

## Artículo de revisión

# Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes

MARÍA LUISA RAMOS IBARRA  
 CECILIA MARGARITA BATISTA GONZÁLEZ  
 BELINDA CLAUDIA GÓMEZ MEDA  
 ANA LOURDES ZAMORA PÉREZ

## DEFINICIÓN Y ALGUNOS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA DIABETES MELLITUS

Desde el aspecto clínico y genético, la diabetes mellitus (DM) constituye un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de carácter crónico, caracterizados por una concentración anormal elevada de glucosa en sangre. Las causas de la hiperglucemia son deficiencia en la secreción de insulina o resistencia de las células del cuerpo a la acción de ésta. A menudo ocurren alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas, como resultado del defecto de la secreción de insulina, acción de insulina o ambas (1-3).

### RESUMEN

La diabetes mellitus es un síndrome caracterizado por la concentración elevada de glucosa sanguínea. La enfermedad es progresiva y está asociada con alto riesgo de ateroesclerosis, daño renal, neuronal y ceguera; lo que la convierte en una de las principales causas de morbi-mortalidad. Actualmente, existen evidencias de que tales complicaciones se deben principalmente a que se produce un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de radicales libres (RL), lo que provoca daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Afortunadamente, dicho daño se puede evitar o disminuir con la administración de dosis adecuadas de antioxidantes exógenos (suplementos de alta calidad), lo que pudiera permitir a los pacientes diabéticos tener mejor calidad de vida, pues es de esperar que las complicaciones micro y macrovasculares ocasionadas principalmente por la producción excesiva de RL disminuyan con la administración de los antioxidantes.

**Palabras clave:** Diabetes, estrés oxidativo, radicales libres, antioxidantes.

Por sus consecuencias, se sitúa como una de las principales causas de morbi-mortalidad de las sociedades desarrolladas o en vías de desarrollo. Afeta a gran número de personas, con aumento acelerado de la prevalencia de DM tipo 1 y "explosivo" de DM tipo 2; esto último, lo relaciona la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el crecimiento y envejecimiento de la población, el incremento de la obesidad, hábitos erróneos de la alimentación y modos de vida sedentarios. Todo esto implica un problema personal y de salud pública de enormes proporciones (2-5).

Algunos estudios realizados por epidemiólogos han descritos que tanto la DM tipo 1 como la 2 son patologías

### SUMMARY

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by high blood glucose levels. Over time, diabetes can lead to blindness, kidney failure, nerve damage and atherosclerosis, what make it one of the main causes of morbidity and mortality. Nowadays some evidences show that such complications, due mainly to a biochemical imbalance are produced by the excessive production of free radicals (FR), which causes oxidative damage to the bio-molecules and that cannot be counteract by the antioxidant systems. Fortunately, this damage can be avoided or diminished with the administration of adequate doses of exogenous antioxidants (high-quality supplements), which could permit to the diabetic patients to have a better quality of life, because it is to expect that the micro and macro vascular complications caused mainly by the excessive production of FR diminish with the administration of antioxidant compounds.

**Key words:** Diabetes, oxidative stress, free radicals, antioxidant.

complicadas y desventajosas con respecto a sus complicaciones tardías, ya que los pacientes diabéticos en comparación a otros presentan 25 veces más posibilidades de quedarse ciegos, 20 veces más de tener problemas renales, así como riesgo de sufrir amputaciones por gangrena y de 2-6 veces más de desarrollar enfermedades coronarias y daños isquémicos en el cerebro. Aquellas personas que se diagnostican con esta patología antes de los 30 años de edad, no llegan a los 50, la mayoría por problemas cardiovasculares y renales (6).

Otros estudios arrojan evidencias de que la DM es la responsable del 80 por ciento de las muertes por ateroesclerosis coronaria, cuya complicación, se presenta con una frecuencia entre dos y cuatro veces más en esta población. Ahora bien, mientras que el 75 por ciento de las hospitalizaciones de diabéticos son atribuibles a enfermedades del corazón, más de la mitad de los pacientes de reciente diagnóstico ya presentan evidencias de problemas cardiovasculares (7).

### **IMPACTO SOCIAL DE LA DM**

Las causas más frecuentes de muerte en la DM son por complicaciones cardiovasculares prematuras, cerebrovasculares y falla renal (3, 4). Esto se debe principalmente a la poca o nula conciencia que existe por parte de los pacientes de disciplinarse en sus hábitos alimentarios, así como el de medicarse bajo vigilancia médica con el fin de mantener un control adecuado de glucosa sanguínea. Debido a estos factores, los diabéticos mal controlados se condicionan a padecer sufrimiento, dado a las múltiples complicaciones que se presentan de forma prematura por la hiperglucemia, lo que origina disminución drástica de su calidad de vida. Además de que tanto para las instituciones empresariales como de salud, implica grandes pérdidas económicas debido a las constantes solicitudes de incapacidad que se expiden para estos pacientes. De ahí la importancia de buscar con urgencia nuevas estrategias terapéuticas que puedan ayudar a contrarrestar los efectos crónico-degenerativos ocasionados por esta enfermedad (8).

### **ASPECTOS HISTÓRICOS DE LA DM**

La DM no es un “mal de este siglo”, sino que se conoce desde la antigüedad. La observación inicial de que este síndrome no es una sola enfermedad se acredita a dos médicos hindúes, Chakrata y Susruta (600 a.C.), quienes distinguieron dos variedades de esta patología, aunque si bien, la mayoría de las descripciones bibliográficas de ese tiempo hacen referencia a la DM tipo 1. Durante los siglos XVIII y XIX se describió otra variedad de este trastorno que comprende menos síntomas clínicos y que hoy se conoce como DM tipo 2. A mediados de 1930, Himsworth postuló que existían por lo menos dos variedades clínicas de DM: sensible e insensible a insulina. Sus observaciones clínicas se confirmaron cuando Bornstein y Lawrence diseñaron un bioanálisis para insulina. Diez años más tarde, estas observaciones fueron contundentes cuando apareció el radioinmunoanálisis (1).

### **CLASIFICACIÓN DE LA DM**

Durante las investigaciones realizadas en los últimos 20 años del siglo pasado, se observó que la DM es un síndrome que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades y aunque los diversos tipos tienen causas y orígenes distintos,

sus efectos patológicos son similares una vez que comienza (1). Uno de los elementos principales para la investigación epidemiológica y clínica, así como para guiar la conducta diagnóstica y terapéutica de esta enfermedad, es una clasificación apropiada, ya que un requisito fundamental para comprender la causa y la evolución natural de la DM radica en que los profesionales de la salud identifiquen y distingan correctamente las distintas variedades y las ubiquen en un marco etiopatológico racional. Por tal razón, en 1996 y 1997 la *American Diabetes Association* creó un comité de expertos que estudió los resultados de investigaciones realizadas durante los últimos 20 años y propuso algunos cambios en la clasificación del *National Diabetes Data Group-(NDDG)-OMS*. Este sistema moderno se reseña en el cuadro I (1).

Varios factores genéticos, metabólicos, ambientales y modo de vida originan fenotipos diabéticos similares (hiperglucemia y complicaciones microvasculares), si bien, los trastornos aquí señalados difieren en cuanto a patogenia, evolución natural, respuestas al tratamiento y medidas preventivas (1, 2, 4, 6, 9, 10), es evidente, que se requiere de más investigación para definir de forma precisa, los distintos tipos de DM, así como el de llegar a establecer claramente sus causas y diseñar estrategias preventivas y terapéuticas idóneas (1).

### **ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo (EOx) se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y radicales libres (RL), que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Este daño se relaciona con el envejecimiento y con más de 100 padecimientos. El daño celular que producen las ER y los RL, ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, el de isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otros (1, 11-22).

### **RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS**

Los RL son moléculas que contienen un electrón ( $e^-$ ) no apareado, ésta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas, lo que a su vez las convierte en moléculas muy reactivas, capaces de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos.

Las ER incluyen a las de oxígeno (ROS), hierro (RIS), cobre (RCS), así como a las de nitrógeno (RNS). Estas especies se forman como productos del metabolismo de los RL y aunque no todas son de esta clase, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en RL, lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células (13, 15, 18, 20, 22).

**CUADRO I.**  
**CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS**

<b>Diabetes mellitus tipo 1</b>
Es causada por la destrucción de células beta, a menudo de tipo inmunitario, que origina la pérdida de la secreción de insulina y deficiencia insulínica absoluta. También comprende los casos en que se desconocen las causas de la destrucción de las células beta. Representa entre el 5 y 10% de los casos del síndrome diabético.
<b>Diabetes mellitus tipo 2</b>
Es producida por una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia insulínica y la deficiencia de insulina. No se conocen con exactitud los genes específicos pero se están investigando de forma intensiva. Algunos de los factores no genéticos son edad avanzada, consumo excesivo de calorías, sobrepeso, adiposidad central, vida sedentaria y bajo o alto peso al nacer. Corresponde entre el 90 y 95% de los casos de síndrome diabético.
<b>Otros tipos específicos de diabetes mellitus</b>
Estas variedades comprenden a un grupo heterogéneo que abarca los casos de diabetes en que las causas se establecen o por lo menos se conocen parcialmente. Comprenden defectos genéticos conocidos que alteran el funcionamiento de las células beta o la acción insulínica, trastornos del páncreas exocrino, endocrinopatías, cambios pancreáticos medicamentosos o químicos y enfermedades y situaciones en que la frecuencia de la diabetes se eleva en grado considerable, pero que aún no se ha establecido una causa precisa. Representa entre el 1 y 2% de los casos de síndrome diabético.
<b>Diabetes mellitus gestacional</b>
Ocasionalmente por resistencia insulínica y deficiencia relativa de insulina durante el embarazo. Ocurre en 3 a 5% de los embarazos.

Modificado de LeRoith, 2003 (1).

### FUENTES BIOLÓGICAS DE RL

La mitocondria constituye la principal fuente de RL. Éstos se producen a nivel de la cadena de transporte de e<sup>-</sup> y fosforilación oxidativa. Este transporte es a través de la membrana interna mitocondrial, en donde se genera un gradiente electroquímico de protones que aporta la energía necesaria para producir adenosin trifosfato (ATP). En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de e<sup>-</sup>, lo que le confiere en más del 95% de estas reacciones un total de 4 e<sup>-</sup> de moléculas con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 e<sup>-</sup> al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los RL (13).

Otra fuente son los peroxisomas, organelos del citosol muy ricos en oxidadas y que generan peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas CAT) y transformado en agua. Los leucocitos polimorfonucleares son otra fuente importante, al activarse por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleucinas, etc). Los leucocitos poseen en la membrana la enzima NADPH oxidasa generadora de oxígeno, que en presencia de hierro se transforma en un potente tóxico ión oxidrilo (OH<sup>-</sup>). Esta situación se da en los procesos inflamatorios (13).

La enzima xantina deshidrogenasa predomina en los endotelios normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del Ca<sup>+</sup>, etc) y genera anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

Se puede apreciar que los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos celulares de defensa, sin embargo, en situaciones patológicas, esta producción se incrementa y provoca el estado de EOx (13).

### REACCIONES DE ÓXIDO-REDUCCIÓN Y LA APARICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las células de nuestro cuerpo están expuestas constantemente a las reacciones de óxido-reducción y un ejemplo es la transformación de los alimentos ingeridos en sustratos más simples, de los cuales es posible obtener energía. Durante el proceso de reproducción celular se consume oxígeno y se genera ATP, lo que origina productos tales como bióxido de carbono y agua. Sin embargo, durante esta transformación normal, se producen ER y RL (21).

Se cree que este proceso evolutivo inició con la aparición de los organismos fotosintéticos, a la vez que se incrementaron los niveles de oxígeno en el medio ambiente, lo que permitió a estos seres desarrollar los mecanismos necesarios para utilizar esta molécula como aceptor final de e<sup>-</sup>. Esto le proporcionó a la célula tener sistemas de producción de energía altamente eficientes a través de la oxidación de la glucosa. Por medio de esta ruta metabólica se producen hasta 38 moléculas de ATP por la oxidación de una molécula de glucosa. Esta ventaja evolutiva trajo como consecuencia el incremento en la producción de RL y ROS, pero a la vez, surgieron sistemas de defensa antioxidantes intra y extracelulares, tanto enzimáticos (las enzimas antioxidantes de mayor importancia son la CAT, la superóxido dismutasa

[SOD] y la glutatión peroxidasa [GPx] como no enzimáticos (elementos principalmente exógenos, como vitamina E, C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides, oligoelementos, glutatión [GSH], urato, ubiquinol y proteínas plasmáticas) para mantener el equilibrio redox en las células (15). Este equilibrio de óxido-reducción es esencial para perpetuar la fisiología de los seres vivos y en todos los procesos metabólicos se producen pequeñas cantidades de RL (15).

### DAÑO OXIDATIVO A LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LA CÉLULA

En el año de 1954, Rebeca Gershman sugirió por primera vez que los RL eran agentes tóxicos generadores de enfermedades, debido a la alta inestabilidad atómica de los mismos. Los RL al colisionar con una macromolécula, la oxida al sustraerle un e<sup>-</sup> y provoca que pierda su función específica en la célula (13). Dicho daño puede causar oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y efectos genotóxicos por la oxidación de nucleótidos (18, 23), lo que produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis (15).

Los lípidos, son los más susceptibles al daño por los RL, específicamente los poli-insaturados que son fácilmente oxidables. El proceso de oxidación de los lípidos es llamado peroxidación lipídica y los productos de estas reacciones se denominan lipoperóxidos (LPO). En este sentido, las membranas son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, de ahí que este proceso dañe directamente la estructura de la membrana celular e indirectamente a otros componentes celulares por la producción de aldehídos reactivos (13, 15, 18, 20).

Por otra parte, el daño que causan los RL a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enroldamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de las estructuras terciaria y cuaternaria. Esto se debe a que todos los residuos de aminoácidos están sujetos al ataque por OH<sup>-</sup>; sin embargo, los aminoácidos que se oxidan con más frecuencia son la fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina y tal oxidación forma las proteínas carboniladas, que favorece el entrecruzamiento entre proteínas o con otras biomoléculas como la glucosa (glucosilación). Estos cambios conformacionales pueden hacer a las proteínas más susceptibles de proteólisis, desnaturización o producir pérdida de su actividad biológica (13, 18).

La oxidación de ADN dependiente de ROS ocurre de forma parecida a la oxidación de proteínas y es sitio-específica. Involucra una reacción entre ADN, metales de transición y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo. La evidencia disponible indica que el escape de e<sup>-</sup>, que conduce a la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocurre en los complejos I, II y III de la cadena respiratoria por la auto-oxidación de algunos componentes (15). Esta oxidación al ADN produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por el daño al gen específico, que puede provocar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátides hermanas, alteración a la estructura de la desoxirribosa-fosfato y oxidación de las cuatro bases nitrogenadas. La oxidación de la desoxirribosa puede inducir liberación de bases y rompimiento de cadena

sencilla en las hebras de ADN, lo que puede producir la formación de micronúcleos (MN, conocidos en hematología como cuerpos de Howell Jolly) (24). La reactividad del OH<sup>-</sup> hacia la desoxirribosa varía considerablemente y los carbonos 4 y 5 resultan ser los más susceptibles. Así pues, la lesión que se observa con más frecuencia es el rompimiento de la hebra, mediado por el hierro y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (13, 18).

Como ya se describió, el daño ocasionado por el EOx a la célula puede ocurrir por muchas rutas (11, 18), pero independientemente de cual sea la vía, es evidente que el exceso de RL y ER provocan desequilibrio en la homeostasis de la célula. Tal alteración puede llevar al desarrollo de patologías crónico-degenerativas como es el caso de la DM, en donde el constante desequilibrio de la glucosa sanguínea (principalmente en pacientes mal controlados), produce en el organismo un estado de oxidación, lo que a su vez explica el por qué los diabéticos desarrollan complicaciones prematuras de diversa índole (3, 17).

### EVIDENCIAS DE DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Se ha descrito que la DM está asociada con las reacciones oxidativas catalizadas por la transición de metales descompartimentalizados (6). Esta serie de hallazgos concuerdan con estudios que presentan considerables evidencias en las que se sugiere que el EOx juega un importante papel en la patogénesis y complicaciones de la DM (3, 17, 25-33). Los mecanismos que pueden contribuir al aumento de dicho estrés en pacientes diabéticos son diferentes, en particular en aquellos sujetos con pobre control de la glicemia e hipertriglicemia. Estos mecanismos que participan en la formación de RL en diabéticos no solamente incluyen el incremento de la glucosilación no enzimática y la auto-oxidativa, sino que también al estrés metabólico, que es el resultado de cambios en la energía del metabolismo, en el nivel de los mediadores de la inflamación y en el estado del sistema antioxidante de defensa (17).

Otros estudios realizados por Šardaš y cols. (2001), en pacientes diabéticos apoyan esta teoría. Ellos encontraron incremento de ROS, tales como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH, lo que contribuyó a que se dañara el ADN de linfocitos en sangre periférica (26). Dicho daño oxidativo afecta tanto al ADN nuclear como al mitocondrial. Al respecto, Ames y cols. (1993), estimaron que una célula humana recibe 10,000 impactos oxidativos en el ADN/día producidos por OH<sup>-</sup>, es decir, de cada 10<sup>12</sup> moléculas de oxígeno que entran a la célula/día, es posible que 1 en 200 dañen al ADN (18).

Por otra parte, en lo que respecta a la DM gestacione, existen estudios realizados en animales de experimentación en los que se especula que las alteraciones morfológicas que se encontraron en los productos de gestación probablemente se debieron a las modificaciones de factores del suero, asociadas a la diabetes en el medio ambiente intrauterino (34), y aunque el mecanismo biológico exacto de teratogenicidad en esta patología se desconoce, en otros estudios con hiper-glucemia inducida en modelos animales se detectaron varias alteraciones, entre ellas, el metabolismo de prostaglandinas y la producción excesiva de ROS.

## CÓMO EL ESTRÉS OXIDATIVO CAUSA DAÑO A LOS DIABÉTICOS

Se han estipulado varias teorías al respecto, sin embargo, los mecanismos que involucran el estado oxidativo en la DM aún no están completamente esclarecidos. Las evidencias acumuladas indican que el incremento en la producción de RL, como el ión superóxido o reducción del estatus antioxidante, juegan un importante papel para que se presente el EOx. Estos mecanismos incluyen a su vez la glucoxidación y la formación de productos avanzados de glucosilación, activación de la vía de los polioles, inactivación de las enzimas antioxidantes, del metabolismo del ascorbato y descontrol en el metabolismo del óxido nítrico (ON) y de las prostaglandinas (3).

Por otra parte, se conoce que el EOx puede aumentar la producción de superóxido y ON, los cuales llevan a la formación del pro-oxidante peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Este compuesto es un potente oxidante capaz de oxidar a las lipoproteínas de baja densidad y por ende, causar disfunción vascular al actuar sobre los residuos de tirosina de las proteínas. Debido a que la producción de ONOO<sup>-</sup> es difícil de determinar, se ha propuesto la medición de nitrotyrosina como marcador de su generación. Esta última ha sido investigada en fluidos biológicos como orina y plasma, sin embargo, sólo se han detectado valores elevados de este compuesto en pacientes con artritis reumatoide, con falla renal crónica, shock séptico, enfermedad celíaca y en diabéticos, pero no en sujetos sanos (25). Por otro lado, existen evidencias de que la hiperglucemia estimula la producción de RL, con activación del factor de necrosis Kappa beta (NF-Kappabeta) y la proteína quinasa-C. Ello aumenta la formación de productos finales de glucosilación intracelulares y la acumulación de sorbitol. Este estado de hiperglucemia produce en la mitocondria RL, los cuales se pueden disminuir por la acción de la CAT, la SOD, el ácido lipoico y la L-propionil carnitina. Por otra parte, los RL, junto con el NF-kappabeta, alteran el cociente de óxido-reducción de la célula, con caída del NADPH oxidasa. Esto se puede revertir por las estatinas, los antagonistas de la enzima convertidora y los bloqueadores de los receptores de angiotensina.

La alteración del cociente óxido-reducción de la célula ocasiona anoxia, con disminución del ON, e incremento de los ONOO<sup>-</sup>. Ello activa las citoquinas inflamatorias y daña al ADN y al endotelio, lo que provoca complicaciones micro y macrovasculares en la diabetes. Así también, la reducción de la expresión de los GLUT 4, conduce a la insulinoresistencia y al bloqueo de la beta oxidación.

Es evidente, que la alteración en alguno de los procesos bioquímicos celulares, como sucede con el metabolismo de la glucosa, específicamente en la hiperglucemia, la cual causa EOx, en la célula, son provocados principalmente por factores como la sobrenutrición y la disminución de la actividad física en el individuo, lo que a su vez desencadena:

- Sobrecarga celular de ácidos grasos libres.
- Disfunción endotelial.
- Resistencia a la insulina, en el músculo
- Alteración de la secreción de insulina en las células beta (33).

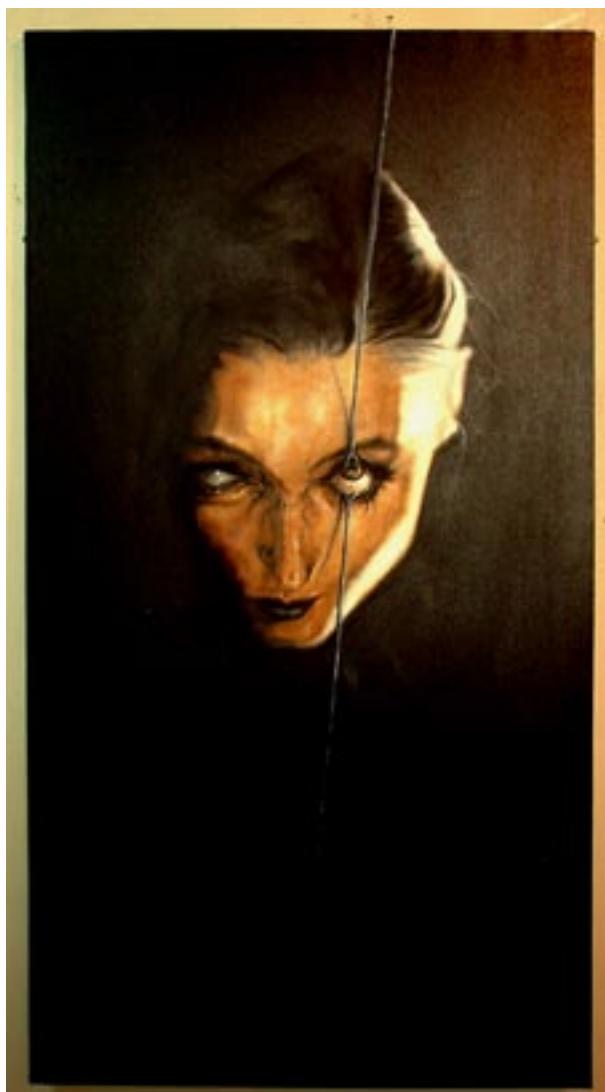
## MEDICIÓN PARCIAL DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Actualmente se cuenta con una gran batería de marcadores biológicos para evaluar EOx, cuyos indicadores han sido desarrollados para determinar el daño mediado por los RL *in vivo*, dentro de los cuales se incluyen las mediciones de lípidos, proteínas y ADN oxidados. Estas técnicas son ampliamente aplicadas en la investigación clínica y epidemiológica (18).

El daño que ocasiona este estrés a las macromoléculas se puede medir mediante métodos directos o indirectos. Entre los primeros tenemos la medición de agentes antioxidantes, lo cual es muy difícil por su corta vida media y lo caro de los equipos, lo que obliga a medirlos indirectamente mediante:

- Determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre macromoléculas: los métodos para medir peróxidos lipídicos por ejemplo, son el malon-dialdehído (MDA).
- Medición de la concentración de antioxidante: que se realiza con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sobre material biológico que puede ser plasma, orina o tejido. Para fines prácticos se determinan niveles plasmáticos de los siguientes antioxidantes: vitamina E, B, C, coenzima Q (ubiquinol) y GSH.
- Medición del estado oxidativo: refleja el balance entre el sistema oxidante y pro-oxidante en diversas patologías (13).

Enseguida se hace una descripción breve de los métodos que se utilizan para medir el daño oxidativo a las principales macromoléculas:



- La peroxidación lipídica es probablemente el proceso inducido por RL más investigado. Los LPO son compuestos inestables que tienden a degradarse rápidamente en una variedad de productos que incluyen: dienos conjugados, alcanos (etano y pentano), productos aldehídicos (MDA, n-aldehídos, -insaturados) e isoprostanos; todos ellos medibles por procedimientos espectrofotométricos, HPLC o cromatografía de gases (CG). El procedimiento más común que se utiliza en los tejidos y fluidos humanos es la medición del MDA acoplado a ácido tiobarbitúrico, cuyo resultado es un aducto cromogénico llamado TBARS (18).
- Para evaluar el daño a las proteínas, se ha desarrollado la medición de proteínas carboniladas en tejidos, pero estos compuestos son muy lábiles y esto dificulta el procedimiento. Por lo tanto, se argumenta que otras modificaciones de las proteínas, tales como la hidroxilación aromática de fenilalanina y la conversión de tirosina a di-tirosina y nitro-tirosina, son mejores marcadores del EOx (18).
- Por otra parte, se han propuesto como marcadores biológicos de EOx al sistema antioxidante a través de la medición de las enzimas SOD, GPx, y CAT, además de componentes no enzimáticos como las vitaminas A, C y E, la concentración del selenio (Se) y zinc (Zn), el GSH, la razón glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG), la capacidad sérica antioxidante total (AT) y recientemente el GAP o brecha antioxidante, este último definido como los antioxidantes diferentes de albúmina y ácido úrico, no medidos en las técnicas para la determinación de AT por método de HPLC (18).

• La medición del daño oxidativo al ADN puede ser a través de la presencia de los productos de oxidación de la guanosina: 8-hidroxiguanosina (8OHG) y su nucleótido 8-hidroxi-2desoxiguanosina (8OHdG) por técnicas de HPLC, CG y ELISA. Otra manera de evaluar el daño al ADN es por medio de la electroforesis unicelular alcalina en gel o ensayo cometa en linfocitos (18). Finalmente, nuestro grupo de trabajo propone un método contundente, más sencillo y económico para detectar indirectamente el daño al ADN ocasionado por la producción elevada de RL y este es la prueba de micronúcleos (MN).

### RADICALES LIBRES Y MN

Se conoce el efecto micronucleogénico que los RL provocan al ocasionar rompimientos en la cadena de ADN (efecto clastógeno) en algunas patologías (11, 18, 23, 35-41). Dicho daño al material genético puede provocar fenómenos de teratogenicidad, carcinogenicidad, muerte y envejecimiento celular. Y en el caso de la DM, se conoce que el daño oxidativo es el responsable, en buena parte, de las complicaciones que desarrolla el paciente diabético (1, 3, 13, 15, 17, 42-45). Estos datos concuerdan con varios estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, en donde se demuestra la hipótesis de que en aquellas patologías como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y diversos tipos de cáncer, en las que ya está demostrado que los pacientes sufren de EOx, se observó incremento de células micronucleadas en mucosa bucal (38, 40, 41). Así mismo, en recién nacidos prematuros (RNP) de madres que presentaron hipertensión arterial, infección vaginal o DM durante la gestación, se encontró

elevada la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN) en sangre periférica (23). En este último estudio, los resultados sugieren que la elevada frecuencia de EMN en RNP, puede estar relacionada con la patología materna (23).

### ANTIOXIDANTES

Para equilibrar la respuesta oxidante el organismo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de RL. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, y en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato, el cual incluye a lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN. De estos podemos destacar a la enzimas antioxidantes intracelulares SOD, GPx y CAT, así como diversos componentes plasmáticos, como GSH oxidado y reducido, bilirrubina, ácido úrico y albúmina, además de los minerales Se y Zn, las hormonas dehidroepiandrosterona, estrógenos y melatonina. Además, las vitaminas antioxidantes A, C y E, así como el ácido fólico, el cual también, cabe mencionar, disminuye el número de MN, y es recomendado a mujeres embarazadas (por ser el más inocuo) para prevenir entre otros problemas, los del cierre del tubo neural (39, 46-63).

Con estos hallazgos, se sugiere por una parte, proponer a los profesionales de la salud la administración de antioxi-



**Carlos Larracilla/Autónoma de tiro**

dantes como terapia alternativa coadyuvante, para contrarrestar el daño que ocasionan los RL a las macromoléculas en aquellos pacientes que padecen alguna enfermedad crónico-degenerativa. Esto es con la finalidad de mejorar la calidad de vida de estos individuos o en su defecto para ayudar a prevenir y/o retardar la enfermedad, la cual se conoce está estrechamente vinculada con el EOx.

Y por otra parte, es importante hacer énfasis en el cuidado que se deberá tener al elegir qué tipo y la dosis adecuada del antioxidante que se prescribirá al paciente, la cual deberá ser de acuerdo a las necesidades muy particulares de éste. Pues de lo contrario, el(los) antioxidante(s) prescrito(s) podría(n) actuar como pro-oxidante, lo que provocaría estragos en las células (1, 46). Por lo tanto, es de vital importancia que las nuevas investigaciones estén más enfocadas sobre este tema, ya que el día que se logre derribar la barrera de contradicciones que existen a este respecto (de sí prescribir o no antioxidantes, de qué tipo y a qué dosis), pero sobre todo el informar y educar adecuadamente a la población sobre este tema, se habrá logrado un gran avance en la ciencia médica, al mismo tiempo que se habrá librado a la humanidad de seguir siendo engañados por "charlatanes" que dicen tener la solución a todas las enfermedades en un frasco de cápsulas "milagrosas".

#### CÓMO ACTÚAN ALGUNOS ANTIOXIDANTES AL INTERACCIONAR CON LAS MACROMOLÉCULAS

El antioxidante al colisionar con el RL le cede un e<sup>-</sup> oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico y que en algunos casos, como la vitamina E, puede generarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Obviamente, no todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL.

De las numerosas clasificaciones que existen de antioxidantes, se recomienda adoptar la que los divide en endógenos, los que son sintetizados por la célula y exógenos o antioxidantes que ingresan a través de los alimentos (13, 18).

Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios. Por ejemplo, la vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos; también neutraliza y captura el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, captura RL hidroxilos y neutraliza peróxidos. La vitamina C neutraliza el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, captura radicales hidroxilos, anión hiperóxidos y regenera la forma oxidada de vitamina E. Por último, el betacaroteno neutraliza el O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Ahora bien, independientemente de que cada antioxidante, tiene su forma muy particular de interaccionar con las moléculas oxidadas, es necesaria la incorporación al organismo de ciertos oligoelementos como el cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mg), Zn y Se, pues forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes (13).

Por otra parte, entre otros antioxidantes no enzimáticos (a los cuales se les denominan barredores [scavengers] de RL), se encuentran algunos aminoácidos como glicina, taurina y el tripéptido glutatión. En condiciones fisiológicas, estos mecanismos de defensa mantienen baja concentración de RL en la célula, a la vez que mantienen una actividad

muy precisa y regulada; de aquí que el equilibrio entre la producción de ER y las defensas antioxidantes determina el grado de EOx.

A manera muy general los antioxidantes pueden actuar de las siguientes formas:

- Al disminuir la concentración de oxidantes.
- Al evitar la iniciación de la reacción en cadena al barrer (cubrir o detener una reactividad química elevada) a los primeros RL que se forman.
- Al unirse a iones metálicos para evitar la formación de ER.
- Al transformar los peróxidos en productos menos reactivos.
- Al detener la propagación y el aumento de RL.

Por último, no se debe olvidar que los sistemas antioxidantes trabajan en forma coordinada en una serie de pasos metabólicos, por ejemplo en los sistemas enzimáticos el O<sub>2</sub><sup>-</sup> al ser metabolizado por la SOD produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este a su vez se metaboliza hasta agua y oxígeno por la CAT o la GPx, que actúa en forma acoplada con la glutatión reductasa. Lamentablemente, se ha demostrado que estos sistemas antioxidantes disminuyen con la edad, en ciertos procesos patológicos y bajo condiciones ambientales como la contaminación atmosférica (15).

Evidentemente, nunca antes hubo una generación en el planeta sujeta a este fenómeno de oxidación que la presente. Los seres humanos están literalmente bajo ataque, proveniente del medio ambiente contaminado, estilos de vida estresantes y una sociedad sobremedicada. Estas condiciones privan a los seres humanos de su condición más preciada, "la salud". Y a pesar de que el organismo cuenta con sus propios sistemas de defensa, los cuales son capaces de neutralizar los RL, hoy en día estos no son suficientes para contrarrestar el daño, por eso es que se necesitan de "aliados" adicionales y estos pueden ser los antioxidantes. La mayoría de éstos, provienen de los vegetales y de las frutas. Sin embargo, se debe tener presente de que en la actualidad, esto crea una brecha protectora, ya que los alimentos que se consumen, lamentablemente, contienen bajo contenido de antioxidantes y minerales, como resultado del agotamiento de minerales en el suelo, de la cosecha acelerada de los productos sin madurar, almacenamiento refrigerado, comidas altamente procesadas y a que la preparación de la comida es deficiente. Por lo tanto, durante el tiempo en que el organismo se encuentra expuesto a las condiciones desfavorables del medio ambiente que rodea a los seres vivos, sus sistemas de defensa naturales están abrumados y agotados. Por ello, es recomendable que se haga todo lo que esté al alcance para reconstruir los sistemas de defensa, al aprender cómo la alimentación completa y balanceada con dosis adecuadas de antioxidantes y suplementos de alta calidad podría ser la mejor esperanza para contrarrestar el efecto tóxico y genotóxico que los RL producen al organismo, ya que de no prestar la debida atención a este problema y exponer de forma prolongada a las células al daño que provoca el EOx, es por de más seguro que el individuo desarrollará una enfermedad crónico-degenerativa (46, 64).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. en C. Guillermo Zúñiga González y a la M. en C. Evelia Martínez Cano, por sus valiosos comentarios y sugerencias para la escritura de este documento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LeRoit D, Taylor SI, Olefssky JM. Diabetes Mellitus. Texto básico y clínico. 2<sup>a</sup> ed. Ed. Mc-Graw Hill, Interamericana. México, D.F. 2003: 1331 pág.
2. www.cica.es/aliens/samfyc/introduc.htm 2005.
3. www.sobrentrenamiento.com/PubliCE/articulo.asp?Ida=558&ctp=s 2005.
4. Taylor SI. Diabetes mellitus. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. 7<sup>th</sup> ed. Ed. McGrawHill, USA. 1995: 843 pág.
5. Khan A, Lasker SS, Chowdhury TA. Are spouses of patients with type 2 diabetes at increased risk of developing diabetes? *Diabetes Care*, 2003;26:710-712.
6. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull*, 1993;49:642-652.
7. www.entornomedico.org/noticias/print.php?sid=2077 2005.
8. Benjamin SM, Valdez R, Geiss LS, Rolka DB, Narayan KM. Estimated number of adults with prediabetes in the US in 2000: Opportunities for prevention. *Diabetes Care*, 2003;26:645-649.
9. Pavia C, Ferrer I, Valls C, Artuch R, Colomé C, Vilaseca MA. Total homocysteine in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2000;23:84-87.
10. Jara Albarrán A. Endocrinología. Ed. Médica Panamericana; Madrid, España. 2001: 920 pág.
11. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat Res*, 1999;428:17-22.
12. Rodríguez Capote K, Céspedes Miranda E. Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed*, 1999;18:67-76.
13. Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit*, 2001;30:36-44.
14. Liu Y, Guterman DD. Oxidative stress and potassium channel function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2002;29:305-311.
15. Dorado Martínez C, Rugerio Vargas C, Rivas Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*, 2003;46:229-235.
16. Irie M, Asami S, Ikeda M, Kassai H. Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003;311:1014-1018.
17. Pitzozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Rotella CM, Dolara P. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leucocytes. *Mutat Res*, 2003;529:129-133.
18. Sánchez-Rodríguez M, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Nuñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica*, 2004;29:81-90.
19. Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A, Mostafalou S, Zamani MJ, Larijani B, Abdollahi M. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients. *Arch Med Res*, 2005;36:376-381.
20. www.neogym-online.com/nutest.htm 2005.
21. www.labnutricion.cl/estres.htm 2005.
22. www.efdeportes.com/efd66/oxid.htm 2005.
23. Batista-González C, Corona-Rivera JR, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Ramos-Ibarra ML, Zúñiga-González G. Micronucleated erythrocytes in preterm newborns in relation to maternal pathology. *Rev Biomed*, 2006;17:(en prensa).
24. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*, 1975;31:9-15.
25. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia*, 2001;44:834-838.
26. Šardaš S, Yilmaz M, Öztok U, Çakir N, Karakaya AE. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat Res*, 2001;490:123-129.
27. El-Missiry MA, Othman AI, Amer MA. L-Arginine ameliorates oxidative stress in alloxan-induced experimental diabetes mellitus. *J Appl Toxicol*, 2004;24:93-97.
28. Hunter-Lavin C, Hudson PR, Mukherjee S, Davies GK, Williams CP, Harvey JN, Child DF, Williams JH. Folate supplementation reduces serum hsp70 levels in patients with type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones*, 2004;9:344-349.
29. Davi G, Falco A, Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*, 2005;7:256-268.
30. Gunes A, Ceylan A, Sarioglu Y, Stefek M, Bauer V, Karasu C. The Antioxidants in Diabetes-induced Complications (ADIC) Study Group. Reactive oxygen species mediate abnormal contractile response to sympathetic nerve stimulation and noradrenaline in the vas deferens of chronically diabetic rats: effects of in vivo treatment with antioxidants. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005;19:73-79.
31. Kalogerakis G, Baker AM, Christov S, Rowley KG, Dwyer K, Winterburn C, Best JD, Jenkins AJ. Oxidative stress and high -density lipoprotein function in type 1 diabetes and end-stage renal disease. *Clin Sci. (Lond)* 2005;108:497-506.
32. Okutan H, Ozcelik N, Yilmaz HR, Uz E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem*, 2005;38:191-196.
33. www.fuedin.org/info congresos/04\_02/congreso.htm 2006.
34. Sakamaki H, Akazawa S, Ishibashi M, Izumino K, Takino H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Goto S, Urata Y, Kondo T, Nagataki S. Significance of glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes*, 1999;48:1138-1144.
35. Schraufstatter IU, Hyslop PA, Hinshaw DB, Spragg RG, Sklar LA, Cochrane CG. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986;83:4908-4912.
36. Lafleur MV, Retel J. Contrasting effects of SH-compounds on oxidative DNA damage: repair and increase of damage. *Mutat Res*, 1993;295:1-10.
37. Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis*, 1997;18:1359-1363.
38. Migliore L, Bevilacqua C, Scarpato R. Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients. *Mutagenesis*, 1999;14:227-31.
39. Ortiz GG, Reiter RJ, Zúñiga G, Melchiorri D, Sewerynek E, Pablos MI, Oh ChS, García JJ, Bitzer-Quintero OK. Genotoxicity of paraquat: micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. *Mutat Res*, 2000;464:239-245.
40. Ramos-Remus C, Dorazco-Barragan G, Aceves-Avila FJ, Alcaraz-Lopez F, Fuentes-Ramirez F, Michel-Diaz J, Torres-Bugarin O, Ventura-Aguilar A, Zúñiga-Gonzalez G. Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*, 2002;20:208-212.
41. Torres-Bugarin O, Ventura-Aguilar A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Morga-Villela G, Gutierrez-Franco A, Zúñiga-González G. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res*, 2004;565:91-101.
42. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 1991;40:405-412.
43. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, 1996;347:444-445.
44. Julie K, Mackness MI, Dean JD, Durrington PN. Susceptibility of low- and high-density lipoproteins from diabetic subjects to in vitro oxidative modification. *Diabet Med*, 1999;16:415-423.
45. Gutierrez Maydata A. Estrés oxidativo en la gestación: ¿una nueva óptica en la atención a la embarazada? *Rev Cubana Obstet Ginecol*, 2005;31:1-9.
46. Lash LH, Hagen TM, Jones DP. Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986;83:4641-4645.
47. Mukherjee A, Agarwal K, Aguilar MA, Sharma A. Anticlastogenic activity of beta-carotene against cyclophosphamide in mice in vivo. *Mutat Res*, 1991;263:41-46.
48. Arroyo PL, Hatch-Pigott V, Mower HF, Cooney RV. Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants. *Mutat Res*, 1992;281:193-202.
49. Sai K, Hayashi M, Takagi A, Hasegawa R, Sofuni T, Kurokawa Y. Effects of antioxidants on induction of micronuclei in rat peripheral blood reticulocytes by potassium bromate. *Mutat Res*, 1992;269:113-118.
50. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*, 1994;55:271-276.
51. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci*, 1995;56:83-89.

52. Panda BB, Subhadra AV, Panda KK. Prophylaxis of antioxidants against the genotoxicity of methyl mercuric chloride and maleic hydrazide in Allium micronucleus assay. *Mutat Res*, 1995;343:75-84.
53. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Leal BZ, Meltz ML. Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human blood lymphocytes. *Mutat Res*, 1996;351:187-192.
54. Rodríguez-Moran M, Guerrero-Romero JF, Parra-Quezada M, Segura-Pineda MJ, Levario-Carrillo M, Sotelo-Ham EI. Deficiencia de folatos y su asociación con defectos del cierre del tubo neural en el norte de México. *Salud Pública de Mex*, 1998;40:474-480.
55. Tang L, Reiter RJ, Li ZR, Ortiz GG, Yu BP, Garcia JJ. Melatonin reduces the increase in 8-hydroxy-deoxyguanosine levels in the brain and liver of kainic acid-treated rats. *Mol Cell Biochem*, 1998;178:299-303.
56. Vijayalaxmi KK, Venu R. In vivo anticalastogenic effects of L-ascorbic acid in mice. *Mutat Res*, 1999;438:47-51.
57. Rivas F, Dávalos IP, Olivares N, Dávalos NO, Pérez-Medina R, Gómez-Partida G, Chakraborty R. Reproductive history in mothers of children with neural tube defects. *Gynecol Obstet Invest*, 2000;49:255-260.
58. Martínez-de Villarreal LE, Limón-Benavides C, Valdez-Leal R, Sánchez-Peña MA, Villarreal-Pérez JZ. Efecto de la administración semanal de ácido fólico sobre los valores sanguíneos. *Salud Pública de Mex*, 2001;43:103-107.
59. Shahin AA, Ismail MM, Saleh AM, Moustafa HA, Aboul-Ella AA, Gabr HM. Protective effect of folic acid an low-dose methotrexate genotoxicity. *Z Rheumatol*, 2001;60:63-68.
60. Gómez-Meda BC, Zúñiga-González GM, Zamora-Pérez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Torres-Mendoza BM. Folate supplementation of cyclophosphamide-treated mothers diminishes micronucleated erythrocytes in peripheral blood of newborn rats. *Environ Mol Mutagen*, 2004;44:174-178.
61. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Ronnemaa T. Elevated plasma homocysteine level is an independent predictor of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, 2004;140:94-100.
62. [www.nacersano.org/centro/9388\\_9907.asp](http://www.nacersano.org/centro/9388_9907.asp) 2005.
63. [www.well-connected.com/rreports/doc42S.html](http://www.well-connected.com/rreports/doc42S.html) 2005.
64. [www.saludymedicinas.com.mx/articulo2.asp?id=1032&cbann=articulodehome&posicion=posicion2](http://www.saludymedicinas.com.mx/articulo2.asp?id=1032&cbann=articulodehome&posicion=posicion2) 2005.

**MARÍA LUISA RAMOS IBARRA<sup>1</sup>**  
**CECILIA MARGARITA BATISTA GONZÁLEZ<sup>1</sup>**  
**BELINDA CLAUDIA GÓMEZ MEDA<sup>2</sup>**  
**ANA LOURDES ZAMORA PÉREZ<sup>2</sup>**

<sup>1,2</sup> Maestra en Ciencias. Laboratorio de Mutagénesis, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara – Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>2</sup> Dra. en Ciencias. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara – Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Guadalajara, Jalisco, México.

#### CORRESPONDENCIA

M. en C. María Luisa Ramos Ibarra  
 Centro de Investigación Biomédica de Occidente  
 Sierra Mojada 800, Colonia Independencia.  
 Guadalajara, Jalisco, México. C.P. 44340  
 Tel: (33) 36-68-3000, ext. 31937. Fax: (33) 36-18-1756  
[mutagenesis95@hotmail.com](mailto:mutagenesis95@hotmail.com)

#### CONFLICTO DE INTERÉS NO DECLARADO



Carlos Larracilla/Cisne