULTADOS

Este estudio observacional se ha llevado a cabo a lo largo de 3 años con las participantes distribuidas en dos grupos, control (gestantes sanas) y DG, 36 mujeres en cada grupo, realizándose un estudio bioquímico en cada trimestre como se describe en Material y métodos, con determinación de dos tipos de parámetros, los considerados como clásicos o convencionales, de uso en la clínica diaria, y los parámetros emergentes, que consideramos potencialmente interesantes en la práctica clínica, ya que determinan la actividad oxidativa y antioxidante de muestras biológicas, en este caso la sangre. Como se citó anteriormente, se descartaron paciente con procesos intercurrentes o con enfermedades agudas, así como aquellas que no completaron el seguimiento, y las fumadoras.

Todos los resultados de este estudio se presentan en tablas como media \pm desviación estándar (DE), o como valor absoluto. Los gráficos con columnas agrupadas comparan los resultados entre trimestres, y los gráficos con líneas comparan la evolución entre los dos grupos.

Según la metodología expuesta en el capítulo anterior se han obtenido los siguientes resultados.

1 VARIABLES DESCRIPTIVAS GENERALES

Las características clínicas de las madres, de las gestaciones, de los partos y de los recién nacidos se describen en la tabla 3.

El estudio estadístico no encuentra diferencias significativas, entre los dos grupos en ninguna de las variables descriptivas analizadas.

Las gestantes con DG presentaron valores medios mas elevados en edad, índice masa corporal (IMC) al inicio de la gestación, y aumento de peso a lo largo de la gestación, sin diferencias significativas. Es de destacar que el peso medio de los recién nacidos es menor en el grupo DG, sin observarse la macrosomía descrita en los casos de DG sin tratamiento adecuado. Ningún recién nacido presentó malformaciones, ni hubo embarazo gemelar. Tampoco hubo diferencias en las características de los partos.

Aunque siete mujeres con DG fueron obesas ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), no hay diferencias significativas entre los 2 grupos, debido principalmente a la gran dispersión de peso, con 1 mujer con DG con obesidad mórbida ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$).

Solo hubo un caso de DG con indicación de tratamiento insulínico, prescribiéndose insulina NPH (0,10 UI/kg/día) en la cena desde la semana 32 hasta el parto, lo que remarca que ambos grupos se sometieron al mismo tratamiento (dieta 2000 kcal/día y ejercicio adaptado realizado regularmente).

Tabla 3. Características de la población estudiada (n=36 para cada grupo). Datos mostrados como media \pm Desviación Estandar (DE) o como valor absoluto. IC 95%, intervalo de confianza al 95%; ns = no significativo. *IMC, índice masa corporal (en el 1° trimestre). RN, recién nacido. ** H/M, hombre/mujer. ⁺I/E, inducido/spontáneo. ⁺⁺ V/C, vaginal/cesárea.

		Media	DE	IC 95%		p
				Límite inferior	Límite superior	
Edad madres (años)	DG	32,86	4,26	31,42	34,30	ns
	Control	29,70	4,64	28,05	31,34	
IMC (kg/m ²) *	DG	27,3	9,9	24,2	31,5	ns
	Control	24,4	3,9	23,1	26,1	
Aumento peso (kg)	DG	10,0	0,35	9,8	10,4	ns
	Control	9,7	0,043	9,6	9,9	
Duración gestación (días)	DG	275,03	11,54	271,12	278,93	ns
	Control	278,85	11,47	274,78	282,92	
Peso RN (g)	DG	3178,61	542,50	2995,05	3362,16	ns
	Control	3287,15	517,38	3100,61	3473,69	
Sexo RN: H/M **	DG	19/17				ns
	Control	21/15				
Inicio parto: I/E ⁺	DG	24/12				ns
	Control	26/10				
Tipo parto: V/C ⁺⁺	DG	26/10				ns
	Control	27/9				
Paridad	DG	1,6	0,8	1	3	ns
	Control	1,8	0,7	1	3	

2 VARIABLES BIOQUÍMICAS

Se muestran las variables que han demostrado asociaciones estadísticamente significativas.

2.1 Hemoglobina glicosilada

Los valores obtenidos para HbA1c se muestran en la tabla 4.

El grupo control mantiene a lo largo de toda la gestación niveles de HbA1c normales. Hay una caída en los valores en el 3º trimestre, con diferencias significativas entre 1º y 2º trimestre, y entre 2º y 3º trimestre, ($p < 0,001$ y $p < 0,028$ respectivamente, figura 12)

El grupo de gestantes con DG también presenta valores normales, siendo el valor más elevados en el trimestre del diagnóstico (2º trimestre), con diferencia significativa entre 2º y 3º trimestre ($p < 0,008$, figura 12).

Los valores medios de HbA1c siempre fueron superiores en el grupo de gestantes con DG respecto al grupo control, encontrándose diferencias significativas entre los dos grupos en el 2º y 3º trimestre ($p < 0,001$, figura 13).

Tabla 4. Valores trimestrales de Hemoglobina Glicosilada (%) en ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1° trimestre	DG	4,24	0,40	3,98	4,49
	Control	4,14	0,28	4,02	4,26
2° trimestre	DG	4,81	0,63	4,59	5,02
	Control	4,25	0,60	4,04	4,46
3° trimestre	DG	4,59	0,49	4,42	4,75
	Control	4,05	0,40	3,91	4,19

Figura 12. Hemoglobina Glicosilada (%): comparativa trimestral de ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$).

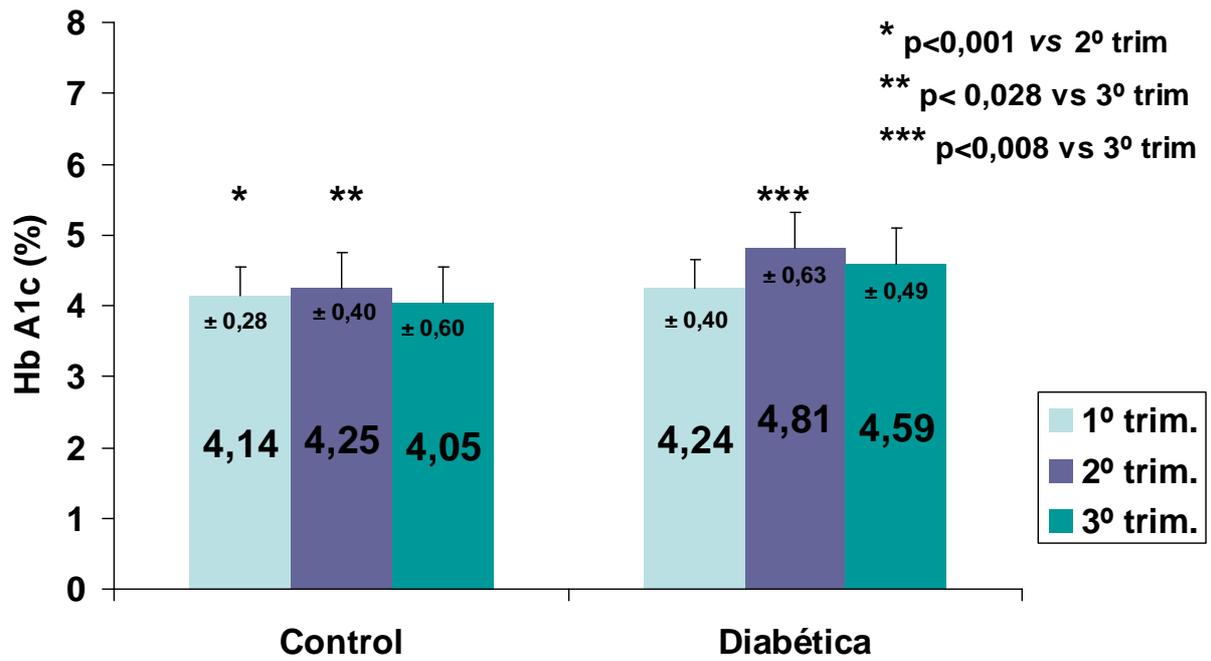
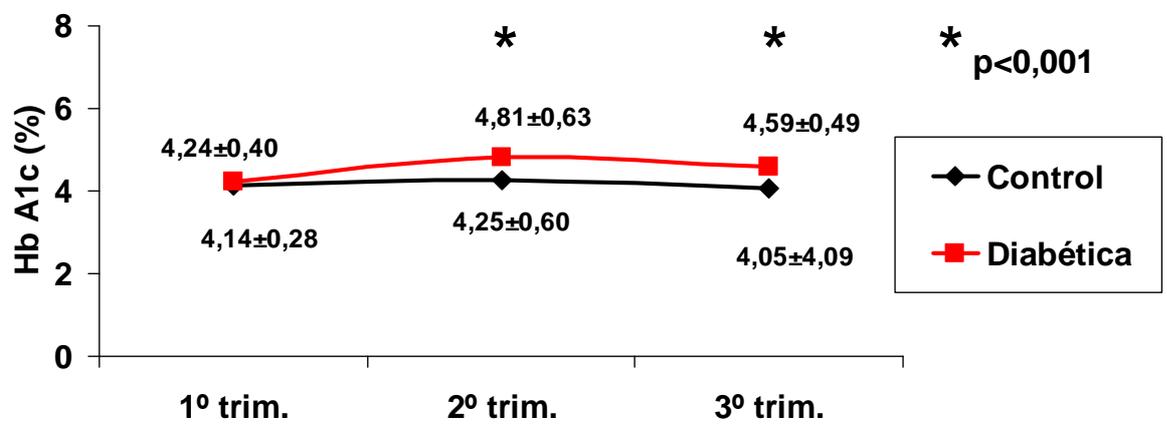


Figura 13. Hemoglobina Glicosilada (%): comparativa evolutiva entre los 2 grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$).



2.2 MDA

Los valores obtenidos para MDA se muestran en la tabla 5.

La comparativa de los valores medios trimestrales del MDA no muestra diferencias significativas dentro de cada grupo (figura 14, ns = no significativo).

Al comparar ambos grupos se detecta que MDA fue siempre superior en el grupo de mujeres con DG, mostrando diferencias significativas en el 1º y 2º trimestre ($p < 0,029$ y $p < 0,028$ respectivamente), pero no en el 3º trimestre (figura 15).

Tabla 5. Valores trimestrales de MDA (μM) en ambos grupos.
 Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1° trimestre	DG	1,04	0,58	0,84	1,24
	Control	0,73	0,39	0,57	0,88
2° trimestre	DG	1,06	0,82	0,78	1,34
	Control	0,68	0,57	0,48	0,88
3° trimestre	DG	0,82	0,61	0,60	1,05
	Control	0,76	0,42	0,61	0,91

Figura 14. MDA (μM): comparativa trimestral de ambos grupos.
Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$); ns, no significativo.

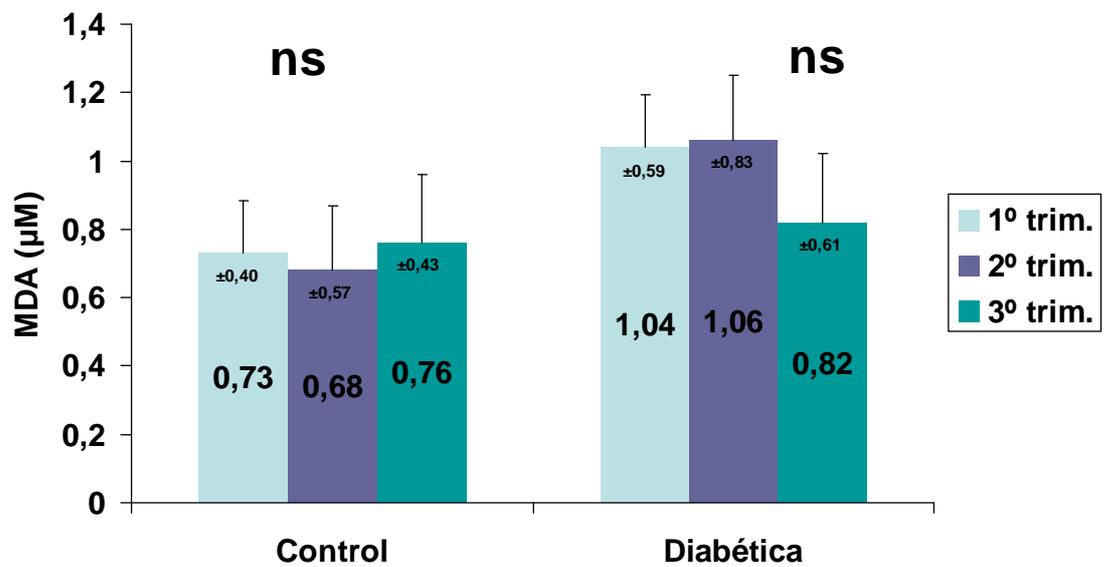
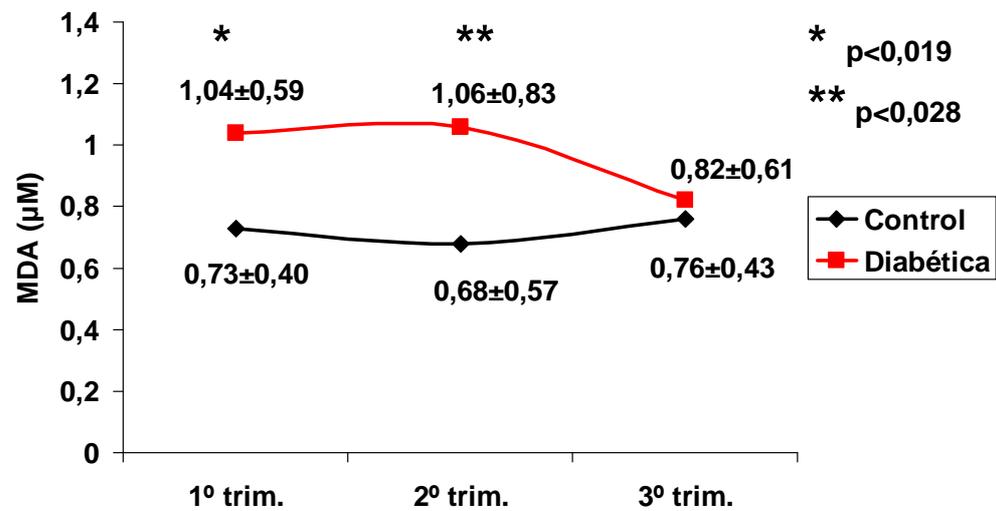


Figura 15. MDA (μM): comparativa evolutiva entre los 2 grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$).



2.3 GPx

Los valores obtenidos para GPx se reflejan en la tabla 6.

El estudio evolutivo en el grupo control no encuentra diferencias significativas de GPx entre los tres trimestres (figura 16).

El análisis en el grupo DG encuentra diferencias significativas de GPx entre el 1° y 2° trimestre ($p < 0,036$), así como entre el 1° y 3° trimestre ($p < 0,015$), no produciéndose esta diferencia significativa entre el 2° y 3° trimestre (figura 16)

La comparación entre grupos demuestra que GPx fue siempre menor en el grupo de mujeres con DG con diferencias significativas en el 1° trimestre ($p < 0,001$, figura 17).

Tabla 6. Valores trimestrales de GPx (mmol/mg prot x min) en ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1° trimestre	DG	43,92	21,75	34,51	53,32
	Control	70,63	16,86	62,49	78,76
2° trimestre	DG	63,04	38,26	46,08	80,01
	Control	66,62	21,33	56,34	76,91
3° trimestre	DG	65,11	33,45	47,91	82,31
	Control	68,13	16,97	60,60	75,66

Figura 16. GPx (mmol/mg prot x min): comparativa trimestral de ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$); ns, no significativo.

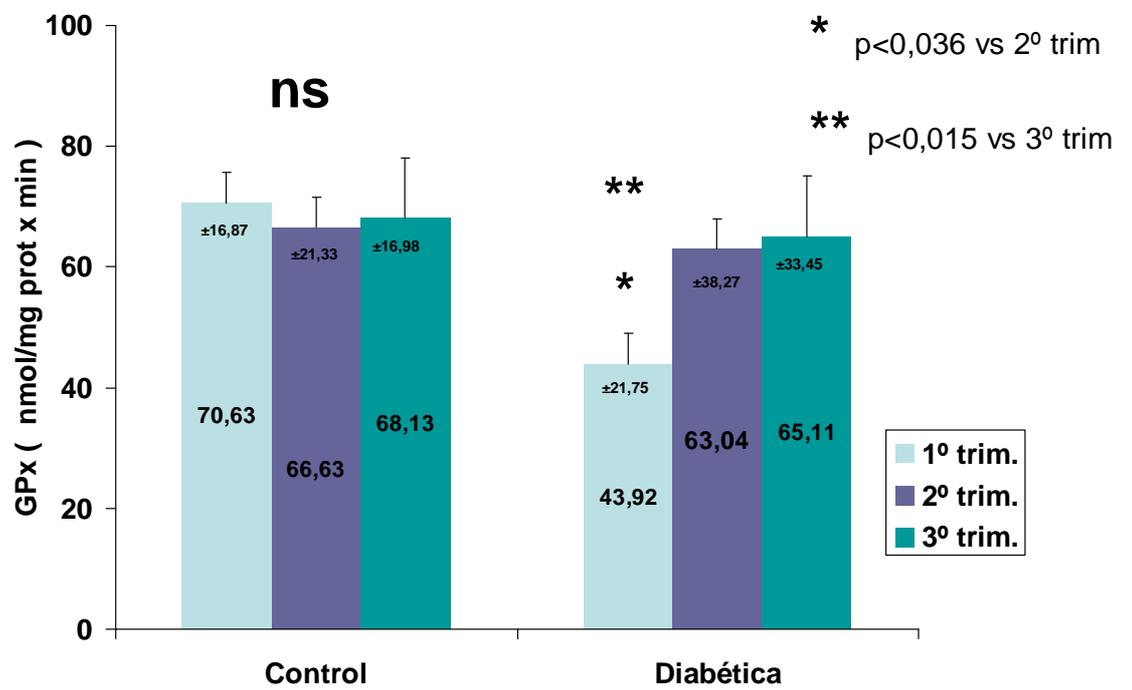
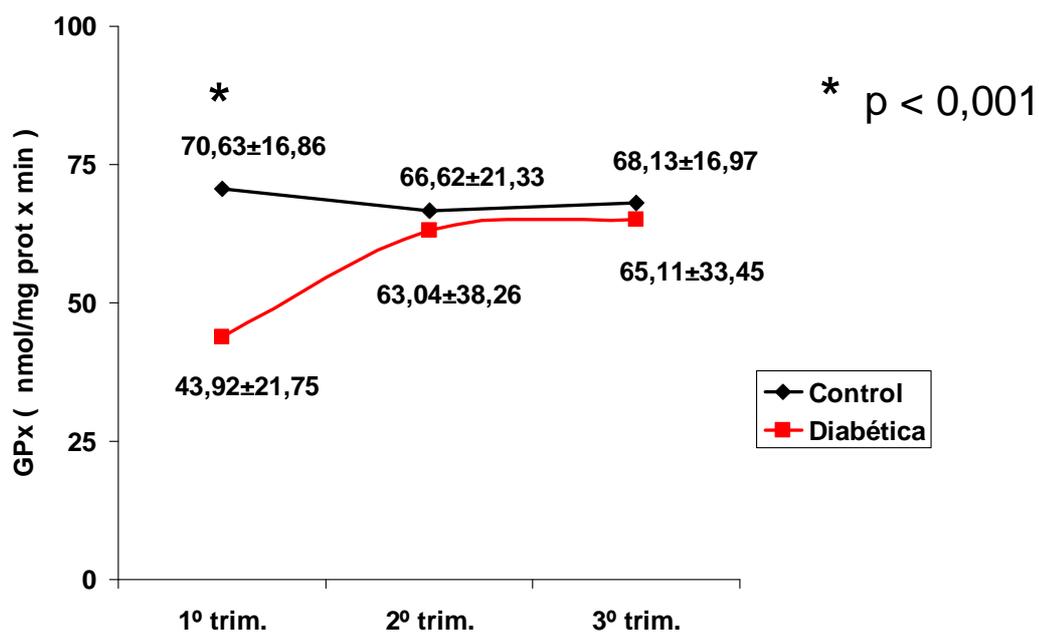


Figura 17. GPx (nmol/mg prot x min): comparativa evolutiva entre los 2 grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$).



2.4 PERFIL LIPÍDICO.

Los resultados de Colesterol, Triglicéridos, LDL-Colesterol y HDL-Colesterol se muestran en las tablas 7, 8, 9 y 10 respectivamente.

En ambos grupos, la evolución de los 4 lípidos analizados muestra una elevación progresiva, característica de una gestación sana, con diferencias significativas entre todos los trimestres consecutivos (figuras 18, 19, 20 y 21).

La comparación entre los dos grupos no encuentra diferencias significativas en las medias \pm DE en ninguno de los 3 trimestres (figura 22).

Tabla 7. Valores trimestrales de Colesterol total (mg/dl) en ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

Colesterol total (mg/dl)		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1° trimestre	DG	172,54	23,42	162,34	182,22
	Control	184,67	39,06	165,04	202,71
2° trimestre	DG	226,08	30,23	211,43	239,71
	Control	226,37	38,11	209,21	245,76
3° trimestre	DG	265,67	38,13	248,03	281,16
	Control	264,20	40,67	247,95	283,33

Tabla 8. Valores trimestrales de Triglicéridos (mg/dl) en ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

Triglicéridos (mg/dl)		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1° trimestre	DG	83,92	32,76	67,36	94,51
	Control	88,33	54,00	63,02	111,04
2° trimestre	DG	152,67	42,00	133,34	170,27
	Control	152,05	47,64	131,82	170,32
3° trimestre	DG	228,33	61,00	208,93	260,71
	Control	206,04	70,56	171,49	220,15

Tabla 9. Valores trimestrales de LDL-Colesterol (mg/dl) en ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

LDL-Colesterol (mg/dl)		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1° trimestre	DG	85,18	24,05	75,82	94,33
	Control	92,83	21,88	82,37	102,67
2° trimestre	DG	114,80	32,99	100,61	128,51
	Control	117,39	24,97	105,20	128,19
3° trimestre	DG	144,54	41,22	126,69	163,36
	Control	142,86	32,86	129,41	155,81

Tabla 10. Valores trimestrales de HDL-Colesterol (mg/dl) en ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

HDL-Colesterol (mg/dl)		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1° trimestre	DG	64,82	15,33	57,21	70,44
	Control	68,32	17,44	62,01	78,43
2° trimestre	DG	70,00	15,51	65,99	79,32
	Control	73,01	18,31	66,71	82,21
3° trimestre	DG	76,40	16,37	69,60	83,67
	Control	79,39	17,58	72,12	86,37

Figura 18. Colesterol (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$).

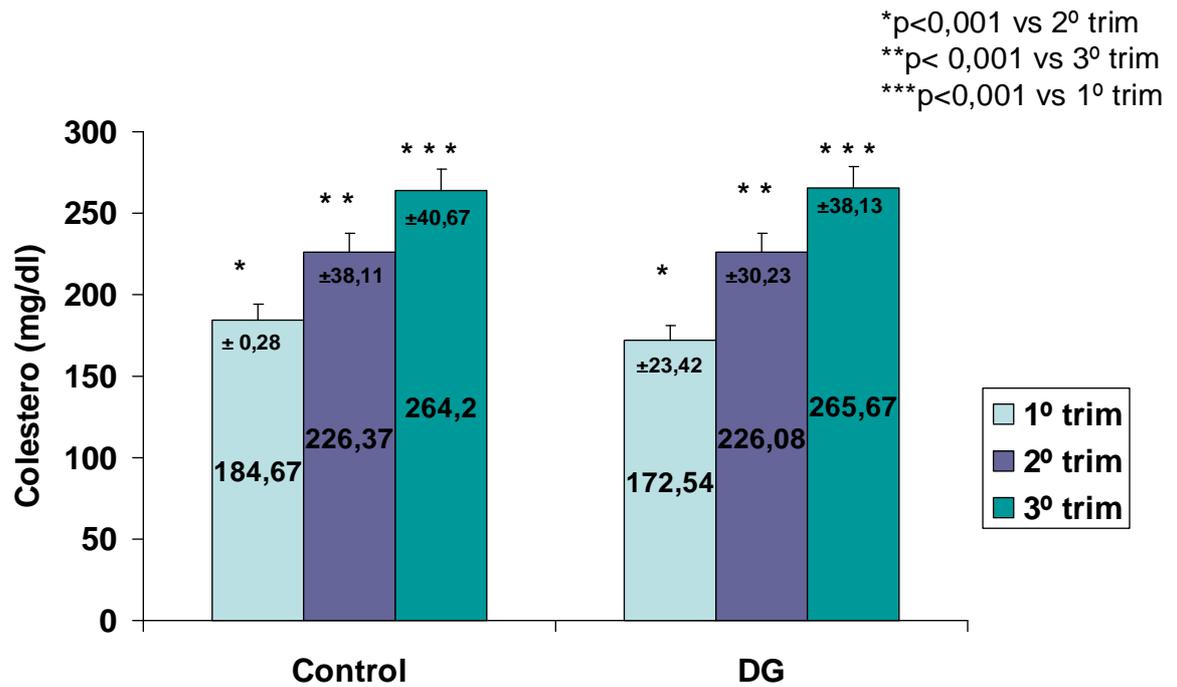


Figura 19. Triglicéridos (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$).

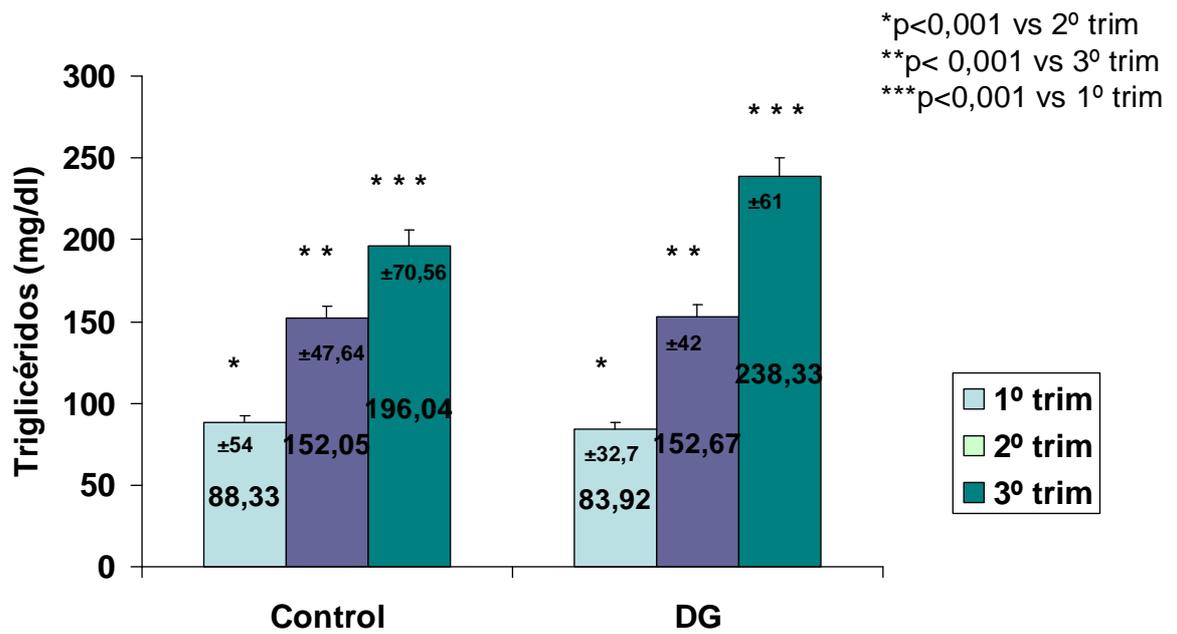


Figura 20. LDL-Colesterol (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$).

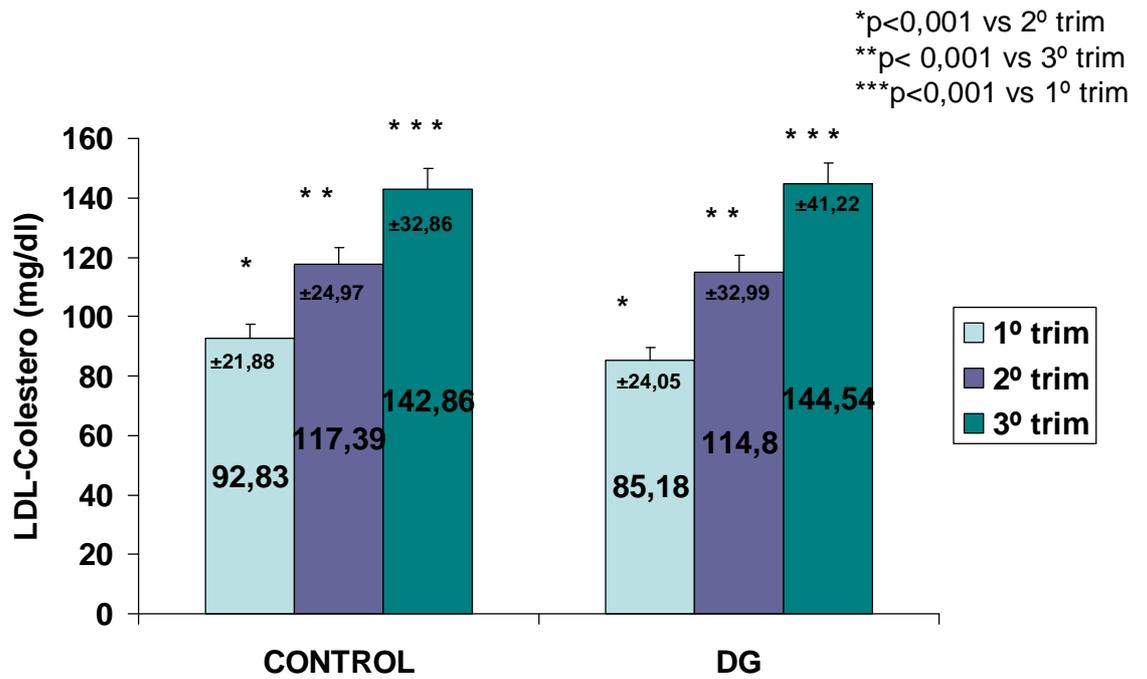


Figura 21. HDL-colesterol (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$).

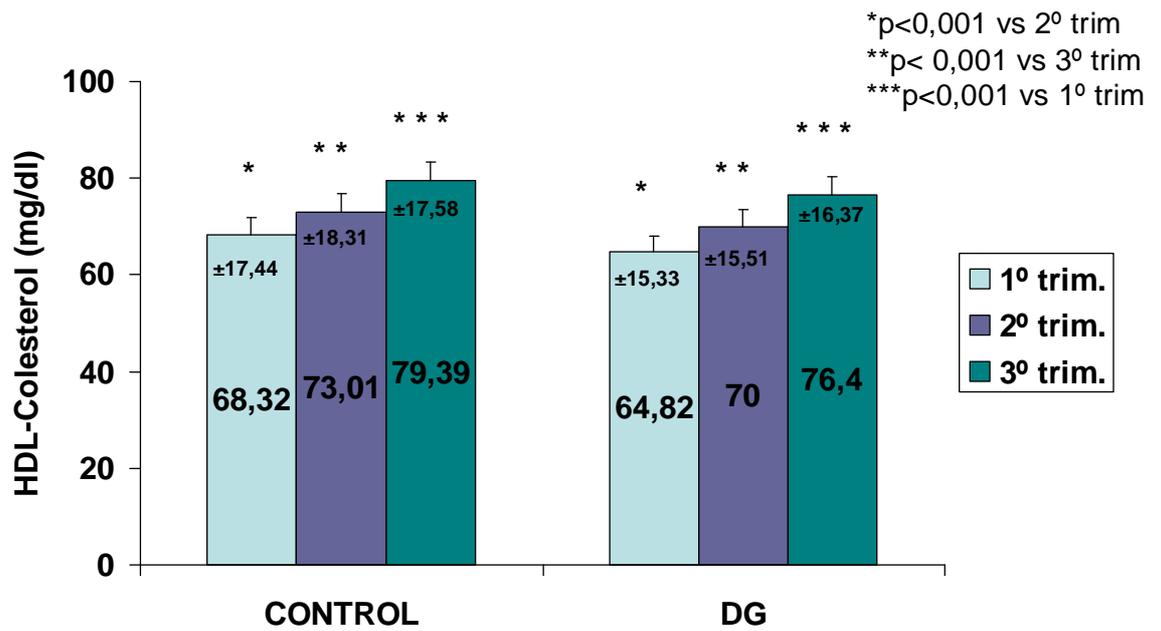
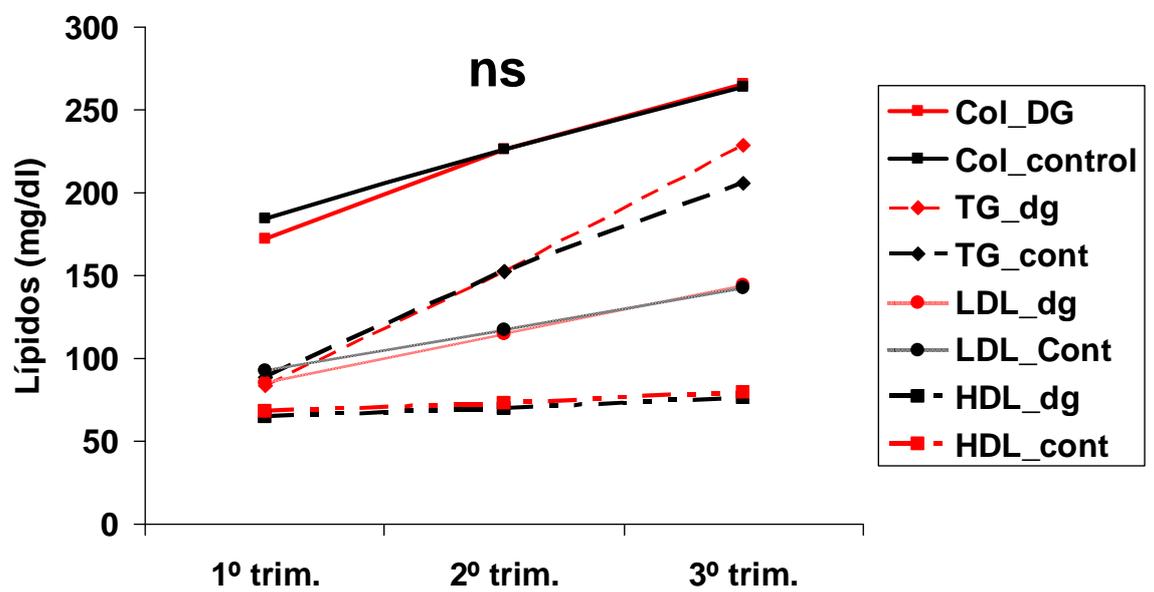


Figura 22. Lípidos (mg/dl): comparativa evolutiva entre los 2 grupos. Datos mostrados en tablas 7 a 10. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$); ns, no significativo.



2.5 GLUCEMIA BASAL

Los resultados se muestran en la tabla 11.

Los valores medios de glucemias en ayunas se mantienen dentro de la normalidad a lo largo de toda la gestación en ambos grupos, siendo mas elevados en el grupo DG. Ninguno de los grupos presenta diferencias significativas entre los tres trimestres (figura 23); tampoco se detectan diferencias entre los dos grupos (figura 24).

Tabla 11. Valores trimestrales de Glucemia basal (mg/dl) en ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1° trimestre	DG	90,33	8,82	87,35	93,32
	Control	83,11	6,18	80,99	85,24
2° trimestre	DG	87,28	9,96	83,91	90,65
	Control	76,91	6,37	74,72	79,10
3° trimestre	DG	83,92	12,26	79,77	88,06
	Control	77,11	7,79	74,44	79,79

Figura 23. Glucemia basal (mg/dl): comparativa trimestral de ambos grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$); ns, no significativo.

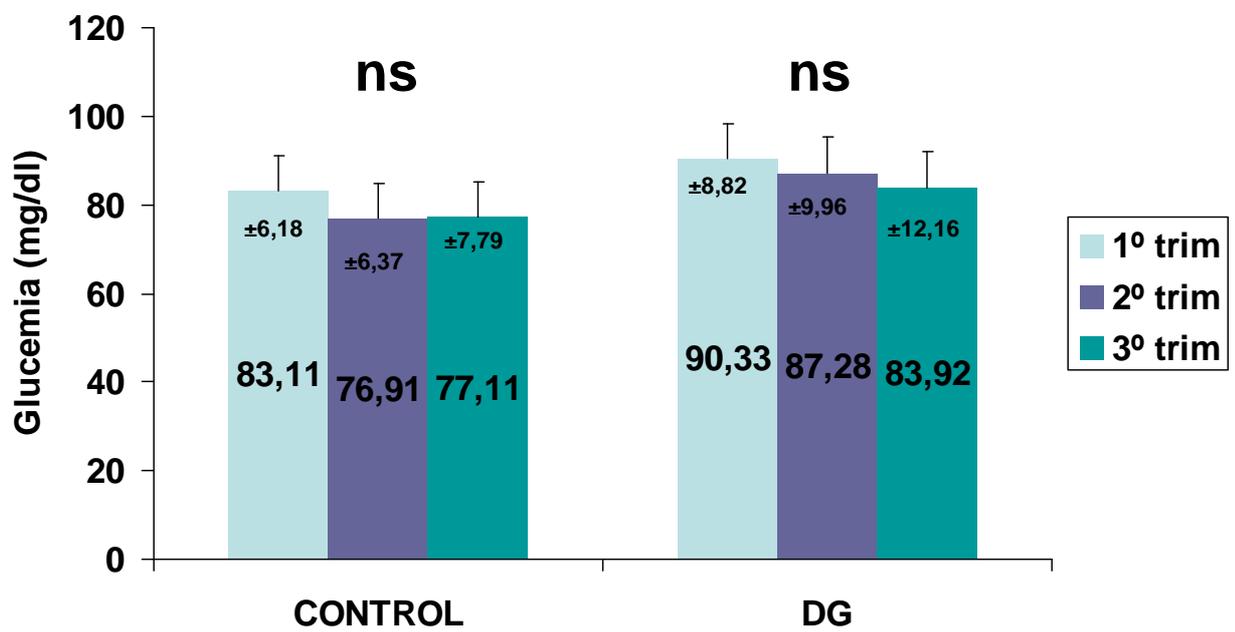
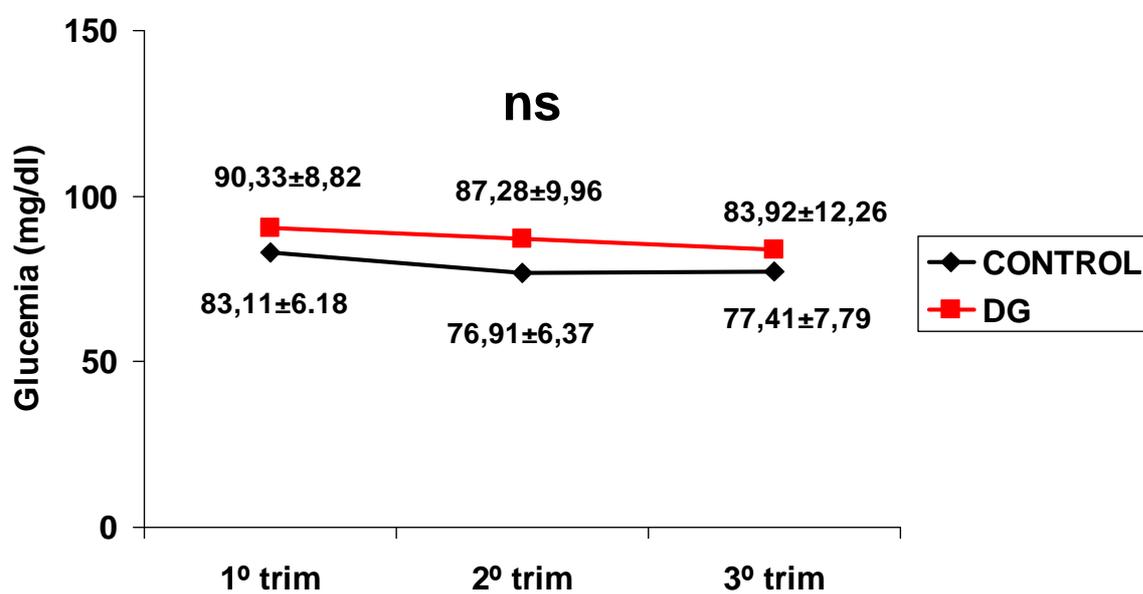


Figura 24. Glucemia basal (mg/dl): comparativa evolutiva entre los 2 grupos. Datos mostrados como media \pm DE. Los resultados significativamente distintos están indicados por * ($p < 0.05$); ns, no significativo.



3 ESTUDIO DE CORRELACIÓN

Se realizó un análisis de correlación múltiple, mediante el test de Pearson, para detectar posibles asociaciones entre los parámetros bioquímicos clásicos y los parámetros emergentes (MDA, GPx).

Se han dividido los datos en dos grupos:

- Valor medio gestacional para cada parámetro. Representa el valor medio de cada parámetro calculada con las muestras obtenidas a lo largo de toda la gestación. Se analiza cada grupo por separado (grupo DG, grupo control), y también el conjunto global de todas las gestantes (grupo DG más grupo control). Permite una visión de conjunto.
- Valor trimestre para cada parámetro: correlación entre los valores medios de cada trimestre, en grupo DG y en grupo control. Ofrece una visión de cada grupo por separado (tablas 4 a 11).

3.1 VALOR MEDIO GESTACIONAL DE MDA, GPx Y HbA1c

En la tabla 12 se detallan los valores medios obtenidos para las variables que muestran asociaciones significativas. Hay que señalar que solo se encuentra asociación entre 3 variables: MDA, GPx y HbA1c. No encontramos asociaciones de MDA ni de GPx con ninguno de los parámetros bioquímicos clásicos analizados.

Tabla 12. Valor medio gestacional de MDA (μM), GPx (mmol/mg prot x min) y HbA1c (%) en cada grupo por separado y en el conjunto global de gestantes. Datos mostrados como media \pm DE. IC 95%, intervalo de confianza al 95%.

		Media	DE	IC 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Media MDA (μM)	DG	0,99	0,51	0,82	1,17
	Control	0,74	0,35	0,62	0,86
	Global	0,87	0,45	0,76	0,98
Media GPx (mmol/mg prot x min)	DG	54,57	24,41	44,02	65,13
	Control	69,09	16,25	61,88	76,29
	Global	61,67	21,85	55,10	68,24
Media HbA1c (%)	DG	4,70	0,51	4,53	4,88
	Control	4,19	0,40	4,05	4,33
	Global	4,45	0,52	4,33	4,58

3.1.1 CONJUNTO GLOBAL

Encontramos las siguientes asociaciones significativas:

- relación lineal directa entre MDA y HbA1c ($p < 0,006$, $r = 0,325$, figura 25)
- relación lineal inversa entre GPx y HbA1c ($p < 0,043$, $r = -0,303$, figura 26),
- relación lineal inversa entre MDA y GPx ($p < 0,002$, $r = -0,447$, figura 27).

Figura 25. Análisis de correlación entre MDA y HbA1c en el conjunto de todas las pacientes.

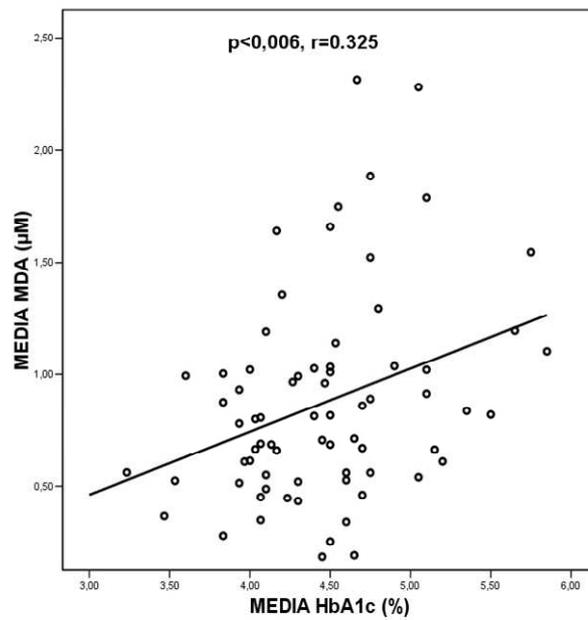


Figura 26. Análisis de correlación entre GPx y HbA1c en el conjunto de todas las pacientes

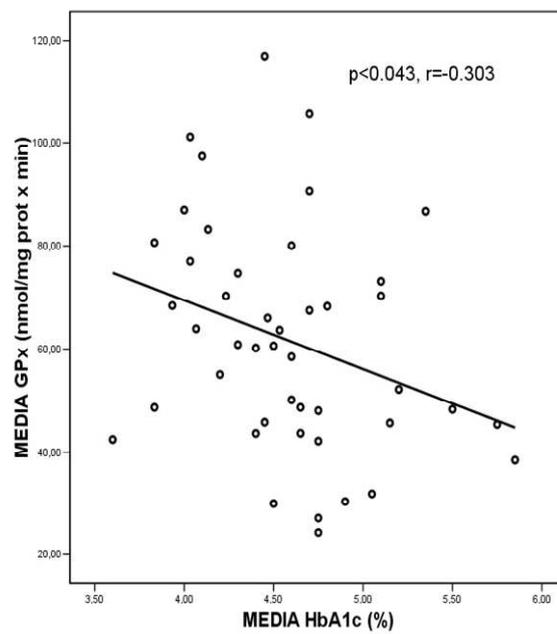
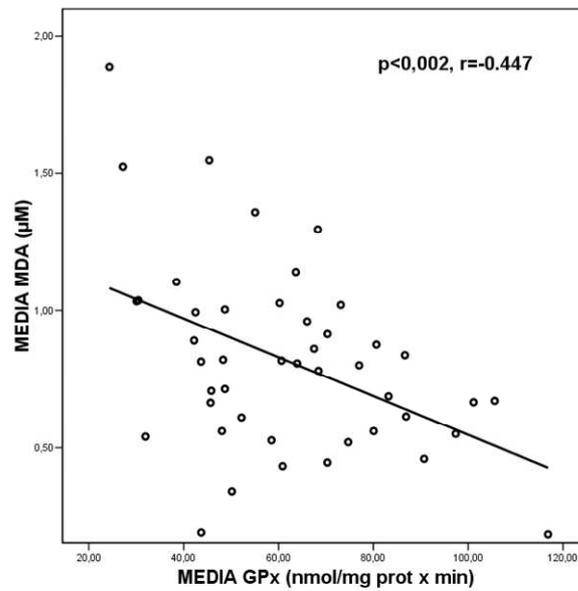


Figura 27. Análisis de correlación entre MDA y GPx en el conjunto de todas las pacientes.



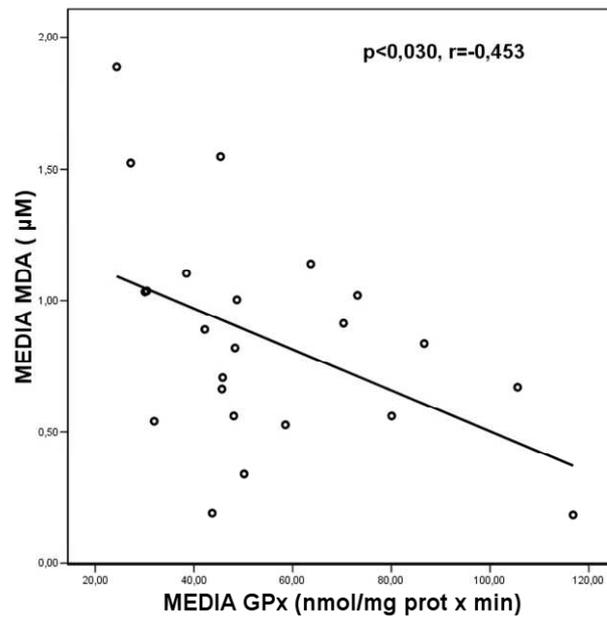
3.1.2 GRUPO DG

Hay relación lineal inversa entre MDA y GPx, aunque de escasa intensidad ($p < 0,030$, $r = -0,453$, figura 28), sin obtenerse otras asociaciones estadísticas en las variables analizadas

3.1.3 GRUPO CONTROL

No hay asociaciones significativas entre las variables analizadas cuando utilizamos el valor medio de toda la gestación.

Figura 28. Análisis de correlación entre MDA y GPx en el grupo DG.



3.2 VALORES TRIMESTRALES EN GRUPO DG

En el estudio por trimestres del grupo con DG, se detecta relación lineal directa significativa de MDA con HbA1c al inicio de la gestación (1º trimestre, $p<0,005$, $r=0,772$, figuras 29 y 30 y 34).

Así mismo hay relación lineal significativa, en este caso inversa, entre MDA y GPx en 2º y 3º trimestre ($p<0,019$, $r=-0,494$ para 2º trimestre, y $p<0,011$ y $r=-0,600$ para 3º trimestre, figuras 29, 31 y 32).

No se encuentran correlaciones significativas de HbA1c con GPx (figura 33); y, como ya se ha citado, sí que hay relación con MDA en 1º trimestre (figura 29, 30 y 34).

En el grupo de enfermas, no se encontró ninguna relación significativa de la glucosa en ninguno de los casos analizados (MDA ni GPx ni HbA1c), en ninguno de los tiempos analizados, es decir, no existió relación lineal que explique aumentos o descensos de la glucosa en ayunas con respecto a los demás parámetros del estudio (figura 35).

Al igual que en el estudio global de casos, no encontramos asociaciones de MDA ni de GPx con los otros parámetros bioquímicos clásicos.

Figura 29. Valores de los coeficientes de correlación lineal del MDA con Glucosa, GPx y HbA1c, por trimestres, en el grupo DG. Las correlaciones significativas se señalan con * o #; ns, no significativo.

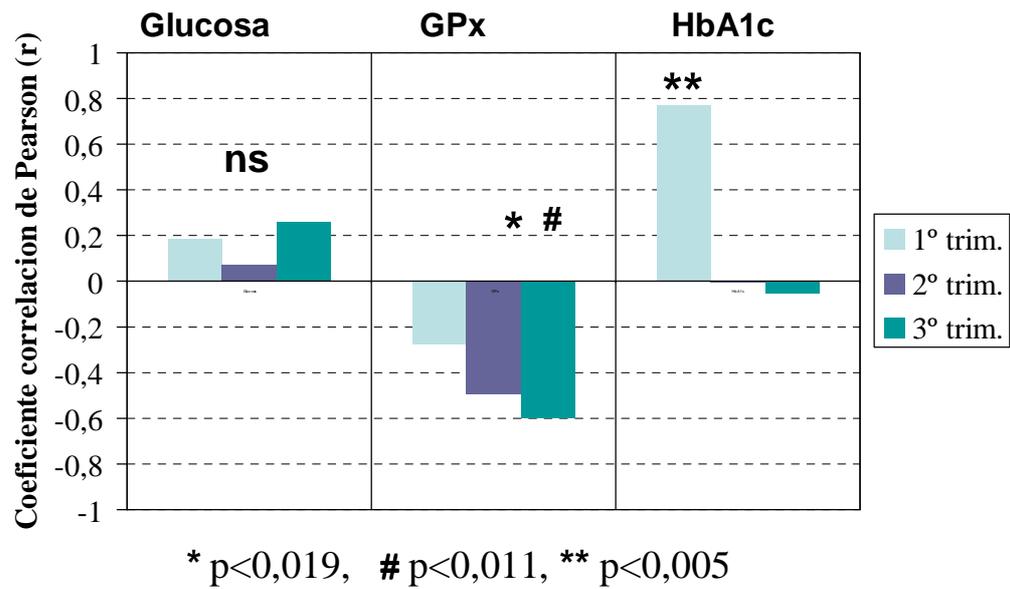


Figura 30. Correlación del MDA con HbA1c en 1º trimestre en el grupo DG.

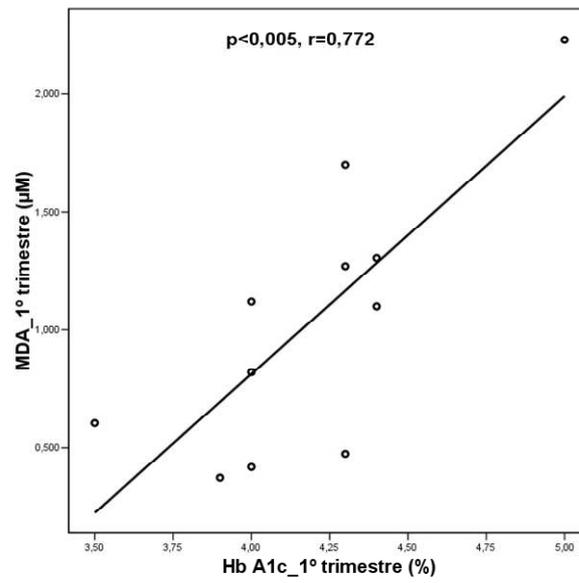


Figura 31. Correlación trimestral del MDA con GPx en 2º trimestre en el grupo DG.

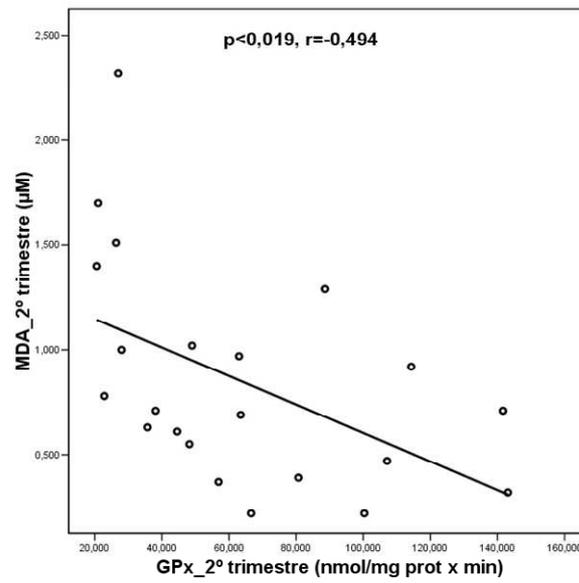


Figura 32. Correlación trimestral del MDA con GPx en 3º trimestre en el grupo DG.

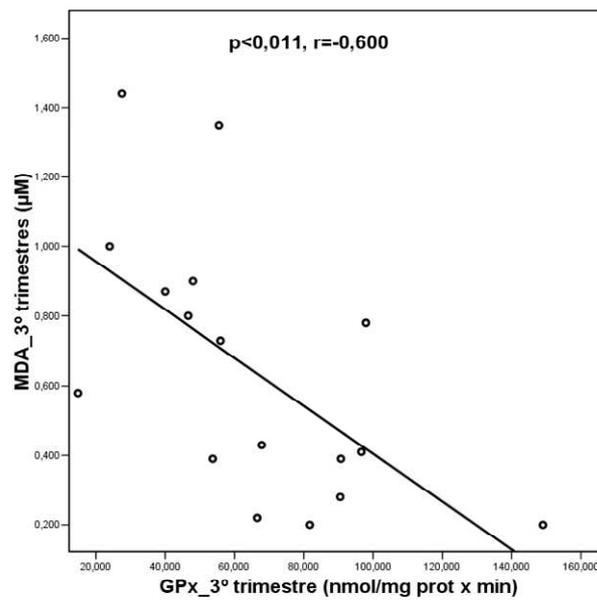
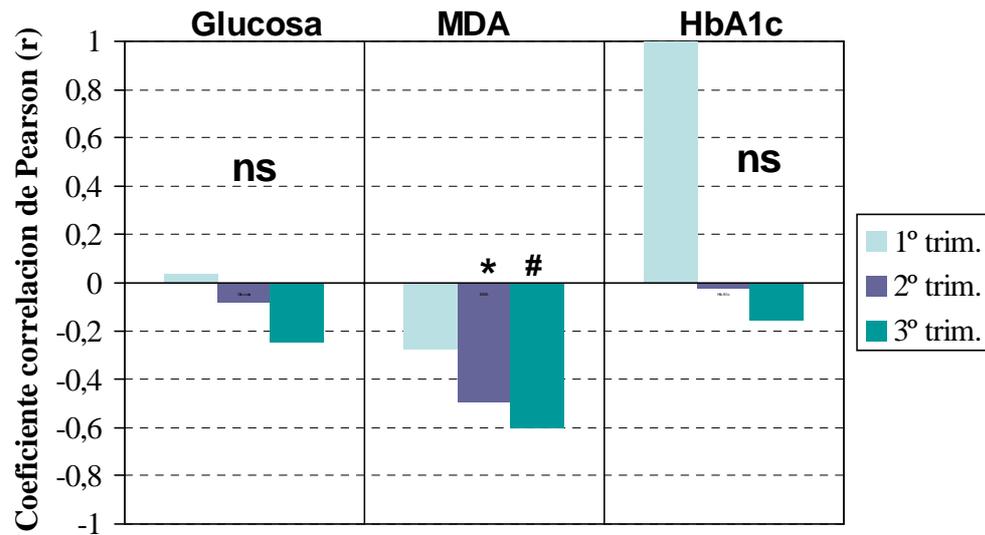


Figura 33. Valores de los coeficientes de correlación lineal del GPx con Glucosa, MDA y HbA1c, por trimestres, en el grupo DG. Las correlaciones significativas se señalan con * o #; ns, no significativo.



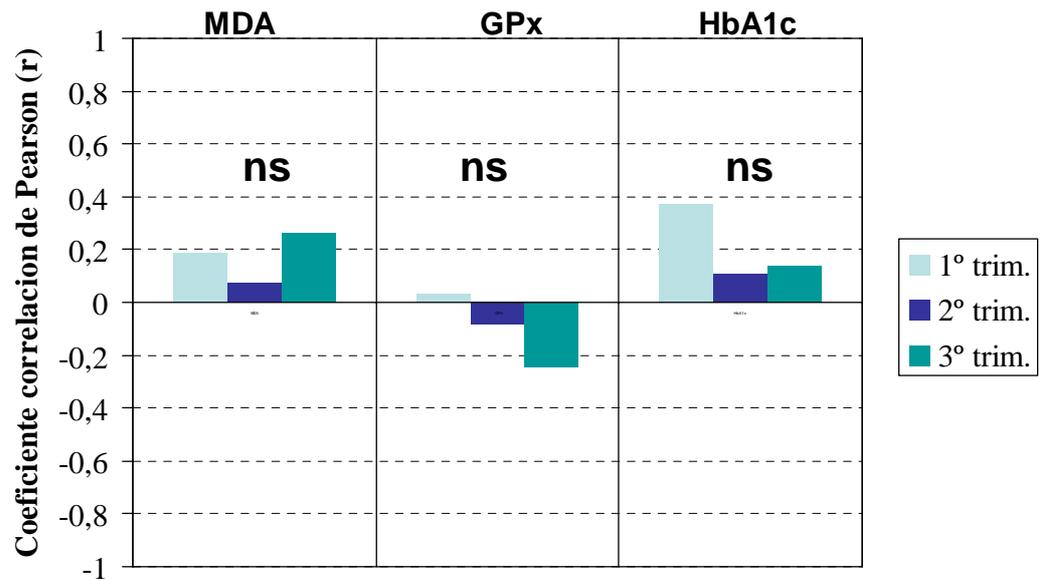
* $p < 0,019$, # $p < 0,011$

Figura 34. Valores de los coeficientes de correlación lineal de la HbA1c con Glucosa, MDA y GPx, por trimestres, en el grupo DG. Las correlaciones significativas se señalan con *; ns, no significativo.



* $p < 0,005$

Figura 35. Valores de los coeficientes de correlación lineal de Glucosa con, MDA, GPx y HbA1c, por trimestres, en el grupo DG. Las correlaciones significativas se señalan con *; ns, no significativo.



3.3 VALORES TRIMESTRALES EN GRUPO CONTROL

En el grupo control se detectaron asociaciones significativas solo en 2º trimestre, con una relación lineal directa entre MDA y HbA1c ($p < 0,022$, $r = 0,393$, figuras 36 y 37), y una relación lineal inversa entre GPx y HbA1c ($p < 0,021$, $r = -0,525$, figuras 38 y 39).

Como en el grupo DG no se encuentra ninguna relación significativa entre glucosa basal y los otros parámetros, en ningún trimestre (figura 40).

No hay asociación significativa entre MDA y GPx, en ningún trimestre (figura 36 y 38).

Las relaciones significativas de HbA1c con MDA y GPx, ya comentadas se resumen en la figura 41.

Al igual que en el estudio global de casos, no encontramos asociaciones de MDA ni de GPx con los otros parámetros bioquímicos clásicos.

Figura 36. Valores de los coeficientes de correlación lineal de MDA con Glucosa, HbA1c y GPx , por trimestres, en el grupo control. Las correlaciones significativas se señalan con *; ns, no significativo.

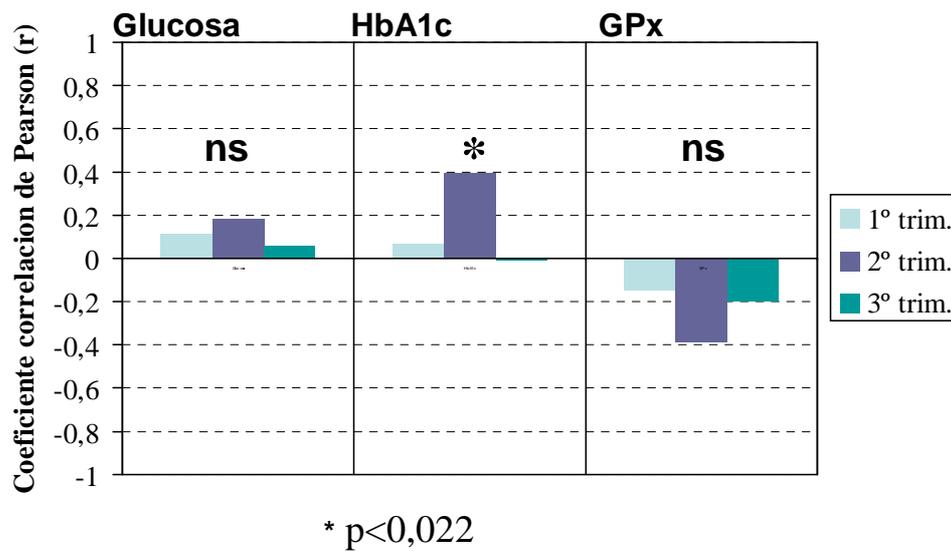


Figura 37. Correlación trimestral del MDA con HbA1c en 2º trimestre en el grupo control.

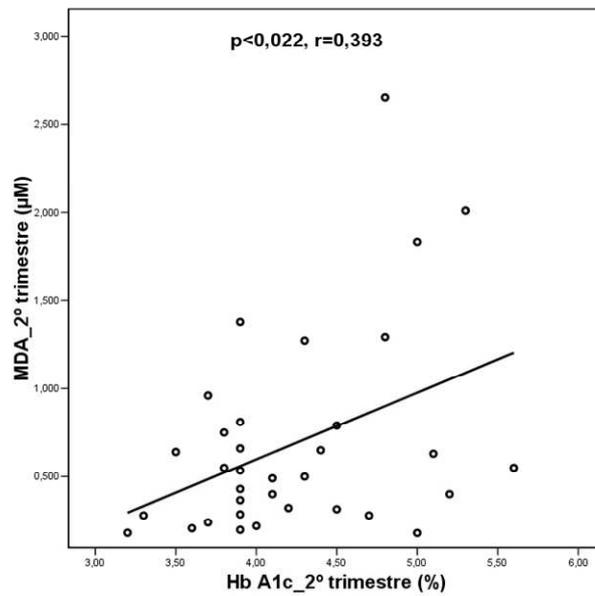
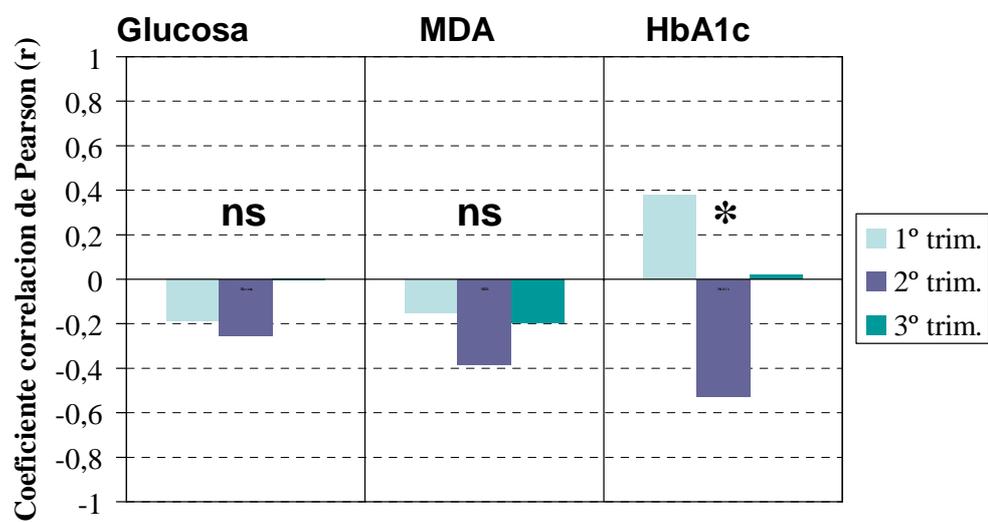


Figura 38. Valores de los coeficientes de correlación lineal de GPx con Glucosa, MDA y HbA1c, por trimestres, en el grupo control. Las correlaciones significativas se señalan con *; ns, no significativo.



* $p < 0,021$

Figura 39. Correlación trimestral de GPx con HbA1c en 2º trimestre en el grupo control.

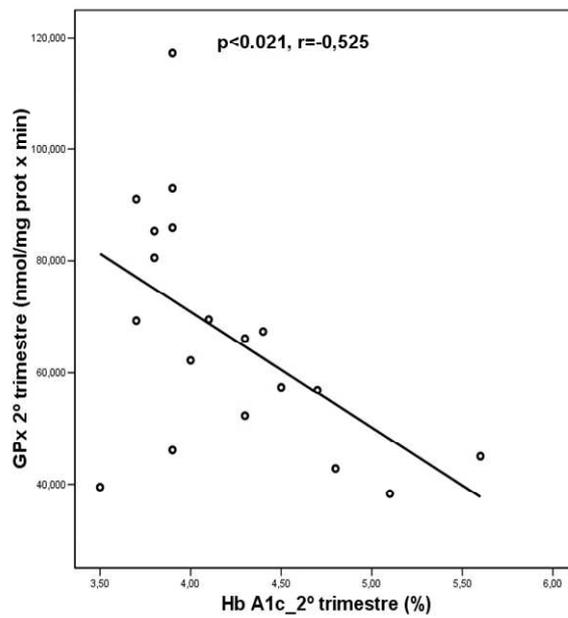


Figura 40. Valores de los coeficientes de correlación lineal de Glucosa con MDA, GPx y HbA1c, por trimestres, en el grupo control. Las correlaciones significativas se señalan con *; ns, no significativo.

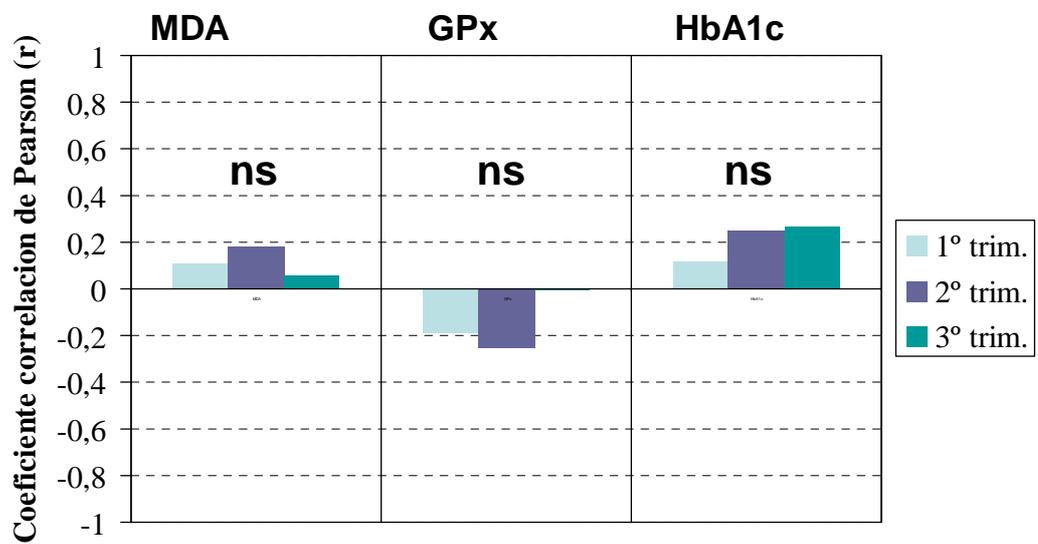
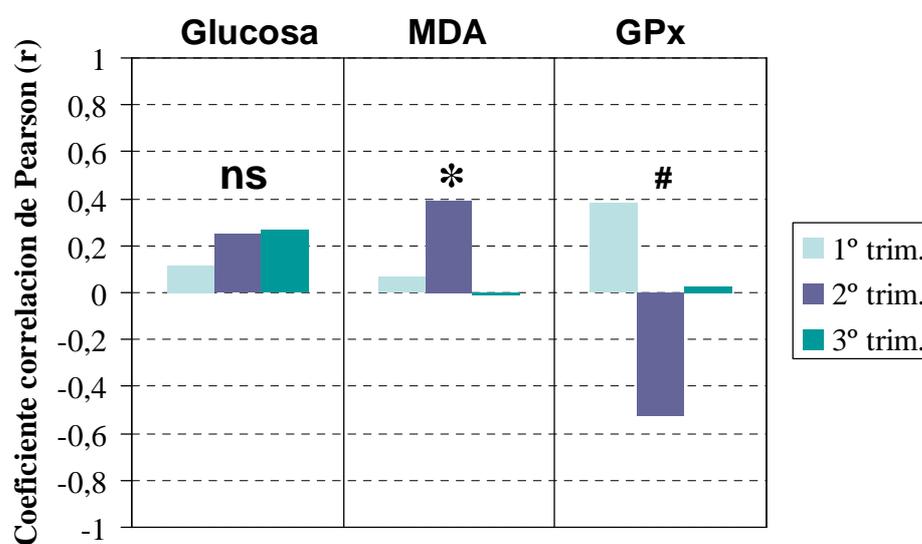


Figura 41. Valores de los coeficientes de correlación lineal de HbA1c con Glucosa, MDA y GPx, por trimestres, en el grupo control. Las correlaciones significativas se señalan con * o #; ns, no significativo.



* $p < 0,022$, # $p < 0,021$

4 ESTUDIO DE REGRESION LINEAL

Al realizar el estudio de regresión lineal múltiple (ANOVA) no encontramos un modelo significativo con el tamaño muestral utilizado, tanto si se analizan los grupos por separados como si se estudia el grupo global de todas las gestantes; para poder obtener conclusiones es necesario ampliar el número de mujeres participantes. No podemos predecir el desarrollo de Diabetes Gestacional a partir de la semana gestacional 24 conociendo los valores de MDA y GPx en el inicio de la gestación.

V.- DISCUSIÓN

El estrés oxidativo es un hallazgo constante en todas las enfermedades crónicas; sus biomarcadores son detectables mediante técnicas diversas, y aunque estas observaciones indican que hay un amplio espectro de daño tisular atribuido al EO, no es probable que sea un mecanismo patogénico primario de muchas de ellas¹⁶³. La importancia de los marcadores de EO en la diabetes es controvertida. La cuestión a cerca de su rol en la DM no es si el EO está aumentado, es saber si ejerce como mecanismo patogénico primario en la diabetes: saber si el EO ocurre al inicio de la DM (precediendo a la aparición de las complicaciones crónicas) o si es simplemente una consecuencia del daño tisular (reflejando la presencia de complicaciones); incluso podría jugar un papel en ambas fases de la diabetes.

Para algunos autores, en fases iniciales de la diabetes tipo 2 (antes de la aparición de las complicaciones crónicas) el aumento de los productos lipoxidados y glicoxidados²³⁹, sin el correspondiente aumento de productos primarios de oxidación (reacción directa de las proteínas con ROS)²⁴⁰, es atribuible al incremento de sustratos oxidables asociado a una insuficiente actividad antioxidante, sin que ello indique un aumento del EO. El EO no está sistemáticamente elevado en diabetes, excepto en estadios avanzados asociados a complicaciones crónicas, por lo tanto para estos autores, no es un mecanismo patogénico primario de la diabetes.

Otros estudios en sujetos con DM2 muestran niveles plasmáticos elevados de hidroperóxidos lipídicos (ROOHs)²⁴¹ y bajos niveles de alfa-tocoferol comparados con sujetos controles, el mismo grupo

encuentra cifras similares en diabéticos con o sin complicaciones, sugiriendo que el EO ocurre en fases iniciales de la DM, y no es una simple consecuencia de las complicaciones diabéticas²⁴².

El propósito principal de esta investigación es estudiar el EO en DG, un modelo de diabetes que permite una evaluación evolutiva rápida que podemos dividir en 3 fases: euglucemia en 1º trimestre (antes del diagnóstico de DG), hiperglucemia incipiente en 2º trimestre (momento del diagnóstico aún sin tratamiento), y respuesta al tratamiento en el 3º trimestre. Se valora también el nivel de actividad antioxidante, las asociaciones con otras variables bioquímicas, y se compara con un grupo control de gestantes sanas. Comentamos la bibliografía de otros estudios similares y expondremos reflexiones finales respecto a las líneas de investigación a continuar tras el estudio.

La diabetes y sus complicaciones crónicas representan un importante problema médico y socioeconómico. La actual estrategia para combatir la diabetes se dirige a mejorar el control de la hiperglucemia para prevenir o modificar el inicio y la progresión de la enfermedad y sus complicaciones. Varios estudios (por ejemplo: DCCT, UKPDS) nos demuestran que no es fácil conseguir niveles óptimos de control glucémico para toda la población, y solo una minoría de pacientes consiguen mantenerlos a lo largo del tiempo; por otro lado el riesgo cardiovascular sólo se explica parcialmente por los factores clásicos asociados a la diabetes, como fumar, la Hipertensión Arterial y la dislipemia. Así, se ha propuesto el EO como una posible explicación a la aceleración de las complicaciones en diabetes. Además del control

glucémico, el control del EO ofrece otra vía de tratamiento de la enfermedad. Dadas las limitaciones de la terapia hipoglucemiante en la práctica clínica, deben desarrollarse nuevas estrategias de tratamiento.

1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS y BIOQUÍMICAS CLÁSICAS

Las mujeres gestantes estudiadas representan dos grupos homogéneos, sin diferencias significativas respecto a las características demográficas (tabla 3), sus datos físicos son similares a las gestantes de otros estudios a cerca de esta materia^{18, 200}, y participan a lo largo de toda sus respectivas gestaciones de forma que las pacientes con alguna incidencia en cualquier momento fueron excluidas para evitar sesgos.

Se eliminaron del estudio todas las mujeres que presentaron conocidos factores que pudieran alterar los marcadores de EO, como hipertensión arterial o preeclampsia, asma bronquial,... etc. Ninguna de las mujeres tiene antecedentes de hiperglucemia pregestacional (ni durante el 1º trimestre de gestación) que pudieran sugerir estados prediabéticos o tolerancia alterada a la glucosa, con el objetivo de conseguir la euglucemia en 1º trimestre en ambos grupos. Todas las mujeres pertenecen a la raza caucásica; se han observado diferencias entre gestantes de raza negra y otras de raza blanca, atribuidas a estilo de vida y base genética¹⁹⁶.

Se descartaron la mujeres fumadoras pues se ha demostrado que las gestantes fumadoras presentan menores concentraciones de vitaminas antioxidantes que las no fumadoras²⁴³, atribuido a una dieta inadecuada o

a una menor ingesta de vitaminas antioxidantes. Así mismo los recién nacidos y sus madres fumadoras presentan aumento de actividad glutatión peroxidasa en suero, sugiriendo que están expuestos a mayor EO²⁴⁴.

Las pacientes con infecciones urinarias fueron retiradas del estudio pues se ha demostrado que esta enfermedad durante la gestación provoca aumento del MDA y descenso de CAT y SOD respecto a un grupo de gestantes control²⁴⁵.

Recientemente se ha comparado a gestantes roncadoras y no roncadoras²⁴⁶, en 2º y 3º trimestre: el valor medio de GPx fue significativamente menor en roncadoras ($p < 0,005$), mientras que el valor medio de MDA fue significativamente mayor en este grupo ($p < 0,005$), sin diferencias entre los recién nacidos. Este dato no fue evaluado en este estudio.

La HbA1c en mujeres gestantes sanas es menor que en no gestantes^{247, 248}; hay controversia a cerca de la evolución durante la gestación: algunos autores no encuentran diferencias significativas a lo largo de la gestación^{247, 249}, otros describen descensos²⁵⁰⁻²⁵², y otros elevaciones en el 3º trimestre^{253, 254}. En nuestro estudio ambos grupos de gestantes, sanas y diabéticas, muestran un ligero ascenso de HbA1c en 2º trimestres (figura 13), imputado por algunos autores al aumento de la glucemia media postprandial, seguido de una caída estadísticamente significativa en el 3º trimestre, atribuido a la disminución de la vida útil de los hematíes, al descenso de la glucemia media y preprandial, y en el

caso de mujeres con DG a la especial intervención terapéutica (dieta y ejercicio).

Al igual que otros estudios en Diabetes Gestacional los valores de HbA1c se solapan con los de gestantes sana²⁵⁵, impidiendo su uso como método diagnóstico; nosotros describimos valores siempre dentro de la normalidad pero significativamente más altos en 2º y 3º trimestre en el grupo DG, lo que demuestra que la terapia aplicada aunque es útil, no es capaz de conseguir un control metabólico comparable al de las mujeres gestantes sanas, sugiriendo que el tratamiento aplicado puede mejorarse, y abriendo la posibilidad de explorar otras terapia como los tratamientos antioxidantes. Posiblemente los objetivos metabólicos deben ser más exigentes y próximos a la normalidad, como sugieren los datos del estudio HAPO²⁵⁶.

El presente estudio dispone de valores de glucemia basal, donde se detecta un descenso progresivo de los valores, sin diferencias significativas entre grupos ni entre trimestres (figura 24). En gestantes sanas está admitido que la glucemia basal muestra un descenso durante la gestación (aproximadamente 8-10 mg/dl)^{21, 53} con un mayor descenso en el tercer trimestre⁵³. Los valores glucémicos postprandiales aumentan durante la gestación^{21, 27}. La glucemia media diaria (compendio de los valores diurnos y nocturnos) no varía en el transcurso de la gestación según algunos autores²⁷, o bien disminuye según otros²¹ como consecuencia del descenso de las glucemias nocturnas.

El perfil lipídico en nuestras pacientes coincide con los datos clásicos publicados. En condiciones fisiológicas el embarazo aumenta

progresivamente las concentraciones de todos los constituyentes lipídicos (figuras 18 a 22), inclusive las apolipoproteínas, la lipoproteína a y especialmente los triglicéridos^{257, 258}, sin observarse diferencias al comparar gestantes sanas con pacientes con DG o con diabetes pregestacional²⁵⁹ (salvo algún grupo que ha detectado mayor LDL-colesterol en el grupo DG¹⁸⁰), por lo que no se aconseja realizar habitualmente el estudio clínico del perfil lipídico en gestante sana (excepto en el caso del seguimiento de algunas hipertrigliceridemias severas que puedan exacerbarse durante la gestación). El incremento de LDL-colesterol se ha asociado con el aumento de la peroxidación lipídica en gestación normal^{179, 180}. Nuestros resultados corroboran varios estudios que muestran la elevación progresiva de Colesterol total y Triglicéridos a lo largo de la gestación y la ausencia de diferencia entre gestantes sanas y DG^{180, 260}.

2 ESTRÉS OXIDATIVO EN GESTACIÓN SANA

En nuestro estudio los niveles de MDA y GPx en las mujeres control no presentan variaciones a lo largo de la gestación, se mantienen estables en los 3 trimestres, mostrando solo un leve descenso estadísticamente no significativo en 2º trimestre; podemos decir que ambos marcadores discurren de forma paralela. Como discutiremos más adelante, los niveles de MDA son menores que en el grupo DG en todos los trimestres, con diferencias significativas en 1º y 2º trimestre (figura 15), y los niveles de GPx son mayores en sanas con diferencia significativa en 1º trimestre (figura 17).

La mayoría de los estudios a cerca de la peroxidación lipídica que comparan gestación sana con mujeres no gestantes encuentran mayores niveles en embarazadas^{183, 189, 190}, variando las ratios entre 1,08 y 3,04, sin relacionarse el marcador con la cantidad de incremento, pero casi ninguno de los estudios alcanza un numero notable de participantes. Podemos asumir que la gestación normal es una condición susceptible de sufrir mayores agresiones oxidativas, siendo la placenta una de sus fuentes^{181, 182}. Y los estudios posparto muestran el descenso de los marcadores ya en los primeros días tras el parto¹⁷⁹.

Algunos estudios en gestación sana se han realizado con una única muestra materna, otros estudios son longitudinales, obteniéndose resultados contradictorios, y en condiciones muy diversas (ver tabla 13).

Entre los estudios con una única muestra, Morris¹⁸³ y Arikan¹⁹⁰ encuentran valores significativamente elevados de MDA respecto a controles no gestantes, sin embargo Kharb²⁶¹ describe leves aumentos sin diferencias significativas.

Los estudios longitudinales nos permiten estudiar la evolución del EO durante la gestación, de nuevo sin encontrar consenso entre los diversos estudios: algunos^{179, 184, 185, 189, 262, 263} describen elevaciones progresivas a lo largo del embarazo con diferencias significativas en 2º y/o 3º trimestre respecto al inicio del embarazo; otros grupos^{187, 188, 196} no encuentran modificaciones a lo largo de la gestación.

Diversos hallazgos se han utilizado para explicar la elevación continua en los marcadores de EO en gestación sana; el continuo envejecimiento placentario (y los lipoperóxidos sintetizados a raíz del aumento de la síntesis de prostaglandinas por la placenta) contribuyen a los niveles plasmáticos maternos^{190, 264}; el aumento paulatino de LDL-COL pequeñas y densas a lo largo de la gestación ofrece una cantidad mayor de material para oxidarse¹⁷⁹; la notable activación de leucocitos en sangre periférica aumentaría los mediadores de fenómenos inflamatorios y facilitarían el EO²⁶⁵.

Los autores que no encuentran variaciones del EO a lo largo de la gestación normal defienden que la peroxidación lipídica es controlada adecuadamente por la defensa antioxidante mediante el aumento de actividad de las enzimas antioxidantes, así como de sistemas de protección no enzimáticos (por ejemplo vitamina E y C, proteínas del grupo tiol), y señalan que más importante que la extensión de la peroxidación (valores absolutos de los marcadores) es el equilibrio del sistema oxidante-antioxidante. Así mismo, critican la ausencia de uniformidad de los métodos de laboratorio, las diversas condiciones de obtención de las muestras (con o sin ayuno, con o sin adición de antioxidantes con función conservante, congelación a -20°C o -70°C, muestras de suero o hematíes o placenta), los diferentes etapas gestacionales de estudio, y, en ocasiones, el escaso número de participantes bajo situaciones mal definidas (es posible que la contracción o expansión del volumen plasmático materno afecta a los valores plasmáticos).

En el presente estudio los valores de GPx en gestación sana, se mantienen estables en los 3 trimestres, mostrando solo un leve descenso no significativo en 2º trimestre. (figura 17).

La actividad de los enzimas antioxidantes (GPx y SOD en plasma y eritrocitos) y sus sustratos (selenio, glutatión) están habitualmente disminuidos respecto a mujeres no gestantes^{189, 190, 192}. Hacia el final de la gestación los resultados son mas variados, describiéndose aumentos^{188, 193, 262}, descensos^{189, 192} o ausencia de cambios respecto al inicio de la gestación,^{184, 185, 194, 266}. Las diferencias metodológicas, ya comentadas anteriormente, hacen difícil la comparación de los estudios. Se ha sugerido que la elevación de estos marcadores antioxidantes indica el esfuerzo del sistema para equilibrar el daño oxidativo (upregulation), mientras que los niveles descendidos obedecen a la depleción por utilización, o sea, agotamiento por uso. En nuestras pacientes gestantes sanas sin enfermedades agudas, los niveles de GPx no oscilan, posiblemente por ausencia de situaciones que agudicen el EO y demanden un mayor esfuerzo antioxidante.

El valor medio de HbA1c más alto en el grupo control se observa en el 2º trimestre (con diferencia significativa). El análisis estadístico detecta en esta fase correlación directa entre HbA1c y MDA, y correlación inversa entre HbA1c y GPx, apuntado una relación entre glucemia y EO, de manera que dentro de la normalidad glucémica los valores más elevados ya se asocian con mas lesión por peroxidación lipídica; y como ya se ha señalado antes los valores disminuidos de GPx podrían deberse a su uso y consumo para minimizar la lesión oxidativa,

de manera que se establece un equilibrio entre los 3 marcadores dentro de rangos fisiológicos. Recordemos que la mayoría de valores de HbA1c en gestantes sanas permanecen en el rango bajo de la normalidad asociados a niveles bajos de MDA que no requieren consumo de GPx y que por lo tanto presenta niveles plasmáticos elevados.

Nuestros resultados están en la línea de lo expresado por Uotila¹⁸⁸ y Roes²⁶⁷: en la gestación normal el proceso de peroxidación lipídica es controlado adecuadamente por la respuesta antioxidante, o expresado de otra manera hay armonía entre las concentraciones de oxidantes y antioxidantes; estos autores apuntan que en gestantes con patologías, como HTA, se rompe este equilibrio.

3 ESTRÉS OXIDATIVO EN DIABETES GESTACIONAL

Las concentraciones plasmáticas de MDA en el grupo DG no presentan variaciones significativas en el transcurso de la gestación, aunque si hay una caída en 3° trimestre (figura 15). La actividad plasmática de la GPx durante el 1° trimestre es significativamente bajo respecto al resto de la gestación, permaneciendo estable en la 2ª mitad del embarazo (figura 17). Como acabamos de describir, el grupo control presenta cifras muy estable de MDA y GPx, son pacientes que no presentan ninguna enfermedad aguda ni condición especial que modifique estos marcadores de EO, pudiendo decirse que representan “el nivel basal de EO a lo largo de una gestación sana”.

Comparado con los controles, el grupo DG muestra en todo momento valores más elevados de MDA, con diferencias significativas entre grupos en el 1º y 2º trimestres, o sea antes y durante el diagnóstico, y antes de aplicar medidas terapéuticas. Los valores de GPx son siempre inferiores respecto a controles con diferencia significativa en 1º trimestre.

Analizando el grupo DG por trimestres, y recordando que ambos grupos presentan características similares, podemos observar que:

El 1º trimestre se caracteriza por la euglucemia en ambos grupos, y niveles de HbA1c similares. Las mujeres que desarrollarán DG presentan más MDA y menos GPx que los controles sanos con diferencia significativa, sugiriendo la implicación del EO en la génesis de la DG. Hemos detectado correlación directa significativa entre MDA y HbA1c, siendo posible que el grado de EO se correlacione con el grado de glucemia en esta fase.

Durante el 2º trimestre se desarrolla el trastorno metabólico de la DG pero aún no recibe tratamiento, y se eleva HbA1c significativamente. Se mantiene la diferencia significativa de MDA entre grupos. Simultáneamente se produce una elevación del nivel de GPx desapareciendo la diferencia entre grupos: posiblemente estamos ante un aumento de la expresión de GPx, en un intento del organismo de reducir el daño por EO.

Finalmente en el 3° trimestre, cuando se aplica la terapia convencional mejora el control glucémico y disminuye la HbA1c, desciende MDA hasta niveles similares al grupo control desapareciendo la diferencia entre grupos, y se mantiene la actividad GPx, probablemente en un intento mantenido de minimizar la lesión por EO y por hiperglucemia, y como respuesta al tratamiento aplicado. Encontramos correlación inversa entre MDA y GPx en 2° y 3° trimestres (ver figuras 31 y 32 respectivamente): niveles altos de MDA se asocian a valores bajos de GPx, quizás porque el organismo lo consume para neutralizar los efectos nocivos de la peroxidación.

Los estudios comparativos con controles gestantes sanas realizados con un única muestra se han realizado en 3° trimestre^{203, 204} y encuentran, a diferencia de nosotros, mayor nivel de MDA en DG con diferencia significativa. Sugieren que la hiperglucemia (incluso en niveles leves típicos de la DG) es causa del aumento en la producción de radicales libres, apuntando que las actuales recomendaciones de control glucémico son demasiado elevadas y potencian el EO, proponiendo valorar el uso de suplementos antioxidantes como arma terapéutica. Opinamos que el diseño transversal de estos estudios no permite valorar adecuadamente la relación causal entre hiperglucemia y EO, y que la falta de datos detallados a cerca del control metabólico y tratamiento resta consistencia a sus conclusiones. Otros estudios transversales^{194, 261} no detectan diferencia en los marcadores de peroxidación lipídica, pero incluyen muy pocas pacientes (máximo 8 casos) o no especifican la semana gestacional (ver tabla 14). Los mecanismos propuestos para explicar el aumento de los radicales libres en Diabetes Gestacional²⁰⁴ son

similares a la DM2: aumento de la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial por la vía del sorbitol, aumento de los productos finales de la glicación, activación de la proteinquinasa C, glicación no enzimática de proteínas, y se ha querido incluir la actividad oxidativa del feto y la placenta.

No hemos encontrado ningún estudio de características similares al presente que analice a las mujeres DG desde el 1º trimestre, y observen su evolución a lo largo de toda la gestación (ver tabla 14). Wender-Ozegowska²⁶⁸ estudia mujeres con DM1 gestantes y demuestra que no hay cambios apreciables en el curso de la gestación en MDA en el grupo de madres con control glucémico satisfactorio. Pocos estudios evolutivos comparan gestantes sanas con DG desde finales del 2º trimestre, pero los resultados son diferentes a los estudios transversales citados anteriormente, y opuestos a los de este estudio.

Santra²⁶⁹, estudiando MDA desde SG 31 y repitiendo análisis cada 4 semanas (siempre en 3º trimestre), describen mayores niveles en controles con diferencia significativa, sin que ningún grupo presente incrementos con el progreso de la gestación; por otro lado los niveles de vitamina E son mayores en el grupo DG (con significación), atribuyendo sus resultados al buen control metabólico y a la ausencia de complicaciones crónicas propias de la diabetes tipo 2, pero no citan datos de glucemia ni hemoglobina glicosilada, e incluyendo pacientes con pre-eclampsia en ambos grupos lo cual dificulta aun mas la interpretación de los datos.

Toescu¹⁸⁰ también describe mayor niveles de EO en controles gestantes sanas comparando LHP postprandial en 2º y 3º trimestre, esta vez sin diferencia significativa (solo detecta niveles significativamente elevados en gestantes con DM2, pero no en gestantes con DM1); además la capacidad antioxidante total es significativamente menor en todas las diabéticas gestantes en todos los trimestres.

Recientemente, Georgiou²⁷⁰ en un estudio con intención predictiva, valora 14 mujeres con DG y mide LPH en SG 11 y 28 (incluyendo pacientes en tratamiento con insulina) detectando nuevamente valores significativamente mayores en controles durante SG 28, atribuyendo los resultados a la inducción aguda de antioxidantes por el embarazo (especialmente SOD¹⁸²) pero que ellos no estudian y a la ausencia de complicaciones crónicas.

Ninguno de estos tres estudios evolutivos analiza toda la gestación, limitándose a dos trimestres finales y a un pequeño número de casos, usan marcadores y técnicas diferentes, y no tienen en cuenta los efectos del tiempo y la terapia sobre la gestación diabética. Sorprende que en estos estudios, esta forma de diabetes no se asocie a mayor EO a diferencia de la mayoría de estudios en población con diabetes tipo 1 y 2. Creemos que son necesarios estudios longitudinales con mayor número de participantes, en fases anteriores y posteriores a la gestación, y con mayor número de marcadores, para aumentar conocimientos acerca de la influencia del EO sobre el inicio y progresión de la DG, y para valorar la posibilidad de usar antioxidantes como parte del tratamiento de la DG.

Por otra parte los estudios realizados periparto en madres y sus recién nacidos, utilizando plasma y placenta, señalan mayores niveles de EO y descenso de las defensas antioxidantes respecto a madres no diabéticas, utilizando como marcadores MDA en muestras de cordón umbilical y homogenado de placenta^{202, 271}, MDA eritrocitario de recién nacido y de la madre¹⁹⁵, 8-isoprostano^{182, 201} en placenta, y TBARS²⁷² en plasma de madre y recién nacido durante el parto. Se ha postulado que la placenta de mujeres DG ofrece una menor respuesta al EO mediada por la represión de la actividad NF-kB, y se ha querido asociar estos elevados niveles de EO en recién nacidos con las malformaciones mas frecuentes en la DG. Coughlan, concluye que hay mayor EO en DG, y sugieren que se debe al peor control glucémico y no a una menor capacidad antioxidante, proponiendo estudiar nuevos métodos de intervención farmacológica.

Respecto a los estudios sobre capacidad antioxidante en DG también nos encontramos con valoraciones muy diversas, tanto en los métodos utilizados como en las condiciones de los estudios. De los 3 estudios evolutivos citados para comentar MDA, solo 2 valoran el estado antioxidante en DG: Santra²⁶⁹ describe mayores niveles de vitamina E y Toescu¹⁸⁰ menor capacidad antioxidante total. Entre los estudios transversales, Peuchant²⁰³ describe, para DG, valores significativamente menores en GPx eritrocitario, sin diferencias en SOD eritrocitaria, mientras que Chaudari²⁰⁴ detecta descenso de SOD en el mismo tipo de muestra.

La peroxidación lipídica se ha relacionado con la alteración en la síntesis de prostaglandinas las cuales pueden ser responsables de las malformaciones fetales atribuidas a la diabetes. Nuestro estudio no incluye datos bioquímicos de los recién nacidos, pero si que hemos podido observar que no hay diferencias en el peso ni se observaron malformaciones congénitas, consecuencia del buen control metabólico. A pesar de que el control glucémico medido por HbA1c es significativamente más alto en el grupo DG en 2º y 3º trimestre, éste se mantiene dentro de los objetivos recomendables.

Peuchant y cols²⁰³ encuentran correlación positiva entre HbA1c y MDA libre eritrocitario en el conjunto de gestantes con diabetes (DM1 gestantes mas DG) en inicios de 3º trimestre, pero no en los grupos citados por separado. En nuestro estudio al analizar los datos del conjunto de todas las mujeres, DG mas controles, encontramos correlación directa entre MDA y HbA1c (ver figura 25), correlación inversa entre GPx y HbA1c (ver figura 26), y otra nueva correlación inversa entre MDA y GPx, (ver figura 27) sugiriendo cierto grado de asociación entre gestación y EO. Al analizar por separado el grupo DG se mantiene la correlación inversa entre MDA y GPx en el conjunto de la gestación, señalando el balance continuo entre oxidantes y antioxidantes.

Por otra parte, hemos estudiado la posibilidad de predecir DG con los marcadores de EO valorados, pues opinamos que es necesario un diagnóstico precoz de DG para minimizar la exposición fetal a condiciones metabólicas subóptimas y prevenir las complicaciones

perinatales y sus secuelas. Por otro lado, persiste la controversia internacional a cerca del momento y método del diagnóstico de DG²⁷³, lo cual trasciende al manejo de las madres y repercute en el resultado perinatal. Identificar mujeres de riesgo permite mejorar el modelo de asistencia e identificar al grupo de pacientes que particularmente necesitan estudio de la tolerancia a la glucosa. Se han estudiado múltiples factores de riesgo durante el 1º trimestre tales como historia familiar de DG y/o DM²⁷⁴, glucemia en ayunas²⁷⁵, HbA1c²⁷⁶, sobrecarga oral de 1 hora²⁷⁷; algunos factores presentan un buen valor predictivo negativo²⁷⁸, todos presentan un valor predictivo positivo pobre y tienen limitada eficacia. Recientemente se ha publicado en España²⁷⁹ que en el 35% de las mujeres embarazadas con el test de O'Sullivan positivo, no se realiza posteriormente el necesario test de sobrecarga oral de glucosa que permite diagnosticar y tratar una posible Diabetes Gestacional. Nuevos marcadores que precedan a la hiperglucemia pueden ser útiles para desarrollar test aplicables al inicio del embarazo e identificar antes la DG. Nuestros datos a cerca del EO demuestran diferencias significativas entre grupos en el inicio de la gestación, antes del diagnóstico de DG, pero el análisis estadístico no detecta asociaciones predictivas con el tamaño muestral actual: MDA y GPx en 1º trimestre no predicen DG en 2º trimestre con el número de casos incluidos en esta investigación, siendo necesario ampliar la muestra. Otros grupos han investigado la misma hipótesis utilizando diversos marcadores. En fechas reciente Georgiou²⁷⁰ ha publicado un estudio predictivo para DG en una población de 250 gestantes: cruzando datos de 14 gestantes DG con un grupo control similar, y analizando 23 marcadores en semana gestacional 11 y 28, encuentra que niveles elevados de insulina

plasmática ($>25 \mu\text{U/ml}$) y bajos de adiponectina ($< 3,5 \mu\text{g/ml}$) predicen correctamente a 12 mujeres en cada grupo, pero no hay asociación para marcadores de EO (nitrotirosina e Hidroperóxido lipídico), ni para el resto de marcadores (varias interleuquinas, leptina, resistina, interferon γ y otros). Coincidimos con este autor en la necesidad de un estudio prospectivo más amplio usando diverso marcadores plasmáticos en ayuno en 1º trimestre.

Puede criticarse el hecho de que todas las mujeres de este estudio reciben un comprimido diario del complejo vitamínico citado en Material y Métodos (según las recomendaciones del Servicio de Ginecología, vigentes en esas fechas) ya que algunas de estas vitaminas tienen efectos antioxidantes. Las dosis utilizadas se consideran complemento nutricional y no son dosis farmacológicas, representan una pequeña fracción de la ingesta diaria recomendada según la Asociación Americana de Diabetes²⁸⁰. Creemos que estas vitaminas interfieren poco en los resultados por que ambos grupos reciben la misma pequeña dosis.

Los estudios en población no gestante con diversas terapias antioxidantes ofrecen resultados discordantes, en parte por la ausencia de condiciones comunes para la evaluación in vivo de los resultados. Hipotéticamente las dietas antioxidantes deben disminuir el EO pero hoy en día aun falta un estudio de intervención definitivo, aunque se ha comprobado que los alimentos con altas concentraciones de antioxidantes tienen un efecto protector, mejorando los efectos deletéreos del círculo vicioso formado por la obesidad, diabetes y EO²⁸¹.

Los estudios de intervención en población general, utilizando una o varias vitaminas antioxidantes a altas dosis, ofrecen resultados contradictorios²⁸²⁻²⁸⁴, quizás porque actúan solo sobre algunos componentes de las vías metabólicas del EO, y posiblemente el efecto antioxidante se deba a un conjunto amplio de elementos (como los aportados por la dieta), actuando en diversos puntos. Aconsejamos una dieta equilibrada como la indicada en nuestro estudio con el objetivo de conseguir los objetivos metabólicos y clínicos en madre y recién nacido, asegurando cubrir los requerimientos nutricionales diarios y aportando antioxidantes naturales, pero en grupos con limitaciones para seguir un estilo de vida y alimentación adecuada, un complemento vitamínico/nutricional puede usarse durante el embarazo²⁸⁵ antes que recomendar un alimento específico.

Algunos estudios han relacionado niveles plasmáticos bajos de vitamina C con mayor riesgo de padecer DG, aconsejando una ingesta adecuada de antioxidantes, y en especial esta vitamina, con la dieta^{205, 286}. Estudios de diabetes experimental en ratas concluyen que las malformaciones fetales y el daño tisular asociado a EO disminuyen cuando se usa una combinación de antioxidantes como vitamina C y E^{287, 288}.

Recientemente se ha publicado el estudio ARISE²⁸⁹ (*Aggressive Reduction of Inflammation Stops Events*), ensayo randomizado y doble ciego, comparativo de succinobucol (antioxidante antiinflamatorio derivado del probucol) frente a placebo, en una cohorte de 6144 pacientes que sufrieron síndrome coronario agudo 14-365 días antes de

iniciar el estudio, concluyendo que este fármaco mejora el control glucémico en diabéticos y reduce un 63% la aparición de nuevos casos de DM, abriendo un nuevo campo terapéutico para la prevención y/o tratamiento de la DM.

No encontramos correlación entre los marcadores estudiados, MDA y GPx, con la glucemia ni lípidos estudiados, ni con otros componentes de la bioquímica ni hemograma convencional. Nuestros resultados coinciden con otros estudios^{180, 241}. Se asume en la literatura que hay correlación entre la hiperglucemia aguda y EO, pero no hay datos convincentes²⁹⁰ pues estudiar el EO asociado a la elevación aguda de glucemia no es fácil y se describen diversas dificultades: falta de sensibilidad y especificidad de los biomarcadores para detectar cambios, estudio sobre tejidos aislados con exposición temporal a la hiperglucemia, testeo inadecuadamente breve, condiciones experimentales no fisiológicas, valoración inadecuada del efecto de antioxidantes. Otros estudios si encuentran asociación entre la glucemia postprandial^{291, 292} y el EO, sugiriendo que las excursiones hiperglucémicas tras las ingestas son mas generadoras de EO que la glucemia basal en ayunas, remarcando la importancia de controlar adecuadamente la glucemia en todo momento del día e indicando la necesidad de monitorizar no solo la HbA1c sino también las glucemias postingesta. Si se ha descrito²⁹³ una mayor susceptibilidad de las LDL a la oxidación en gestantes diabéticas, atribuyéndoles mayor capacidad aterógena y facilitando el desarrollo de complicaciones cardiovasculares crónicas.

Los datos de esta investigación son consistentes con la hipótesis que implica al EO en la patogénesis de la DG. Futuros estudios son necesarios para ampliar nuestros conocimientos, incluyendo mujeres en las semanas previas y posteriores a la gestación.

Tabla 13. Resumen de publicaciones acerca de marcadores de estrés oxidativo en gestantes sanas comparadas con no gestantes *.

Estudio	N [†]	Muestra [†]	Semana gestacional	Marcador Principal	Hallazgo (evolución trimestral)
Una sola determinación					
Morris ¹⁸³	19/7	Plasma	No especificada	MDA, LHP, vitamina E	Todos ↑§
Arikan ¹⁹⁰	20/20	Plasma y eritrocitos	3º trimestre	MDA, Glutatión	MDA↑§ ambos tejidos, Glutatión eritrocitario↓§
Kharb ²⁶¹	25/25	Plasma	No especificada	MDA, vitamina E	NS
Estudios evolutivos					
Toescu ¹⁷⁹	17/12	Plasma	1º,2º,3º trimestre (posprandial)	TAC, LHP, LDL-Col	TAC y LHP↑§ 3º tr
Mihailovic ¹⁸⁹	115**/20	Plasma	1º,2º,3º trimestre	MDA, GPx	MDA ↑§ 2º y 3º tr. GPx↓§ 2º y 3º tr
Carone ¹⁸⁴	10/10	Hemolisado hematíes	1º,2º,3º trimestre	TBARS, GPx, CAT, SOD	TBARS ↑§ 3º tr. GPx y CAT NS. SOD ↑§ todos los trimestres.
Loverro ¹⁸⁵	10/20	Hemolisado hematíes	1º,2º,3º trimestre	TBARS, GPx, CAT, SOD	TBARS ↑§ 3º tr. GPx y CAT NS. SOD ↑§ 3º tr.
Djordjevic ²⁶²	30/30	Hemolisado hematíes	1º,2º,3º trimestre	TBARS, GPx, CAT, SOD	TBARS ↑§ 3º tr. GPx ↑§ 2º y 3º tr. SOD ↑§ todos los trimestres. CAT ↓§ 1º y 3º trimestres
Fialova ²⁶³	102***/26	Plasma	1 y 2º trimestre	AOSPP, PCR	Todos ↑§
Gladen ¹⁸⁷	28/21	Sangre total	Mensual	LHP	NS entre trimestres pero mayor que no gestante
Patrick ¹⁹⁶	30/--	Plasma	1º,2º,3º trimestre	MDA	NS entre trimestres
Uotila ¹⁸⁸	10/--	Suero y Otros	1º,2º,3º trimestre (posprandial)	TBARS, GPx (plaquetas y hematíes)	TBARS NS entre trimestres. GPx↑§ 3º tr
Zachara ¹⁹²	49/6	Plasma y hematíes	10,20,30,40 semana	GPx	Plasma ↓§ semana 30 y 40, Hematíes ↓§ semana 40
Chen ²⁹⁴	408/--	Hemolisado hematíes	semana 16 y 30	GPx	↑§
Orhan ¹⁹⁴	16/--	Hematíes	3º trimestre y posparto	GPx-Se dependiente	NS respecto 1-2 días posparto

*Otros grupos, como DG, DM1 y DM2, no están incluidos. † Gestantes sanas/No gestantes sanas. † Otros tejidos, como líquido amniótico, no están incluidos. ↑ Aumentado respecto no gestante sana, ↓ Disminuido respecto no gestante sana. § Diferencia significativa, ↑x2 Aumentado el doble respecto no gestante sana.** 35 mujeres de 1º tr, 22 de 2º tr, 38 de 3º tr. *** 86 mujeres de 1º tr, 102 de 2º t. AOPPs= Productos avanzados de la oxidación proteica, PCR=proteína C reactiva.

Tabla 14. Resumen de publicaciones acerca de marcadores de estrés oxidativo en mujeres con DG comparadas con gestantes sanas *.

Estudio	N [↖]	Muestra [†]	Semana gestacional	Marcador Principal	Hallazgo (GD vs controles)
Muestra de tejidos					
Kinalski ²⁹⁵	19/13	Placenta	Posparto inmediato	MDA, SOD, GSH	MDA↑§, SOD↓, GSH↑
Coughlan ¹⁸²	12/11	Placenta	15 minutos posparto	8-isoprostano, SOD, GPx	8-isoprostano ↑x2. SOD↑§. GPx NS.
Lappas ²⁰¹	12/10	Placenta, tejido adiposo, músculo esquelético	10 minutos posparto	8-isoprostano	8-isoprostano basal ↑ en todos los tejidos.
Coughlan ²⁰⁰	5/5	Placenta	15 minutos posparto	8-isoprostano	8-isoprostano basal ↑x2
Muestras Sangre materna					
Chaudari ²⁰⁴	20/20	Eritrocitos, hemolisado	3° trimestre	MDA, SOD	MDA↑§, SOD↓
Peuchant ²⁰³	16/27	Plasma y eritrocitos	3° trimestre	MDA, SOD, GPx, vitaminas A y E	MDA↑§ en ambas muestras, GPx eritrocitos↓§, otros marcadores NS
Toescu ¹⁸⁰	12/17	Plasma	2° y 3° trimestre	TAC, LHP	TAC↓§, total TAC y LHP NS
Orhan ¹⁹⁴	3/16	Plasma y eritrocitos	3° trimestre	GPx, CATM, TBARS	Todos NS
Kamath ¹⁹⁵	20/15	Eritrocitos	Posparto inmediato	MDA, actividad proteolítica	MDA NS, actividad proteolítica ↑§
Sobki ²⁹⁶	46/40 **	Plasma	Parto	MDA, vitamina E	MDA NS, vit E ↑§ si dieta, vit E NS si insulina
Zhang ²⁰⁵	33/722 #	Plasma	13	Ácido ascórbico	Niveles bajos triplican el riesgo de DG

*Otros grupos, como DM1 y DM2, no están incluidos. ↖ Diabetes Gestacional/controles gestantes sanas. † Otros tejidos, como cordón umbilical, no están incluidos. # A propósito de un estudio con 755 gestantes, 33 desarrollaron DG. ** 27 mujeres DG tratadas con dieta, y 19 con insulina. ↑ Aumentado respecto gestante sana, ↓ Disminuido respecto gestante sana. § Diferencia significativa, ↑x2 Aumentado el doble respecto gestante sana. GSH=glutación.

VI.- CONCLUSIONES

1. Las mujeres que desarrollan Diabetes Gestacional presentan mayores niveles de peroxidación lipídica, estimada como la mayor concentración plasmática de Malondialdehído, que el grupo control, con diferencias significativas en 1º y 2º trimestres (antes del diagnóstico y tratamiento), sugiriendo la implicación del estrés oxidativo en su génesis.
2. El grupo de mujeres con Diabetes Gestacional presenta niveles más bajos de defensa antioxidante, menor actividad Glutación Peroxidasa, que el grupo control, con diferencias significativas en 1º trimestre.
3. En pacientes con Diabetes Gestacional existe una correlación inversa entre Malondialdehído y Glutación Peroxidasa en la segunda mitad del embarazo. No se encuentran correlaciones del MDA ni de GPx con lípidos plasmáticos, hemoglobina glicosilada ni con el resto de variables analizadas.
4. Con el número de casos analizados, la concentración de Malondialdehído y la actividad Glutación Peroxidasa en el primer trimestre no pueden predecir el desarrollo de Diabetes Gestacional, siendo necesario ampliar el tamaño muestral.
5. El tratamiento de la Diabetes Gestacional (dieta, ejercicio y complejo polivitamínico, sin insulina) consigue normalizar los niveles de MDA al finalizar la gestación, logrando partos y recién nacidos similares al grupo control.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Steinbrook R. Facing the diabetes epidemic--mandatory reporting of glycosylated hemoglobin values in New York City. *N Engl J Med* 2006;354(6):545-8.
2. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20(7):1183-97.
3. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15(7):539-53.
4. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26(11):3160-7.
5. Bennewitz HG. *De diabete mellito, graviditatis symptomate*: Berlin; 1824.
6. Hoet J. [Diabetogenic effects of pregnancy.]. *Concours Med* 1953;75(13):1183-7.
7. O'Sullivan JB, Mahan CM. Criteria for the Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. *Diabetes* 1964;13:278-85.
8. Metzger BE. Summary and recommendations of the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee *Diabetes Care* 1991;40 Suppl 2:B197-201.
9. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 2:B161-7.
10. King H. Epidemiology of glucose intolerance and gestational diabetes in women of childbearing age. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 2:B9-13.
11. O'Sullivan JB, Charles D, Mahan CM, Dandrow RV. Gestational diabetes and perinatal mortality rate. *Am J Obstet Gynecol* 1973;116(7):901-4.
12. Widness JA, Cowett RM, Coustan DR, Carpenter MW, Oh W. Neonatal morbidities in infants of mothers with glucose intolerance in pregnancy. *Diabetes* 1985;34 Suppl 2:61-5.
13. O'Sullivan JB. Diabetes mellitus after GDM. *Diabetes* 1991;40 Suppl 2:131-5.
14. Freinkel N. Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny. *Diabetes* 1980;29(12):1023-35.
15. Silverman BL, Rizzo TA, Cho NH, Metzger BE. Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 2:B142-9.
16. Brody SC, Harris R, Lohr K. Screening for gestational diabetes: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Obstet Gynecol* 2003;101(2):380-92.
17. Coustan DR. Management of gestational diabetes mellitus: a self-fulfilling prophecy? *Jama* 1996;275(15):1199-200.
18. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2005;352(24):2477-86.
19. Pettitt DJ, Moll PP, Knowler WC, et al. Insulinemia in children at low and high risk of NIDDM. *Diabetes Care* 1993;16(4):608-15.

20. Williams D. Pregnancy: a stress test for life. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003;15(6):465-71.
21. Cousins L, Rigg L, Hollingsworth D, Brink G, Aurand J, Yen SS. The 24-hour excursion and diurnal rhythm of glucose, insulin, and C-peptide in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1980;136(4):483-8.
22. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165(6 Pt 1):1667-72.
23. Lutale JK, Justesen A, Swai AB, Alberti KG, McLarty DF. Glucose tolerance during and after pregnancy in nondiabetic women in an urban population in Tanzania. *Diabetes Care* 1993;16(4):575-7.
24. Weiss P. Gestational Diabetes: a survey and the Granz approach to diagnosis and therapy. In: Weiss P, Cousins D, eds. *Gestational Diabetes*. Viena: Springer-Verlag; 1988:1-5.
25. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19(4):259-70.
26. Lind T, Billewicz WZ, Brown G. A serial study of changes occurring in the oral glucose tolerance test during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1973;80(12):1033-9.
27. Gillmer MD, Beard RW, Brooke FM, Oakley NW. Carbohydrate metabolism in pregnancy. Part I. Diurnal plasma glucose profile in normal and diabetic women. *Br Med J* 1975;3(5980):399-402.
28. Langer O, Mazze R. The relationship between large-for-gestational-age infants and glycemic control in women with gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159(6):1478-83.
29. Hollingsworth DR. Alterations of maternal metabolism in normal and diabetic pregnancies: differences in insulin-dependent, non-insulin-dependent, and gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1983;146(4):417-29.
30. Service FJ, Nelson RL. Characteristics of glycemic stability. *Diabetes Care* 1980;3(1):58-62.
31. de Veciana M, Major CA, Morgan MA, et al. Postprandial versus preprandial blood glucose monitoring in women with gestational diabetes mellitus requiring insulin therapy. *N Engl J Med* 1995;333(19):1237-41.
32. Bergman RN, Phillips LS, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and beta-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. *J Clin Invest* 1981;68(6):1456-67.
33. Kuhl C. Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 2:B19-26.
34. Kuhl C. Glucose metabolism during and after pregnancy in normal and gestational diabetic women. 1. Influence of normal pregnancy on serum glucose and insulin concentration during basal fasting conditions and after a challenge with glucose. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1975;79(4):709-19.
35. Kuhl C, Holst JJ. Plasma glucagon and the insulin:glucagon ratio in gestational diabetes. *Diabetes* 1976;25(1):16-23.

36. Van Assche FA. Quantitative morphologic and histoenzymatic study of the endocrine pancreas in nonpregnant and pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1974;118(1):39-41.
37. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1978;85(11):818-20.
38. Catalano PM, Huston L, Amini SB, Kalhan SC. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(4):903-16.
39. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, et al. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol* 1993;264(1 Pt 1):E60-7.
40. Kalkhoff RK, Kissebah AH, Kim HJ. Carbohydrate and lipid metabolism during normal pregnancy: relationship to gestational hormone action. *Semin Perinatol* 1978;2(4):291-307.
41. Costrini NV, Kalkhoff RK. Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *J Clin Invest* 1971;50(5):992-9.
42. Bellmann O, Hartmann E. Influence of pregnancy on the kinetics of insulin. *Am J Obstet Gynecol* 1975;122(7):829-33.
43. Cousins L. Pregnancy complications among diabetic women: review 1965-1985. *Obstet Gynecol Surv* 1987;42(3):140-9.
44. Leturque A, Hauguel S, Sutter Dub MT, Maulard P, Girard J. Effects of placental lactogen and progesterone on insulin stimulated glucose metabolism in rat muscles in vitro. *Diabete Metab* 1989;15(4):176-81.
45. Schmitz O, Klebe J, Moller J, et al. In vivo insulin action in type 1 (insulin-dependent) diabetic pregnant women as assessed by the insulin clamp technique. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61(5):877-81.
46. Ciaraldi TP, Kettel M, el-Roeiy A, et al. Mechanisms of cellular insulin resistance in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(2):635-41.
47. Andersen O, Kuhl C. Adipocyte insulin receptor binding and lipogenesis at term in normal pregnancy. *Eur J Clin Invest* 1988;18(6):575-81.
48. Damm P, Handberg A, Kuhl C, Beck-Nielsen H, Molsted-Pedersen L. Insulin receptor binding and tyrosine kinase activity in skeletal muscle from normal pregnant women and women with gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1993;82(2):251-9.
49. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67(2):341-7.
50. Buchanan TA, Kitzmiller JL. Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annu Rev Med* 1994;45:245-60.
51. Anderson O, Falholt K, Kuhl C. Activity of enzymes of glucose and triglyceride metabolism in adipose and muscle tissue from normal pregnant women at term. *Diabet Med* 1989;6(2):131-6.
52. Falholt K, Jensen I, Lindkaer Jensen S, et al. Carbohydrate and lipid metabolism of skeletal muscle in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 1988;5(1):27-31.
53. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in basal hepatic glucose production and suppression during

- insulin infusion in normal pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167(4 Pt 1):913-9.
54. Leturque A, Ferre P, Burnol AF, Kande J, Maulard P, Girard J. Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* 1986;35(2):172-7.
55. Mauricio D, de Leiva A. Autoimmune gestational diabetes mellitus: a distinct clinical entity? *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17(6):422-8.
56. Ellard S, Beards F, Allen LI, et al. A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. *Diabetologia* 2000;43(2):250-3.
57. Hornnes PJ, Kuhl C, Lauritsen KB. Gastro-entero-pancreatic hormones in normal pregnancy: response to a protein rich meal. *Eur J Clin Invest* 1981;11(5):345-9.
58. Hornnes PJ, Kuhl C, Lauritsen KB. Gastrointestinal insulinotropic hormones in normal and gestational-diabetic pregnancy: response to oral glucose. *Diabetes* 1981;30(6):504-9.
59. Metzger BE, Unger RH, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. XIV. Relationships between circulating glucagon, insulin, glucose and amino acids in response to a "mixed meal" in late pregnancy. *Metabolism* 1977;26(2):151-6.
60. Kuhl C, Hornnes PJ. Endocrine pancreatic function in women with gestational diabetes. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1986;277:19-23.
61. Hornnes PJ, Kuhl C. Endocrine pancreatic sensitivity to glucose in women with gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1983;62(3):305-8.
62. Hornnes PJ, Kuhl C. Plasma insulin and glucagon responses to isoglycemic stimulation in normal pregnancy and post partum. *Obstet Gynecol* 1980;55(4):425-7.
63. Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162(4):1008-14.
64. Hornnes PJ. Gastroentero-pancreatic hormones in pregnancy. *Scand J Gastroenterol* 1984;19(4):451-6.
65. Kuhl C, Hornnes PJ, Jensen SL, Lauritsen KB. Effect of intraduodenal and intravenous triglyceride infusions on plasma gastric inhibitory polypeptide and insulin in fetal and neonatal pigs. *Diabetologia* 1982;23(1):41-4.
66. Hornnes PJ, Kuhl C, Lauritsen KB. Gastro-entero-pancreatic hormones in gestational diabetes: response to a protein rich meal. *Horm Metab Res* 1982;14(7):335-8.
67. Buchanan TA. Glucose metabolism during pregnancy: normal physiology and implications for diabetes mellitus. *Isr J Med Sci* 1991;27(8-9):432-41.
68. Cousins L. Insulin sensitivity in pregnancy. *Diabetes* 1991;40 Suppl 2:39-43.
69. Catalano PM, Roman NM, Tyzbir ED, Merritt AO, Driscoll P, Amini SB. Weight gain in women with gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1993;81(4):523-8.
70. Zimmer DM, Golichowski AM, Karn CA, Brechtel G, Baron AD, Denne SC. Glucose and amino acid turnover in untreated gestational diabetes. *Diabetes Care* 1996;19(6):591-6.
71. Grigorakis SI, Alevizaki M, Beis C, Anastasiou E, Alevizaki CC, Souvatzoglou A. Hormonal parameters in gestational diabetes mellitus during the third trimester: high glucagon levels. *Gynecol Obstet Invest* 2000;49(2):106-9.

72. Andersen O, Kuhl C. Insulin receptor binding to monocytes and erythrocytes during normal human pregnancy. *Eur J Clin Invest* 1986;16(3):226-32.
73. Andersen O, Kuhl C, Buch I. Insulin receptors in normal pregnant women and women with gestational diabetes. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1986;277:27-30.
74. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005;115(3):485-91.
75. Martinez C, Ruiz P, Andres A, Satrustegui J, Carrascosa JM. Tyrosine kinase activity of liver insulin receptor is inhibited in rats at term gestation. *Biochem J* 1989;263(1):267-72.
76. Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Hancock JA, Golichowski AM. Multiple defects in the adipocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes. Heterogeneity in the number and a novel abnormality in subcellular localization of GLUT4 glucose transporters. *Diabetes* 1993;42(12):1773-85.
77. Shao J, Catalano PM, Yamashita H, et al. Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM): evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM. *Diabetes* 2000;49(4):603-10.
78. Catalano PM, Avallone DA, Drago NM, Amini SB. Reproducibility of the oral glucose tolerance test in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169(4):874-81.
79. Kuhl C. Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management. *Diabetes* 1991;40 Suppl 2:18-24.
80. Reaven GM, Bernstein R, Davis B, Olefsky JM. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? *Am J Med* 1976;60(1):80-8.
81. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91(3C):31S-8S.
82. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(9-10):1865-79.
83. Williams KJ, Fisher EA. Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8(2):139-46.
84. Tylicki L, Rutkowski B, Horl WH. Antioxidants: a possible role in kidney protection. *Kidney Blood Press Res* 2003;26(5-6):303-14.
85. Scott JA, King GL. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031:204-13.
86. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *Jama* 2005;293(11):1338-47.
87. Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest* 1993;92(3):1564-71.

88. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320(6061):454-6.
89. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997;22(12):477-81.
90. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320(6):365-76.
91. Davies KJ, Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem* 1987;262(17):8220-6.
92. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15(1):7-10.
93. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84(4):1381-478.
94. Cantin AM. Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2004;10(6):531-6.
95. Bonnefont-Rousselot D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol* 2004;3(1):41-52.
96. Vina J, Lloret A, Orti R, Alonso D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2004;25(1-2):117-23.
97. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr* 2005;24(2):172-83.
98. Kas J, Blattna J. Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol [Med] (Praha)* 1986;32(1-2):81-92.
99. Gabig TG, Babior BM. The O₂(⁻) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 1979;254(18):9070-4.
100. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993;49(3):506-22.
101. Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 1992;307(1):108-12.
102. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17(2):145-52.
103. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1620-4.
104. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19(3):257-67.
105. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983;23:239-57.
106. Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 1982;31(21):3335-46.
107. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol* 1985;5:183-9.

108. Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985;5:365-90.
109. Dean RT, Thomas SM, Garner A. Free-radical-mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane. Roles for lipid radicals. *Biochem J* 1986;240(2):489-94.
110. Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O. Modification of human low density lipoprotein by lipid peroxidation. *Basic Life Sci* 1988;49:369-73.
111. Bazan NG. The metabolism of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the eye: the possible role of docosahexaenoic acid and docosanoids in retinal physiology and ocular pathology. *Prog Clin Biol Res* 1989;312:95-112.
112. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990;9(6):515-40.
113. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81-128.
114. Pryor WA, Stanley JP. Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 1975;40(24):3615-7.
115. Wilson DF, Owen CS, Erecinska M. Quantitative dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation on oxygen concentration: a mathematical model. *Arch Biochem Biophys* 1979;195(2):494-504.
116. Halliwell. Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. In: Packer L RP, Tritschler HJ, King GL, Azzi A, ed. *Antioxidants in Diabetes Management*. New York: Marcel Dekker Inc; 2000:33-52.
117. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995;18(1):125-6.
118. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711-60.
119. Fahey RC, Buschbacher RM, Newton GL. The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. *J Mol Evol* 1987;25:81-8.
120. Kosower NS, Kosower EM. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 1978;54:109-60.
121. Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 1992;257(5076):1496-502.
122. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J* 1999;13(10):1169-83.
123. Romero FJ, Sies H. Subcellular glutathione contents in isolated hepatocytes treated with L-buthionine sulfoximine. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123(3):1116-21.
124. DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991;52(3):287-305.
125. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, et al. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 1997;273(1 Pt 1):G7-17.
126. Romero FJ, Soboll S, Sies H. Mitochondrial and cytosolic glutathione after depletion by phorone in isolated hepatocytes. *Experientia* 1984;40(4):365-7.

127. Barber T, Borrás E, Torres L, et al. Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic Biol Med* 2000;29(1):1-7.
128. Van Vleet JF, Boon GD, Ferrans VJ. Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in ducklings fed silver, copper, cobalt, tellurium, cadmium, or zinc: protection by selenium or vitamin E supplements. *Am J Vet Res* 1981;42(7):1206-17.
129. Schramm H, Robertson LW, Oesch F. Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat. *Biochem Pharmacol* 1985;34(20):3735-9.
130. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta* 1982;710(2):197-211.
131. Habig WH, Jakoby WB. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol* 1981;77:218-31.
132. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1988;5(2):113-24.
133. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 1979;21(1):104-7.
134. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 1993;49(3):642-52.
135. Malaisse WJ. Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. A new hypothesis. *Biochem Pharmacol* 1982;31(22):3527-34.
136. Mendola J, Wright JR, Jr., Lacy PE. Oxygen free-radical scavengers and immune destruction of murine islets in allograft rejection and multiple low-dose streptozocin-induced insulinitis. *Diabetes* 1989;38(3):379-85.
137. Rother KI. Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med* 2007;356(15):1499-501.
138. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(5):816-23.
139. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(6865):813-20.
140. Simoneau JA, Colberg SR, Thaete FL, Kelley DE. Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *Faseb J* 1995;9(2):273-8.
141. Karowicz-Bilinska A, Suzin J, Sieroszewski P. Evaluation of oxidative stress indices during treatment in pregnant women with intrauterine growth retardation. *Med Sci Monit* 2002;8(3):CR211-6.
142. Simmons RA. Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006;40(6):917-22.
143. Chandel NS, Budinger GR, Schumacker PT. Molecular oxygen modulates cytochrome c oxidase function. *J Biol Chem* 1996;271(31):18672-7.
144. Antinozzi PA, Ishihara H, Newgard CB, Wollheim CB. Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues. *J Biol Chem* 2002;277(14):11746-55.

145. Malaisse WJ, Hutton JC, Carpinelli AR, Herchuelz A, Sener A. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release: metabolism and cationic effects of leucine. *Diabetes* 1980;29(6):431-7.
146. Mertz RJ, Worley JF, Spencer B, Johnson JH, Dukes ID. Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells by specific products of glucose metabolism. Evidence for privileged signaling by glycolysis. *J Biol Chem* 1996;271(9):4838-45.
147. Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1995;64:689-719.
148. Noda M, Yamashita S, Takahashi N, et al. Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the beta-cell model of mitochondrial diabetes. Characteristics of betaHC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription. *J Biol Chem* 2002;277(44):41817-26.
149. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 1996;20(3):463-6.
150. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997;46(11):1733-42.
151. Maechler P, Jornot L, Wollheim CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 1999;274(39):27905-13.
152. Moran A, Zhang HJ, Olson LK, Harmon JS, Poitout V, Robertson RP. Differentiation of glucose toxicity from beta cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15. *J Clin Invest* 1997;99(3):534-9.
153. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, et al. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(1):216-22.
154. Shah S, Iqbal M, Karam J, Salifu M, Mcfarlane S. Oxidative Stress, Glucose Metabolism, and the Prevention of Type 2 Diabetes: Pathophysiological Insights. *Antioxidants & Redox signaling* 2007;9(7):911-29.
155. Selak MA, Storey BT, Peterside I, Simmons RA. Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle of intrauterine growth-retarded rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285(1):E130-7.
156. Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* 1992;15(12):1902-25.
157. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404(6779):787-90.
158. Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17(3):189-212.

159. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003;52(1):1-8.
160. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23(5):599-622.
161. Nawroth P, Borcea V, Bierhaus A, Joswig M, Schiekofer S, Tritschler H. Oxidative Stress, NF-kB activation, and late diabetic complications. In: Packer L, Rösen P, Tritschler H, King G, Azzi A, eds. *Antioxidants in Diabetes Management*. New York: Marcel Dekker; 2000:185-204.
162. Chappuy O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 1997;27(2):97-108.
163. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48(1):1-9.
164. Hohman T, Banis D, Basso M, Cotter M, Cameron N. Resistance to increased oxidative stress is decreased in experimental diabetic neuropathy. *J Periph Nerv Syst* 1997;2:272.
165. Kim J, Rushovich EH, Thomas TP, Ueda T, Agranoff BW, Greene DA. Diminished specific activity of cytosolic protein kinase C in sciatic nerve of streptozocin-induced diabetic rats and its correction by dietary myo-inositol. *Diabetes* 1991;40(11):1545-54.
166. Hermenegildo C, Raya A, Roma J, Romero FJ. Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* 1993;18(8):893-6.
167. Ziegler D, Gries FA. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy. *Diabetes* 1997;46 Suppl 2:S62-6.
168. Karasu C, Ozansoy G, Bozkurt O, Erdogan D, Omeroglu S. Antioxidant and triglyceride-lowering effects of vitamin E associated with the prevention of abnormalities in the reactivity and morphology of aorta from streptozotocin-diabetic rats. *Antioxidants in Diabetes-Induced Complications (ADIC) Study Group. Metabolism* 1997;46(8):872-9.
169. Haffner SM. Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism* 2000;49(2 Suppl 1):30-4.
170. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol* 1994;266(3 Pt 2):H1153-61.
171. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *Jama* 1979;241(19):2035-8.
172. Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48(5):937-42.
173. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329(14):977-86.
174. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352(9131):837-53.

175. Niedowicz DM, Daleke DL. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 2005;43(2):289-330.
176. Kaaja R. Insulin resistance syndrome in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16(1):41-6.
177. Sattar N, Greer IA, Loudon J, et al. Lipoprotein subfraction changes in normal pregnancy: threshold effect of plasma triglyceride on appearance of small, dense low density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(8):2483-91.
178. Desoye G, Schweditsch MO, Pfeiffer KP, Zechner R, Kostner GM. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64(4):704-12.
179. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57(5):609-13.
180. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, et al. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2004;106(1):93-8.
181. Poston L, Raijmakers MT. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome--a review. *Placenta* 2004;25 Suppl A:S72-8.
182. Coughlan MT, Vervaart PP, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2004;25(1):78-84.
183. Morris JM, Gopaul NK, Endresen MJ, et al. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105(11):1195-9.
184. Carone D, Loverro G, Greco P, Capuano F, Selvaggi L. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993;51(2):103-9.
185. Loverro G, Greco P, Capuano F, Carone D, Cormio G, Selvaggi L. Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in pregnancy complicated with hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;70(2):123-7.
186. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999;13(5):347-52.
187. Gladen BC, Tabacova S, Baird DD, Little RE, Balabaeva L. Variability of lipid hydroperoxides in pregnant and nonpregnant women. *Reprod Toxicol* 1999;13(1):41-4.
188. Uotila J, Tuimala R, Aarnio T, Pyykko K, Ahotupa M. Lipid peroxidation products, selenium-dependent glutathione peroxidase and vitamin E in normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;42(2):95-100.
189. Mihailovic M, Cvetkovic M, Ljubic A, et al. Selenium and malondialdehyde content and glutathione peroxidase activity in maternal and umbilical cord blood and amniotic fluid. *Biol Trace Elem Res* 2000;73(1):47-54.
190. Arikan S, Konukoglu D, Arikan C, Akcay T, Davas I. Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecol Obstet Invest* 2001;51(3):145-9.
191. McKinney ET, Shouri R, Hunt RS, Ahokas RA, Sibai BM. Plasma, urinary, and salivary 8-epi-prostaglandin f2alpha levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(4):874-7.

192. Zachara BA, Wardak C, Didkowski W, Maciag A, Marchaluk E. Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 1993;35(1):12-7.
193. Chen X, Scholl TO, Leskiw MJ, Donaldson MR, Stein TP. Association of glutathione peroxidase activity with insulin resistance and dietary fat intake during normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(12):5963-8.
194. Orhan H, Onderoglu L, Yucel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2003;267(4):189-95.
195. Kamath U, Rao G, Raghobama C, Rai L, Rao P. Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. *Acta Paediatr* 1998;87(6):676-9.
196. Patrick TE, Hubel CA, Roberts JM. Evidence of increased oxidative stress, unexplained by lipid changes, is present in nulliparous black women from early gestation. *Hypertens Pregnancy* 2004;23(1):91-100.
197. Silver HM, Seebeck M, Carlson R. Comparison of total blood volume in normal, preeclamptic, and nonproteinuric gestational hypertensive pregnancy by simultaneous measurement of red blood cell and plasma volumes. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(1):87-93.
198. Paolisso G, Giugliano D. Oxidative stress and insulin action: is there a relationship? *Diabetologia* 1996;39(3):357-63.
199. Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, et al. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 1998;28(4):329-33.
200. Coughlan MT, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Repression of oxidant-induced nuclear factor-kappaB activity mediates placental cytokine responses in gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3585-94.
201. Lappas M, Permezel M, Rice GE. Release of proinflammatory cytokines and 8-isoprostane from placenta, adipose tissue, and skeletal muscle from normal pregnant women and women with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(11):5627-33.
202. Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, et al. Lipid peroxidation, antioxidant defence and acid-base status in cord blood at birth: the influence of diabetes. *Horm Metab Res* 2001;33(4):227-31.
203. Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, et al. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2004;37(4):293-8.
204. Chaudhari L, Tandon OP, Vaney N, Agarwal N. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetics. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003;47(4):441-6.
205. Zhang C, Williams MA, Sorensen TK, et al. Maternal plasma ascorbic Acid (vitamin C) and risk of gestational diabetes mellitus. *Epidemiology* 2004;15(5):597-604.
206. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99(2):224-9.
207. Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 1993;57(5):650-6.

208. Paolisso G, D'Amore A, Balbi V, et al. Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol* 1994;266(2 Pt 1):E261-8.
209. Control básico del embarazo en la Comunitat Valenciana. 2000. (Accessed http://biblioteca.sp.san.gva.es/biblioteca/publicaciones/MATERIAL/PUBLICACIONES/INFAN_MUJER/PERINATAL/EMBARAZO/CONTROL_BASICO_DEL_EMBARAZO.PDF, at
210. Grupos Español de Diabetes y Embarazo (GEDE). *Diabetes Mellitus y Embarazo* (3ª edición). Madrid; Guía Asistencial; 2005.
211. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* 1979;28(12):1039-57.
212. Ricart W, Lopez J, Mozas J, et al. Potential impact of American Diabetes Association (2000) criteria for diagnosis of gestational diabetes mellitus in Spain. *Diabetologia* 2005;48(6):1135-41.
213. Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, et al. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2(2):S251-60.
214. Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144(7):768-73.
215. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl 1:S88-90.
216. Jovanovic-Peterson L, Bevier W, Peterson CM. The Santa Barbara County Health Care Services program: birth weight change concomitant with screening for and treatment of glucose-intolerance of pregnancy: a potential cost-effective intervention? *Am J Perinatol* 1997;14(4):221-8.
217. Franz MJ, Horton ES, Sr., Bantle JP, et al. Nutrition principles for the management of diabetes and related complications. *Diabetes Care* 1994;17(5):490-518.
218. Langer O, Conway DL, Berkus MD, Xenakis EM, Gonzales O. A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000;343(16):1134-8.
219. Barthelmai W, Czok R. [Enzymatic determinations of glucose in the blood, cerebrospinal fluid and urine.]. *Klin Wochenschr* 1962;40:585-9.
220. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20(4):470-5.
221. Tietz NW. In: *Clinical guide to laboratory test*. 3º ed. Filadelfia: WB Saunders Company; 1995:610-1.
222. Miki Y. A homogeneous assay for the selective measurement of LDL-cholesterol in serum. Enzymatic selective protection method. *Clin Lab* 1999(45):398-401.
223. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem* 1980;26(2):227-31.
224. Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21(11):731-48.
225. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved

- recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;24(7):481-95.
226. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *J Clin Chem Clin Biochem* 1986;24(7):497-510.
227. Shaw LM, Stromme JH, London JL, Theodorsen L. International Federation of Clinical Chemistry, (IFCC), Scientific Committee, Analytical Section. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for gamma-glutamyltransferase [(gamma-glutamyl)-peptide: amino acid gamma-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2]. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21(10):633-46.
228. Tolman KG, Rej R. Liver function. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1999:1136-7.
229. Larsen K. Creatinine assay in the presence of protein with LKB 8600 Reaction Rate Analyser. *Clin Chim Acta* 1972;38(2):475-6.
230. Talke H, Schubert GE. [Enzymatic Urea Determination in the Blood and Serum in the Warburg Optical Test.]. *Klin Wochenschr* 1965;43:174-5.
231. Goodwin JF, Murphy B, Guillemette M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. *Clin Chem* 1966(12):47-57.
232. Bernard A, Lauwerys R. Turbidimetric latex immunoassay for serum ferritin. *J Immunol Methods* 1984;71(2):141-7.
233. Gruber CA, Koets MD. Quantitation of hemoglobin A1a+b and hemoglobin A1c by automated "high-performance" liquid chromatography. *Clin Chem* 1979;25(11):1970-1.
234. Dunn PJ, Cole RA, Soeldner JS. Further development and automation of a high pressure liquid chromatography method for the determination of glycosylated hemoglobins. *Metabolism* 1979;28(7):777-9.
235. John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini-Arkay HA 8140 hemoglobin A1c analyzer. *Clin Chem* 1997;43(6 Pt 1):968-75.
236. Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J Nutr* 1978;108(6):981-7.
237. Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 1992;577(1):9-18.
238. Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998;25(9):993-7.
239. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993;91(6):2463-9.

240. Wells-Knecht MC, Lyons TJ, McCance DR, Thorpe SR, Baynes JW. Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes. *J Clin Invest* 1997;100(4):839-46.
241. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 1995;44(9):1054-8.
242. Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997;40(6):647-53.
243. Ortega RM, Lopez-Sobaler AM, Martinez RM, Andres P, Quintas ME. Influence of smoking on vitamin E status during the third trimester of pregnancy and on breast-milk tocopherol concentrations in Spanish women. *Am J Clin Nutr* 1998;68(3):662-7.
244. Ermis B, Ors R, Yildirim A, Tastekin A, Kardas F, Akcay F. Influence of smoking on maternal and neonatal serum malondialdehyde, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase levels. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34(4):405-9.
245. Ciragil P, Kurutas E, Gul M, Kilinc M, Aral M, Guven A. The effects of oxidative stress in urinary tract infection during pregnancy. *Mediators Inflamm* 2005;5:309-11.
246. Koken G, Sahin FK, Cosar E, et al. Oxidative stress markers in pregnant women who snore and fetal outcome: a case control study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007;86(11):1317-21.
247. Nielsen LR, Ekbom P, Damm P, et al. HbA1c levels are significantly lower in early and late pregnancy. *Diabetes Care* 2004;27(5):1200-1.
248. Mosca A, Paleari R, Dalfra MG, et al. Reference intervals for hemoglobin A1c in pregnant women: data from an Italian multicenter study. *Clin Chem* 2006;52(6):1138-43.
249. O'Kane MJ, Lynch PL, Moles KW, Magee SE. Determination of a diabetes control and complications trial-aligned HbA(1c) reference range in pregnancy. *Clin Chim Acta* 2001;311(2):157-9.
250. Lind T, Cheyne GA. Effect of normal pregnancy upon the glycosylated haemoglobins. *Br J Obstet Gynaecol* 1979;86(3):210-3.
251. Hanson U, Hagenfeldt L, Hagenfeldt K. Glycosylated hemoglobins in normal pregnancy: sequential changes and relation to birth weight. *Obstet Gynecol* 1983;62(6):741-4.
252. Gunter HH, Ritter C, Reinhardt W, Strahl B, Niesert S, Mitzkat HJ. [Influence of non-diabetic pregnancy on fructosamine and HbA1c concentration]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 1995;199(4):148-55.
253. Worth R, Potter JM, Drury J, Fraser RB, Cullen DR. Glycosylated haemoglobin in normal pregnancy: a longitudinal study with two independent methods. *Diabetologia* 1985;28(2):76-9.
254. Radder JK, van Roosmalen J. HbA1c in healthy, pregnant women. *Neth J Med* 2005;63(7):256-9.
255. Agarwal MM, Dhatt GS, Punnose J, Koster G. Gestational diabetes: a reappraisal of HbA1c as a screening test. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84(12):1159-63.

256. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358(19):1991-2002.
257. Reichel R, Widhalm K. Lipids and lipoproteins during pregnancy. *Prog Clin Biol Res* 1988;255:125-33.
258. Herrera E, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA. Lipid metabolism in pregnancy. *Biol Neonate* 1987;51(2):70-7.
259. Montelongo A, Lasuncion MA, Pallardo LF, Herrera E. Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes* 1992;41(12):1651-9.
260. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, et al. Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. *Diabet Med* 2005;22(1):21-5.
261. Kharb S. Lipid peroxidation in pregnancy with preeclampsia and diabetes. *Gynecol Obstet Invest* 2000;50(2):113-6.
262. Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A, Djordjevic R, Grubor-Lajsic G. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;16(6):367-72.
263. Fialova L, Malbohan I, Kalousova M, et al. Oxidative stress and inflammation in pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2006;66(2):121-7.
264. Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann Clin Biochem* 1981;18(Pt 3):158-62.
265. Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(1):80-6.
266. Biondi C, Pavan B, Lunghi L, Fiorini S, Vesce F. The role and modulation of the oxidative balance in pregnancy. *Curr Pharm Des* 2005;11(16):2075-89.
267. Roes EM, Hendriks JC, Raijmakers MT, et al. A longitudinal study of antioxidant status during uncomplicated and hypertensive pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85(2):148-55.
268. Wender-Ozegowska E, Kozlik J, Biczysko R, Ozegowski S. Changes of oxidative stress parameters in diabetic pregnancy. *Free Radic Res* 2004;38(8):795-803.
269. Santra D, Sawhney H, Aggarwal N, Majumdar S, Vasishta K. Lipid peroxidation and vitamin E status in gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol Res* 2003;29(5):300-4.
270. Georgiou HM, Lappas M, Georgiou GM, et al. Screening for biomarkers predictive of gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2008.
271. Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta* 2006;27(2-3):327-32.
272. Rajdl D, Racek J, Steinerova A, et al. Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. *Physiol Res* 2005;54(4):429-36.
273. Agarwal MM, Dhath GS, Punnose J, Koster G. Gestational diabetes: dilemma caused by multiple international diagnostic criteria. *Diabet Med* 2005;22(12):1731-6.
274. Caliskan E, Kayikcioglu F, Ozturk N, Koc S, Haberal A. A population-based risk factor scoring will decrease unnecessary testing for the diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83(6):524-30.

275. Sacks DA, Chen W, Wolde-Tsadik G, Buchanan TA. Fasting plasma glucose test at the first prenatal visit as a screen for gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 2003;101(6):1197-203.
276. Cypryk K, Czupryniak L, Wilczynski J, Lewinski A. Diabetes screening after gestational diabetes mellitus: poor performance of fasting plasma glucose. *Acta Diabetol* 2004;41(1):5-8.
277. Maegawa Y, Sugiyama T, Kusaka H, Mitao M, Toyoda N. Screening tests for gestational diabetes in Japan in the 1st and 2nd trimester of pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;62(1):47-53.
278. Nahum GG, Wilson SB, Stanislaw H. Early-pregnancy glucose screening for gestational diabetes mellitus. *J Reprod Med* 2002;47(8):656-62.
279. Martinez Bugallo F, Rodriguez Alvarez C, Salgado Parreno FJ, Aguirre-Jaime A. [Gestational diabetes hidden by breach of the diagnosis protocol.]. *Med Clin (Barc)* 2008;130(17):676-7.
280. Reader DM. Medical nutrition therapy and lifestyle interventions. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S188-93.
281. Franzini L, Ardigo D, Zavaroni I. Dietary antioxidants and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11(4):471-6.
282. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342(3):154-60.
283. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360(9326):23-33.
284. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr* 2005;25:151-74.
285. Glenville M. Nutritional supplements in pregnancy: commercial push or evidence based? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18(6):642-7.
286. Zhang C, Williams MA, Frederick IO, et al. Vitamin C and the risk of gestational diabetes mellitus: a case-control study. *J Reprod Med* 2004;49(4):257-66.
287. Cederberg J, Siman CM, Eriksson UJ. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr Res* 2001;49(6):755-62.
288. Siman CM, Eriksson UJ. Vitamin C supplementation of the maternal diet reduces the rate of malformation in the offspring of diabetic rats. *Diabetologia* 1997;40(12):1416-24.
289. Tardif JC, McMurray JJ, Klug E, et al. Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008;371(9626):1761-8.
290. Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ, Hannigan BM. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med* 2008;44(7):1217-31.
291. Wright E, Jr., Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract* 2006;60(3):308-14.
292. Monnier L, Mas E, Ginet C, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *Jama* 2006;295(14):1681-7.

293. Sanchez-Vera I, Bonet B, Viana M, et al. Changes in plasma lipids and increased low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in pregnancies complicated by gestational diabetes: consequences of obesity. *Metabolism* 2007;56(11):1527-33.
294. Chen X, Scholl TO. Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2005;5(4):282-8.
295. Kinalski M, Telejko B, Kowalska I, Urban J, Kinalska I. [The evaluation of lipid peroxidation products and antioxidative enzymes activity in cord blood and placental homogenates of pregnant diabetic women]. *Ginekol Pol* 1999;70(2):57-61.
296. Sobki SH, Al-Senaidy AM, Al-Shammari TA, Inam SS, Al-Gwiser AA, Bukhari SA. Impact of gestational diabetes on lipid profiling and indices of oxidative stress in maternal and cord plasma. *Saudi Med J* 2004;25(7):876-80.