

Efectos teratogénicos de la diabetes: papel de los radicales libres

B. BONET SERRA*^{***}, M. VIANA ARRIBAS*
y E. HERRERA CASTILLÓN*

**Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Universidad de San Pablo-CEU. Madrid. **Unidad de Pediatría. Fundación Hospital Alcorcón.*

No se conocen bien los mecanismos responsables de la mayor incidencia de malformaciones congénitas en los recién nacidos de madres con diabetes mellitus insulino dependientes (DMID), en relación con la población no diabética. Se ha propuesto que tanto el descontrol metabólico (hiperglucemia, hipoglucemia o hiperconetemia) como las alteraciones endocrinas que pueden afectar el desarrollo fetal (cambios en la concentración de inhibidores de la somatomedina, expresión del factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α] o en el metabolismo de las prostaglandinas) podrían asociarse a los efectos teratogénicos de la diabetes, aunque se reconoce que el proceso es multifactorial.

Recientemente, ha despertado interés la posible relación entre el estrés oxidativo y los efectos teratogénicos de la diabetes. Independientemente de factores exógenos, numerosos procesos celulares generan radicales libres, que están siendo continuamente neutralizados por los múltiples sistemas antioxidantes de que dispone el organismo. Un desequilibrio entre los radicales libres generados y estos sistemas antioxidantes permite que los primeros lleguen a reaccionar con diferentes moléculas, lesionando su estructura. Esta lesión puede producirse en los ácidos grasos, las proteínas y las bases de ADN, pudiendo incluso originar mutaciones en el material genético y afectar la expresión de determinados genes.

En la diabetes, se producen una serie de cambios metabólicos que ponen de manifiesto una mayor producción de radicales libres. Hace unos años se observó que la adición de agentes antioxidantes, concretamente de superóxido dismutasa, a embriones de ratas cultivados en un medio con alta concentración de glucosa reducía la tasa de malformaciones. Recientemente, nosotros hemos demostrado, por primera vez in vivo, que la administración por vía oral de la vitamina E a las ratas diabéticas preñadas, durante el período embrionario (hasta el día 11,5 de la gestación) reducía drásticamente la incidencia de malformaciones embrionarias, que pasaban de ser de un 24% en las que no recibían tratamiento al 5% en las tratadas diariamente con 150 mg/día de dicha vitamina. También demostramos que los efectos de la vitamina E son dosis-dependiente, y que altas dosis de la misma son tóxicas, produciendo un aumento en la tasa de reabsorciones, que llega a afectar al 45% de los embriones. Así pues, parece claramente establecida la participación de los radicales libres en la teratogénesis diabética, brindando la administración de antioxidantes como un mecanismo coadyuvante al control metabólico de la madre para prevenir las malformaciones congénitas asociadas a la diabetes. Se requieren ensayos clínicos para determinar su efectividad en los humanos.

EFFECTOS TERATOGÉNICOS DE LA DIABETES

La incidencia de malformaciones congénitas en los recién nacidos de madres con diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) alcanza valores cercanos al 10%¹⁻⁹, cifra muy superior al 2-3% hallado en la población no diabética. Dicha tasa de malformaciones congénitas está relacionada con el grado de control metabólico alcanzado en el período peri-

Correspondencia: Dr. B. Bonet.
Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo-CEU.
Apartado de correos 67. 28660 Boadilla del Monte. Madrid.

Manuscrito recibido el 28-11-1997; aceptado para su publicación el 6-7-1998.

Palabras clave: Diabetes mellitus. Radicales libres. Teratogénesis. Vitamina E.

concepcional y/o durante el período de desarrollo embrionario¹⁰; de hecho, diversos estudios han demostrado que en las mujeres con DMID sometidas a un estricto control metabólico, previo a la concepción, la tasa de malformaciones congénitas es similar a la hallada en la población no diabética^{6,10,11}.

El mecanismo o los mecanismos responsables de los efectos teratogénicos de la diabetes no son bien conocidos, al igual que sucede en prácticamente todas las complicaciones secundarias a la misma. Es en el animal experimental y en cultivos de embriones de rata o ratón, donde se han llevado a cabo estudios que han puesto de manifiesto que algunas de las alteraciones metabólicas y endocrinológicas comúnmente observadas en la diabetes pueden producir malformaciones congénitas; entre estas destacan:

Hiperglucemia

Concentraciones elevadas de glucosa, en cultivos de embriones de rata y ratón, producen un aumento en la incidencia de embriones malformados¹²⁻¹⁶; aunque este efecto es dependiente de la concentración de glucosa, se requieren concentraciones de 500 mg/dl o superiores que raramente se producen in vivo para alcanzar tasas significativas de embriones malformados.

Varios mecanismos podrían ser responsables de los efectos indeseables de la hiperglucemia sobre el desarrollo embrionario, incluyendo la hiperosmolaridad del medio de cultivo que produce la hiperglucemia¹³⁻¹⁶, la glucosilación de proteínas¹⁷ alterando su función, los cambios en el metabolismo del inositol¹⁸ y, finalmente, un aumento en la generación de radicales libres¹⁹. En cultivos de embriones, estas alteraciones han sido asociadas con un aumento en la incidencia de malformaciones congénitas.

En la mujer, la relación existente entre la hiperglucemia y la incidencia de malformaciones congénitas se ha puesto de manifiesto mediante la correlación encontrada entre el porcentaje de hemoglobina glicosilada durante el primer trimestre de gestación y la incidencia de malformaciones congénitas y abortos espontáneos, presumiblemente como consecuencia de malformaciones^{1-4,8,9}.

Hipercetonemia

También en cultivos de embriones de ratón, se ha demostrado que altas concentraciones de cuerpos cetónicos en el medio de cultivo producen un incremento en la tasa de embriones malformados^{20,21}. Los efectos teratogénicos de los cuerpos cetónicos no son constantes a lo largo de todo el período embrionario, sino que dependen del grado de desarrollo embrionario en el momento de producirse la hipercetonemia. Así, concentraciones que producen una elevada tasa de malformaciones en cultivos de embriones de 3-4 somites, dan lugar a muy pocas malformaciones en embriones de 5-6 somites^{20,21}. En la mujer, una elevación de las concentraciones de cuerpos cetónicos en el primer trimestre de gestación también produce un aumento en la incidencia de malformaciones congénitas²².

Alteraciones hormonales

En embriones de rata, alteraciones en la concentración de factores inhibidores de la somatomedina²³, en la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)²⁴ y en el metabolismo de las prostaglandinas^{25,26} han sido asociadas a los efectos teratogénicos de la diabetes.

Según se desprende de estas observaciones, los efectos teratogénicos de la diabetes son multifactoriales. Recientemente se ha observado que a pesar de normalizar las con-

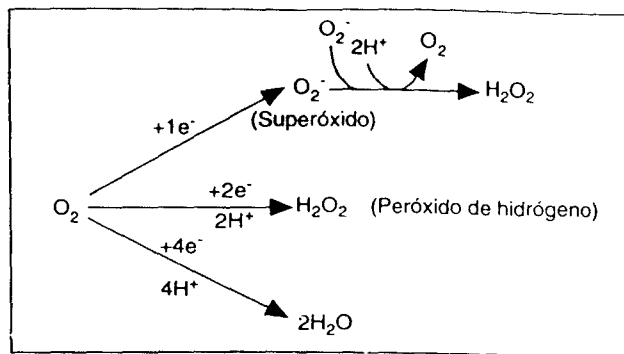


Fig. 1. El oxígeno, al tener en su molécula dos electrones no apareados, es un radical libre. La captación de un electrón por el oxígeno lo transforma en superóxido, otro radical libre. La unión de dos moléculas de superóxido junto a dos protones permite la transformación de éstos en peróxido de hidrógeno y oxígeno. La captación de dos electrones y dos protones por el oxígeno lo transforma en peróxido de hidrógeno. Por último, la captación de cuatro electrones y cuatro protones permite la transformación del oxígeno en dos moléculas de agua.

centraciones de glucosa y cuerpos cetónicos, el suero de la rata diabética sigue siendo altamente teratogénico²⁷.

Hipoglucemia

Tampoco está exenta de riesgos para el embrión de las mujeres con DMID la obtención de un grado óptimo de control metabólico, ya que con frecuencia éste lleva asociado un aumento en la incidencia de episodios de hipoglucemia²⁸. Nuevamente, es en el animal experimental donde se ha demostrado que la hipoglucemia aumenta la incidencia de malformaciones embrionarias²⁹⁻³¹. Este efecto sucede cuando la hipoglucemia tiene lugar en las fases tempranas del desarrollo embrionario, cuando la principal fuente de energía de las células embrionarias deriva del metabolismo anaerobio de la glucosa^{12-15,32}.

Durante el primer trimestre de gestación, las mujeres con DMID requieren frecuentes cambios en la dosis de insulina³³, lo que aumenta el riesgo de hipoglucemia y podría aumentar el de malformaciones embrionarias, en caso de que, al igual que sucede en el animal experimental, la hipoglucemia sea también teratogénica en el humano.

PAPEL DE LOS RADICALES LIBRES EN LOS EFECTOS TERATOGÉNICOS DE LA DIABETES

En los años noventa, ha despertado un gran interés la posible relación existente entre el estrés oxidativo y la generación de radicales libres, con los efectos teratogénicos de la diabetes.

¿Qué son los radicales libres?

Los radicales libres son moléculas que poseen uno o más de un electrón no apareado en sus orbitales, siendo por lo tanto moléculas inestables, que tienden a reaccionar con otras, captando o cediendo electrones para estabilizar su estructura³⁴⁻³⁷. El radical libre más extendido en la naturaleza es el oxígeno, que tiene dos electrones no apareados, y éste al captar o ceder electrones forma varios compuestos, algunos de los cuales son también radicales libres mucho más reactivos que el propio oxígeno, como sucede con el radical hidroxilo (OH^\cdot). En la figura 1, se presentan algunos de los radicales libres que se producen a partir del oxígeno³⁴⁻³⁷.

Producción de radicales libres

Numerosos procesos celulares generan radicales libres, entre los que se pueden incluir la cadena respiratoria y las reacciones enzimáticas en las que interviene el oxígeno y/o metales de transición. Todas estas reacciones tienen lugar de forma controlada y los radicales libres que se producen son neutralizados casi inmediatamente. No obstante algunos de estos radicales libres pueden escaparse del sistema y reaccionar con otros compuestos. Entre las moléculas que son alteradas con mayor facilidad por los radicales libres, destacan los ácidos grasos poliinsaturados. La debilidad de los grupos metileno próximos a los dobles enlaces hace que éstos cedan electrones con relativa facilidad³⁴⁻³⁷. El ácido graso al perder un electrón se transforma en un nuevo radical libre, capaz de reaccionar con otras moléculas para estabilizarse, generando nuevos radicales libres y dando lugar a una reacción en cadena. Esta secuencia de reacciones sólo termina cuando dos radicales libres reaccionan entre sí, formando un compuesto estable, o cuando interviene alguno de los mecanismos capaces de neutralizar radicales libres³⁴⁻³⁷. Los radicales libres no sólo reaccionan con los ácidos grasos, sino que también pueden reaccionar con mayor o menor facilidad con cualquier otra molécula, incluyendo los ácidos nucleicos y las proteínas.

Mecanismos de eliminación de radicales libres

Dada la alta reactividad de los radicales libres y las lesiones que pueden producir, los seres vivos han desarrollado diversos mecanismos que permiten la estabilización de los

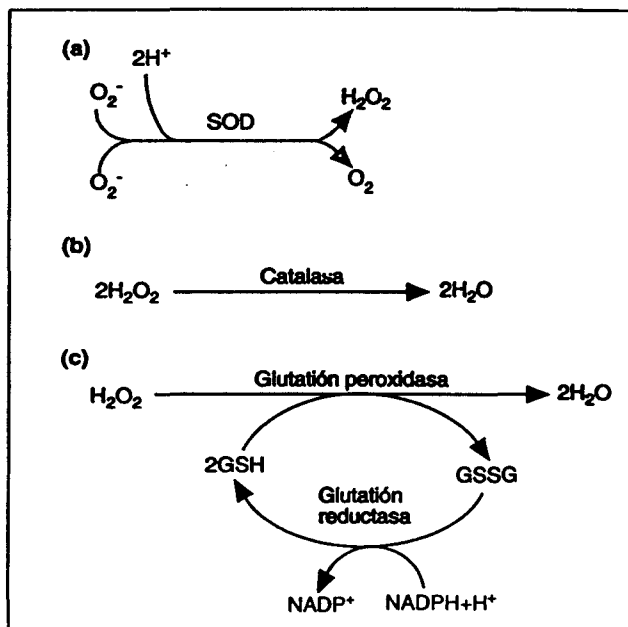


Fig. 2. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la reacción de dos moléculas de superóxido (a) transformándolas en peróxido de hidrógeno. (b) La catalasa cataliza la hidrólisis de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Por último, la glutatión peroxidasa reduce los peróxidos de lípidos (c), para lo que utiliza electrones cedidos por el glutatión (GSH), que actuaría como coenzima. Dos moléculas de GSH oxidado reaccionan entre sí, neutralizando así la falta de un electrón (GSSG). El GSSG oxidado es reducido por la glutatión reductasa, que utiliza NADPH como dador de electrones.

TABLA 1. Sistemas antioxidantes

Mecanismos enzimáticos
Superóxido dismutasa
Catalasa
Glutatión peroxidasa
Mecanismos no enzimáticos
Vitamina A
Vitamina C
Vitamina E
Bilirrubina
Ácido úrico
Albúmina
Glutatión

mismos y, consecuentemente, su eliminación. Entre estos mecanismos, destacan los catalizados por las superóxido dismutasas, que eliminan radicales superóxido (fig. 2), y las catalasas y la glutatión peroxidasa, que eliminan peróxidos de hidrógeno y peróxidos de lípidos en general (fig. 2) (tabla 1), que, si bien no son radicales libres, pueden generarlos con relativa facilidad. También existen una serie de moléculas de pequeño tamaño, tanto lipo como hidrosolubles, que tienen capacidad para neutralizar radicales libres (tabla 1). Entre las hidrosolubles, destacan la vitamina C, los flavonoides, el ácido úrico y la bilirrubina. Esta última desempeña un papel especialmente relevante durante el período neonatal, en el que el recién nacido se ve sometido a un aumento en la concentración de oxígeno y los mecanismos encargados de eliminar radicales libres no están plenamente desarrollados³⁸. Entre las liposolubles, destacan los betacarotenos y la vitamina E. Esta última constituye el mejor sistema de neutralización de radicales libres generados en medios lipídicos, siendo muy efectiva para prevenir la lesión causada por los mismos en las membranas celulares o en las lipoproteínas³⁹⁻⁴¹. Como se puede observar, varias de estas moléculas son vitaminas, lo que indica que dependemos del aporte exógeno de las mismas y que sus concentraciones plasmáticas y celulares se encuentran moduladas por la dieta.

Efectos de los radicales libres sobre el material genético

A pesar de los numerosos mecanismos que permiten eliminar los radicales libres generados dentro de la célula, algunos de ellos se escapan de los sistemas de control, llegando a reaccionar con diferentes moléculas y lesionando su estructura. La reacción de los radicales libres con bases de ADN puede producir cambios en su estructura^{42,43} y, cuando no son reparados de forma adecuada, alteraciones en el código genético. De hecho, en cultivos de bacterias, la inclusión de un generador de radicales libres en el medio de cultivo aumenta la tasa de cepas mutantes⁴⁴. Efectos similares pueden tener lugar en organismos superiores. Los radicales libres no sólo pueden alterar el material genético al reaccionar con las bases del ADN, sino también como consecuencia de su reacción con ácidos grasos, y la generación de peróxidos de lípidos producto de esta reacción puede generar factores clastogénicos que producen roturas cromosómicas^{45,46}. Los radicales libres también afectan la expresión de determinados genes⁴⁷⁻⁴⁹, lo que teóricamente podría conducir a la aparición de malformaciones. Así pues, son numerosos los mecanismos a través de los cuales la generación de radicales libres puede afectar al normal desarrollo embrionario y dar lugar a malformaciones.

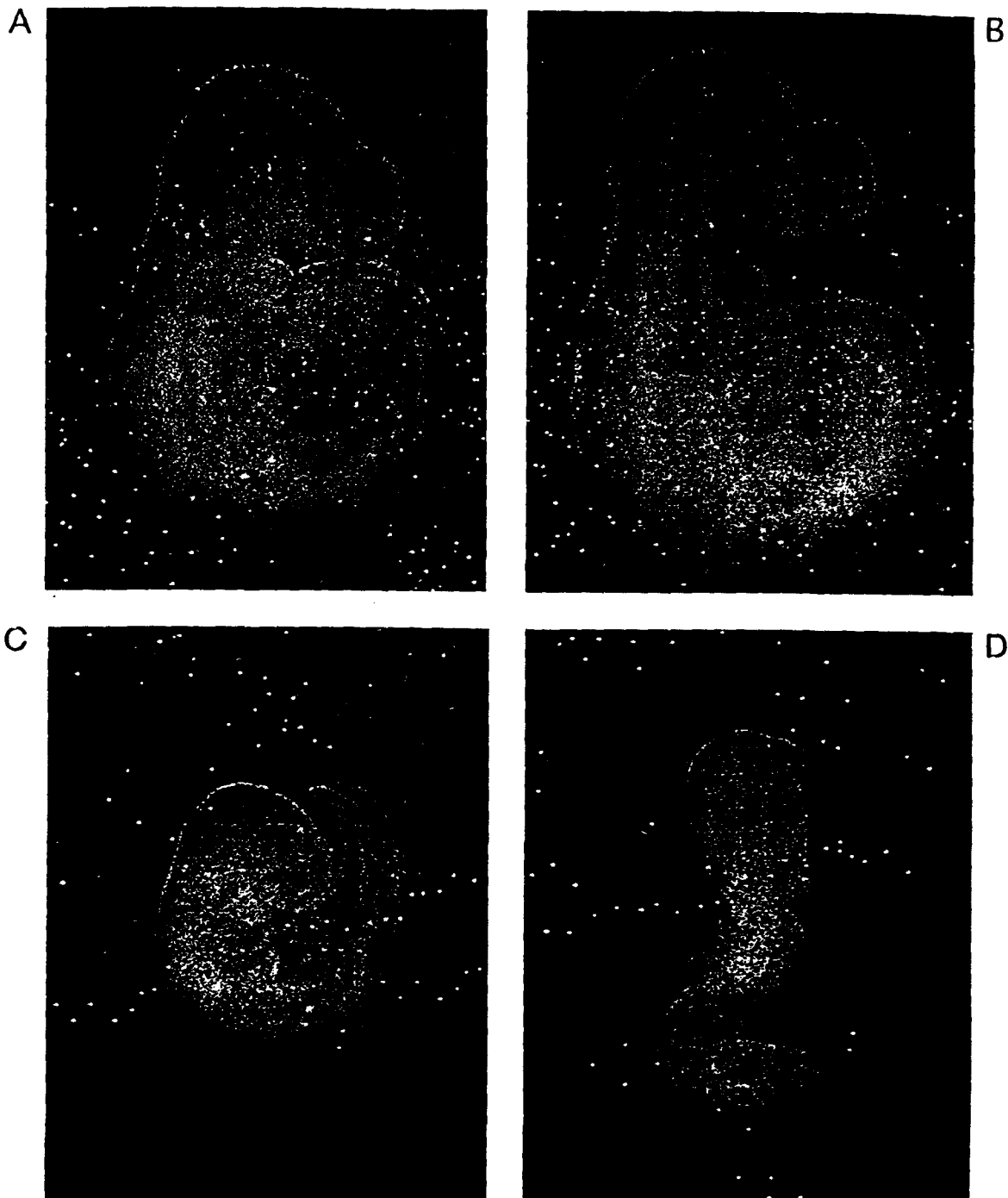


Fig. 3. Embriones de 11,5 días de gestación de las ratas normales y las diabéticas. Panel A: embrión normal de rata de 11,5 días de gestación; paneles B, C, D y E: embriones de ratas diabéticas con diferentes malformaciones.

DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Desgraciadamente, todavía no existen métodos que permitan detectar in vivo la generación de radicales libres y sólo a través de métodos indirectos se puede deducir que en determinadas situaciones existe un aumento en la producción de los mismos, dando lugar a una situación de estrés

oxidativo. En la diabetes, se han puesto de manifiesto una serie de cambios que permiten señalar un incremento en la formación de radicales libres, entre los que cabe destacar: a) disminución de las concentraciones plasmáticas e intracelulares de vitaminas antioxidantes⁵⁰⁻⁵³, posiblemente como resultado de un mayor consumo, fruto de una mayor generación de radicales libres; b) aumento en la concentración

plasmática de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)^{54,56}, compuestos derivados de la reacción de radicales libres con lípidos; c) mayor susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a oxidarse^{57,58}; d) menor capacidad antioxidante del plasma⁵⁷, y e) aumento en las concentraciones plasmáticas de 8-hidroxideoxiguanosina⁵⁹, producto generado por la reacción de radicales libres con la guanina^{42,43}. Así pues, se producen numerosos cambios que de forma indirecta permiten indicar que en la diabetes existe un mayor estrés oxidativo.

Prevención de los efectos teratogénicos de la diabetes mediante la administración de antioxidantes

Hace unos años que iniciamos una serie de estudios encaminados a demostrar que los efectos teratogénicos de la diabetes estaban relacionados con el estrés oxidativo. Para ello, decidimos determinar in vivo si la administración de antioxidantes, concretamente de vitamina E, a las ratas gestantes diabéticas disminuía la incidencia de malformaciones embrionarias, como sería de esperar en caso de que éstas fueran consecuencia de un aumento en la generación de radicales libres. Estos estudios se llevaron a cabo utilizando un modelo experimental de DMID, concretamente el inducido mediante la administración intravenosa de estreptozotocina. Una vez inducida la diabetes, a partir del primer día de gestación, los animales se trataron con 150 mg de vitamina E/día, por vía oral, y fueron estudiados al día 11,5 de gestación, que corresponde al final del período embrionario en la rata. Se extrajeron los embriones y se determinó la presencia de malformaciones en los mismos (fig. 3). El tratamiento con vitamina E produjo una importante reducción en la incidencia de malformaciones embrionarias, que pasaron del 24% en las ratas diabéticas sin ningún tipo de tratamiento, al 4% en las ratas diabéticas suplementadas con la mencionada dosis de vitamina E. Este valor fue muy similar al 2-3% hallado en los animales controles⁶⁰ de nuestro animalario. Posteriores estudios llevados a cabo por otros autores también in vivo, utilizando modelos experimentales de diabetes, encontraron resultados muy similares a los que habíamos observado^{61,62}. La administración de otros antioxidantes, como el butilato de hidroxitolueno (BHT), también ha resultado ser efectiva en la reducción de la tasa de malformaciones embrionarias asociadas a la diabetes⁶³. En conjunto, estos estudios ponen de manifiesto una clara asociación entre el estrés oxidativo y los efectos teratogénicos de la diabetes y demuestran un claro efecto protector de los agentes antioxidantes.

Dado que la administración de antioxidantes no está exenta de riesgos, llevamos a cabo un estudio dosis-respuesta en las ratas diabéticas. En dicho estudio, observamos que la administración de dosis bajas de vitamina E (25 y 50 mg/día) no era efectiva para reducir la tasa de malformaciones, y dosis muy elevadas (500 mg/día) incrementaban la incidencia de reabsorciones embrionarias, lo que permitió concluir que las dosis elevadas de vitamina son tóxicas para el concepto⁶⁴.

A pesar de los efectos negativos de dosis elevadas de vitamina E, existen datos que permiten afirmar que la administración de antioxidantes puede constituir un mecanismo coadyuvante al control metabólico, como forma de prevención de las malformaciones congénitas asociadas a la diabetes. Esta estrategia podría ser especialmente útil en aquellos casos en los que, por distintas razones, no es posible alcanzar un grado óptimo de control metabólico. De todas formas, es obvia la necesidad de ensayos clínicos que permitan determinar si la administración de vitamina E también es

efectiva en los humanos. A su vez, se necesitan más estudios experimentales que permitan comprender los mecanismos a través de los cuales los radicales libres afectan al desarrollo embrionario.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido llevado a cabo con fondos del Ministerio de Sanidad (FIS 94-0398), del Ministerio de Educación y Ciencias (PB92-0833) y de la Universidad San Pablo-CEU (11/96).

BIBLIOGRAFÍA

- Lucas MJ, Leveno KJ, Williams ML, Raskin P, Whalley PJ. Early pregnancy glycosylated hemoglobin, severity of diabetes and fetal malformations. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 426-431.
- Mills JL, Knopp RH, Simpson JL, Jovanovic-Peterson L, Metzger BE, Holmes LB et al. Lack of relation of increased malformation rates in infants of diabetic mothers to glycemic control during organogenesis. *N Engl J Med* 1988; 318: 671-676.
- Miller E, Hare JW, Cloherty JP, Dunn PJ, Gleason RE, Soeldner JS et al. Elevated maternal hemoglobin A_{1c} in early pregnancy and major congenital anomalies in infants of diabetic mothers. *N Engl J Med* 1981; 304: 1.331-1.334.
- Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG, Jovanovic-Peterson L, Van Allen M, Aarons JH et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med* 1988; 319: 1.617-1.622.
- Garner P. Type I diabetes mellitus and pregnancy. *Lancet* 1995; 346: 157-161.
- Greene MF. Prevention and diagnosis of congenital anomalies in diabetic pregnancies. *Clin Perinatol* 1993; 20: 533-547.
- Figueroa R, Verma U, Tejani N. Glycosylated hemoglobin predicts pregnancy morbidity in diabetics. *J Matern Fetal Med* 1995; 4: 5-11.
- Kitzmiller JL, Gavin LA, Gin GD, Jovanovic-Peterson L, Main EK, Zigrang WD. Preconception care of diabetes. Glycemic control prevents congenital anomalies. *JAMA* 1991; 265: 731-736.
- Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J, Siddiqi TA. Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 55-520.
- Hanson U, Persoon B, Thunell S. Relationship between haemoglobin A_{1c} in early type 1 (insulin-dependent) diabetic pregnancy and the occurrence of spontaneous abortion and fetal malformation in Sweden. *Diabetologia* 1990; 33: 100-104.
- Gregory R, Tattersall RB. Are diabetic pre-pregnancy clinics worth while? *Lancet* 1992; 340: 656-658.
- Freinkel N. Diabetic embryopathy and fuel-mediated organ teratogenesis: lessons from animal models. *Horm Metabol Res* 1988; 20: 463-475.
- Freinkel N. Banting lecture 1980. Of pregnancy and progeny. *Diabetes* 1980; 29: 1.023-1.035.
- Eriksson UJ, Karlsson MG, Styrud J. Mechanisms of congenital malformations in diabetic pregnancy. *Biol Neonate* 1987; 51: 113-118.
- Freinkel N, Cockcroft DL, Lewis NJ, Gorman L, Akazawa S, Phillips LS et al. The 1986 McCollum award lecture. Fuel-mediated teratogenesis during early organogenesis: the effects of increased concentrations of glucose, ketones, or somatomedin inhibitor during rat embryo culture. *Am J Clin Nutr* 1986; 44: 986-995.
- Garnham EA, Beck F, Clarke CA, Stanistreet M. Effects of glucose on rat embryos in culture. *Diabetologia* 1983; 25: 291-295.
- Cohen MP. Diabetes and protein glycation. Clinical and pathophysiological relevance. Philadelphia: JC Press, 1996.
- Baker L, Piddington R, Goldman A, Egler J, Moehring J. Myo-inositol and prostaglandins reverse the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos. *Diabetologia* 1990; 33: 593-596.
- Eriksson UJ, Borg LAH. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* 1991; 34: 325-331.
- Horton WE, Sadler TW. Effects of maternal diabetes on early embryogenesis. Alterations in morphogenesis produced by the ketone body, B-hydroxybutyrate. *Diabetes* 1983; 32: 610-616.
- Shum L, Sadler TW. Recovery by mouse embryos following teratogenic exposure to ketosis. *Diabetologia* 1991; 34: 289-295.
- Jovanovic-Peterson L. NICHD-Diabetes in early pregnancy study group (DIEP). First trimester beta-hydroxybutyrate in diabetic pregnancies: relationship to malformations and birthweight. *Diabetes* 1997; 46 (Supl 1): 259.
- Sadler TW, Phillips LS, Balkan W, Goldstein S. Somatomedin inhibitors from diabetic rat serum alter growth and development of mouse embryos in culture. *Diabetes* 1986; 35: 861-865.
- Pampfer S, Vanderheyden I, Wu YD, Baufays L, Maillet O, De Her-

- togh R. Possible role for TNF-alpha in early embryopathy associated with maternal diabetes in the rat. *Diabetes* 1995; 44: 531-536.
25. Goto MP, Goldman A, Uhing MR. PGE₂ prevents anomalies induced by hyperglycemia or diabetic serum in mouse embryos. *Diabetes* 1992; 41: 1.644-1.650.
 26. Wentzel P, Eriksson UJ. High glucose levels and cyclooxygenase inhibitors cause embryonic dysmorphogenesis in vitro. *Diabetes* 1997; 46 (Supl 1): 259.
 27. Buchanan TA, Denno KM, Sipos GF, Sadler TW. Diabetic teratogenesis: in vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose per se. *Diabetes* 1994; 43: 656-660.
 28. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
 29. Buchanan TA, Sipos GF. Lack of teratogenic effect of brief maternal insulin-induced hypoglycemia in rats during late neuralation. *Diabetes* 1989; 38: 1.063-1.066.
 30. Buchanan TA, Freinkel N, Lewis NJ, Metzger BE, Akazawa S. Fuel-mediated teratogenesis. Use of D-mannose to modify organogenesis in the rat embryo in vivo. *J Clin Invest* 1985; 75: 1.927-1.934.
 31. Ellington SKL. Development of rat embryos cultured in glucose-deficient media. *Diabetes* 1987; 36: 1.372-1.378.
 32. Freinkel N, Lewis NJ, Akazawa S, Roth SL, Gorman L. The honeybee syndrome. Implications of the teratogenicity of mannose in rat-embryo culture. *N Engl J Med* 1984; 310: 223-230.
 33. Crombach G, Siebolds M, Mies R. Insulin use in pregnancy. Clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 1993; 24: 89-100.
 34. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press, 1989.
 35. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-88.
 36. Pryor WA. Free radicals and lipid peroxidation: what they are and how they got that way. En: Frei B, editor. *Natural antioxidants in human health and disease*. Philadelphia: Academic Press, 1994; 1-24.
 37. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344: 731-724.
 38. Sullivan JL. Iron, plasma antioxidants and the "oxygen radical disease of prematurity". *AJDC* 1988; 142: 1.341-1.344.
 39. Meydani M. Vitamin E. *Lancet* 1995; 345: 170-175.
 40. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 1991; 53 (Supl): 314-321.
 41. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 1990; 10: 357-382.
 42. Halliwell B, Aruoma OL. DNA and free radicals. Londres: Ellis Horwood, 1993.
 43. Shigenaga MK, Park JW, Cundy KC, Gimeno CJ, Ames BN. In vivo oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 1990; 186: 521-529.
 44. De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Cesarone CF. Antioxidant activity and other mechanism of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med* 1991; 91 (Supl 3C) 122-130.
 45. Emerit I. Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radical Biol Med* 1994; 16: 99-109.
 46. Emerit I. Clastogenic factores: detection and assay. *Methods Enzymol* 1990; 186: 555-566.
 47. Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 1994; 344: 862-863.
 48. Tyrrell RM. Gene activation by the oxidative component of solar radiation [resumen]. Barcelona: VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research, 1996.
 49. Chiarpotto E, Lonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F, Camandola S, Vogli S et al. 4-Hydroxynonenal up-regulated TGF beta-1 gene expression and synthesis in cells of the macrophage lineage [resumen]. Barcelona: VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research, 1996.
 50. Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes* 1991; 40: 1.241-1.244.
 51. Cunningham JJ, Ellis SL, McVeigh KL, Levine RE, Calles-Escandon J. Reduced mononuclear leukocyte ascorbic acid content in adults with insulin-dependent diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Metabolism* 1991; 40: 146-149.
 52. Otero P, Barbas C, Castro M, Blázquez A, Herrera E, Bonet B. Factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en individuos diabéticos. A Coruña: VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, 1995.
 53. Jain SK, McVie R. Effect of glycemic control, race (white versus black), and duration of diabetes on reduced glutathione content in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 1994; 43: 306-309.
 54. Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 1990; 39: 971-975.
 55. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid peroxide levels in plasma of diabetic patients. *Chem Med* 1979; 21: 104-107.
 56. Morel DW, Chisolm GM. Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res* 1989; 30: 1.827-1.834.
 57. Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD, Chait A. Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 1994; 43: 1.010-1.014.
 58. Bonet B, Knopp RH. Accelerated LDL oxidation in diabetic gestation [resumen]. 2nd Internat Graz Symp on Gestational Diabetes, Graz, Austria, 1992.
 59. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996; 347: 444-445.
 60. Viana M, Herrera E, Bonet B. Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. *Diabetologia* 1996; 39: 1.041-1.046.
 61. Martín Siman C, Eriksson UJ. Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* 1997; 46: 1.054-1.061.
 62. Sivan E, Reece EA, Wu YK, Homko CJ, Polansky M, Borenstein M. Dietary vitamin E prophylaxis and diabetic embryopathy: morphologic and biochemical analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 779-893.
 63. Eriksson UJ, Siman CM. Pregnant diabetic rats fed the antioxidant butylated hydroxytoluene show decreased occurrence of malformations in offspring. *Diabetes* 1996; 45: 1.497-1.502.
 64. Bonet B, Viana M, Herrera E. The prevention of the teratogenic effects of diabetes by vitamin E is dose dependent [resumen]. Boston, EE.UU.: 57 th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association, 1997.