

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Estrés oxidativo y marcadores bioquímicos en ratas  
diabéticas con dieta suplementada con vitamina E**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

**AUTOR**

Lázaro Rubén Valdivieso Izquierdo

**ASESOR**

Acela Inés Arnao Salas

Lima – Perú

2015

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) “Alberto Guzmán Barrón” por brindarme los ambientes y equipos para el desarrollo la tesis.

A mi asesora, Mg Acela Inés Arnao Salas por su orientación invaluable al desarrollo de la tesis.

A mi colega y amiga Rosa Lorenza Oriondo Gates y todas las personas que me apoyaron y contribuyeron a desarrollar la tesis.

**A mis Familiares:**

Padres: Lázaro y Ricardina

Hermanas: María del Pilar y Carmen Rosario

A la memoria: Dra María Raquel Oré Sifuentes  
por su apoyo constante.

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>I</b>
<b>INDICE .....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VII</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>VIII</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Situación problemática.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Formulación del Problema.....</i>	<i>4</i>
1.3 <i>Justificación de la Investigación.....</i>	<i>4</i>
1.4 <i>Objetivos.....</i>	<i>4</i>
1.4.1 <i>Objetivo General .....</i>	<i>4</i>
1.4.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>5</i>
<b>2 MARCO TEORICO.....</b>	<b>6</b>
2.1 <i>Antecedentes de Investigación.....</i>	<i>6</i>
2.2 <i>Bases teóricas.....</i>	<i>11</i>
2.2.1 <i>Diabetes.....</i>	<i>11</i>
2.2.2 <i>Complicaciones bioquímicas de la diabetes:.....</i>	<i>12</i>
2.2.3 <i>Inducción de diabetes experimental .....</i>	<i>15</i>
2.2.4 <i>Especies reactivas de oxígeno. ....</i>	<i>17</i>
2.2.5 <i>Fuentes de Radicales Libres del Oxígeno.....</i>	<i>17</i>
2.2.6 <i>Daño de los radicales libres a las biomoléculas.....</i>	<i>18</i>
2.2.7 <i>Estrés oxidativo.....</i>	<i>21</i>
2.2.8 <i>Los antioxidantes también pueden ser prooxidantes (Bender 2009).....</i>	<i>21</i>
2.2.9 <i>Vitamina E.....</i>	<i>22</i>
2.2.10 <i>Absorción y metabolismo de la vitamina E.....</i>	<i>23</i>
2.2.11 <i>Concentración y Fuentes de la Vitamina E.....</i>	<i>24</i>
2.2.12 <i>Mecanismos fisiológicos de la vitamina E.....</i>	<i>25</i>
2.2.13 <i>Efecto antioxidante de la vitamina E.....</i>	<i>25</i>
2.2.14 <i>Mecanismo de regeneración de la vitamina E (<math>\alpha</math>-Tocoferol).....</i>	<i>26</i>
2.3 <i>Glosario de términos.....</i>	<i>27</i>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
3.1 <i>Estudio.....</i>	<i>30</i>
3.1.1 <i>Tipo y Diseño de Investigación.....</i>	<i>30</i>
3.1.2 <i>Unidad de análisis .....</i>	<i>30</i>
3.1.3 <i>Tamaño de la muestra.....</i>	<i>30</i>
3.1.4 <i>Selección de muestra.....</i>	<i>30</i>
3.1.5 <i>Lugar.....</i>	<i>30</i>
3.1.6 <i>Técnicas de recolección de Datos.....</i>	<i>30</i>

3.2	<i>Materiales y Métodos</i> .....	31
3.2.1	Material biológico .....	31
3.2.2	Diabetes experimental .....	31
3.2.3	Diseño experimental.....	31
3.3	<i>Determinaciones Analíticas:</i> .....	33
3.3.1	Determinación de Glucosa: .....	33
3.3.2	Determinación de Hemoglobina Glicada (HbA <sub>1c</sub> ).....	33
3.3.3	Determinación de Colesterol Total, HDL colesterol y LDL colesterol. ....	34
3.3.4	Determinación de Triglicéridos.....	34
3.3.5	Determinación de Albúmina.....	35
3.3.6	Determinación de Proteínas Totales .....	35
3.3.7	Antioxidantes Totales (TAS).....	35
3.3.8	Determinación Lipoperoxidación en suero.....	36
3.3.9	Determinación de Ácido Úrico.....	36
3.4	<i>Análisis De Datos</i> .....	37
3.5	<i>Limitaciones</i> .....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>38</b>
4.1	<i>Resultados</i> .....	38
4.2	<i>Discusión</i> .....	43
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>55</b>
7.1	<i>Fotos</i> .....	55
7.2	<i>Operacionalización de variables</i> .....	58

## LISTA DE TABLAS

TABLA N° 1 Clasificación etiológica de la diabetes mellitus .....	12
TABLA N° 2 Composición de las dietas según grupos .....	32
TABLA N° 3 Porcentaje promedio de ganancia de peso (g) en ratas según tratamiento .....	38
TABLA N° 4 Niveles promedio de glicemia y porcentaje de hemoglobina glicada (% Hb <sub>A1c</sub> ) en ratas, según tratamiento .....	39
TABLA N° 5 Niveles promedios del perfil lipídico en ratas según tratamiento...	40
TABLA N° 6 Proteínas, albumina y globulinas en ratas según tratamiento.....	41
TABLA N° 7 Niveles promedio en suero de antioxidantes totales (TAS), lipoperoxidación y ácido úrico en ratas según dieta .....	42

**LISTA DE FIGURAS**

Figura N°1	Proceso de Glicación no enzimática de proteínas .....	14
Figura N° 2	Conversión de la Glucosa en fructosa.....	15
Figura N° 3	Aloxano .....	16
Figura N° 4	Estreptozotocina .....	16
Figura N° 5	Vitamina E .....	22
Figura N° 6	Mecanismo de regeneración de la vitamina E .....	27

## RESUMEN

La vitamina E protege a los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares y a la LDL, de la acción nociva de las especies reactivas de oxígeno. La LDL está involucrada en la formación de placas ateromatosas que son responsables de problemas cardio y cerebrovasculares, complicaciones diabéticas, entre otros. El objetivo del presente trabajo fue determinar el rol de la vitamina E en los parámetros bioquímicos y antioxidantes en ratas diabéticas. La diabetes fue inducida experimentalmente con estreptozotocina (35 mg/kg de peso por v.i.p.). Los animales (n= 24) fueron divididos en cuatro grupos: Grupo I: Control, Grupo II: Control + Vitamina E (25 mg/día), Grupo III: Diabética y Grupo IV: Diabética + Vitamina E (25 mg/día), durante 8 semanas. Parámetros bioquímicos como glucosa, la hemoglobina glicada y perfil lipídico fueron evaluados, así mismo se determinaron marcadores de daño oxidativo como antioxidantes totales, lipoperoxidación (TBARS) y niveles de ácido úrico. La administración de vitamina E a los animales diabéticos, mostró una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para la glicemia, hemoglobina glicada y el perfil lipídico, así como también disminuyó los niveles de TBARS en suero. Conclusión: El tratamiento de los animales diabéticos con vitamina E, redujo la glicemia, hemoglobina glicada y el perfil lipídico, y ejerció un efecto protector contra el daño oxidativo al elevar sus niveles de antioxidantes totales.

**Palabras Claves:** Ratas diabéticas, antioxidantes, Vitamina E, Hemoglobina glicada, lipoperoxidación.

## SUMMARY

Vitamin E protects polyunsaturated fatty acids present in cell membranes and LDL, the harmful effects of reactive oxygen species. LDL is involved in the formation of atheromatous plaques that are responsible for cardio and cerebrovascular problems, diabetic complications, among others. The aim of this study was to determine the role of vitamin E in biochemical and antioxidant parameters in diabetic rats. Diabetes was induced experimentally streptozotocin (35 mg / kg per v.i.p.). The animals (n = 24) were divided into four groups: Group I: Control, Group II: Control + Vitamin E (25 mg / day), Group III: Diabetic and Group IV: Diabetic + Vitamin E (25 mg / day) for 8 weeks. Biochemical parameters as glucose, glycated hemoglobin and lipid profile were evaluated, also oxidative damage markers as total antioxidants, lipid peroxidation (TBARS) and uric acid levels were determined. Administration of vitamin E to the diabetic animals showed a statistically significant reduction ( $p < 0.05$ ) for glucose, glycated hemoglobin and lipid profile, as well as decreased levels of TBARS in serum. Conclusion: The treatment of diabetic animals with vitamin E, reduced glycemia, glycated hemoglobin and lipid profile, and exerted a protective effect against oxidative damage by raising their levels of total antioxidants.

Keywords: diabetic rats, antioxidants, Vitamin E, glycated hemoglobin, lipid peroxidation.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-Azino-di[3-etilbenzotiazolin sulfonato].

ADA: American Diabetes Association.

CENAN: Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.

EDTA: Sal Sódica de etilendi-amino-tetraacético.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

GPx: Glutation peroxidasa.

Hb: Hemoglobina.

HbA<sub>1c</sub>: Hemoglobina Glicada.

HDL: Lipoproteína de Alta Densidad.

HPLC: Cromatografía Líquida de alta definición.

kDa: kilo Dalton.

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad.

MDA: Malondialdehído.

mM: milimolar.

nm: Nanómetro.

PAG: Productos avanzados de glicación.

RL: Radicales Libres.

SOD: Superóxido dismutasa.

SZT: Estreptozotocina.

TAS: Estado de Antioxidantes Totales.

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Lipoperoxidación, mediante el complejo TBA y MDA

TCA: Acido Tricloro acético.

VBC: Verde de Bromocresol.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Situación problemática

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por la incapacidad de metabolizar los carbohidratos y las grasas, debido a la insuficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina o por la resistencia periférica de algunos tejidos frente a la acción de la hormona. Esta enfermedad ocasiona hiperglicemia en diferentes grados, hasta el caso extremo de provocar glucotoxicidad, ejerciendo daño sobre las células betas del páncreas y causando marcada disminución de la secreción de insulina (Rossel, 1992).

La diabetes mellitus constituye actualmente un problema de salud pública en todo el mundo y está considerada como una de las enfermedades crónicas que ha tenido una gran emergencia en las últimas décadas, al punto de ser caracterizada como una epidemia. La Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF) confirmaron que para el año 2013 la existencia de 382 millones de pacientes diabéticos y 592 millones para el 2035. A nivel regional, Latinoamérica está considerada como una de las poblaciones que aumentará el número de pacientes diabéticos de 24,1 millones a 38,5 millones para los años 2013 al 2035, respectivamente. La tasa de mortalidad general, para hombres y mujeres de 65 años y más, es de 200 y 232 por 100 000, para cada caso. En nuestro país, estudios epidemiológicos realizados recientemente, permiten asumir la existencia de un millón de pacientes diabéticos.

Este problema de salud está produciendo un alto costo económico, social y familiar, producto de la demanda de atención médica que ocasiona el diagnóstico, tratamiento y control. Entre los factores causales estarían el bajo nivel educativo de la población afectada y la inadecuada capacitación técnica de los profesionales que asisten a dichos pacientes, lo que explica la frecuente presentación clínica de las complicaciones agudas y crónicas como

la insuficiencia renal, retinopatías y enfermedad coronaria y cerebrovascular. (Sociedad Peruana de Endocrinología, 2008; Atlas de la diabetes, 2013).

Los seres vivos aerobios necesitan oxígeno para generar energía, y éste puede reaccionar con otros elementos químicos, produciendo radicales libres. Estas sustancias son especies que contienen uno o más electrones desapareados en su órbita externa, son muy inestables y muy reactivas, ya que una vez formadas pueden captar un electrón de otras moléculas cercanas. El organismo dispone de un sistema de defensa antioxidante capaz de eliminar estos radicales libres que incluye enzimas como: superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y otras. Además, existen diferentes sustancias no enzimáticas como glutatión, taurina, Coenzima Q, vitamina C, E y carotenoides. (González, 2000)

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la generación y degradación de radicales libres pero cuando el equilibrio se rompe, bien por producción en exceso o por disminución de los sistemas de defensa, o ambos casos, se produce lo que se conoce como daño oxidativo. Este daño se debe a la capacidad que tienen los radicales libres de actuar sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos de la célula. Cuando los radicales libres interactúan con estos componentes celulares, se originan alteraciones estructurales y funcionales y como consecuencia de ello, se produce un deterioro de la homeostasis de la célula y la aparición de diferentes enfermedades crónicas, e incluso la muerte celular.

El estrés oxidativo se ha implicado en la patogénesis de la diabetes mellitus. El aumento de los radicales libres empeora la acción de la insulina a nivel periférico, contribuye a la disfunción de la célula beta pancreática y está relacionado con el desarrollo de las complicaciones crónicas (Giuliano, 1996; Orasanu, 2009; Yu 2005; Forbes, 2008).

La diabetes ocasiona hiperglicemia crónica, la cual es producida por numerosos factores ambientales y genéticos. Es causante de varios signos y síntomas característicos como: cetoacidosis, alteraciones progresivas de los vasos capilares del riñón y la retina, así mismo se encuentra asociada a otras enfermedades como:

angiopatías, nefropatías, hipertensión, arterioesclerosis. Los antioxidantes de la dieta juegan un papel importante en la defensa frente al envejecimiento y a las enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, el cáncer, y la enfermedad cardiovascular. En pacientes diabéticos se ha evidenciado una disminución de los niveles plasmáticos de enzimas antioxidantes, glutatión y de vitaminas antioxidantes y por otro lado, existe evidencia de un aumento de la peroxidación lipídica mediada por radicales libres (Giuliano, 1996).

Los compuestos antioxidantes inactivan la sobreproducción de los radicales libres implicados en el estrés oxidativo e impiden su propagación. La suplementación con antioxidantes naturales podría tener un efecto benéfico por mejorar la morbimortalidad de los pacientes diabéticos, de tal forma que podrían prevenir y retrasar el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes (Brown, 2001; Ceriello, 2009; Ceriello 2004).

La vitamina E actúa como antioxidante y protege a los lípidos insaturados de la autooxidación, evitando la agresión oxidativa, en especial de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas (Márquez, 2002). Las propiedades de la vitamina E se derivan de su estructura molecular: es una molécula liposoluble capaz de fijar radicales libres del tipo  $O_2^-$ ,  $O_2^{2-}$  y  $HO^{\cdot}$ , debido al grupo fenólico. Existen evidencias que en sujetos diabéticos los radicales libres del oxígeno (EROs) se forman en una situación de hiperglicemia y por un aumento de glicosilación no enzimática de las proteínas, especialmente de la hemoglobina. Esto trae como consecuencia la formación de peróxidos de lípidos, lesionando las proteínas de las membranas, haciendo que sean más permeable y finalmente deteriorando su función biológica. Tanto la hiperglicemia como una mayor glicosilación de las proteínas, ejemplo la hemoglobina, jugarían un rol importante en el desarrollo de la diabetes y en especial de sus complicaciones como angiopatías, nefropatías, hipertensión, arterioesclerosis acelerada. (Evans, 2003)

Por las evidencias antes mencionadas se estudiará el efecto de la Vitamina E en ratas diabéticas, su correlación con los parámetros bioquímicos y antioxidantes con el fin de aportar conocimientos para una suplementación adecuada de esta vitamina

## **1.2 Formulación del Problema**

¿La suplementación con la Vitamina E en la dieta de las ratas diabéticas disminuye el estrés oxidativo y mejora los parámetros bioquímicos?

## **1.3 Justificación de la Investigación**

La diabetes es uno de los grandes problemas de salud a nivel mundial, que afecta cada día a un mayor número de personas y por ser una enfermedad crónica, el tratamiento es costoso y la calidad de vida del paciente se deteriora con el paso del tiempo. Ante ello se hace necesario evaluar el papel de la vitamina E en la mejora de los indicadores bioquímicos alterados con esta enfermedad.

Sin embargo, el papel de la vitamina E en la diabetes sigue siendo controversial, ya que existe discrepancia entre los estudios experimentales y los clínicos. En los estudios realizados en animales se ha evidenciado los efectos benéficos de la vitamina E y la diabetes, por lo que la presente propuesta es estudiar en conjunto los marcadores antioxidantes y los metabólicos, lo que podría dar nuevas luces al conocimiento sobre este tema.

Teniendo en consideración que la ingesta de vitaminas es vital para la salud, los resultados del presente estudio permitirán recomendar la administración de alimentos ricos en vitamina E o suplementos que contribuyan a restablecer la homeostasis del metabolismo de carbohidratos, lípidos y estado redox celular en el estado diabético.

## **1.4 Objetivos**

### ***1.4.1 Objetivo General***

Evaluar el estado de estrés oxidativo y marcadores bioquímicos en ratas diabéticas con dieta suplementada con vitamina E.

### ***1.4.2 Objetivos Específicos***

- 1) Cuantificar el estrés oxidativo, en los grupos de animales en estudio.
  
- 2) Determinar el efecto de la suplementación con vitamina E en la dieta sobre los parámetros bioquímicos del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas en los grupos de animales en estudio.

## 2 MARCO TEORICO

### 2.1 Antecedentes de Investigación

Oré R. y colaboradores (2000) en el trabajo “Capacidad antioxidante en ratas diabéticas, rol de la vitamina E”, estudiaron el papel de esta vitamina en ratas diabéticas, evaluando los cambios en la glicemia, hemoglobina glicada (Hb<sub>A1c</sub>), lipoperoxidación, antioxidante totales, albúmina y proteínas totales. Se trabajó con 4 grupos: I control, II control más vitamina E (25 mg/día), III: diabéticos inducidos con estreptozotocina (35 mg/kg) y IV diabético más vitamina E. Concluyeron que los grupos de ratas diabéticas suplementados con vitamina E disminuyeron la glicemia, la Hb<sub>A1c</sub>, la peroxidación lipídica y aumentaron los antioxidantes totales.

Céspedes T. y Sánchez D. (2000), en el artículo de revisión “Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación”; evaluaron el estrés oxidativo y su papel en la patogénesis de diversos procesos especialmente en las enfermedades cardiovasculares. Se sabe que el organismo posee mecanismos que producen y a la vez limitan la producción de especies reactivas de oxígeno. La actividad antioxidante protege a los tejidos del daño oxidativo a través de enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la catalasa. Un exceso de radicales libres suele iniciar el daño de la pared vascular y en este proceso se encuentra implicado el colesterol de LDL. Concluyeron que una suplementación de antioxidantes disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares.

Romay Ch.(2005), estudió la variación de la capacidad de antioxidante total del suero (TRAP) respecto del grado de control glicémico, en 104 pacientes diabéticos (50, tipo I y 54, tipo II) y 89 sujetos sanos, evaluando la fructosamina sérica. Se encontró una disminución significativa de la capacidad TRAP en el grupo de pacientes pobremente controlados (fructosamina 3,5 mmol/L) respecto a los controles y a los satisfactoriamente controlados. Además halló niveles bajos de

uratos séricos lo que se debería a una excreción urinaria incrementada en los diabéticos.

Blanco R y colaboradores (2004), realizaron el estudio “Lipoperóxidos (LPO), actividad antioxidante y factores prooxidantes en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2”, que tuvo como objetivo determinar la relación de los niveles plasmáticos de lipoperóxidos, actividad antioxidante y factores prooxidantes con la diabetes mellitus tipo 2 en adultos mayores. Fue un estudio transversal que incluyó 146 sujetos mayores de 60 años (72 sanos y 74 diabéticos) a los que se le midieron los lipoperóxidos por el método de TBARS, la actividad de las enzimas SOD y GPx, y la capacidad antioxidante total (AT). Obtuvieron como resultado, que los LPO fueron más altos en los ancianos diabéticos que en los sanos ( $0,329 \pm 0,13$  vs  $0,293 \pm 0,09$  mmol/L), sin diferencia significativa. La AT mostró una actividad significativamente menor en los sujetos diabéticos que en los no diabéticos ( $0,93 \pm 0,22$  vs  $1,12 \pm 0,23$  mmol/L;  $p < 0,05$ ). Concluyeron que los datos apoyan la evidencia teórica de la asociación etiológica y fisiopatológica del estrés oxidativo con la diabetes mellitus, lo cual explicaría la influencia del envejecimiento sobre la mayor prevalencia de la diabetes mellitus en la vejez.

Seven A. y colaboradores (2004), trabajó el “Efecto de la suplementación de la vitamina E en el estrés oxidativo en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina: Investigación en hígado y plasma” emplearon 40 ratas albinas machos con pesos de 150 a 200 g, divididos en 4 grupos: controles (G1), control más vitamina E (G2), diabéticos (G3) y diabéticos más vitamina E (G4). La diabetes fue inducida con estreptozotocina a la dosis de 60 mg/kg y la vitamina E fue administrada vía i.p. a la dosis de 500 mg/kg y el tratamiento fue aplicado por 30 días. Determinaron en plasma y en tejido hepático: lipoperoxidación lipídica como TBA, SOD, GPx, Glutación. Resultados: los grupos suplementados con la vitamina E presentaron niveles menores en lipoperoxidación lipídica, glutación, y niveles mayores en la SOD. Proponen un nuevo índice para evaluar la eficiencia de la vitamina E, la razón entre la concentración de la vitamina E y lipoperoxidación lipídica tanto en plasma como en tejido hepático, siendo mayor en los grupos que recibieron la vitamina E.

Obregón O y colaboradores (2005) en el trabajo “Efecto antiglicosilante de las vitaminas E y C” describen que dichas vitaminas han mostrado que pueden intervenir en la glicosilación no enzimática de las proteínas al bloquear la unión de los grupos aminos libres con el carbonilo de la glucosa, interfiriendo con las fases tempranas reversibles de esta reacción. Así mismo, por sus propiedades antioxidantes, estas vitaminas participan en las fases de autooxidación de la glucosa, disminuyendo la producción de radicales libres de oxígeno aumentadas en el diabético. También evaluaron el efecto de estas vitaminas sobre los niveles de hemoglobina glicada aún en presencia de niveles elevados de glucosa en sangre en 14 pacientes diabéticos tipo 2, con edades entre 37 a 76 años (12 mujeres y 2 varones) que recibieron tratamiento de vitamina E (200 mg/día) y C (2 g/día), por 8 semanas. Resultados: hallaron una reducción en los valores de hemoglobina glicada tanto a la 4<sup>ta</sup> semana como a la 8<sup>ava</sup> semana. Concluyeron que las vitaminas E y C, disminuyen los niveles de hemoglobina glicada, a corto plazo y que sus efectos a largo plazo prevendrá de las complicaciones crónicas de esta enfermedad.

Díaz Arce (2006), en su estudio: “Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético”, revisaron algunas evidencias que relacionan a las especies reactivas del oxígeno con los principales mecanismos que explican las complicaciones observadas en los pacientes con diabetes mellitus. La generación de productos de glicosilación avanzada, la activación de la vía de los polioles y de las hexosaminas, así como la activación de la proteína quinasa C, están en estrecha relación con las especies reactivas de oxígeno que conducen a un estrés oxidativo crónico en estos pacientes. También sugirieron que un posible tratamiento antioxidante, puede mejorar el cuadro clínico de los pacientes diabéticos.

Esthart H y Mukhopadhyay (2006), estudiaron el “Efecto del extracto acuoso del *Ocimum sanctum* (tulsi) y la vitamina E sobre los parámetros bioquímicos y retinopatía en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina”. Las ratas de estudio fueron albinas machos de 150 a 200 g de peso, la diabetes fue inducida con estreptozotocina (60 mg/kg), la administración del extracto acuoso del *Ocimum sanctum* fue a la dosis de 250 mg /kg y la de vitamina E a 544 mg/kg, el tratamiento duró 16 semanas. Hallaron que los niveles de glicemia disminuían en los grupos diabéticos tratados con el extracto *Ocimum sanctum* y/o vitamina E (p

<0,05); así mismo reportaron una disminución en los niveles de Hemoglobina glicada, Colesterol total, LDL colesterol, VLDL colesterol, triglicérido y lipoperoxidación en los grupos diabéticos tratados con el extracto *Ocimumsanctum* y/o vitamina E en comparación al grupo diabético sin tratamiento. Además hubo un incremento en las proteína totales, HDL colesterol, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en los grupos diabéticos tratados con el extracto *Ocimumsanctum* y/o vitamina E en comparación al grupo diabético sin tratamiento. En cuanto a la retinopatía se observó una mejora en la retina en los animales tratados con el extracto *Ocimumsanctum* y/o vitamina E.

Sánchez M y colaboradores (2008), realizaron el trabajo “Estrés y vitaminas antioxidantes en pacientes diabéticos tipo 2”, que tuvo como objetivo determinar el estrés oxidativo, defensa antioxidante y consumo de alimento ricos en vitamina A y E. Participaron 24 pacientes de 35 a 55 años con diagnóstico reciente de diabetes tipo 2 y se determinó: la concentración de Malondialdehido (MDA) para evaluar el estrés oxidativo, la defensa antioxidante fue evaluada mediante la determinación sérica de la vitamina A y E; CT, TG y el consumo de alimentos ricos en antioxidantes a través de un cuestionario de consumo. Concluyeron que no se encontró estrés oxidativo en etapas tempranas de la diabetes pero sí una disminución de los niveles séricos de las vitaminas A y E. Sugieren que la suplementación racional de los antioxidantes en los pacientes diabético tipo 2 retarda la aparición del estrés oxidativo y las complicaciones de la diabetes.

Castillo Ble y colaboradores (2008), en su estudio titulado: “Suplementación con vitamina E, ¿benéfica o dañina?”, realizaron una revisión sobre las características de la vitamina E, sus principales efectos benéficos, su toxicidad potencial y discutieron los resultados de algunos meta análisis recientes en relación al aumento del riesgo de mortalidad. Aunque en estudios de laboratorio se han observado efectos potencialmente benéficos de la vitamina E, los resultados de la evaluación clínica son inconsistentes. Una situación que ha limitado el conocimiento en esta área, es la dificultad para establecer comparaciones entre los diferentes estudios. Existen diferencias entre sujetos, de tipos de formulaciones, etapas de la enfermedad, y otros aspectos. El consumo de megadosis de esta vitamina se ha incrementado en muchos países. En estudios recientes se ha informado que además de su capacidad

antioxidante, esta vitamina tiene acciones moleculares precisas que influyen en la actividad de varias enzimas modulando la expresión de genes y la inducción de apoptosis. Sin embargo, algunos estudios clínicos y de meta análisis han informado que dosis de 400 UI/día o mayores de  $\alpha$ -tocoferol, se asocian con aumento de índice de mortalidad. Resulta claro que hasta la fecha, no se tiene un conocimiento completo de los efectos de estas sustancias a nivel celular y que existe controversia en los resultados de ensayos clínicos.

Cuerda C y colaboradores (2011), realizaron una revisión sistemática con el objetivo de evaluar la relación entre el estrés oxidativo y la diabetes, y los posibles efectos antioxidantes en la prevención y tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. Su trabajo titulado “Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia”, reporta que los estudios de intervención con diferentes combinaciones de antioxidantes no han demostrado un efecto beneficioso sobre la mortalidad cardiovascular y global en diferentes poblaciones, incluidos los pacientes con diabetes mellitus. Tampoco en estos estudios se ha demostrado un efecto beneficioso de estas sustancias en la prevención de la diabetes. La evidencia científica actual apoya que estas sustancias pueden disminuir la peroxidación lipídica, la oxidación de las partículas de LDL-colesterol y mejorar la función endotelial y la vasodilatación dependiente del endotelio, sin que esto se relacione de forma significativa en el control metabólico de los pacientes.

Tavares A y colaboradores (2012), estudiaron el efecto de la suplementación de vitamina E (440 UI/kg) en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (60 mg/kg) por el periodo de 30 días. Luego del tratamiento determinaron: glicemia, variación de peso, perfil lipídico, nivel de urea, creatinina y la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa. Trabajaron con ratas machos de 225 g de peso promedio, distribuidas en 4 grupos: Grupo control (GI), Grupo Vitamina E (GII), Grupo ratas diabéticas (GIII) y Grupo de ratas diabéticas con vitamina E (G IV). Hallaron que el tratamiento de la vitamina E reduce los niveles de: glucosa, urea, Colesterol total, LDL colesterol, VLDL colesterol y triglicéridos e incrementa la actividad de la Superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Diabetes**

La diabetes mellitus es un trastorno heterogéneo definido por la presencia de hiperglicemia. Los criterios diagnóstico para la diabetes incluyen: 1) glucosa plasmática en ayunas  $\geq 126$  mg/dL; 2) Síntomas de diabetes más una glucosa plasmática aleatoria  $\geq 200$  mg/dL; o 3) Concentración plasmática de glucosa  $\geq 200$  mg/dL; después de una dosis por vía oral de 75 g de glucosa (prueba de tolerancia a la glucosa). La hiperglicemia se debe en todos los casos, a una deficiencia funcional en la acción de la insulina, y se debería a una disminución en la secreción de la hormona a cargo de las células  $\beta$  pancreáticas, menor respuesta a la insulina por los tejidos blancos (resistencia a la insulina), o a incremento en las hormonas contra reguladoras opuestas a los efectos de la insulina. (Rossel, 1992)

Como consecuencia de la hiperglicemia crónica, se observa disfunción y lesión de diversos órganos especialmente ojos, nervios, corazón, vasos sanguíneos; complicaciones que producen alteraciones del bienestar y una disminución en la calidad de vida. (Soc P Endocrinología, 2008; Atlas de la diabetes, 2013)

Esta enfermedad produce alteraciones del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, en conjunto con una relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a la hormona. En el estado diabético disminuye la captación de glucosa por los tejidos sensibles a la insulina, esto es, músculo y tejido adiposo. La insulina es necesaria para la captación de glucosa en estos tejidos y el diabético o bien carece de insulina o ha desarrollado resistencia a la insulina en estos tejidos. La resistencia a la insulina es una anomalía del receptor de insulina o en pasos posteriores que mediatizan el efecto metabólico de la insulina. (Wolfenbutel, 1996)

En 2014, la American Diabetes Association (ADA) clasifica la diabetes mellitus, según la tabla 1. (Iglesias, 2014).

**TABLA N° 1 clasificación etiológica de la diabetes mellitus (ada, 2014)**

I Diabetes tipo 1 A) Autoinmune. B) Idiopática.
II Diabetes tipo 2
III Otros tipos específicos de diabetes A) Defectos genéticos de la célula beta. B) Defectos genéticos de la acción de la insulina. C) Enfermedades del páncreas exocrino. D) Endocrinopatías. E) Inducida por fármacos o sustancias químicas. F) Infecciones G) Formas poco frecuentes de diabetes mediada por inmunidad. H) Otros síndromes genéticos, asociados a diabetes.
IV Diabetes gestacional.

Fuente ADA. Iglesias (2014).

### **2.2.2 Complicaciones bioquímicas de la diabetes:**

Glicación de proteínas.

Cada vez existe mayor evidencia de que niveles elevados de glucosa sanguínea favorecen la glicación no enzimática de las proteínas tisulares de larga duración, donde la glucosa se liga químicamente a los grupos aminos primarios, formándose la hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>). La hemoglobina sufre una serie de lentas redistribuciones químicas originando luego una serie de productos avanzados de glicación (PAG), que suelen acumularse y que estarían involucrados en la generación de EROs. (Wolfenbutel, 1996; Céspedes, 2000).

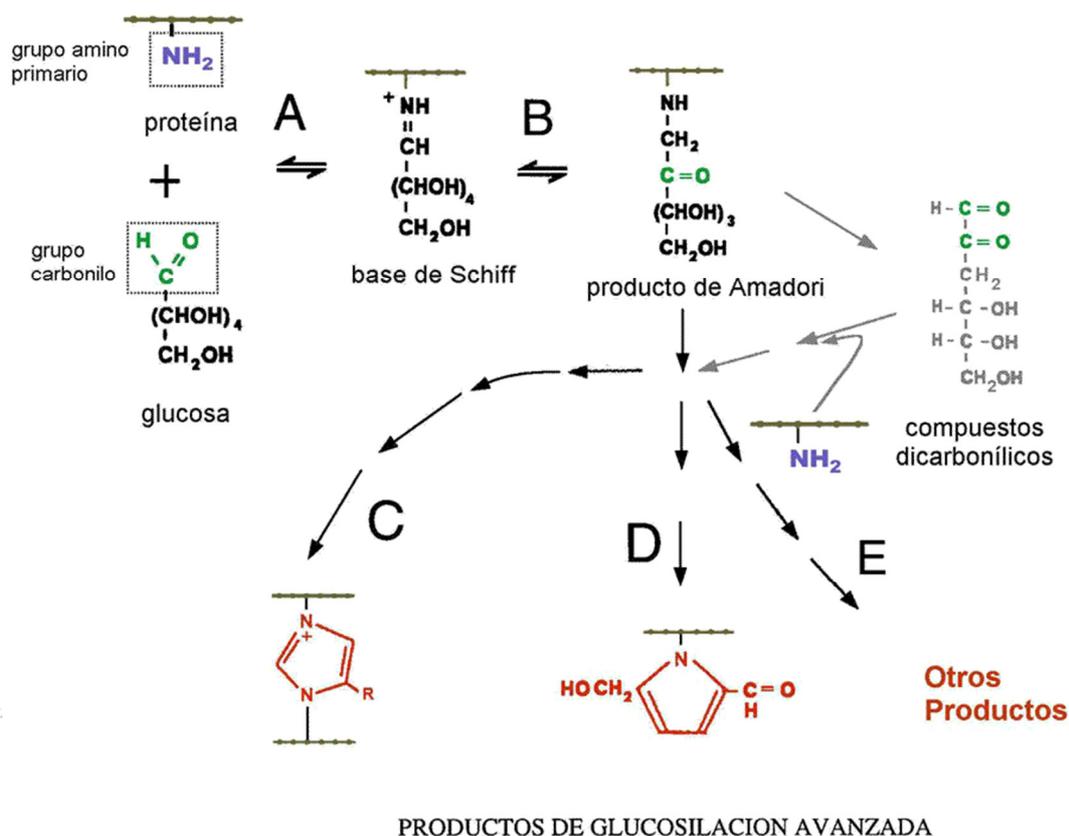
Los valores de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) en sangre permiten diagnosticar la ocurrencia de la diabetes en meses anteriores a la fecha del examen. Los niveles de hemoglobina glicada están en relación directa con los niveles de peroxidación lipídica que son los resultados del daño ocasionado por los radicales libres. Así mismo, los sistemas antioxidantes en el organismo se encuentran disminuidos y para aliviar el daño ocasionado por los radicales libres y evitar la propagación de la peroxidación lipídica se consume la vitamina E por su acción antioxidante a nivel de lípidos. (Young 1995).

La hiperglicemia con el paso del tiempo causa problemas en ciertos órganos y tejidos, tales como los riñones, los nervios, pies y los ojos. Tener diabetes, también puede aumentar el riesgo de tener enfermedades cardíacas y trastornos óseos y articulares; conocidos como complicaciones de la diabetes. La hiperglicemia crónica es el factor patológico principal en relación al desarrollo de complicaciones que se presentan en la diabetes mellitus. Hoy en día, se admite la existencia de una estrecha relación entre la diabetes y la intensidad de la afección micro y macro vasculares. Estas complicaciones se tratan de explicar a partir de los trabajos experimentales, que han permitido clarificar cada vez más los mecanismos de las lesiones derivados de la hiperglicemia persistente (Young, 1995). Experimentos realizados por Engerman y Kern (Gonzales, 1992) en perros hiperglicémicos inducidos con aloxano, demostraron que los animales diabéticos no controlados desarrollaron retinopatías.

La posible relación entre hiperglicemia y estrés oxidativo ha sido avalada por otros experimentos *in vitro* e *in vivo*. Un estudio en la línea de células beta pancreáticas MIN-6 expuesta por 2 h a elevadas concentraciones de glucosa estimuló la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) detectada por la tinción del diacetado-2',7'-diclorofluoresceína. Además se produjo una marcada disminución de los niveles de alfa tocoferol en las membranas de este tipo celular.(Romay 1996)

El beneficio de un buen control de la glicemia y del perfil lipídico en las complicaciones que se presentan en la diabetes son actualmente comprendidas, aumentando el daño oxidativo y disminuyendo el estado antioxidante causa la progresión de esta enfermedad. Las defensas antioxidantes están localizadas tanto

fuera como intracelularmente, lo que va permitir proteger al organismo del estrés oxidativo, siendo la vitamina E una de vitaminas más estudiadas por su potencial antioxidante a nivel de membranas lipídicas. (Cleir, 1990)



### Figura N° 1. Proceso de Glicosilación no enzimática de proteínas

(A) Formación de la base de Schiff. (B) Reordenamiento de Amadori. A través de una serie de reacciones complejas los productos de Amadori pueden originar derivados con estructura imidazólica (C) pirrólica (D) y otras diversas (iminas, furanos, piridinas, etc).

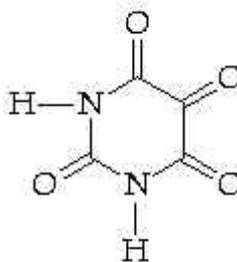
Fuente: <http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero2/articulos/articulo2>.

### Conversión de la glucosa en fructosa por vía del sorbitol

El mecanismo alternativo para metabolizar la glucosa consiste en convertirlo en un *poliol* por reducción del grupo aldehído a hidroxilo, dando como resultado la formación de sorbitol, mediante la enzima *reductasa de aldolasa*. Esta enzima se encuentra en muchos tejidos, como cristalino, retina, hígado, riñón, placenta, eritrocitos, ovarios y vesículas seminales. La enzima *deshidrogenasa de sorbitol* oxida al sorbitol en fructosa en las células del hígado, ovario, espermatozoide y



requiere de la administración de insulina para no sobrepasar la hiperglicemia arriba de los 500 mg %. (Ramos, 1994).



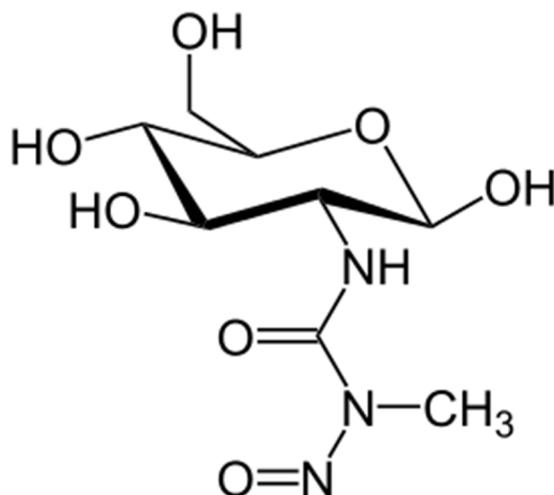
**Figura N° 3 Aloxano.**

Fuente: [www.bing.com/images/search?q=aloxano](http://www.bing.com/images/search?q=aloxano)

Estreptozotocina.

Sustancia selectiva para las células beta, se fija a la membrana reconociendo algunos receptores sobre las células  $\beta$ , causando diabetes permanente. Se aplica a la dosis de 45 mg / kg de peso por vía intramuscular o intraperitoneal y genera hiperglicemia a las 24 h con valores arriba de los 300 mg % de glicemia.

La hiperglicemia es menos marcada con la estreptozotocina que con el aloxano en los primeros días de la inyección. (Ramos, 1994).



**Figura N° 4 Estreptozotocina**

Fuente: [www.bing.com/images/search?q=estreptozotocina&FORM=HDRSC2#view=detail&id](http://www.bing.com/images/search?q=estreptozotocina&FORM=HDRSC2#view=detail&id)

#### **2.2.4 Especies reactivas de oxígeno.**

Los radicales libres son especies moleculares muy reactivas con un electrón no apareado, con un tiempo de vida media muy corta del orden de  $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  s, que al colisionar con otra moléculas para sustraer o donar un electrón, logran la estabilidad. Este proceso genera un nuevo radical a partir de la molécula con la cual colisionó. Los radicales más perjudiciales en sistemas biológicos son los radicales del oxígeno, conocidas como especies reactivas del oxígeno (EROs), entre los que tenemos al radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ), hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y perhidroxilo ( $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ), radical peroxilo ( $\cdot\text{OOR}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El daño al tejido causado por radicales del oxígeno suele llamarse daño oxidativo y los factores que protegen contra daño por el radical de oxígeno se conoce como antioxidantes.

La interacción de radicales libres con bases del DNA puede llevar a cambios químicos que si no son reparados pueden heredarse en las células hijas, el daño por radical de ácidos grasos insaturados en membranas celulares y proteínas plasmáticas conduce a la formación de peróxidos de lípidos y después a dialdehidos muy reactivos que pueden modificar químicamente proteínas y bases de ácidos nucleicos y finalmente el daño por radicales puede generar mutaciones, cáncer, enfermedad autoinmunitaria y aterosclerosis. (Bender, 2009).

#### **2.2.5 Fuentes de Radicales Libres del Oxígeno.**

- 1) Fuente Extracelular: Humo de cigarrillos, luz solar, oxidación por drogas ( $\text{CCl}_4$ ), radiaciones ionizantes, sustancias cíclicas de naturaleza redox como paraquat (herbicida bipyridilo no selectivo que se utiliza para el control de malezas).
- 2) Fuente Intracelular: Transporte de electrones mitocondriales, reacciones del complejo citocromo P450 en el metabolismo xenobiótico en el retículo endoplasmático, de ácidos grasos en los peroxisomas, el NADPH oxidasa de membrana (especialmente en células inflamatorias), células fagocíticas, subproductos de reacciones enzimáticas como en la xantina oxidasa. (Bender, 2009)

### 2.2.6 *Daño de los radicales libres a las biomoléculas*

Cuando las especies reactivas oxidantes superan las defensas antioxidantes se produce el daño oxidativo a macromoléculas como: las proteínas, lípidos insaturados, ácidos nucleicos y los carbohidratos. (Venero, 2002; González, 2000)

Proteínas.

Las proteínas son modificadas de diferentes maneras por EROs. Por ejemplo.

- a) Puede reaccionar directamente con el ligando metálico de metaloproteínas, por ejemplo, el hierro de la hemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina, la catalasa es inhibida por el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que la convierte en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo; el peróxido de hidrógeno reduce al  $Cu^{+2}$  de la superóxido dismutasa Cu-Zn a  $Cu^{+1}$ , reaccionando después con él y generando luego el radical hidroxilo. Este a su vez, ataca un residuo adyacente de histidina del centro activo del enzima, necesario para la actividad catalítica.
- b) Las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones de aminoácidos mediados por radicales libres, así se ha observado que la gliceraldehído -3-deshidrogenasa y la superóxido dismutasa, que dependen de estos aminoácidos para su actividad, se inhiben en presencia de radicales libres.
- c) Los enlaces peptídicos son susceptibles de ser atacados por los radicales libres, estos pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido.

Lípidos.

La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones en la permeabilidad, o la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la de los organelos celulares. En relación a la permeabilidad se afectan tanto el transporte pasivo como el activo. La peroxidación (autooxidación) de lípidos expuesto a oxígeno no sólo causa deterioro de alimentos (rancidez) sino también daña tejidos o puede ser causa de cáncer, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis y envejecimiento. Los efectos se

originan por los radicales libres ( $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{OH}\cdot$ ) producidos en el transcurso de la formación de peróxido a partir de ácidos grasos que contienen dobles enlaces interrumpidos por metileno. La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que proporciona un aporte continuo de radicales libres que inician peroxidación adicional. El daño por radical de ácidos grasos insaturados en membranas celulares, conducen a la formación de peróxidos de lípidos y después a dialdehídos muy reactivos que pueden modificar químicamente proteínas y las bases de los ácidos nucleicos.

#### Ácidos Nucleicos.

El daño provocado a nivel del ADN por los radicales libres puede generar mutaciones somáticas, que llevarían a la síntesis de proteínas defectuosas y a la generación de transformaciones malignas. El ADN es susceptible de ser dañado por los radicales libres a nivel de la desoxirribosa, e induce el rompimiento del enlace entre este azúcar y el grupo fosfato del siguiente nucleótido, mecanismo mediante el cual se produce el rompimiento de la cadena sencilla, los que pueden ser reparados por medio de las enzimas. Los radicales hidroxilo tienen la capacidad de reaccionar también con las bases nitrogenadas del ADN, entre los tipos de alteraciones que puede observarse son las sustituciones, deleciones y con menor frecuencia las inserciones. Las mutaciones se establecen cuando una cadena de ADN dañada es copiada durante la duplicación.

#### Carbohidratos.

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas, así también los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas, como la despolimerización del ácido hialurónico.

## Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que tiene la capacidad de neutralizar los radicales libres; estas sustancias tienen la propiedad de combatir las deficiencias asociadas al estrés oxidativo, tales como las enfermedades cardiovasculares, reumáticas y a eventos tan comunes en los seres humanos como el envejecimiento. Un antioxidante es definido como la sustancia, que al estar presente en baja concentración, retarde o inhiba significativamente la oxidación de otra sustancia (López 2007).

Las sustancias antioxidantes se clasifican en dos principales sistemas, el enzimático y el no enzimático; también conocidos como endógenos y exógenos respectivamente; las cuales pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular.

El primer sistema de defensa comprende a las enzimas: superóxido dismutasa CE 1.15.1.1, catalasa CE 1.11.1.6, glutatión peroxidasa CE 1.11.1.9, tioredoxina reductasa CE 1.8.1.9 y glutatión reductasa CE 1.8.1.7. La superóxido dismutasa permite la dismutación del ión superóxido en peróxido de hidrógeno y cuya acumulación se evita por el sistema de catalasa (CAT)/glutatión peroxidasa (GSH-PX), transformándolo en oxígeno no molecular, agua y glutatión oxidado (Zamora, 2007).

El segundo sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno, es un sistema paralelo al primero y especialmente útil cuando el sistema endógeno se satura. Está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres; los cuales intervienen logrando retrasar la producción de los radicales libres. Algunos antioxidantes no enzimáticos en las células son el glutatión, el ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinonas, fenoles, polifenoles, la vitamina E, la vitamina C, la vitamina A y los carotenoides; mientras que los minerales selenio, cobre, zinc y magnesio forman parte de la estructura molecular de algunas de las enzimas antioxidantes (Zamora, 2007).

Se ha relacionado al consumo de frutas, verduras, hierbas y otros alimentos con una menor incidencia de enfermedades degenerativas, debido al alto contenido de varios antioxidantes (principalmente carotenoides, vitaminas C y E) que se encuentran presentes en éstos alimentos; los cuales neutralizan la acción de los radicales libres, desempeñando una función fundamental en la prevención de éstas enfermedades, logrando un efecto positivo en la salud pública (Carranco, 2011).

### 2.2.7 Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es definido como la pérdida del equilibrio entre la producción de radicales libres o de especies reactivas del oxígeno y los sistemas de defensa antioxidantes, y que afecta sobre los carbohidratos, lípidos y las proteínas, además, está relacionada con la progresión de diferentes enfermedades crónicas como aterosclerosis, nefropatía, retinopatías neuropatías o con la apoptosis. En la diabetes mellitus el estrés oxidativo se da a través de diferentes mecanismos bioquímicos como la glucosilación excesiva de proteínas generando productos de glucosilación intermedia y avanzada como la hemoglobina glicada aumentada en los diabéticos, la autooxidación de la glucosa a partir de la enolización de la glucosa con formación de productos intermedios como la 3-desoxiglucosona y la activación de la vía de los polioles a través de la participación enzima aldosa reductasa con acumulación intracelular de sorbitol y fructosa (Villa, 2000)

### 2.2.8 Los antioxidantes también pueden ser prooxidantes (Bender, 2009)

El ascorbato es un antioxidante que reacciona con superóxido e hidroxilo para dar monodehidroascorbato y peróxido de hidrógeno o agua.



El ascorbato también puede actuar como prooxidante al reaccionar con el Oxígeno o  $\text{Cu}^{+2}$  para generar el radical superóxido o hidroxilo.



Para la actividad prooxidante del ascorbato se requiere de valores altos del mismo y es poco probable que se alcancen en los tejidos, con valores en plasma de ascorbato

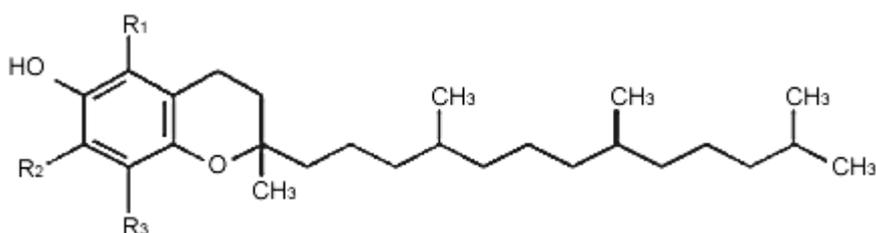
de 30 mmol/L, se llega al umbral renal y en ingestiones por arriba de los 100 a 120 mg /día la vitamina se excreta en la orina.

El betacaroteno es un antioxidante que atrapa radicales en condiciones de presión parcial baja de oxígeno, a presiones altas de oxígeno como en los pulmones y en concentraciones altas, el betacaroteno es un prooxidante auto catalítico y puede dañar los lípidos y proteínas por radicales.

### 2.2.9 Vitamina E

La vitamina E corresponde a una familia de 8 sustancias relacionadas, los tocoferoles y los tocotrienoles. Reyna Evans (Reyna, 2002) propuso el nombre de tocoferol, que significa transportar (pherein) al nacimiento (tocos), dado que es necesaria para que las ratas gestantes se reproduzcan y amamanten a sus crías.

Las cuatro formas principales de vitamina E son designadas como alfa, beta, delta y gamma, según el número y posición de los grupos metilos en el anillo cromanol (Figura 5).



COMPUESTO	R1	R2	R3
$\alpha$ – tocoferol	CH3	CH3	CH3
$\beta$ – tocoferol	CH3	H	CH3
$\gamma$ – tocoferol	H	CH3	CH3
$\delta$ - tocoferol	H	H	CH3

**Figura N° 5 Formas químicas de la vitamina E**

Fuente: <http://www.3tres3.com/nutricion/el-papel-de-la-vitamina-e-en-la-inmunidad> 1378/4-11-2014

La esterificación del grupo fenol del anillo cromanol con acetato, succinato o nicotinato protege de la oxidación a la molécula de tocoferol. Pero, como este grupo fenol es el lugar activo para la función antioxidante de la vitamina E, los ésteres de tocoferol han de ser hidrolizados para que la vitamina E pueda desarrollar la actividad biológica.

Los actuales métodos de análisis del tocoferol en el plasma, tejidos, alimentos, aceites y otras sustancias se basan en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta técnica permite separar y analizar los diferentes tocoferoles: alfa, delta, gamma.

#### ***2.2.10 Absorción y metabolismo de la vitamina E***

La vitamina E alimentaria está formada fundamentalmente por los tocoferoles alfa y gamma, de los que suele absorberse de 20% a 50%. Debido a su naturaleza hidrofóbica, la vitamina E se absorbe de manera similar a la grasa. Los ácidos biliares secretados por el hígado la solubilizan para que puedan atravesar el medio acuoso de la luz intestinal y alcanzar las células intestinales absorbivas. Antes de la absorción, las esterasas pancreáticas y las enzimas de la mucosa intestinal hidrolizan los ésteres de vitamina E. En la mucosa intestinal, la absorción se efectúa por difusión pasiva, la vitamina E puede absorberse también en forma de micelas intactas que penetran en las células de la mucosa, una vez dentro de los enterocitos, los tocoferoles alfa y gamma libres quedan incorporados a otros productos de la digestión de los lípidos de la dieta y a las apolipoproteínas producidas por las células intestinales en los quilomicrones, que la transportan a través de los vasos linfáticos mesentéricos y del conducto torácico hasta la circulación sistémica. Por tanto, cualquier proceso que altere la digestión de la grasa alimentaria puede provocar una absorción defectuosa con posible deficiencia de vitamina E. (Zorrilla, 2002)

Inicialmente, la vitamina E es transportada en los quilomicrones, luego la vitamina E puede liberarse hacia los tejidos o ser transferida a lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sin embargo, gran parte de la vitamina E absorbida vuelve al hígado en los remanentes de los quilomicrones y es captada por los hepatocitos. En los hepatocitos, la vitamina E se separa de las lipoproteínas y se une a la proteína hepática de

transferencia de tocoferol, una proteína citosólica de 30 kDa, donde es transportado al retículo endoplasmático o al aparato de Golgi para ser empaquetado en VLDL (Obregón, 2005).

Una vez en la VLDL circulante, el alfa tocoferol puede ser transferido a la HDL durante la lipólisis de la VLDL en la circulación, puede viajar con el núcleo de VLDL durante su conversión a LDL en la circulación, o puede volver al hígado con los remanentes de VLDL. Una pequeña cantidad de los tocoferoles alfa y gamma que penetran en el hígado puede aparecer en la bilis, posiblemente como producto de excreción (Márquez, 2002).

### ***2.2.11 Concentración y Fuentes de la Vitamina E***

En los adultos normales, la vitamina E en plasma oscila entre 5 a 20 ug/mL, siempre que los valores de los lípidos sean normales. Los valores de los niños y los lactantes son ligeramente inferiores a los de los adultos, especialmente en los recién nacidos prematuros, cuyos niveles séricos de lípidos son bajos, y los niveles de alfa-tocoferol son aproximadamente la mitad que los de los adultos (Evans, 2003).

Las fuentes más ricas de vitamina E son los aceites vegetales (soja, maíz, semilla de algodón), los productos derivados de estos aceites (margarina, grasa para cocinar y mayonesa), el germen de trigo, nueces, otros cereales. Los tocoferoles se encuentran en los huevos, los aceites vegetales y el germen de trigo. Las carnes, el pescado, la grasa animal y la mayoría de las frutas y vegetales contienen poca cantidad de vitamina E; las verduras aportan cantidades apreciables. Algunos de los derivados de los aceites contienen más tocoferol gamma que alfa. Durante el procesamiento, almacenamiento y preparación de los alimentos pueden perderse cantidades considerables de tocoferol (Zorrilla, 2002).

El recambio de la vitamina E en el hígado es rápido, por lo que nunca se acumula gran cantidad en este tejido, sin embargo, en el adiposo sí se almacena a largo plazo. La acumulación como la liberación de la vitamina E en el tejido adiposo es lenta. El músculo almacena gran parte de los depósitos orgánicos de tocoferol. La vitamina E

se encuentra casi exclusivamente en las gotitas de grasa de las células adiposas, en todas las membranas celulares y en las lipoproteínas circulantes. (Obregón, 2005)

### ***2.2.12 Mecanismos fisiológicos de la vitamina E***

La función fisiológica de la vitamina E es la de un limpiador de los radicales libres, evitando así que los radicales libres y oxidantes lesionen a los ácidos poliinsaturados de las membranas celulares, a las proteínas ricas en grupos tiol de las membranas y del citoesquelético, y a los ácidos nucleicos (Giuliano, 1996).

En condiciones normales se generan especies de oxígeno reactivo y radicales libres (RL) en contraparte a ello el organismo ha evolucionado un complejo sistema de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que tienen por objeto detoxificar los RL.

La vitamina E es uno de los factores primordiales de este sistema de defensa, ya que es soluble en los lípidos y, por tanto, puede proteger directamente a las membranas celulares. Otros antioxidantes son la vitamina C, el  $\beta$ -caroteno y el selenio. Al reaccionar con un RL, la molécula de tocoferol se convierte en radical tocoferil, que puede ser reducido de nuevo a tocoferol por la vitamina C o por el glutatión.

Los efectos fisiológicos potenciales de la vitamina E están relacionados con su actividad antioxidante. En estudios con animales de experimentación, la vitamina E protege frente a los metales pesados, las hepatotoxinas que generan radicales libres y diversos fármacos que provocan lesiones por oxidación (Orasanu, 2009).

### ***2.2.13 Efecto antioxidante de la vitamina E***

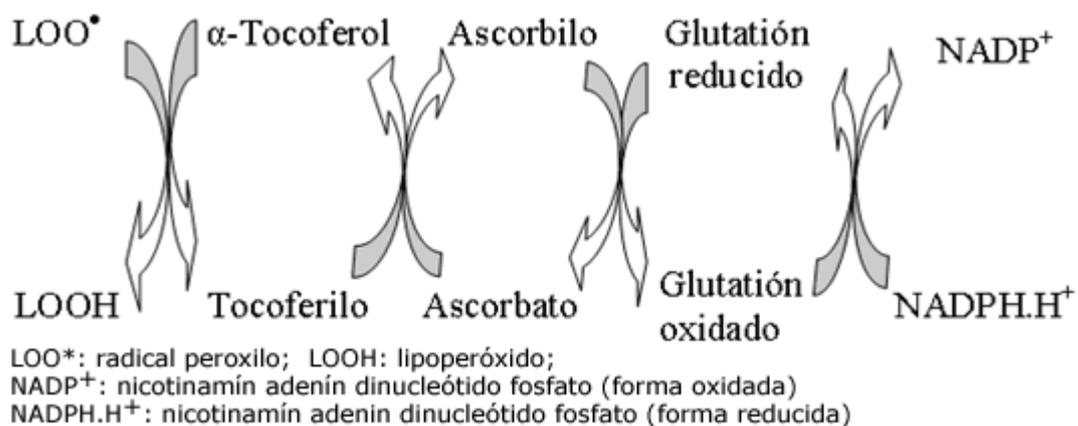
La vitamina E incluye a un grupo de lípidos relacionados como los tocoferoles y tocotrienoles, de todos ellos, el compuesto activo que con mayor frecuencia se denomina vitamina E es el  $\alpha$ -tocoferol. Los tocoferoles son antioxidantes biológicos, que reaccionan con las formas más reactivas del oxígeno y otros radicales libres. Los radicales libres pueden atacar a los ácidos grasos insaturados presentes en los lípidos de membrana oxidándolos y ocasionando fragilidad celular.

La función de la vitamina E como un antioxidante natural, evita la oxidación de los componentes celulares por radicales libres, por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares y protege contra el desarrollo de cardiopatías evitando la oxidación de LDL. (Gonzales, 1992). Los estudios epidemiológicos han demostrado que los niveles plasmáticos de tocoferol son inversamente proporcionales a la incidencia de cardiopatía isquémica en diversas poblaciones humanas (Yu, 2005). La base de estas observaciones parece ser que la LDL oxidada es un factor iniciador de la aterosclerosis. Los suplementos de vitamina E protegerían a la LDL de la oxidación, evitando la propagación iniciada por el ataque de los radicales libres (Forbes, 2008).

Además, la vitamina E protege al sistema nervioso, al músculo esquelético y la retina ocular frente a la oxidación (Brown, 2001). Para el buen desarrollo de los sistemas neuromusculares humanos, y para el funcionamiento adecuado de la retina, es necesario que la ingesta y la absorción sean adecuadas. La producción de neurotransmisores en el sistema nervioso va acompañada de la generación de grandes cantidades de radicales libres, por lo que es esencial evitar los daños causados por los radicales libres en las mitocondrias y en las membranas axonales del sistema nervioso.

#### ***2.2.14 Mecanismo de regeneración de la vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol)***

El radical peroxilo LOO\* puede abstraer hidrógeno de moléculas con enlaces débiles como el OH del  $\alpha$ -tocoferol y se producen una serie de reacciones en las que intervienen el ascorbato y el glutatión reducido que permiten la regeneración de la vitamina E.



**Figura 6 Mecanismo de Generaci6n de la Vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol)**

Fuente: C6spedes, T.; Rev Cubana Cardio 2000; 14(1):56

### 2.3 Glosario de t6rminos.

**6cido 6rico.-** Es uno de los mayores antioxidantes presentes en suero. Es un barredor de radicales peroxilo, radicales hidroxilo y oxigeno singlete. El 6cido 6rico es un subproducto del metabolismo de las purinas en los seres humanos y otros primates.

**Antioxidante.-** Cualquier sustancia que estando en concentraci6n mucho m6s baja que la de cualquier sustrato oxidable por un radical libre, previene o demora la oxidaci6n de dicho sustrato. El antioxidante posee una estructura qu6mica apropiada para reaccionar f6cilmente con un radical libre con un costo m6nimo para el organismo.

**Antioxidante totales (TAS).-** Concentraci6n de antioxidantes totales presentes en el suero.

**Colesterol Total (CT).-** Alcohol esteroideo, blanco e insoluble en agua. Participa en la estructura de algunas lipoprote6nas plasm6ticas y su presencia en exceso se atribuye la g6nesis de la aterosclerosis. Esterol eucari6tico que en animales superiores es precursor de 6cidos biliares y hormonas esteroideas.

Equivale a la suma de las fracciones: HDL, LDL, VLDL.

***Diabetes experimental.***- Procedimiento químico de laboratorio que permite inducir a la diabetes en animales.

***Diabetes Mellitus.***- Enfermedad producida por una deficiencia de la acción de la insulina en el cuerpo.

***Estreptozotocina (STZ).***- Antibiótico antitumoral del grupo de las nitrosoureas. Su indicación principal es el tumor de islotes celulares del páncreas. Por esta razón es utilizado en investigación básica donde produce diabetes mellitus en los animales por destrucción de las células que producen insulina.

***Estrés Oxidativo.***- Se define como una perturbación del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, con un desplazamiento a favor de los primeros, de modo tal que esta alteración da lugar a cambios en las biomoléculas y de hecho a las modificaciones funcionales en los lugares donde las mismas se encuentren en un momento dado.

***Glicemia.***- Niveles de glucosa en la sangre, cuyos valores en humanos es de 70 a 110 mg% Semejante al de las ratas.

***HDL-c.***- Contenido de colesterol presente en la Lipoproteína de alta densidad

***Hemoglobina Glicada.***- Glicosilación del grupo  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina y los aminos terminales de la hemoglobina.

***LDL-c.***- Contenido de colesterol presente en la Lipoproteína de baja densidad

***Lipoperoxidación lipídica.***- Reacción autocatalítica donde un radical libre oxida a una molécula de ácido graso poliinsaturado transformándolo en un radical de ácido graso, que a su vez puede oxidar a otra molécula de ácido graso. La peroxidación lipídica genera numerosos productos como malondialdehído, 4-hidroxinonenal, dienos conjugados, carbonilos y oxígeno singlete que pueden ser determinados mediante diversas técnicas y constituyen métodos de medición de estrés oxidativo.

**Malondialdehido (MDA).**- producto tóxico derivado de la oxidación de los lípidos y que es ampliamente utilizado como marcador de lipoperoxidación.

**Radicales libres.**- Átomo o grupos de átomos que tiene un electrón no apareado.

**Triglicéridos (TG).**- Compuesto consistente en tres moléculas de ácido graso esterificados con el glicerol.

**Vitamina E.**- Compuesto liposoluble con actividad antioxidante biológica similar al alfa tocoferol y otros isómeros del tocoferol y tocotrienoles.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Estudio

##### 3.1.1 *Tipo y Diseño de Investigación*

Tipo Experimental por la intervención de la diabetes experimental

##### 3.1.2 *Unidad de análisis*

Animales de experimentación: ratas Sprague-Dowley albinas machos

##### 3.1.3 *Tamaño de la muestra*

24 ratas albinas distribuidas en 6 ratas por cada grupo según tratamiento.

##### 3.1.4 *Selección de muestra*

Luego del período de aclimatación en el bioterio, las ratas se distribuyeron en los grupos en forma aleatoria.

##### 3.1.5 *Lugar*

Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición. (CIBN). Bioterio de la Facultad de Medicina, UNMSM. Lima. Perú.

##### 3.1.6 *Técnicas de recolección de Datos*

Los parámetros bioquímicos en suero o sangre se describen a continuación en materiales y métodos.

## **3.2 Materiales y Métodos**

### ***3.2.1 Material biológico***

Los animales fueron obtenidos del Centro Nacional de Alimentación Nacional (CENAN) y tuvieron un período de aclimatación en el bioterio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) de la Facultad de Medicina Humana durante 1 semana.

Se usaron ratas albinas machos Sprague-Dowley (n=24) de un peso aproximado de 250 a 280 g, colocados en jaulas individuales, en condiciones ambientales de temperatura promedio 22 – 25°C., humedad, luz oscuridad, controlados y agua ad libitum.

Se controló el peso interdiario durante el tiempo de experimentación con una balanza electrónica con una precisión de 0,1g.

### ***3.2.2 Diabetes experimental***

Se indujo a la diabetes experimental después de 12 horas de ayuno con estreptozotocina (SZT) administrándola por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 35 mg/kg de peso.

La solución de estreptozotocina se preparó en buffer citrato 10 mM pH 4,5 y se administró dentro de los 10 minutos de su preparación (Jurupe 1998).

Se midió la glicemia basal día a día con un equipo Glucotest y en aquellos animales cuya glicemia superaba los 300 mg /dL, se les administró insulina de acción lenta a la dosis de 4 U/kg de peso hasta la estabilización de los valores.

Se consideró como ratas diabéticas a las que presentaron valores de glicemia superior a 150 mg /dL y menores de 350 mg/dL. (Jurupe 1998)

### ***3.2.3 Diseño experimental***

Se formaron 4 grupos experimentales en forma aleatoria, según lo siguiente:

G1: Control con dieta estándar.

G2: Control con dieta estándar + vitamina E (900 mg/kg de dieta).

G3: Diabético con dieta estándar.

G4: Diabético con dieta estándar + vitamina E (900 mg/kg de dieta).

La tabla 2 muestra la composición de la dieta estándar que recibieron los animales del presente estudio.

**Tabla N° 2: COMPOSICION DE LAS DIETAS (g), SEGÚN GRUPOS**

COMPONENTE	DIETA CONTROL	DIETA CON VIT E
	GRUPOS	
	G1, G3	G2, G4
Proteínas (g)	181,695	181,695
Lípidos (g)	145,060	145,060
Carbohidratos (g)	560,342	560,342
Fibra (g)	15,108	14,258
Minerales (g)	38,349	38,349
Mezcla Vitaminas (g)	37,720	37,720
Agua (g)	21,676	21,676
Vitamina E (g)	<b>0,050</b>	<b>0,900</b>
<b>TOTAL (g)</b>	1 000 g	1 000 g
<b>TOTAL DE Cal</b>	<b>4 273,688 Cal</b>	<b>4 273,688 Cal</b>

La Vitamina E se adquirió en la farmacia Universal y se usó como suplemento vitamínico, grageas de 1 g de vitamina, Natural E 1000 IU de alfa tocoferol acetato de la Casa Comercial GNC (1 mg acetato de  $\alpha$ -Tocoferol equivale 1 UI)

Los animales consumieron entre 25 a 30 g de dieta por día equivalente a un consumo de 1,25 a 1,5 mg de vitamina E por día en la dieta control no suplementada y en la dieta suplementada corresponde a un consumo diario de Vitamina E de 22,5 a 27 mg por día.

Después de 8 semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados siguiendo las recomendaciones éticas para el trabajo con animales de laboratorio, y se extrajo la muestra sangre. Para las pruebas bioquímicas se usó suero.

### **3.3 Determinaciones Analíticas:**

#### **3.3.1 Determinación de Glucosa:**

Se realizó mediante el uso de un glucómetro y de tiras reactivas que contienen la enzima glucosa deshidrogenasa. La glicemia se determinó tomando la gota de sangre directamente de la cola, que se depositó en la tira reactiva de Hemoglucotest. Se usó el equipo Reflolux S de Boehringer Mannheim para determinar la concentración de la glicemia, con una precisión  $\pm 5$  mg/dL.

**Principio de medición:** Determinación fotométrica de la glucosa mediante tinción de glucosa con oxidorreductasa.

Valores de referencia: Glicemia Normal: 70 a 110 mg/dL.

Diabetes: 150 a 350 mg/dL

#### **3.3.2 Determinación de Hemoglobina Glicada (HbA<sub>1c</sub>)**

Se determinó en sangre, mediante el método de Cromatografía en columna de intercambio catiónico. El eluato se midió en el espectrofotómetro a 415 nm. (BioSystems, 1985).

**Fundamento del método.** Después de preparar un hemolizado, donde se elimina la fracción lábil, las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio catiónico, eluyéndose de forma específica la hemoglobina A<sub>1c</sub> previa eliminación por lavado de la HbA<sub>1a+b</sub>. La estimación del porcentaje de la HbA<sub>1c</sub> se realiza por lectura de la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresa en % de Hemoglobina de Glicada, tomando como base (100 %) la hemoglobina total.

Valores de referencia en humanos: menor de 5,7 % normal, 5,7 % a 6,0 % pre diabético y mayor de 6,0 % diabético. (BioSystems 1985)

### ***3.3.3 Determinación de Colesterol Total, HDL colesterol y LDL colesterol.***

El colesterol sérico se determinó enzimáticamente, midiéndose luego en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 505 nm.

Para la determinación de HDL colesterol y LDL colesterol se precipitó las fracciones específicamente para luego determinar colesterol en los sobrenadantes. (Valtek 1998).

Valores de referencia: Colesterol Total menores de 120 mg % normal

LDL c menores de 70 mg %

HDL c mayores de 35 mg %

**Fundamento:** El Colesterol se determina por acción enzimática: el Colesterol éster hidrolasa que libera al colesterol de los ésteres de colesterol, el Colesterol oxidasa que oxida al colesterol liberado, produciendo peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de la enzima Peroxidasa reacciona con el sistema cromogénico (4-aminoantipirina y el ácido p-hidroxibenzoico) formando un compuesto coloreado que absorbe a 505 nm.

### ***3.3.4 Determinación de Triglicéridos.***

En suero, se cuantifica con reactivos enzimáticos y midiéndose en el espectrofotómetro a 520 nm. (Valtek 1998).

Valores de referencia: menores de 120 mg %

**Fundamento:** Los Triglicéridos son hidrolizados por una Lipasa específica liberando ácido graso y glicerol. El Glicerol es fosforilado por la enzima gliceroquinasa formando glicerol-3-fosfato y ADP y posteriormente, el glicerol-3-fosfato es oxidado a dihidroxiacetona con formación de agua oxigenada por la enzima glicerol fosfato oxidasa posteriormente, el peroxido de hidrógeno reacciona con 4-amino- antipirina y el ácido 3,5-Diclorobencensulfónico para producir por medio de la enzima Peroxidasa un compuesto coloreado en cantidad proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra, midiéndose a 520 nm.

### 3.3.5 *Determinación de Albúmina*

En suero, se analizaron las muestras en el espectrofotómetro con el reactivo de verde de Bromocresol. (Valtek, 1998).

Valores de referencia: 3 a 4,2 g %

### 3.3.6 *Determinación de Proteínas Totales*

La cuantificación de Proteínas Totales en suero se determinó por el método de Biuret. (Valtek, 1998)

Valores de referencia: 5 a 6,6 g %

### 3.3.7 *Antioxidantes Totales (TAS)*

Se determina en suero o plasma por el método espectrofotométrico midiendo el radical catión ABTS<sup>+</sup> (2,2'-Azino-di [3-etilbenotiazolin sulfanato]). Este radical desarrolla un color verde azulado, midiéndose a 600 nm. (BioSystems, 1985).

Valores referenciales: menor de 5 mM

**Principio del Análisis:** El ABTS<sup>+</sup> (2,2'-Azino-di [3-etilbenotiazolin sulfanato]) se incuba con peroxidasa (metamioglobina) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para dar el radical catión ABTS<sup>·</sup>. Este radical presenta una coloración verde azulada relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración, siendo esta supresión, proporcional a la concentración de antioxidantes. Se usó como patrón: indicar el compuesto usado como patrón 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-ácido carboxílico.

Valores de referencia: menores de 4 mM.

Cálculos:

$$\text{TAS (mM)} = \text{Conc Patrón} \times (\Delta A_B - \Delta A_{MP}) / (\Delta A_B - \Delta A_{\text{Patrón}})$$

### 3.3.8 *Determinación Lipoperoxidación en suero*

Se realizó por medición del complejo Tiobarbitúrico-Malondialdehído (TBARS): según el método de Buege con algunas modificaciones (Suarez, 1995).

#### **Procedimiento:**

En un tubo de centrífuga de tapa rosca pipetear 0,3 ml de muestra de suero adicionar 0,6 ml de ATC 20%. Mezclar.

Colocar los tubos anteriores (tapados) en Baño María hirviente por 10 minutos

Enfriar. Añadir 0,9 ml del ácido tiobarbitúrico 0.67 % en HCl 0.25 N. Mezclar.

Trasladar los tubos al Baño María hirviente por 30 minutos. Enfriar.

Centrifugar a 3000 RPM por 10 minutos.

Separar el sobrenadante a otro tubo con ayuda de la pipeta Pasteur.

Leer los sobrenadantes en el espectrofotómetro a 535 nm.

Cálculos: Complejo Tiobarbitúrico-malondialdehído (TBARS)

En Suero:

$$(\text{TBARS}) \text{ umol/L} = 3,846 \times 10^{-5} \times \text{Lectura}_{\text{MP}}$$

El Factor  $3,846 \times 10^{-5}$  proviene de dividir  $(6/1,56 \times 10^5)$ , donde 6 es el factor de dilución de la muestra y  $1,56 \times 10^5 \text{ L. (cm.mol)}^{-1}$  es el coeficiente de extinción molar del MDA.

Valores de referencia: menores de 4,5 uM

### 3.3.9 *Determinación de Ácido Úrico.*

Se cuantificó en suero por el método enzimático, midiendo la absorbancia a 555 nm. (Valtek, 1998).

Valores de referencia: menores de 5,8 mg %

**Fundamento:** El Ácido Úrico es oxidado por la enzima específica uricasa generándose alantoína y peróxido de hidrógeno, posteriormente en una reacción mediada por la enzima peroxidasa el peróxido de hidrógeno reacciona con el ácido 3-dimetilaminobenzoico y 4-aminoantipirina produciéndose un compuesto coloreado

con un máximo de absorción a 555 nm., en cantidad proporcional que presenta la muestra.

Valores de referencia: menores de 5 mg %

### **3.4 Análisis De Datos**

Los parámetros bioquímicos de cada grupo o tratamiento experimental será procesado en EXCEL, determinando la media y desviación estándar; la diferencia estadística entre los grupos según el tipo de tratamiento fue determinado mediante la prueba t-student a un nivel de significancia del 5 %.

### **3.5 Limitaciones**

En el presente trabajo no fue posible determinar Vitamina E en suero por:

- El alto costo en la de determinación, mediante HPLC.
- Por la poca muestra de suero que se obtuvo.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Resultados

En la **TABLA N° 3** se detallan los pesos iniciales y finales de los grupos de estudio, así mismo el porcentaje de la ganancia de peso por grupos. Los grupos controles (Control G1 y Control + Vit E , G2 ) presentan una ganancia de peso porcentual de 50.8 % y 54,9 % respectivamente, sin embargo en los grupos diabéticos (Diabético y Diabético + Vit E) la ganancia de peso porcentual fueron alrededor del 29 %.

Existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los porcentajes de ganancias de peso entre los grupos controles y diabéticos ya sea con o sin suplemento de la vitamina E.

**TABLA N° 3 PORCENTAJE PROMEDIO DE GANANCIA DE PESO (g) EN RATAS SEGUN TRATAMIENTO**

<b>Peso ( g)</b>	<b>Control G1</b>	<b>Control + Vit E G2</b>	<b>Diabético G3</b>	<b>Diabético + Vit E G4</b>
<b>Final</b>	<b>417 ± 18</b>	<b>405 ± 16</b>	<b>341,5 ± 17</b>	<b>333,5 ± 16</b>
<b>Inicial</b>	<b>276 ± 20</b>	<b>261,5 ± 18</b>	<b>265 ± 14</b>	<b>258 ± 19</b>
<b>Ganancia de peso (%)</b>	<b>50,8 ± 2,54 *</b>	<b>54,9 ± 3,3 a</b>	<b>28,9 ± 2,5 *</b>	<b>29,2 ± 2,3 a</b>

**n = 6 en cada tratamiento**

**Casillas con signos (\* , a) iguales ( $p < 0,05$ ). Diferencia Significativa.**

La Glicemia promedio según los grupos de dieta se muestra en la **TABLA N° 4**, donde los grupos controles (control G1 y control + Vit E G2) presentan niveles de glucosa en ayunas de 87,7 mg% y 79,9 mg% respectivamente y los grupos Diabéticos (Diabético G3 y Diabético + Vit E G4) tuvieron valores elevados de

glicemia, siendo menor en el grupo diabético con el suplemento de Vit E (326,4 mg% y 279,3 mg% respectivamente). Existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) al comparar los niveles de glicemia entre los grupos diabéticos más no así entre los grupos controles.

En la **TABLA N° 4** también reporta el porcentaje de hemoglobina glicada (%HbA<sub>1c</sub>) donde se observa que los niveles en los grupos diabéticos son mayores que los respectivos grupos controles. La administración de la vitamina E en los grupos control y diabéticos produjo una reducción del porcentaje de hemoglobina glicada y esta diferencia resultó significativa ( $p < 0,05$ ) entre los grupos diabéticos.

**TABLA N° 4 NIVELES PROMEDIO DE GLICEMIA Y PORCENTAJE DE HEMOGLOBINA GLICADA (% HbA<sub>1c</sub>) EN RATAS SEGUN TRATAMIENTO**

<b>TRATAMIENTO (GRUPO)</b>	<b>GLICEMIA mg%</b>	<b>% HbA<sub>1c</sub></b>
<b>Control (G1)</b>	<b>87,76 ± 8,24</b>	<b>4,67 ± 0,14</b>
<b>Control + Vit E (G2)</b>	<b>79,94 ± 8,68</b>	<b>4,54 ± 0,16</b>
<b>Diabética (G3)</b>	<b>326,41 ± 85,95</b>	<b>6,08 ± 0,40 *</b>
<b>Diabética + Vit E (G4)</b>	<b>279,39 ± 80,45</b>	<b>5,37 ± 0,17 *</b>

**Casillas con signos (\*) iguales ( $p < 0,05$ ). Diferencia Significativa.**

**n = 6 en cada tratamiento**

Los niveles de Perfil Lipídico en ratas según el tipo de dieta se describen en la **TABLA N° 5**. Los valores de triglicéridos, colesterol total y LDL colesterol son más elevados en los grupos diabéticos que en los controles respectivos ya sea con o sin suplemento de Vit E. Existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los grupos diabéticos al comparar las medias de los parámetros estudiados.

En cuanto a los niveles de HDL- colesterol, los grupos diabéticos presentan valores menores que los controles; y al comparar los grupos G2 y G4 (+ Vitamina E) con los G1 y G3, los valores fueron mayores en los primeros. Existió diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) al comparar las medias de HDL entre los grupos diabéticos, no así en los grupos controles.

**TABLA N° 5 NIVELES PROMEDIOS DEL PERFIL LIPIDICO EN RATAS SEGUN TRATAMIENTO**

<b>Perfil Lipídico</b>	<b>Control (G1)</b>	<b>Control + Vit E (G2)</b>	<b>Diabética (G3)</b>	<b>Diabética + Vit E (G4)</b>
<b>Triglicérido mg %</b>	<b>116,85 ± 2,23</b>	<b>112,55 ± 5,48</b>	<b>151,68 ± 16,87</b> *	<b>115,73 ± 5,60</b> *
<b>Colesterol T. mg %</b>	<b>116,55 ± 9,93</b>	<b>110,24 ± 4,58</b>	<b>164,85 ± 24,44</b> a	<b>130,31 ± 15,28</b> a
<b>HDL mg %</b>	<b>40,50 ± 0,70</b>	<b>42,56 ± 2,35</b>	<b>25,10 ± 0,30</b> *	<b>31,15 ± 1,65</b> *
<b>LDL mg %</b>	<b>57,74 ± 3,00</b>	<b>60,97 ± 5,27</b>	<b>122,81 ± 17,72</b> b	<b>79,09 ± 32,0</b> b

**Casillas con signos ( \*, a, b ) iguales p < 0,05 Diferencia Significativa. n = 6.**

Los resultados de Proteínas Totales (g%), Albúmina (g%) y Globulinas en suero de ratas según tratamiento se describe en la TABLA N° 6.

Los niveles de proteínas y de albúmina en los grupos que recibieron la vitamina E son menores si se compararan con los grupos que no recibieron la vitamina.

También las proteínas (g%) en los grupos diabéticos son menores que sus respectivos grupos controles. No existe diferencia significativa entre las medias de proteínas entre los grupos controles y diabéticos.

Referente a la albúmina existe diferencia significativa entre los grupos controles más no en los grupos diabéticos.

**TABLA N° 6 PROTEINAS TOTALES, ALBUMINA Y GLOBULINAS EN RATAS SEGUN TRATAMIENTO**

TRATAMIENTO (GRUPO)	Proteínas T. ( g%)	Albúmina (g%)	Globulinas (g%)
Control (G1)	6,64 ± 0,53	3,70 ± 0,20 *	2,93 ± 0,36
Control + Vit E (G2)	6,24 ± 0,48	3,29 ± 0,26 *	2,95 ± 0,37
Diabética (G3)	5,82 ± 0,46	3,54 ± 0,28	2,28 ± 0,35 *
Diabética + Vit E (G4)	5,54 ± 0,44	3,33 ± 0,26	2,21 ± 0,32 *

Casillas con signos iguales (\*)  $p < 0,05$  Diferencia significativa,  $n = 6$

El estado de Antioxidantes Totales (TAS) en suero se detalla en la TABLA N° 7 donde se observa que los grupos que recibieron el suplemento de vitamina E presentan menores niveles TAS que los grupos que no recibieron la vitamina E, existiendo marcada diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0,05$ ). Como se observa en la Tabla N° 6, los niveles de Lipoperoxidación en los grupos diabéticos presentan niveles mayores a los controles respectivos; mostrando con ello que en los grupos diabéticos existe mayor daño oxidativo, al comparar los niveles de lipoperoxidación (TBARS) entre los grupos controles (o diabéticos) observamos que los grupos que recibieron vitamina E, presenta menores valores de lipoperoxidación. En este caso, existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los grupos diabético, más no así entre los grupos controles,

Otro parámetro estudiado como antioxidante son los niveles séricos de **ácido úrico** en ratas y según el tipo de tratamiento, se observó que los grupos que recibieron el suplemento de vitamina E presentan niveles menores de ácido úrico que los grupos que no recibieron el suplemento vitamínico. Además, los grupos diabéticos presentan niveles mayores de ácido úrico que los respectivos grupos controles, (Tabla N° 7). Existe sólo diferencia significativa  $p < 0,05$  entre los grupos diabéticos.

**TABLA N° 7 NIVELES PROMEDIO EN SUERO DE ANTIOXIDANTES TOTALES (TAS), LIPOPEROXIDACIÓN (TBARS) Y ÁCIDO ÚRICO EN RAYAS SEGUN TRATAMIENTO**

<b>TRATAMIENTO (GRUPO)</b>	<b>TAS (mM)</b>	<b>TBARS x10<sup>-6</sup> M</b>	<b>Ac Úrico (mg%)</b>
<b>Control (G1)</b>	<b>3,30 ± 0,26 *</b>	<b>3,14 ± 0,25</b>	<b>5,00 ± 0,37</b>
<b>Control + Vit E (G2)</b>	<b>2,65 ± 0,19 *</b>	<b>2,89 ± 0,18</b>	<b>4,62 ± 0,24</b>
<b>Diabética (G3)</b>	<b>6,91 ± 0,56 a</b>	<b>6,56 ± 0,53 *</b>	<b>6,60 ± 0,49 b</b>
<b>Diabética + Vit E (G4)</b>	<b>5,37 ± 0,48 a</b>	<b>5,10 ± 0,45 *</b>	<b>5,06 ± 0,38 b</b>

**Casillas con signos iguales (\*, a, b) Diferencia significativa p < 0,05 n = 6**

## 4.2 Discusión

Se ha estudiado el rol de la administración de vitamina E en ratas machos diabéticas inducidas experimentalmente con estreptozotocina sobre los cambios metabólicos en la glicemia, hemoglobina glicada, perfil lipídico, proteínas y albúmina y defensas antioxidantes.

Una de los primeros indicadores evaluados fue el peso corporal de las ratas expresado como porcentaje de ganancia de peso. Los grupos controles presentaron altos porcentajes de ganancia de peso en comparación con los diabéticos siendo esta ganancia en los primeros alrededor del 50 %. La pérdida de peso es un exponente de la gravedad de la diabetes y de la rapidez de su evolución, lo cual indicaría el estado diabético de los animales en el presente estudio.

Tavares de Almeida (2012), trabajó con ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y tratadas con vitamina E y reporta resultados parecidos al nuestro al determinar el peso, con la diferencia que el grupo de ratas diabéticas presentaron mayor peso al final del tratamiento. Las diferencias entre ambos estudios fueron el tiempo y dosis de suplementación de vitamina E. En nuestro caso la duración del tratamiento fue mayor (8 semanas vs 4 semanas) y la dosis aproximada de vitamina E suplementada en la dieta fue menor (Aproximadamente 25 mg de vitamina E/día vs 100 mg de Vitamina E/día). También Sinhdu (2004) et al. han reportado que en ratas macho Sprage Dawley con diabetes inducida por Streptozotocina (STZ), a las cuatro semanas de la administración de STZ, mostraron una marcada pérdida de peso.

Está bien establecido, que la escasa ganancia de peso de los animales diabéticos demostraría la ineficiente utilización de la glucosa como combustible energético de las células a pesar de la hiperglicemia. Esto obligaría al organismo a consumir las reservas de proteínas musculares y lípidos que ocasionarían la pérdida de peso en estos animales la que se acentuaría con el tiempo.

Como ya lo hemos señalado, lo que define el estado diabetógeno en un organismo, es la hiperglicemia, que puede ser monitoreada por los niveles de glucosa y la hemoglobina glicada. En nuestro estudio los niveles de glicemia disminuyeron en los grupos que recibieron el suplemento de vitamina E, siendo significativo ( $p < 0,05$ ) en el grupo G4 al ser comparado con G3 con un descenso de la glicemia en un 15%.

Esthrat M, (2006) estudió el efecto de la Vitamina E (a la dosis de 544 mg/kg peso) sobre la retinopatía en ratas diabéticas inducidas con la estreptozotocina (60 mg/kg peso) por 16 días de tratamiento hallando los niveles de glicemia de 72 mg %, 336 mg % y 175 mg % para los grupos controles, diabéticos y diabético con vitamina E, mostrando una notable mejoría en la retinopatía. Si bien el modelo experimental de diabetes inducida con estreptozotocina es semejante al nuestro, la reversión de la glucosa que consigue Esthrat con la suplementación de Vitamina E es mayor (48%). Tavares de Almeida (2012) también reporta una mejor respuesta al tratamiento con vitamina E de las ratas diabéticas ya que logra una disminución de aproximadamente 70% en los niveles de glicemia.

Por otro lado, E. Sivan (1996) estudió las malformaciones en los embriones de ratas preñadas en 12 días de tratamiento con vitamina E a la dosis de 440 mg de vitamina E/kg de dieta y describe niveles de glicemia bastantes semejantes entre los grupos controles (89,6 mg%) y control con vitamina E (89,2 mg%) y en los grupos diabéticos (348,2 mg % y 332,8 mg % sin y con vitamina E respectivamente). En este caso, sólo se logra disminuir en un 5% la glicemia de las ratas alimentadas con suplemento de vitamina E. Consideramos, que un factor importante para la reducción de la glucosa sanguínea es la dosis de vitamina E empleada, la vía de administración y la duración del tratamiento.

La Hemoglobina glicada ( $Hb_{A1c}$ ) es un parámetro bioquímico muy utilizado para el seguimiento del tratamiento de la diabetes, dado que una elevada glicemia tiene la posibilidad de ligar glucosa a la hemoglobina de forma no enzimática que puede reflejarnos el nivel de glucosa sanguínea de dos o tres meses atrás.

En pacientes diabéticos la Hemoglobina glicada es mayor a 7,5 % tal como lo reportan los siguientes estudios realizados por: Krall (1992) mayor del 13% de Hemoglobina glicada para una glicemia mayor a 300 mg%, Palomino (1997) menciona un 12,76 % Hb<sub>A1c</sub> para pacientes DMNID con una glicemia de 128 mg%, Wolfenbutel et al (1996) refiere en pacientes DMNID un valor de 13,3 % de Hb<sub>A1c</sub>, Stewart (1997) establece niveles mayores a 7% de Hb<sub>A1c</sub> para personas diabéticas, y la Asociación Americana de Diabetes (ADA 2014) establece 6,5 % de Hb<sub>A1c</sub> para personas diabéticas.

En el presente estudio, las ratas diabéticas con el suplemento de vitamina E (G4) presentan menor grado de hemoglobina glicada (5,37 %) frente a las diabéticas sin vitamina E (6,08 %), con una diferencia significativa de  $p < 0,05$ . Una posible explicación a este resultado sería lo descrito por Obregón y col (2005), que reportan que las vitaminas C y/o E intervienen en las fases tempranas de la glicosilación no enzimática bloqueando la formación de base de Schiff entre la glucosa y la hemoglobina.

Si bien la diabetes, empieza con una alteración del metabolismo de carbohidratos luego compromete a los lípidos y proteínas. Es conocido que la LDL-colesterol inicia una cascada de eventos que conducen a la formación del ateroma y sus niveles constituyen marcadores indirectos del daño oxidativo a los lípidos.

En relación al perfil lipídico, cuyos parámetros se presentan en la tabla 4, observamos que la suplementación de la vitamina E en las ratas diabéticas mejora los resultados en los niveles de triglicéridos, colesterol y LDL con respecto al grupo diabético sin suplementación encontrando diferencia significativa con  $p < 0,05$  en todos los casos antes mencionados.

Tavares de Almeida (2012) reporta valores del perfil lipídico para ratas diabéticas sin y con vitamina E, los siguientes: triglicéridos 137 mg% y 76,1 mg%; Colesterol total 271 mg% y 115 mg%; LDLc 217 mg% y 57 mg%; respectivamente, resultados parecidos al presente trabajo, es decir los grupos tratados con vitamina E presentaron niveles de perfil lipídico menores a los grupos que no recibieron suplementación.

Resultados muy semejantes ha reportado Oré (1999) al estudiar el efecto de la vitamina E en ratas hipercolesterolémica por un periodo de 3 meses en donde los

niveles del perfil lipídico antes mencionados son menores en los animales que recibieron el suplemento vitamínico.

El valor de HDL colesterol en los animales diabéticos que recibieron suplemento de vitamina E mejora su nivel en relación a los grupos que no lo recibieron, tal es el caso que nosotros encontramos 25,10 mg% de HDL en el grupo diabético y 31,15 mg % en los diabéticos con vitamina E, siendo la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Tavares de Almeida reporta valores de HDLc 24 mg% y 43 mg% para los grupos diabéticos sin y con vitamina E suplementada respectivamente.

Esthrat M en el 2006, en su estudio reporta los siguientes valores de perfil lipídico para los grupos diabéticos y diabéticos suplementado con vitamina E, tal como sigue: Triglicérido 200 mg% y 120 mg%; Colesterol Total 235 mg% y 168 mg%; LDLc 180 mg% y 97 mg%; HDLc 34 mg% y 48 mg% respectivamente, resultados con comportamiento muy parecidos a nuestro trabajo.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, también apoyarían el rol de la vitamina E en prevenir la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, deteniendo la cadena de autooxidación.

Las proteínas constituyen un indicador del estado antioxidante ya que es un blanco de los radicales libres dando lugar a estructura oxidadas y siendo la albúmina la proteína más abundante, representaría un marcador del estrés oxidativo.

Referente al estudio de las proteínas totales y a la albúmina en los animales diabéticos, éstos presentaron menores concentraciones que los respectivos grupos controles. Se presume que la generación de radicales libres tiende a oxidar a la albúmina y proteínas por que los niveles de estos parámetros en los grupos diabéticos resultaron ligeramente menores, No hallamos diferencia significativa entre los grupos para los niveles de proteínas totales, pero sí para la albúmina, sólo en los grupos controles ( $p < 0,05$ ).

Esthrat M, (2006) en su estudio, reporta los niveles de proteínas siguientes, 7,0 g %; 6,0 g % y 6,7 g % para los grupos Controles, diabético y diabético con vitamina E respectivamente. En el trabajo de Tavares de Almeira (2012) presenta los niveles de proteínas siguientes, 7,3 g%; 7,1 g %; 4,3 g % y 7,2 g % para los grupos control, control + vit E, diabético y diabético respectivamente. Observamos en todos los

trabajos que el grupo diabético, presenta menor nivel de proteínas tal como en nuestro estudio.

Como ya ha sido mencionado, la diabetes induce a una alteración metabólica en los carbohidratos, lípidos y proteínas que conlleva a un desbalance del estado prooxidante/antioxidante en favor del primero. Por tal motivo es interesante estudiar algunos parámetros del estado redox a nivel sérico.

Los factores implicados en la protección antioxidante fueron evaluados mediante la determinación del estado de los antioxidantes totales (TAS). Estos no muestran mayor diferencia entre los grupos control o diabéticos, pero sí, una pequeña disminución en los grupos que recibieron el suplemento vitamínico.

Por otro lado, la lipoperoxidación ocasiona daño a los componentes de las membranas celulares alterando sus propiedades funcionales como fluidez, permeabilidad entre otras. Este daño oxidativo puede ser evitado si se dispone de antioxidantes tal como la vitamina E que es muy eficiente en la captura de los radicales peroxilos.

Al medir los niveles de lipoperoxidación en suero estos se hallaron incrementados en ambos grupos diabéticos (G3 y G4) en relación a los grupos controles (G1 y G2) y los grupos con el suplemento vitamínico (G2 y G4) presentan niveles menores de lipoperoxidación en relación al grupo que no recibieron el suplemento (G1 y G3), lo que se puede observar en la tabla N° 6. Es importante señalar que existe diferencia significativa con un  $p < 0,05$  en los grupos diabéticos. Esta disminución en los niveles de lipoperoxidación en los grupos que recibieron el suplemento vitamínico puede deberse a que la vitamina E, es uno de los mejores sistemas de neutralización de RL, siendo muy efectiva en ambientes hidrofóbicos.

Trabajos de investigación realizados por Oré y Col (1998) en animales hipercolesterolémicos a los que se les administró la vitamina E a la dosis de 500 mg/kg de dieta durante 3 meses, describen comportamientos parecidos al presente trabajo, con los siguientes resultados del complejo coloreado Tiobarbitúrico-Malondialdehido (TBARS x uM): 3,96 en grupo control; 2,69 en control con

vitamina E; 6,26 en hipercolesterolémico y 3,54 en hipercolesterolémico con vitamina E.

Arzu Seven (2004) reporta también resultados comparables al nuestro donde los grupos suplementados con vitamina E presentan menor daño oxidativo expresado como TBARS-MDA, sus resultados fueron: 6,27 uM; 6,09 uM; 7,90 uM; 6,62 uM para los grupos, controles, control + Vit E, diabético y diabético + Vit E respectivamente. En los trabajos antes señalados y en el nuestro, la dieta suplementada con vitamina E, disminuyó los valores de lipoperoxidación a nivel sérico.

Finalmente, determinamos los valores de ácido úrico, molécula a la que se le atribuye propiedades antioxidantes in vitro ya que previene la inactivación de la superóxido dismutasa extracelular y citosólica por el peróxido de hidrógeno y estabiliza al ácido ascórbico en plasma. (Alcaíno, 2011).

En nuestro estudio, los niveles de Ácido Úrico en suero en las ratas fueron mayores en los grupos diabéticos y menores en los animales que recibieron la suplementación con la vitamina E. Los valores altos de ácido úrico en los diabéticos se explican como un mecanismo de compensación antioxidante, resultado congruente al trabajo de Inouye, 1999 y Blanco-Hernández, 2004.

Debido a los buenos resultados conseguidos en los estudios experimentales con ratas diabéticas y la suplementación de vitamina E, se han llevado a cabo diferentes investigaciones en personas diabéticas en las que se ha administrado la suplementación vitamínica, sin embargo, los resultados obtenidos no son concluyentes y más bien son controversiales.

Blanco Hernández y colaboradores (2004) estudiaron la lipoperoxidación, actividad antioxidante y factores prooxidantes en adultos mayores con diabetes tipo 2 y sugieren suplementar con vitaminas E y C la dieta de los diabéticos para disminuir el daño oxidativo. López Martínez y colaboradores (2005) al estudiar la nutrición artificial en la hiperglicemia y diabetes mellitus en pacientes críticos, recomiendan un aumento del aporte de antioxidantes como vitamina E y C, carotenoides y selenio para disminuir el daño oxidativo en los diabéticos.

Ble Castillo J. L y colaboradores en el 2008, se preguntaron si la suplementación de la vitamina E es benéfica o dañina, y al realizar una revisión de diferentes trabajos concluyen que una dosis de vitamina E mayor de 400 UI/día incrementa el riesgo de mortalidad y que debiera de evitarse. Cuando se emplearon dosis menores a los 400 UI/día encontró una disminución de la mortalidad, estos resultados no se puede extrapolar en sujetos sanos ya que los estudios se realizaron en pacientes con distintas enfermedades crónicas. (Castillo, 2008).

Cuerda C. y colaboradores en el 2011 realizaron una revisión de los antioxidantes, en la diabetes mellitus y sus complicaciones, encontrando que la diferentes combinaciones de antioxidantes no han demostrado un efecto beneficioso sobre la morbimortalidad cardiovascular en diferentes poblaciones, pero si hay evidencia científica de que los antioxidantes disminuyen: la peroxidación lipídica, la oxidación de la LDLc y mejora la función endotelial y la vasodilatación dependiente del endotelio.

No existe consenso en la actualidad sobre el mecanismo de acción que explique el efecto benéfico de la suplementación con vitamina E a diferentes niveles del metabolismo ya que incluso se reporta que dosis altas pueden resultar tóxicas. Lo que si está bien establecido es su actividad antioxidante a nivel de las membranas lipídicas. Se está estudiando su acción reguladora en la actividad de enzimas a nivel génico y sobre la apoptosis. Los futuros estudios sobre este tema nos ayudarán a comprender mejor su papel como antioxidante/ o modulador de señales en la prevención de enfermedades tal como la diabetes.

Consideramos que se debe seguir investigando en humanos este efecto de la suplementación vitamínica en la dieta, mejorando el diseño de los estudios y la metodología, para obtener los resultados esperados.

Finalmente, en nuestro trabajo experimental con ratas controles y diabéticas que consumieron una dieta con y sin suplementación de vitamina E, los resultados obtenidos demostrarían que esta vitamina mejora significativamente la hiperglicemia, hemoglobina glicada, perfil lipídico, antioxidantes totales, peroxidación lipídica.

## 5 CONCLUSIONES

- 1) La suplementación con Vitamina E en la dieta de las ratas del grupo control y diabético mejoró los indicadores del estrés oxidativos disminuyendo los niveles de: antioxidantes totales (TAS), Lipoperoxidación lipídica y ácido úrico.
- 2) La suplementación con vitamina E en la dieta de las ratas del grupo control y diabético disminuyeron los niveles de Glicemia, Hemoglobina glicada, triglicéridos, Colesterol Total, proteínas totales, albúmina.
- 3) Los niveles de HDLc aumentaron en los grupos suplementados con vitamina E y los niveles de LDLc disminuyeron en el grupo diabético suplementado con vitamina E.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- 1 Alcaño, H. Greig, D. Castro, P. Verdejo, H. Mellado, R. García, L. Díaz, G. Quiroga, C. Chiong, M. Lavadero, S. (2011). Ácido úrico: una molécula con acciones paradójicas en la insuficiencia cardiaca. *Rev Med Chile*, 139, 505-515.
- 2 Atlas de la diabetes de la FID. (2013). *Federación internacional de la diabetes (FID)*, Pag. 51 – 64
- 3 Bender, D. (2010). Radicales libres y nutrientes antioxidantes. En Murray, R. Bioquímica Harper. Mc Graw Hill Lange. (pp. 452 – 5) México D.F.
- 4 Bio Systems Bisse E. (1985). *Manual de técnicas*. Abraham Ec. J. Chromatog. 344:81-91
- 5 Blanco, J. Socarras, M. Gonzáles, D. Licea, M. (2002). Algunos indicadores de la dieta en un grupo de pacientes diabéticos tipo 2 de Centro. Habana. *Revista Cubana Aliment Nutr*, 16(1), 23-30
- 6 Blanco, R. Ruiz, M. Sánchez, M. Mendoza, V. (2004). Lipoperoxidos, actividad antioxidante y factores prooxidantes en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2. *Bioquimia*, 29(4), 118-25.
- 7 Ble-Castillo, j. Diaz-Zagoya, J. Mendez, J. (2008). Suplementación con vitamina E, ¿ Es benéfica o dañina?. *Gac Med Mex*, 144(2), 147- 54.
- 8 Brown, .AA. Hu, F.B. (2001). Dietary modulation on endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 71, 673-86.
- 9 Ceriello, A. Motz, E. (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 816-23.
- 10 Ceriello, A. Testa, R. (2009). Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32, S32-6.
- 11 Céspedes, C. T. Sánchez, S. D. (2000). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular*, 14(1), 55-60.
- 12 Champe P.C.; Harvey R.A; Ferrier D.R.(2007). *Bioquímica*. 3 ra Edición. Mc Graw Hill. Interamericana. México.
- 13 Cleir, A. Wilson, R. (1990). Free radicals and activity in type 2 diabetes. *Diabet. Med. Jan*. 7(1): 27 – 30

- 14 Cuerda, C. Luengo, M. Valero, A. Vidal, A. Burgos, R. Calvo, L. Martínez, C. (2011). Antioxidante y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. *Nutr Hosp*, 26(1), 68-78.
- 15 Díaz A, D. (2006). Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. *Rev Cubana Invest Biomed*, 25(3), 1-10.
- 16 Eshrat, H. Mukhopadhyay, A. (2006). Effect of *Ocimum sanctum* (tulsi) and vitamin E on biochemical parameters and retinopathy in streptozotocin inducin diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21(2), 181-8.
- 17 Evans, J. Goldfme, I. Maddus, B. Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signalling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*, 52:1-8.
- 18 Forbes, J.M. Coughlan, M.T. Cooper, M.E. (2008). Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 57,1446-54.
- 19 García D, Mónica. (2005). Influencia de la diabetes experimental en repuestas serotoninérgicas a nivel cardiovascular y renal. Universidad de Salamanca. Tesis Doctoral.
- 20 Giugliano, D. Ceriello, A. Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 19, 257-67.
- 21 Gonzáles de B, S.M. (1992). *Bioquímica Clínica*. Mc Graw Hill Interamericana. (1992). Madrid. España.
- 22 González, M. Betancourt, M. Ortiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquimia*, 25(1), 98-106.
- 23 Guía Peruana de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes tipo 2.(2008). *Sociedad Peruana de Endocrinología*, Pag. 19 – 20.
- 24 Iglesias, R. Barutell, L. Artola, S. Serrano, R. (2014). Resumen de las recomendaciones de ADA para la práctica clínica en el manejo de la diabetes mellitus. *Diabetes práctica*, 5 (Supl Extr 2), 1-24.
- 25 Inouye, M. Mio, T. Sumino, K. (1999). Glicated hemoglobin and lipid peroxidation in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolismo*, 48:205-9.
- 26 Jurupe, J.H. (1998). Contribución al estudio del efecto antidiabético de *Abuta Rufescens* [Aublet]. Tesis de Maestría. Fac. Medicina. UNMSM. Lima. Perú.
- 27 Krall, L.P. Beaser, R.S. (1992). *Manual Joslin de diabetes*. Ediciones Científicas y Técnicas. S.A. Barcelona. España.

- 28 Lopez, J. Mesejo, A. Montejo, J. (2005). Nutrición artificial en la hiperglicemia y diabetes mellitus en pacientes críticos. *Nutr Hosp* , 20, Supl 2, 34-37.
- 29 Manual de técnicas. (1998). *Reactivos Valtek para diagnóstico clínico*. Santiago. Chile.
- 30 Márquez, M. et al. (2002). Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. *Invest. Clin*, 43(3), 191-204.
- 31 Obregón, O. Vecchionacce, H. Brito, S. Castro, J. Ramírez, X. Villarroel, O. (2005). Efecto antiglicosilante de las vitaminas E y C. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 24(1),74-77.
- 32 Orasanu, G. Plutzky, J. (2009). The pathologic continuum of diabetes vascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 53 (Suppl 5), S35-42.
- 33 Oré, M. Huerta, D. (2000). Capacidad antioxidante en ratas diabéticas. Rol de la vitamina E. Fac de Ciencias Biológicas UNMSM. *Rev. Per. Biol*, 7(2), 191-99.
- 34 Oré. R, Arnao I, Sandoval M, Suarez S, Valdivieso R. (1998). Rol de la vitamina E en ratas hipercolesterolémica. CIBN. Fac Medicina. UNMSM. Lima. Perú.
- 35 Palomino, R.H. (1997). Determinación de hemoglobina glicada y parámetros hematológicos en pacientes DMNID. Tesis. Facultad de Farmacia. UNMSM. Lima. Perú.
- 36 Ramos R, Gabriel (1994). Diabetes experimental. *Ciencia Veterinaria*. 6,1994 México D.F.
- 37 Romay, Ch. Tate, S. Lightbody, J. Mc Master, D. Trimble, E. (1996). Capacidad antioxidante total del suero en la diabetes mellitus. *Rev Cubana Invest Bioméd*, 15(2), 1-7.
- 38 Rossel, L. Giaccari, A. De Fronzo, R.A. Glucosotoxicity. (1992). *Diabetes Care*, 15(3), 318-68.
- 39 Sánchez, M. Rodríguez, R. Lares, M. Eucaris, M. (2008). Estrés y vitaminas antioxidantes en pacientes diabéticos tipo 2. *Archivos Venezolanos de farmacología y terapéutica*, 27(1), 59-65.
- 40 Seven, A. Guzet, S. Seymen, O. Civelek, S. Bolayirh, M. Uncu, M. Burcak, G. (2004). Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in Streptozotocin induced diabetic rats: Investigation of liver and plasma. *Yonsei Med J*, 45(4), 703 – 710.
- 41 Sharma S, Jaya D, Jha A., Sharma S. (2010). Experimental model of diabetes *Ijrap*, 1(2):292 – 301

- 42 Silbernagl S, Lang F. (2010). Fisiología, *Texto y Atlas*. 3ra Edición. Editorial Medicapanamericana.
- 43 Sivan, E. Reece, E. Wu, Y. Homko, C. Polansky, M. Borenstein, M. (1996). Dietary vitamine E prophylaxis and diabetic embryopathy: morphologic and biochemical analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 175(4), 793-99.
- 44 Stewart M. (1997). ¿Reemplazará la hemoglobina glicada a la prueba de tolerancia a la glucosa oral? *The Lancet*. 30(6), 317
- 45 Suárez, C. S. (1995). Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios en ratas. Tesis de Maestría en Bioquímica UNMSM. Lima. Perú.
- 46 Tavares, D. Pereira, C. Barbosa, E. Henrique, A.(2012). Evaluation of lipid profile and oxidative stress in STZ-induced rats treated with antioxidant vitamin. *Braz. Arch. Biol. Tecnhnol*, 55(4), 527-36.
- 47 Venero G, Justo. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidants. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2), 126-33.
- 48 Villa, C.L. Nava, A. Frati, A. Ponce, H.(2000). El estrés oxidativo. ¿es necesario medirlo en el paciente diabético?. *Gac Med Mex*, 136(3), 249-55.
- 49 Wolfenbutel, B. H.; Giardano, D. (1996). Valoración a largo plazo del control de glucosa mediante determinación de hemoglobina-PFGA. *The Lancet*, 24 (1), 39-41.
- 50 Young et al. (1995). The effects of desferriaxamine and ascorbate on oxidative stress a in streptozotocin diabetic rat. *Free radical Biol. Med.*18 (5), 833 – 840.
- 51 Yu, Y. Lyons, T.J.(2005). A lethal tread in diabetes, hyperglucemia, dyslipemia, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Am J Med Sci*, 330, 227-32.
- 52 Zamora S. Juan D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr*, 34(1), Marzo
- 53 Zorrilla, G. A. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*. 21(3), 178-185.

## 7 ANEXO

### 7.1 Fotos



*FOTO N° 1 JAULAS*



*FOTO N° 2 GRUPOS: C y D*



**FOTO N° 3 GRUPOS: CE y DE**



**FOTO N° 4 PESADA**



**FOTO N° 5 IMPLEMENTOS DE TOMA DE MUESTRA**



**FOTO N° 6 TOMA DE MUESTRA**

## 7.2 Operacionalización de variables

VARIABLE		PRUEBA	TIPO	ESCALA	DIMENSIONES	INDICADOR
INDEPENDIENTE	Suplemento	Vitamina E	Cualitativa	Nominal	Si No	Vitamina en la dieta
DEPENDIENTE	Estrés Oxidativo	TBARS	Cuantitativo	De Razón	Normal	< 3.5 umol/L
		Antioxidantes Totales (TAS)			Alto	> 4.5 umol/L
					Normal	< 4.5 mmol/L
	Ácido úrico	Alto			> 5 mmol/L	
		Normal			<= 5 mg%	
	Parámetros Bioquímicos	Glicemia			Alto	> 5 mg%
					Normal	< 110 mg%
		Triglicérido (TG)			Diabético	> 150 mg%
					Normal	< 160 mg%
		Colesterol Total (CT)			HiperTG	> = 160 mg %
					Normal	< 120 mg %
		HDL-c			Alto	>= 160 mg %
					Normal	>= 35 mg %
		LDL-c			Bajo	< 35 mg %
Normal	< 70 mg %					
Hemoglobina Glicada (Hb1AC)	Alto	>70 mg %				
	Normal	<= 5,7 %				
Proteínas T	Normal	5 – 6.6 g%				
Albúmina	Normal	3 – 4,7				