



FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DOBLE CIEGO, RAMDOMIZADO Y
CONTROLADO SOBRE LA SEGURIDAD Y EFICACIA
DE LA INGESTA DE PRODUCTOS CÁRNICOS CON
ANTIOXIDANTES NATURALES Y ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS EN NIÑOS CON DIABETES
MELLITUS TIPO 1**

Dr. Julio Guerrero Fernández
Madrid 2010

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, ESENCIALMENTE.

Al **Dr. Gracia Bouthelier**, de quién nunca se podrá dejar de aprender; es un saco sin fondo de sabiduría.

A mis apreciadas **Dra. González Casado** y enfermera **M^a Angeles Cardiel**, referentes fundamentales en mi formación diabetológica y sobre la vida en general.

Al **Dr. Oliver**, una gran persona y un excelente profesional a quien le debo muchas cosas... su humildad le hará preguntarse qué.

A mis compañeros jóvenes de trabajo, el **Dr. Luis Salamanca** y la **Dra. Ana Coral Barreda**, que me han apoyado incondicionalmente y a los que necesitaré siempre a mi lado. No seré ni la mitad en su ausencia.

Al resto del equipo, la **Dra. Molina**, las enfermeras, incansables y dispuestas a todo, **Viki, Susana** y **Bene**, las auxiliares **Fátima** y **M^a Angeles**, y las secretarias, de paciencia infinita, **Merche, M^a José, Almudena...**

A **Elena Ibañez**, científica incansable del CSIC y generosa hasta lo indecible.

A otras personas que marcaron mi vida y de referencia obligada, pues sin ellas el curso de mi historia vital hubiese sido otro y este trabajo trataría de otra cosa: mi familia segedana, Marta García Ascaso < > M^a Victoria Guiote... ups!

INDICE

I. INFORMACIÓN GENERAL	5
1. INTRODUCCION	5
2. ANTECEDENTES	6
<i>2.1 Estrés oxidativo en Diabetes Mellitus</i>	<i>6</i>
<i>2.2 Lípidos en la dieta de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1</i>	<i>17</i>
<i>2.3 Alimentos funcionales</i>	<i>21</i>
3. ENSAYOS CLÍNICOS RELEVANTES CON PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1	29
II. JUSTIFICATIVA	31
III. OBJETIVOS	32
1. OBJETIVO PRINCIPAL	32
2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	32
IV. PLAN DE INVESTIGACIÓN	33
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	33
2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO	33
<i>2.1 Criterios de selección</i>	<i>33</i>
3. TRATAMIENTOS	33
4. PROGRAMA DE VISITAS Y VALORACIONES	35
V. PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGIA	37
1. VARIABLES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO (DATOS):	37
2. GESTIÓN DE LOS DATOS	39
<i>2.1. Recogida de datos</i>	<i>39</i>
<i>2.2. Gestión de datos y control de calidad</i>	<i>39</i>
<i>2.3. Tratamiento estadístico de los datos y programas utilizados</i>	<i>40</i>
<i>2.4. Divulgación y confidencialidad</i>	<i>40</i>
3. ASPECTOS ÉTICOS	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	42
1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	42
2. REGISTRO DE DATOS Y ACONTECIMIENTOS QUE PUEDEN INTERFERIR EN LA EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	43
3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA	46
VII. CONCLUSIONES	93
VIII. BIBLIOGRAFÍA	94
ANEXOS	107

PRODUCTOS DEL ESTUDIO CLÍNICO	108
REGISTRO DE CONSUMO DEL PRODUCTO (DIARIO).....	110
INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE Y CONSENTIMIENTO	111
ESPECIFICACIONES DEL CALIPER	115
FORMULARIO DE REGISTRO ALIMENTARIO	116
PROTOCOLOS ANALITICOS DEL PERFIL OXIDATIVO	118
ANÁLISIS DE PERCEPCIÓN SENSORIAL DEL PRODUCTO CONSUMIDO	127
CUESTIONARIO DE TOLERANCIA AL TRATAMIENTO	128

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. INTRODUCCION

Uno de los aspectos más importantes de la investigación actual en el campo de los denominados alimentos funcionales es demostrar la actividad terapéutica real de dichos alimentos y el beneficio para la salud que puede suponer su consumo como parte de la dieta.

Es bien conocido que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la Diabetes Mellitus, así como en sus complicaciones asociadas, habiéndose demostrado un incremento en la concentración de especies reactivas (oxidantes) y una disminución de la capacidad antioxidante en comparación con la población normal. También se conocen bien los cambios del perfil lipídico que sufren estos pacientes y el riesgo cardiovascular que dichos cambios conllevan. Como veremos más adelante, ambas situaciones se encuentran interrelacionadas y sobre ellas se puede intervenir.

Centrándonos en dos de los productos que más efecto pueden tener sobre este tipo de enfermedades, el extracto de romero y los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) $\omega 3$, son numerosos los estudios que demuestran su efectividad. Respecto al extracto de romero, nos consta que hasta el momento se han realizado ensayos *in vivo* dirigidos hacia el estudio de la inhibición de la tumorigénesis y efectos sobre la disminución de la peroxidación lipídica inducida por radicales libres en el organismo, con resultados esperanzadores (1-10).

Basándonos en esta hipótesis de partida, consideramos adecuado plantear la evaluación del potencial terapéutico de productos cárnicos enriquecidos con extractos de romero (concentrados en diterpenos fenólicos como ácido carnósico) y PUFAs omega-3¹, mediante un ensayo clínico en pacientes preadolescentes con diabetes mellitus tipo 1.

¹ Los productos cárnicos objeto de este ensayo clínico han sido diseñados por el grupo de Investigación de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Madrid. Registro Sanitario 10.05771/M.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estrés oxidativo en Diabetes Mellitus

En los últimos tiempos se han ido acumulando cada vez más evidencias de que los radicales libres que se originan cuando la concentración de glucosa en el medio es elevada, cumplen un papel muy significativo en el desarrollo de la diabetes y de sus complicaciones asociadas (11-13). También se ha observado un descenso en la capacidad antioxidante total del plasma de pacientes diabéticos (14-20). Ambos hechos permiten afirmar que existe un incremento del estrés oxidativo en ellos (21) (Figura 1). Este área de investigación, tanto clínico como experimental, ha crecido de forma exponencial, aumentando el número de publicaciones desde 500 entre 1970-75 hasta 3000 entre 1995-2000.

El estrés oxidativo que supone complicaciones, fundamentalmente polineuropatías y complicaciones cardiovasculares, ha sido extensamente revisado por Rösen et al.(21) a partir de multitud de estudios clínicos que muestran aumentos en los niveles de marcadores de estrés oxidativo como, por ejemplo, los hidroperóxidos, 8-isoPGF2 α , 8-OHdG y LDL oxidadas en diabéticos tipo 1 (DM1) y tipo 2 cuando se comparan con controles sanos de edad similar (15,

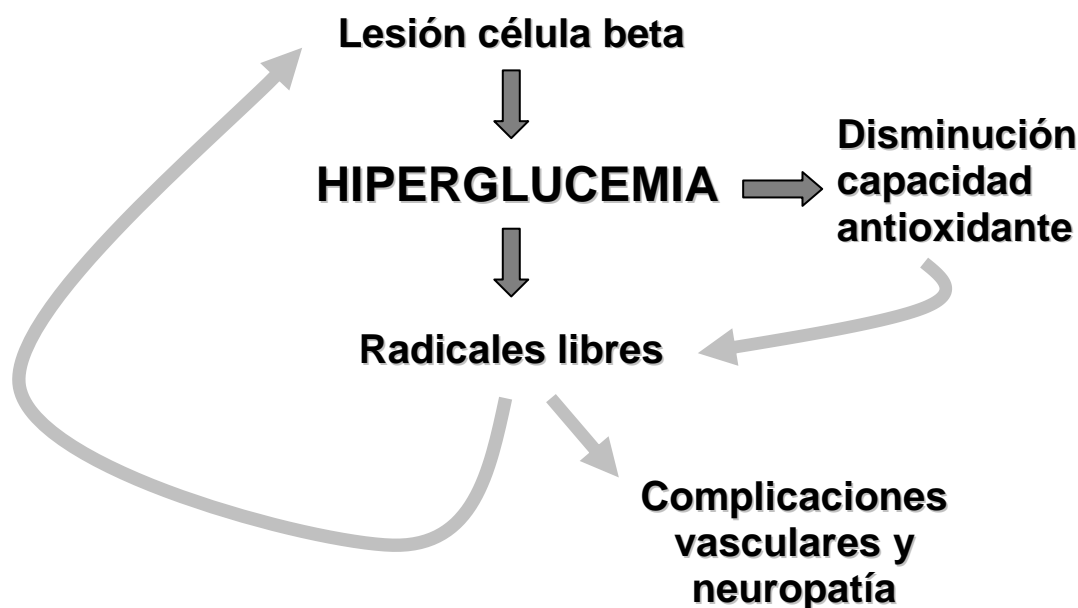


Figura 1

22-33).

Generalidades. Los radicales libres y los mecanismos antioxidantes

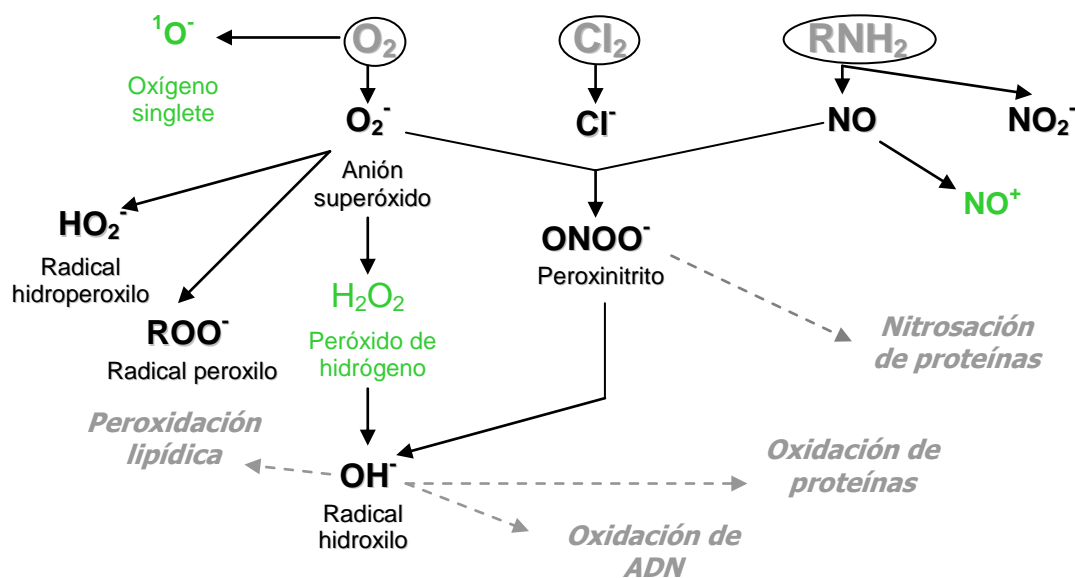
No es objeto de este trabajo detallar la patogénesis general de la formación de los radicales libres, de los efectos perjudiciales que éstos generan en el organismo, así como tampoco de los mecanismos que los anulan, aunque si conviene recordar unas nociones básicas que permitirán proseguir en el entendimiento de los mecanismos patogénicos del estrés oxidativo en la Diabetes Mellitus.

El término genérico más correcto que debe emplearse para designar a aquellas especies químicas con capacidad de interactuar, directa o indirectamente, con otras moléculas alterándolas es el de *especies reactivas*. Éstas, a su vez, se denominan *radicales libres* si presentan un electrón desapareado que las hacen extremadamente inestables y las obliga, para llegar a su estabilidad, a interaccionar directamente con otras moléculas; e *intermediarios no radicales* si precisan de mecanismos (enzimáticos o no) para ejercer el efecto lesivo, esto es, convertirse en radicales libres propiamente dichos (34). La Tabla 1 clasifica las especies reactivas en 3 grupos según el átomo de origen: oxígeno, nitrógeno o cloro.

Tabla 1. Especies reactivas. Clasificación.

Radicales libres	No radicales (intermediarios)
<i>Especies reactivas derivadas del oxígeno</i>	
Superóxido, O_2^-	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^-	Ácido hidrocloroso, $HOCl$
Peroxilo, RO_2^-	Ácido hidrobromoso, $HOBr$
Alcoxilo, RO^-	Ozono, O_3
Hidroperoxilo, HO_2^-	Oxígeno singlete, O
<i>Especies reactivas derivadas del nitrógeno</i>	
Monóxido de nitrógeno, NO	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de nitrógeno, NO_2^-	Cation nitroso, NO^+
	Anión nitroso, NO^-
	Tetraóxido de dinitrógeno, N_2O_4
	Trióxido de dinitrógeno, N_2O_3
	Peroxinitrito, $ONOO^-$
	Ácido peroxinitroso, $ONOOH$
	Cation nitrilo, NO_2^+
<i>Especies reactivas derivadas del cloro</i>	
Cloro atómico, Cl	Ácido hipocloroso, $HOCl$
	Cloro, Cl_2
	Cloruro de nitrilo, NO_2Cl

Los radicales libres más frecuentemente generados en organismos aeróbicos son el radical superóxido (O_2^-), el ión hidroxilo (OH^-), el peroxilo (RO_2^-) y el monóxido de nitrógeno (NO) (34, 35). Su génesis resulta inevitable a partir de las infinitas reacciones químicas que acontecen en el organismo vivo y cuya secuencia final puede verse resumida en la Figura 2.

**Figura 2**

El daño generado por estas especies químicas deriva de su interacción con proteínas (oxidación y nitrosación), ácidos nucleicos (oxidación de guanina y adenina, fundamentalmente) y lípidos (peroxidación lipídica). El daño proteico consiste en cambios estructurales y, por tanto, funcionales, con consecuencias tremendamente variadas habida cuenta de la gran diversidad de proteínas y, por ende, de las funciones que éstas ejercen; por su parte, el daño sobre el ADN es responsable de mutaciones generadoras de apoptosis (envejecimiento) y tumorigénesis; finalmente, la peroxidación lipídica va a ser causa, principalmente, de ateromatosis (patología cardiovascular) al alterarse el equilibrio entre factores anti y proinflamatorios (34-37). Cabe decir que, aunque considerados como dañinos, los radicales libres resultan esenciales cuando el objetivo de su producción es neutralizar la acción de ciertos microorganismos (virus y bacterias)

a partir de reacciones químicas que tienen lugar, fundamentalmente, en neutrófilos y macrófagos (34).

Por todo lo anterior, se requieren de **mecanismos antioxidantes** que protejan de la acción lesiva de los radicales libres. Tales mecanismos se pueden clasificar en dos grandes grupos, los enzimáticos y los no enzimáticos (antioxidantes primarios) (Tabla 2) (34).

Tabla 2. Mecanismos antioxidantes más importantes.

1. Mecanismos enzimáticos:

- 1.1 Superóxido Dismutasa (SOD)
- 1.2 Catalasa
- 1.3 Glutathion peroxidasa
- 1.4 Glutathion reductasa

2. Antioxidantes primarios:

- 2.1 Vitamina E dextro (RRR- α -tocoferol)
- 2.2 Vitamina C
- 2.3 Glutathion reducido
- 2.4 Ácido α -lipoico
- 2.5 Otros: ácido úrico, albúmina, bilirrubina, haptoglobina, β -caroteno, etc.

La Figura 3, Figura 4 y Figura 5 muestran el lugar de acción de los tres principales mecanismos enzimáticos:

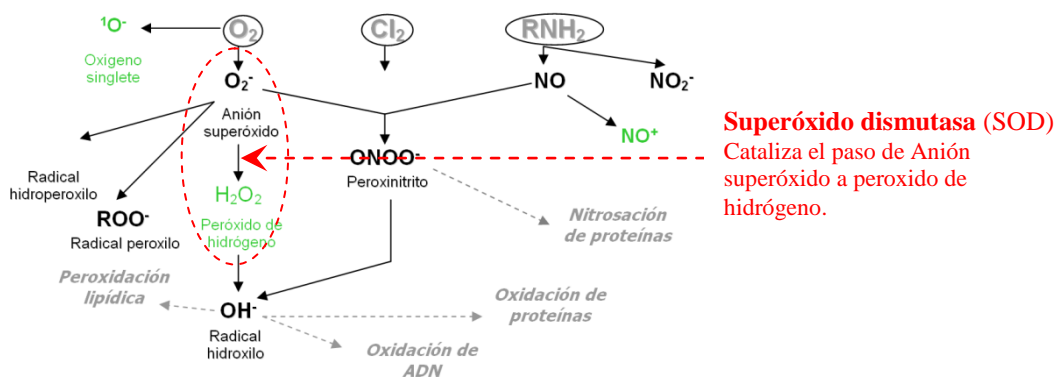


Figura 3

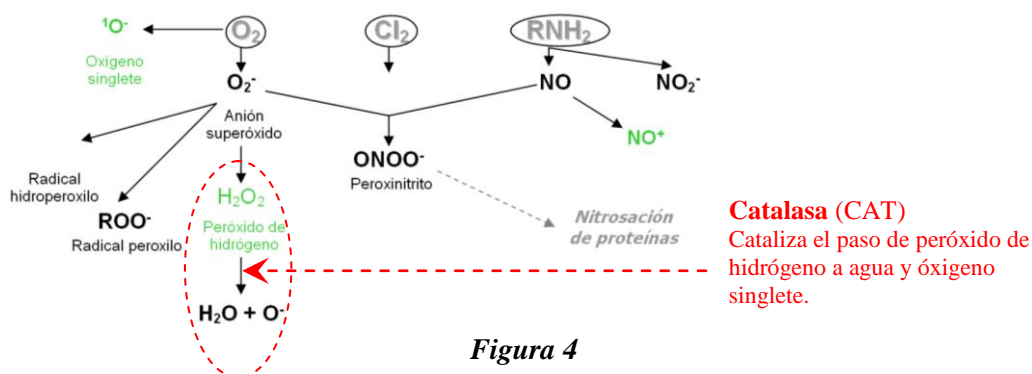


Figura 4

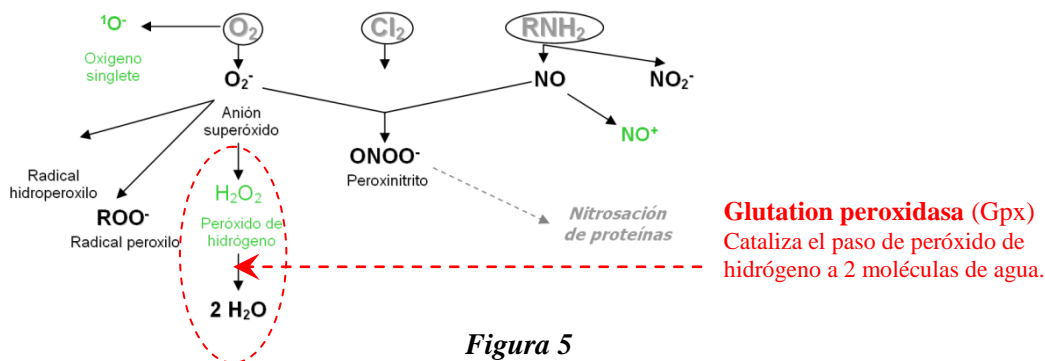


Figura 5

En lo que respecta a los antioxidantes primarios, los de mayor importancia y mejor conocidos son la forma dextro de la Vitamina E (RRR- α -tocoferol), la vitamina C, el glutatión reducido y el ácido α -lipoico. Todos ellos actúan en cascada sin mediación enzimática salvo la del paso a glutatión oxidado (glutatión reductasa) y según se muestra en la Figura 6 (34).

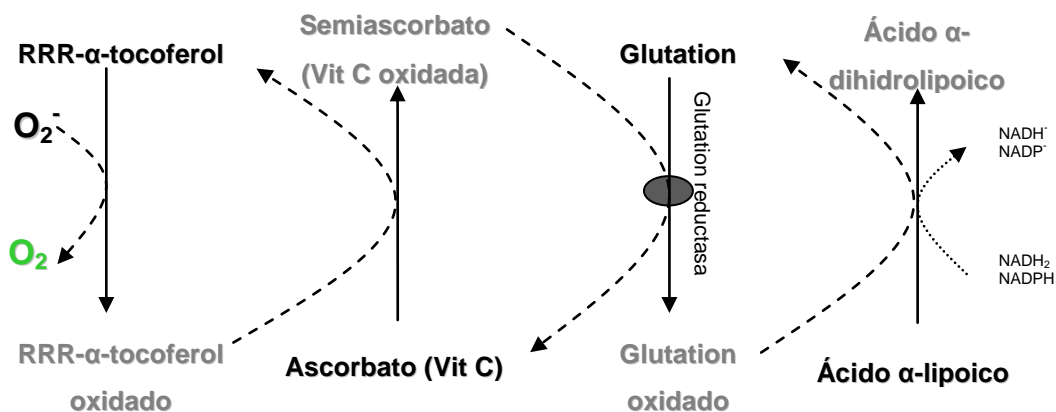


Figura 6

Cuando en este delicado equilibrio entre la tasa de generación de radicales libres y la efectividad de los mecanismos antioxidantes, hay predominio de los primeros, se habla de **estrés oxidativo**, situación que predice mayor tasa de morbilidad (34-37).

Por último, dada la tendencia de estas especies químicas a reaccionar rápidamente y a ser degradadas por mecanismos antioxidantes, su existencia es efímera lo que las hace muy difícilmente detectables por los métodos habituales, requiriéndose, por tanto, de la detección de las moléculas que han sido objeto de su ataque o de intermediarias. De igual forma, es posible detectar la capacidad antioxidante del plasma a través del examen de aquellas sustancias implicadas directa o indirectamente en dicho proceso (34, 37).

¿Cómo se cuantifican ambas situaciones, esto es, el grado de estrés oxidativo? La Tabla 3 resume las moléculas y las técnicas más utilizadas a tales efectos en la actualidad (37).

Tabla 3. Cuantificación del estrés oxidativo y la capacidad antioxidante.

Estrés Oxidativo	
Daño lipídico (peroxidación lipídica)	
Malondialdehído mediante Tbars	El ácido tiobarbitúrico (Tbars) se utiliza como reactante para la medición de malondialdehído, a su vez, un compuesto altamente reactivo que deriva de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados cuando reaccionan con radicales libres del oxígeno. El malondialdehído reacciona con la desoxiguanosina y la desoadenosina incrementando el riesgo mutagénico.
8-isoprostanos en orina	Los isoprostanos son compuestos similares a las prostaglandinas que se sintetizan a partir del ácido araquidónico como consecuencia de la peroxidación lipídica pero de forma

	espontánea por efecto de los radicales libres y sin mediación de la ciclooxigenasa.
Daño proteico	
Proteínas oxidadas	La oxidación de una proteína puede ser por: - <i>Carbonilación</i> : unión de un carbono con radicales del oxígeno (sobre todo OH-), fundamentalmente prolina, arginina y lisina. Es el más frecuente e irreversible. El método analítico tiene por objeto determinar aldehídos y cetonas. - Otros: la nitración, la formación de enlaces proteína-proteína, la glutatiónización, etc.
LDL oxidada	La medición directa de LDL oxidada en suero o plasma no es factible al ser rápidamente neutralizada por autoanticuerpos. Métodos basados en este hecho tienen por objeto determinar el inmunocomplejo circulante (autoanticuerpo-LDL oxidada) y, más que cuantificar estrés oxidativo, sus niveles parecen estar más en relación con el riesgo cardiovascular.
Daño de ADN	
8-hidroxideoxiguanosina (8OHdG)	Medido en orina mediante ELISA, representa uno de los marcadores más utilizados para medir estrés oxidativo y daño de ADN. Sus niveles elevados parecen incrementar el riesgo para padecer cáncer, aterosclerosis y diabetes. Además, en pacientes con diabetes, se ha correlacionado muy bien con el grado de severidad de la nefropatía y la retinopatía diabética.
8-hidroxiadenina	Marcador de status oxidativo y daño de ADN que se eleva más específicamente en pacientes con demencia.
Otros	7-metil-hidroxi-guanina, 8-oxoguanina, etc.
Capacidad antioxidante	
Vitamina E (RRR- α -tocoferol)	Requiere medirse mediante el cociente vitamina E/lípidos totales ya que sus niveles aislados dependen de estos últimos.
Glutación reducido	Tripéptido intracelular cuya determinación requiere métodos que provoquen la citólisis y el empleo de fluorescencia.
Estudio enzimático	De la actividad de la SOD, catalasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa en eritrocitos.
Capacidad antioxidante del plasma	Método que determina de un modo muy genérico la capacidad antioxidante del plasma al mezclarse éste con una solución oxidante y midiéndose posteriormente indirectamente el grado de oxidación residual en el plasma.
Otros (inespecíficos)	Ácido úrico, albúmina, bilirrubina, haptoglobina, β -caroteno, etc

Mecanismos patogénicos del estrés oxidativo en la Diabetes Mellitus y sus complicaciones.

Los mecanismos moleculares propuestos para explicar los daños causados por la hiperglucemia crónica son variados y dependen, en gran medida, de los órganos y tejidos que se analicen. Hasta el momento se han descrito cuatro: acumulación de productos de glicosilación avanzada (PGA; del inglés AGE: Advanced Glycation End-Products), activación de la vía del sorbitol, activación de la vía de las hexosaminas y activación de diversas vías mediadas por las proteínas quinasas C (PKC)(38)

Múltiples han sido los resultados publicados que avalan la relación entre la hiperglucemia y el estrés oxidativo. Baste solo citar algunos ejemplos:

Una investigación con 2296 personas adultas realizada en EEUU asoció las elevadas concentraciones de glucosa sanguínea a valores disminuidos de glutatión reducido y niveles elevados de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Tbars), si bien, en presencia de una actividad elevada de la enzima glutatión peroxidasa (39). Otro estudio epidemiológico en personas adultas sin antecedentes de diabetes mellitus indicó una relación inversa entre la concentración de glucosa sanguínea y la concentración de vitamina E plasmática tras ajustarse el análisis por edad, sexo, hábito de fumar, ejercicio físico, entre otras variables relacionadas, con el estrés oxidativo (40).

La posible relación entre glucosa y estrés oxidativo también ha sido avalada por otros experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, la observada en un estudio con células beta pancreáticas expuesta durante 2 horas a elevadas concentraciones de glucosa que estimuló la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) detectada por la tinción del di-acetado-

2',7'-dichlorofluoresceína. También se pudo constatar una marcada disminución de los niveles de alfa tocoferol en las membranas de estas células (41).

Un resultado similar al anterior se observó en células mononucleares y polimorfonucleares de personas sometidas a la ingestión de 75 g de glucosa, ya que mostraron una elevada producción de especies reactivas de oxígeno con un máximo a las 2 horas tras la sobrecarga, correlacionado con una disminución significativa de los niveles de alfa tocoferol en sus membranas (42). Lo anterior parece deberse a una inhibición de la unión de este compuesto a este tipo de células, lo que pudiera estar asociado a un desbalance redox intracelular que conduce a peroxidación lipídica ante concentraciones de glucosa superiores a los 300 mg/dL (43).

Otro estudio en células endoteliales de la vena umbilical expuestas a elevadas concentraciones de glucosa durante 2 semanas mostró una inducción en la expresión de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) a partir del séptimo día de tratamiento (44). Una investigación similar fue realizada en fibroblastos humanos expuestos a concentraciones de glucosa de 90 y 400 mg/dL durante 12 semanas. En este caso se demostró que los fibroblastos de los pacientes diabéticos con nefropatía presentaban una afectación en la expresión de estas enzimas antioxidantes, no así los pacientes diabéticos sin nefropatía o aquellos no diabéticos con afectación renal (45).

Clapés S et al. realizaron una investigación con niños y adolescentes diabéticos tipo 1 objetivando que éstos poseían mayores concentraciones de proteínas oxidadas y menores de glutatión reducido y de la actividad de las enzimas CAT y SOD que los niños del grupo control. Además, se obtuvo una correlación negativa significativa entre las concentraciones de malondialdehído (mediante Tbars) y las de glutatión reducido, y entre las concentraciones de grupos carbonilos (proteínas oxidadas) y actividad de la SOD (46).

Una publicación posterior realizada por otros autores mostró que los niveles de alfa tocoferol y de coenzima Q 10 en las membranas de los eritrocitos de niños y jóvenes diabéticos tipo 1 estaban elevados a pesar de los altos valores de glucemia (47). No obstante, tal contradicción con los resultados expuestos en párrafos anteriores parece perderse cuando se sabe que los eritrocitos humanos poseen en sus membranas un sistema de naturaleza proteica capaz de unir alfa tocoferol, incluso a elevadas concentraciones de glucosa (48).

Todo esto sugiere que una exposición a elevadas concentraciones de glucosa sanguínea puede generar un incremento de ERO, que reaccionan con los sistemas antioxidantes primarios del organismo (por ejemplo, alfa tocoferol y glutatión reducido; Tabla 2 y Figura 6) provocando una disminución en su concentración. Además, esto sugiere que las ERO generadas ante tal estímulo son capaces de inducir la síntesis de otras barreras defensivas como las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. No obstante, cuando la exposición a altas concentraciones de glucosa es mantenida durante mucho tiempo, como es el caso de los pacientes diabéticos, la situación parece cambiar. Esto pudiera deberse, como se ha expuesto en el apartado anterior, a que la hiperglucemia crónica mantiene también un estrés oxidativo crónico capaz de dañar múltiples moléculas de importancia biológica entre las que se pueden encontrar el ADN celular y las enzimas anteriormente señaladas.

Pero, ¿cómo se producen las ERO y, por tanto, este desbalance redox en el paciente diabético? Son 4 los mecanismos que se proponen para explicar los efectos tóxicos de la elevación en las concentraciones de glucosa sanguínea. Estos mecanismos, que se detallarán a continuación, pueden resumirse gráficamente en la Figura 11.

1. Productos de glicosilación avanzada (PGA) y estrés oxidativo. Los PGA son fundamentalmente el resultado de la reacción de la glucosa y otros monosacáridos con proteínas y aminoácidos. De este modo se producen moléculas modificadas química y biológicamente capaces de ocasionar graves daños al organismo (38, 49).

Un estudio en conejos de experimentación ha reportado una correlación positiva entre los niveles de LDL oxidada y los PGA, y entre malondialdehído (MDA) y los PGA, y correlación negativa entre GPx y los PGA, lo que parece estar relacionado con la formación de placas de aterosclerosis (50).

Desde hace más de una década se conoce que la glicosilación no enzimática de proteínas puede generar directamente la producción de anión superóxido (O_2^-), en cantidades suficientes como para desencadenar *in vitro* peroxidación lipídica (51).

Asimismo, el glioxal, especie derivada de la oxidación de la glucosa, de la degradación de proteínas glicosiladas y de la peroxidación lipídica, puede acelerar la formación de PGA. De este modo se ha observado *in vitro* que este compuesto puede generar citotoxicidad mediada por un incremento de la generación de ERO y disminución de glutatión reducido intracelular (52). La cantidad de esta molécula podría estar elevada bajo condiciones de hiperglucemia crónica.

Otro modo de incrementar la producción de ERO por los PGA es mediante su unión con receptores específicos denominados RAGE (por sus siglas en inglés: *receptor for advanced glycation end products*), lo que provoca diversos eventos intracelulares entre los que se encuentra la elevación en los niveles de ERO (53, 54). Lo anterior pudiera deberse a un aumento en la expresión de algunas citoquinas como la interleuquina 1 (IL-1), citoquina cuya expresión se eleva en macrófagos tratados con PGA. Esta molécula se ha propuesto como mediadora del daño oxidativo en el páncreas de pacientes que desarrollan diabetes mellitus tipo 1, estimulando la síntesis del óxido nítrico (NO^\cdot) (55). Como ya mostramos en la Figura 2, el NO^\cdot es una molécula radicalica capaz de reaccionar con el anión superóxido y generar otras especies reactivas altamente deletéreas para la célula.

Otra hipótesis sugiere que la glicosilación de proteínas puede ser la causa de la disminución que se observa en algunos casos de la actividad de las enzimas antioxidantes en plasma de los pacientes diabéticos (46). No obstante, en esta hipótesis queda por demostrar si la glicosilación de estas enzimas ocurre verdaderamente o está tamponada por otras proteínas que se encuentran en mucha mayor concentración en plasma.

En la Figura 7 se muestra resumida la secuencia que hemos descrito.

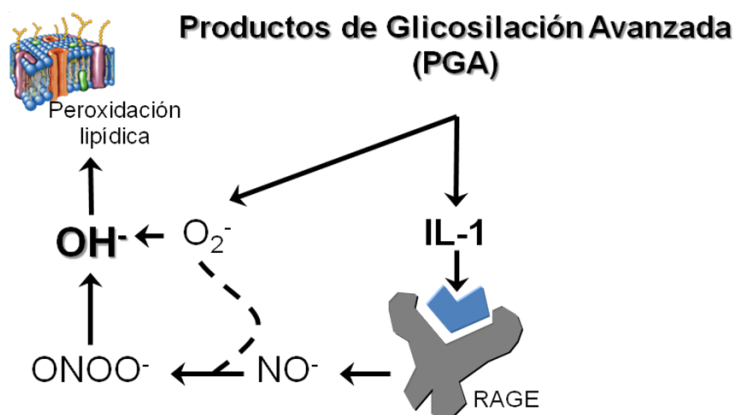


Figura 7

2. Activación de la vía del sorbitol y estrés oxidativo. La vía del sorbitol implica una secuencia de 2 reacciones en las que intervienen las enzimas aldosa reductasa (AR) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH), como se muestra a continuación (Figura 8).



Figura 8

Esta constituye una de las vías fundamentales en la degradación de la glucosa y tiene gran relevancia en aquellos tejidos que no requieren de la insulina para la captación de glucosa. Resulta de interés señalar, como es bien conocido, que estos tejidos (riñón, retina, cristalino y sistema nervioso) son en los que en mayor proporción se presentan las complicaciones crónicas en los individuos diabéticos.

Los mecanismos por los cuales esta vía puede causar daños a los tejidos de pacientes hiperglucémicos se basan fundamentalmente en las consideraciones siguientes: depleción del NADPH,H^+ intracelular, incremento de la concentración de fructosa y acumulación del sorbitol:

2.1 Efecto de la disminución en la concentración de NADPH,H^+ sobre el estrés oxidativo. Como se mostró en la secuencia de reacciones anteriores, una activación de la vía de los polioles ocasionaría una disminución en las concentraciones de NADPH,H^+ , importante molécula requerida para mantener el estado redox intracelular. El NADPH,H^+ es formado a partir del NADP^+ fundamentalmente en el ciclo de las pentosas fosforiladas, del que existen evidencias que indican una inhibición in vivo ante situaciones de hiperglucemia crónica (56).

Las enzimas antioxidantes CAT y glutatión reductasa (GRd, véase Figura 6) tienen como cofactor enzimático al NADPH,H^+ por lo que la disminución de este último provocaría también una inhibición de la actividad de estas proteínas. Esto a su vez produciría la caída en las concentraciones intracelulares de glutatión reducido y un aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y sus productos de oxidación. De este modo, la elevación en la expresión de las enzimas antioxidantes observada por algunos autores, se vería contrarrestada por una posible inhibición de su actividad.

2.2 Efectos de la acumulación del sorbitol: El sorbitol, como sustancia que atraviesa mal la membrana plasmática celular, se acumula intracelularmente provocando un efecto osmótico con entrada subsiguiente de agua y daño celular. Esto determina daño directo, y también probablemente indirecto por alteración del hematíe que pasa por capilares pequeños, de los órganos diana, fundamentalmente retina y riñón. Por otra parte, parece que el sorbitol inhibe la entrada de mioinositol, molécula necesaria para la conducción nerviosa (neuropatía periférica) (21).

2.3 Efectos de la acumulación de fructosa sobre el estrés oxidativo. La activación de la vía del sorbitol ocasiona una sobreproducción de fructosa intracelular, que puede entrar en la ruta glucolítica ya sea como fructosa-6-fosfato o como fructosa-1-fosfato.

Sea cual fuere el modo de entrada, el resultado siempre sería un incremento en las cantidades de los intermediarios gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) (57). Para esto, se debe tener en cuenta que la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) puede estar inhibida por múltiples mecanismos en los pacientes diabéticos con hiperglucemia mantenida (56). Por otro lado, es bien reconocido en la literatura que la entrada de fructosa a la ruta glucolítica como fructosa-1-fosfato genera directamente DHAP y gliceraldehído, evadiendo además un importante punto de control de esta vía metabólica dado por la enzima fosfofructo quinasa.



Figura 9

Los metabolitos antes mencionados poseen también capacidad reactiva suficiente como para glicosilar proteínas y generar, por tanto, anión superóxido y contribuir de esta manera al estrés oxidativo.

3. Activación de la vía de las hexosaminas y estrés oxidativo. La acumulación de fructosa puede también estimular la actividad de la vía de las hexosaminas, porque la formación de glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de la fructosa-6-fosfato y glutamina.

La activación de esta vía ha sido asociada con el desarrollo de resistencia a la insulina (58), lo que puede estar mediado por la estimulación en la expresión de genes como los de TGF α y b (59) y del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) (56).

Algunos estudios *in vitro* sugieren que la activación de esta vía está relacionada con la producción mitocondrial de anión superóxido. Así, se ha observado que condiciones de elevados niveles de glucosa, conducen a la elevación en los niveles de esta especie radicalica concomitante a la activación de la vía de las hexosaminas. Sin embargo, cuando se disminuye la producción de superóxido se inhibe la activación de la vía antes mencionada (56).

Por otro lado, algunos autores plantean que el estrés oxidativo en gestantes diabéticas puede afectar desfavorablemente el desarrollo del embarazo (60). Un estudio en ratas gestantes diabéticas ha relacionado a la activación la vía de las hexosaminas con una expresión anormal de genes embrionarios. Lo anterior parece estar relacionado con una afectación del balance redox intracelular, producido por una inhibición del ciclo de las pentosas fosforiladas y, con esto, del NADPH, H⁺ (61).

Lo resultados anteriores sugieren un lazo de retroalimentación positiva en el cual el estrés oxidativo activa la vía de las hexosaminas y esta a su vez conduce a la generación de más ERO y por tanto a acentuar aún más el desbalance redox. Ver figuras Figura 10 y Figura 11.

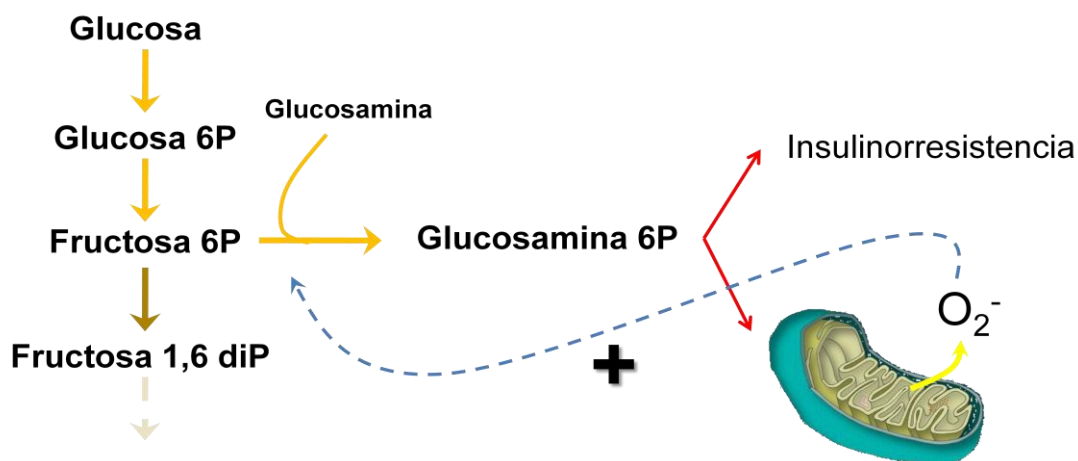


Figura 10

4. Activación de la Protein Kinasa C (PKC) y estrés oxidativo. Las PKC son una familia de isoenzimas que poseen la propiedad general de ser activadas por el diacil glicerol (DAG). Este compuesto se eleva en el interior de células expuestas a elevadas concentraciones de glucosa (62). Lo anterior puede deberse a la elevación de los metabolitos DHAP y G3P producto de la inhibición de la enzima G3PDH (63) y al aumento de su formación por la acumulación de fructosa como se explicó antes. Estos metabolitos son precursores para la síntesis de los DAG. Por tanto, su elevada formación ante condiciones de hiperglucemia mantenida justificaría en parte la activación de las PKC observada en los pacientes diabéticos (64).

Algunos experimentos han señalado la posible relación entre las PKC, las ERO y las complicaciones cardiovasculares en los pacientes diabéticos (64, 65). Sin embargo, todo parece indicar que no todas las isoformas responden de igual modo ante estímulos de elevadas concentraciones de glucosa. Se ha mostrado en modelos animales que la isoforma delta es la que estimula el estrés oxidativo mediado por la activación de la enzima NADPH oxidasa (66). La inhibición de esta última enzima también reduce la producción de ERO medida *in vivo* por resonancia magnética de espín (67).

En la siguiente figura se ensamblan gráficamente los 4 mecanismos expuestos:

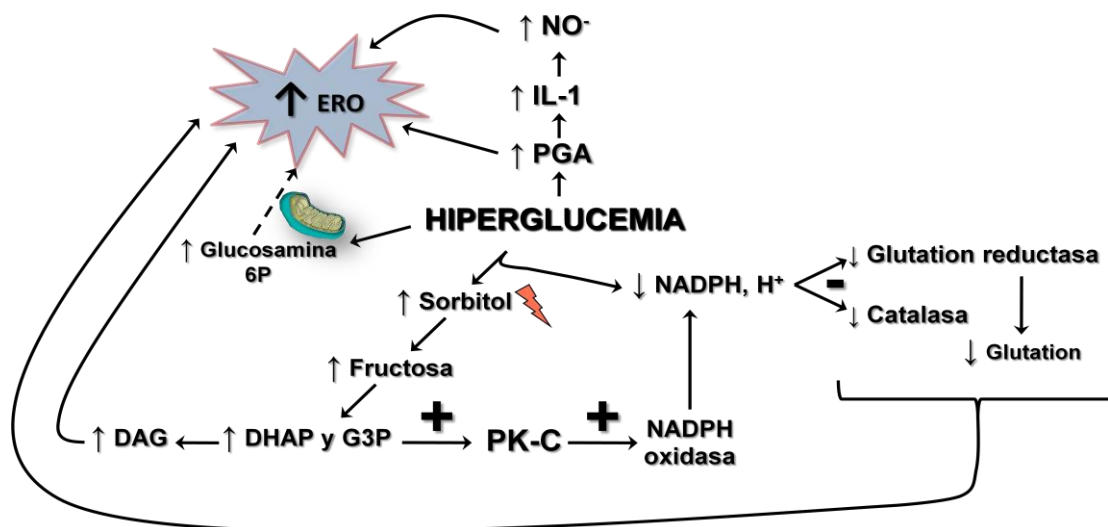


Figura 11

ERO: Especies Reactivas del oxígeno, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, G3P: gliceraldehído 3 fosfato, DAG: diacil glicerol.

Conocida la patogenia del estrés oxidativo en el paciente diabético (Figura 11) y dado que disponemos de métodos que permiten cuantificarlo (Tabla 3), cabe preguntarse, más concretamente en la infancia, por los parámetros analizados en niños con diabetes mellitus tipo 1. Aunque ya se han comentado algunos, son escasos los estudios publicados a este respecto que, a modo de resumen, exponemos en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de estrés oxidativo en niños con Diabetes Mellitus tipo 1

<i>Jos y cols. 1990</i>	No encontraron diferencias en la actividad intraeritrocitaria de las enzimas SOD, glutacion reductasa y glutacion peroxidasa entre niños diabéticos tipo 1 (DM1) y controles sanos con excepción de un paciente con retinopatía y mal control metabólico donde había reducción en la actividad de la glutacion peroxidasa (68).
<i>Asayama y cols. 1993</i>	Disminución de la capacidad antioxidante así como de transferrina y haptoglobina en niños y adolescentes DM1 con mal control metabólico comparado con controles. Encontraron, sin embargo, niveles incrementados de vitamina C y E (69).
<i>Domínguez y cols. 1998</i>	Encontraron diferencias significativas tanto en el debut de pacientes con DM1 entre 2 y 12 años de edad, como en la evolución de otro grupo entre 13 y 24 años de edad con DM1 ya establecida, comparados con controles sanos en lo respecta a los siguientes parámetros: Tbars (aumentados en DM1), carbonilación de proteínas (aumentadas), actividad de SOD (aumentada), actividad de glutacion peroxidasa (disminuida), glutacion reducido (disminuido), cociente alfa-tocoferol /lípidos totales (reducido) y beta-caroteno (reducido) (70).
<i>Ruíz y cols. 1999</i>	Pacientes adolescentes y adultos con DM1 establecida donde encuentran aumento significativo de Tbars comparado con controles, correlacionando claramente sus niveles con el grado de control metabólico (HbA1c) y la existencia o no de complicaciones vasculares. También encuentran disminución de la actividad de la glutacion peroxidasa (GPx) comparada con controles y dependiente ésta del control metabólico pero no de si existen complicaciones vasculares. No encuentran diferencias para la actividad de la SOD (71).
<i>Clapés y cols. 2002</i>	En niños y adolescentes con DM1 detectan concentraciones

<i>Martín-Gallan y cols. 2003</i>	<p>disminuidas de glutatión reducido y de la actividad de las enzimas CAT y SOD respecto a los niños del grupo control. Además, se obtuvo una correlación negativa significativa entre las concentraciones de malondialdehído (mediante Tbars) y las de glutatión reducido, y entre las concentraciones de grupos carbonilos (proteínas oxidadas) y actividad de la SOD (46).</p> <p>En niños y adolescentes con DM1 reciente (< 6 meses del debut) encuentran actividad de GPx intraeritrocitario, glutatión reducido y beta-caroteno reducidos comparados con controles aunque sin diferencias entre el grupo con complicaciones microvasculares y el que no las tiene. Elevación de la SOD y los Tbars en ellos sin relación con la presencia o no de estas complicaciones. Ratio vitamina E/lípidos totales disminuido en DM1, menor en los que tienen complicaciones. Finalmente, mayor carbonilación de proteínas en DM1 con complicaciones, hallazgo que al que se le atribuye posible relación con la génesis de las mismas (72).</p>
<i>Varvarovska y cols. 2003</i>	<p>Elevación de Tbars con disminución de glutatión peroxidasa y capacidad antioxidante del plasma en niños con DM1 respecto a controles sanos. No encuentran modificación de la actividad de la SOD. En hermanos sanos de estos niños encuentran alteraciones similares aunque no estadísticamente significativas respecto al resto de sanos, lo que plantea la posibilidad de que sean también factores contribuyentes en su patogénesis (73).</p>
<i>Davi y cols. 2003</i>	<p>Elevación de 8-isoprostanos en orina en pacientes recién debutados comparados con pacientes con DM1 ya establecida (> 1 año de evolución) en los que había tendencia a la normalización. Esta elevación estaba directamente relacionada con niveles de 11-dehidrotromboxano A2 e IL-6 como marcadores de respuesta inflamatoria y, por tanto, de activación plaquetaria y peroxidación lipídica (74).</p>
<i>Martín-Gallan y cols. 2005</i>	<p>Conclusiones similares al estudio de <i>Domínguez y cols. 1998</i> en el debut de DM1 de niños y adolescentes (75).</p>
<i>Martín-Gallan y cols. 2007</i>	<p>Se establece la evolución del perfil oxidativo en niños y adolescentes con DM1, esto es, al debut, durante los primeros años y posteriormente en presencia o no de complicaciones microvasculares. Malondialdehído (Tbars), proteínas carboniladas y 8-OH-deoxiguanosina se muestran muy disminuidos al debut con tendencia a decrecer durante el siguiente año y medio tras la terapia, para luego incrementarse posteriormente. El glutatión reducido y la actividad de la glutatión peroxidasa intraeritrocitarios se encontraron francamente disminuidos en el debut y en pacientes con complicaciones microvasculares (76).</p>

Tras todo lo anterior, **¿podría resultar beneficioso el tratamiento antioxidante en la diabetes mellitus?** Aunque esta cuestión se tratará en el subapartado 3, podemos adelantar algunas cosas.

Ya se ha mencionado que las ERO pueden generar considerables daños a las células, afectando directa o indirectamente a moléculas de importancia biológica como ya se ha expuesto anteriormente. Múltiples han sido las patologías asociadas a este estado y evidencias sobran para relacionarlo con las complicaciones que se observan en la diabetes mellitus. Es por ello que no resulta descabellado pensar en una terapia antioxidante con tal de prevenir o disminuir los efectos de la hiperglucemia crónica sobre los órganos y tejidos de estos pacientes. Véanse algunos ejemplos:

La mejor terapia para evitar estas complicaciones asociadas al estrés oxidativo es el control metabólico, pues en pacientes con diabetes mellitus que presentan un aumento de la excreción urinaria de 8-IP, se puede llegar a normalizar esa excreción mediante un riguroso control metabólico (31).

En lo que respecta a la terapia antioxidante propiamente dicha, la disminución de la generación de ERO ha sido demostrada *in vivo* en modelos animales de ratas diabéticas cuando

éstas se tratan con el antioxidante alfa-tocoferol (66). Otros experimentos en estos animales han indicado que la muerte de los cardiomiocitos inducida por la hiperglucemia puede prevenirse por el tratamiento con antioxidantes (77).

Uno de los efectos observados en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 es la pérdida progresiva de funcionalidad de las células beta pancreáticas (78). Este tipo de células es especialmente susceptible a la producción de ERO disminuyendo su síntesis y secreción de insulina (79). La administración de antioxidantes a modelos de ratones diabéticos produjo una disminución en la tolerancia a la glucosa y un aumento significativo en la masa de células beta. También conservan la expresión de ARNm de insulina y su concentración (80).

Estudios realizados en humanos han demostrado que el plasma total y las LDL aisladas de diabéticos tipo 2 son más susceptibles a la peroxidación que sus respectivos controles, y que la suplementación con RRR- α -tocoferol disminuye los procesos de peroxidación en pacientes diabéticos (81-83). Los efectos beneficiosos de la suplementación con α -tocoferol o con ácido α -lipoico disminuyendo el estrés oxidativo se han estimado mediante la medida de los hidroperóxidos o la oxidación de LDL (82, 84). A pesar de los argumentos que se pueden formular acerca de la validez de algunos biomarcadores individuales, la suma de la evidencia que nos proporciona la medida de marcadores de estrés oxidativo en DNA, lípidos y proteínas apoya la idea de un estrés oxidativo aumentado en la diabetes, y de que una terapia antioxidante puede mejorar esta situación (85), aunque la severidad de la diabetes o de las lesiones asociadas a la diabetes no se correlacionen exactamente con parámetros que se determinan habitualmente para determinar el estrés oxidativo, como los Tbars (86, 87). Además, existen incluso estudios sobre pacientes diabéticos en los que no se encuentran variaciones en los marcadores de estrés oxidativo (8-IP y MDA) y en los que los niveles plasmáticos de α -tocoferol corregidos por lípidos son incluso más altos en los pacientes diabéticos que en los sujetos controles (88).

Todo lo anterior muestra que, aunque existen discrepancias en algunos resultados, es factible un tratamiento antioxidante para evitar las complicaciones observadas en los pacientes con diabetes mellitus. Los esfuerzos también pudieran encaminarse a la búsqueda de inhibidores selectivos de enzimas específicas implicadas en la generación directa o indirecta de ERO como pueden ser la NADPH,H⁺ oxidasa y las proteínas kinasas C.

2.2 Lípidos en la dieta de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1

La dieta occidental ha evolucionado de manera que en los últimos 150 años el componente de grasa en la dieta ha cambiado cuantitativa y cualitativamente. Se postula que el ser humano evolucionó durante miles de años con una dieta en la que la grasa no suponía más del 25% del aporte total de energía, y con una proporción relativamente equilibrada de omega 6 : omega 3 (1-2:1), pero, en la actualidad y predominantemente en la sociedad occidental, la ingesta de grasa puede llegar a aportar más del 40% del total de energía de la dieta, y la relación entre omega 6 y omega 3 se estima que está entre 20-30:1 (89). A pesar de los posibles efectos hipolipemiantes de los omega 6 y de ser esenciales en la dieta, se ha constatado que este desequilibrio parece estar fuertemente relacionado con distintas enfermedades como la aterosclerosis (*Figura 12*), algunos tipos de cáncer e incluso un aumento en la resistencia insulínica (90), por lo que, aunque no se ha podido establecer cuál es la relación óptima de omega 6 : omega 3 (hay que tener en cuenta el resto de componentes de la dieta), se recomienda mantener una ingesta equilibrada de ambos grupos de ácidos grasos. Por otra parte, son numerosos los estudios que correlacionan el alto consumo de ácidos grasos polinsaturados omega-3 (ω -3) con la baja prevalencia de enfermedades cardiovasculares o de su riesgo a desarrollarlas (91-94). Los ácidos grasos polinsaturados ω -3 aportan al organismo efectos y propiedades cardioprotectoras, como antiarrítmicas, hipolipemiantes, antitrombóticas y antiinflamatorias (91, 94-96). La *Figura 12* y la *Figura 13* muestran los productos finales de la degradación de ω 6 y ω -3 y sus efectos.

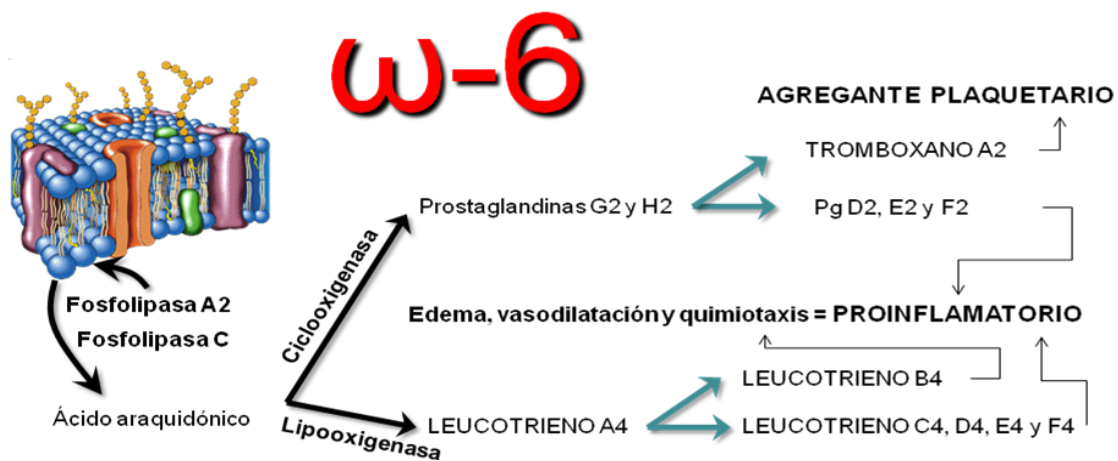


Figura 12

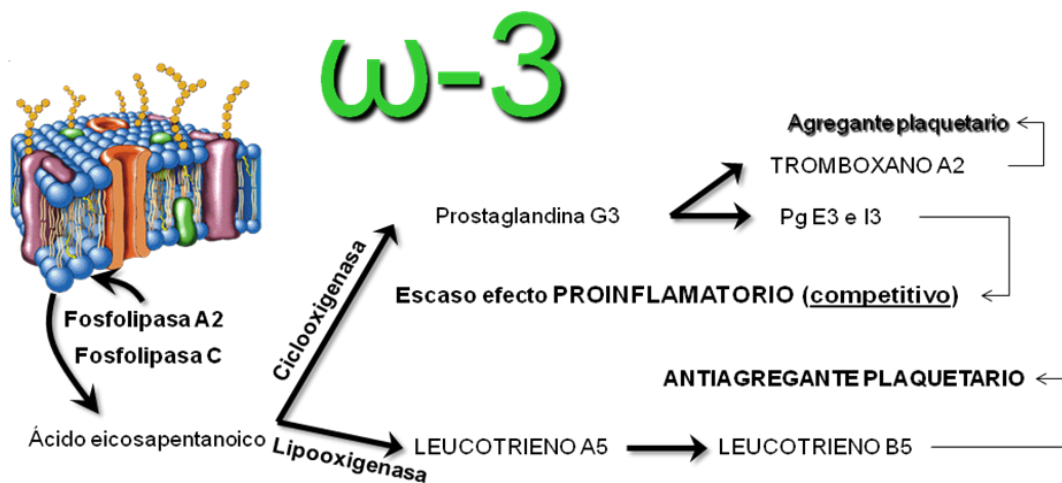


Figura 13

Se han comentado los perjuicios que supone el cambio dietético en la sociedad actual aunque al sujeto diabético se le añade un problema más a este respecto, esto es, la alteración del perfil lipídico como generador de patología cardiovascular. Este problema sobreañadido es la acusada **hiperlipidemia** cuando el control metabólico es pobre, y se caracteriza, en la **diabetes mellitus tipo 2**, por una importante hipertrigliceridemia acompañada de niveles normales o sólo ligeramente elevados de colesterol (97). El enriquecimiento en triglicéridos se produce principalmente en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y quilomicrones) (98), porque hay un aumento en la cantidad de ácidos grasos libres que llegan al hígado, donde pueden ser reesterificados y pasan a formar parte de nuevas VLDL que salen a la circulación. Por otra parte, aunque demostrado en ratas con diabetes mellitus tipo 1 inducida por estreptozotocina (STZ), la secreción hepática de VLDL es menor que en ratas controles en las mismas condiciones por lo que la hipertrigliceridemia también se ha atribuido a un menor aclaramiento de las VLDL del plasma (98).

Los mecanismos que explican estos hallazgos son variados aunque se han atribuido, fundamentalmente, a la disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL). A nivel del miocardio este mecanismo asociado a una menor actividad de la LPL postheparínica (99, 100), supone una disminución en la degradación de las VLDL (99). Este efecto inhibitorio de la diabetes sobre la actividad LPL no se debe a una disminución de los sitios de unión a heparán

sulfato en el endotelio (101). En cardiomiocitos aislados de corazones de ratas con diabetes aguda, tanto la actividad LPL celular como la post-heparínica están disminuidas con tan sólo una pequeña disminución en la masa de proteína LPL; como resultado, la actividad específica es menor, sugiriendo que existen acontecimientos postraduccionales que suponen una acumulación de proteína LPL inactiva (102).

El conjunto de factores que conducen a esta reducción de la actividad LPL no está claro, pues pueden estar implicados cambios en la disponibilidad de sustrato y/o en los niveles hormonales. Aunque la administración in vivo de insulina a ratas diabéticas rápidamente revierte la disminución en la actividad LPL del miocardio, la insulina no estimula la LPL cuando es añadida in vitro a cardiomiocitos de ratas, controles o diabéticas (100, 102, 103), por lo que existen factores adicionales in vivo que deben actuar junto con la insulina para estimular la actividad LPL. En este sentido, la combinación de dexametasona e insulina se ha demostrado que tiene un efecto estimulador tanto sobre la LPL celular como sobre la LPL post-heparínica de cardiomiocitos de ratas controles (104) y de diabéticas (105, 106), mientras que la insulina sola no tiene ningún efecto.

No obstante, la disminución en la actividad LPL puede no ser suficiente para justificar la hipertrigliceridemia. Como ya se ha indicado, los remanentes de quilomicrones son aclarados menos eficazmente de la circulación en la situación de diabetes (107), lo que parece indicar que estos remanentes y los de VLDL (IDL) son captados más lentamente vía mecanismos asociados a receptores. De hecho, se ha demostrado que en ratas tratadas con STZ hay una reducción de un 50% en los receptores de LDL en tejido adiposo epididimal y de un 80% en el mRNA del receptor LDL en el mismo tejido (108).

Además, hay que tener en cuenta que, en ausencia de insulina, la vida media de las VLDL circulantes aumenta (109), debido principalmente a la menor actividad de la LPL. Al estar más tiempo en circulación y al encontrarse en situación de hiperglucemia, aumentan las posibilidades de que las apoproteínas de las distintas lipoproteínas estén glicosiladas, lo que también dificulta su reconocimiento por los distintos receptores y retrasa su aclaramiento (110, 111). De hecho, se ha descrito que las VLDL de diabéticos son más resistentes a la acción de la LPL que las VLDL normales (112).

En la diabetes mellitus tipo 1 no controlada predomina, por el contrario, la alteración del colesterol en forma de disminución del HDL y de la Apo A1 con una elevación discreta del LDL. Aunque inconstante, puede existir también elevación de los triglicéridos, Apo B y CIII, pues, al igual que en la diabetes mellitus tipo 2, disminuye también la actividad LPL del tejido adiposo, fundamentalmente porque disminuye la actividad específica de la enzima, si bien, durante la diabetes inducida por STZ, también se ha demostrado una menor cantidad de mRNA y una menor cantidad de enzima (113). Los mecanismos que explican los hallazgos típicos (hipercolesterolemia) son, sin embargo, aún menos claros aunque se sugiere que, aún consiguiéndose una normalización del perfil lipídico, persiste la alteración en la distribución de las apoproteínas, lo que sigue implicando cierto riesgo cardiovascular (114-116). Parece ser que la hiperglucemia (glicosilación de apoproteínas) y la oxidación juegan un papel importante. Por una parte se postula un incremento de la actividad de la forma desforilada de HMG CoA reductasa que facilita la síntesis de colesterol a partir de acetil CoA y aceto acetil CoA (116). Y, por la otra, hay discrepancias respecto a la actividad de la LCAT (lecitin colesterol acil transferasa) en sujetos diabéticos mal controlados, si bien, de encontrarse realmente disminuida, explicaría el descenso en los niveles de HDL al haber menor paso de colesterol libre a esterificado (116-118). Por último, es fácil deducir que parte del riesgo aterogénico pese a un buen control metabólico y del perfil lipídico en estos pacientes, se deba al papel de la LDL oxidada, más incrementada en ellos por el estrés oxidativo y el incremento persé de la LDL. Este proceso tiene lugar cuando la LDL que atraviesa el endotelio se modifica oxidándose; dicha oxidación produce ácidos grasos poliinsaturados (dialdehído malónico e hidroxinoneal), que hacen más electronegativa la lipoproteína al reaccionar con las lisinas de la apo B100, y oxiesteroles (colesterol esterificado). Estos últimos son tóxicos sobre las células del endotelio, favoreciendo toda la secuencia aterogénica. Además, parece ser que las LDL oxidadas son reconocidas por un receptor no específico de las células, cuya funcionalidad no se modifica por la entrada de colesterol a la célula de modo que son internalizadas continuamente. También se

ha demostrado el efecto proinflamatorio de esta molécula que perpetúa aún más este fenómeno (119).

La siguiente figura resume los mecanismos que explican las alteraciones lipoproteicas de la diabetes mellitus:

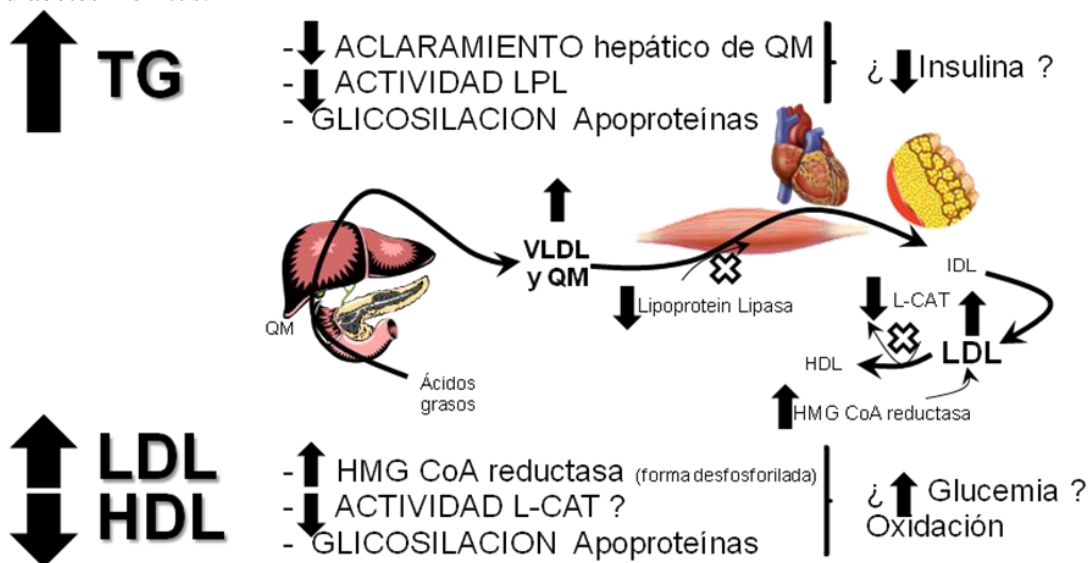


Figura 14

Podemos concluir, como muchos han sugerido, que la hiperlipidemia asociada a la diabetes está relacionada con el estrés oxidativo y que, por tanto, glucotoxicidad y lipotoxicidad están inter-relacionadas (76).

Siguiendo el hilo expositivo del subapartado anterior cabe preguntarse, llegados a este punto, lo siguiente: **¿podría resultar beneficioso una modificación de la dieta basada en grasas en la diabetes mellitus?**

La *American Heart Association* recomienda, basándose en las evidencias mencionadas al principio, la ingesta diaria de 1 g de ω -3 en las personas que han desarrollado alguna complicación cardiovascular (94, 120), principalmente de los provenientes del pescado como son el ácido eicosapentanoico, C20:5 ω -3, (AEP) y el docosahexanoico, C22: 6 ω -3, (DHA) (91, 95). El Fat Consensus Statemens recomienda la Dieta Mediterránea tradicional, en la que el aceite de oliva es la principal fuente de ácidos grasos (121). Estudios clínicos recientes muestran como la ingesta suplementaria diaria 850 mg de los ω 3, AEP y DHA, puede reducir el riesgo de manifestar enfermedades coronarias en un 25% y en 45% en el caso de muerte súbita coronaria. El denominado índice ω -3, un reciente parámetro de evaluación del riesgo coronario que hace relación a la presencia de estos dos ω -3, AEP y DHA en la pared de los eritrocitos, ayuda a determinar la propensión del riesgo cardiaco (122). Además, se ha descrito como el aumento de la ingesta de ω -3 de pescado o su suplementación dietética ayuda a regular la homeostasis de la glucosa y ayuda a prevenir la aparición de la diabetes mellitus tipo 2, disminuye la fracción lipídica aterogénica de las LDL (123) y media su acción a través de factores de transcripción y de genes implicados en oxidación lipídica y en su síntesis.

En lo referente al tratamiento de la diabetes mellitus, sobre todo en la tipo 2, estas dietas ricas en aceite de pescado también mejoran la tolerancia a la glucosa y, fundamentalmente, disminuyen la hiperlipidemia (124). Por tanto, se utilizan por que podrían disminuir el riesgo elevado que tienen estos enfermos de padecer enfermedades cardiovasculares (125). Incluso se han demostrado efectos beneficiosos de esta dieta sobre el daño renal (126), reduciendo la microalbuminuria (124, 127) y mejorando la función renal (127) y la presión arterial (124).

La disminución de los triglicéridos totales en plasma, la concentración de VLDL y la concentración de triglicéridos en las VLDL con aceite de pescado (128-137) es consecuencia de una reducción en la síntesis y secreción hepática de VLDL (138) y una mayor eliminación de estas lipoproteínas por aumento de la LPL (139). A su vez, el enriquecimiento con aceite de

pescado de la dieta de animales de experimentación aumenta significativamente la actividad del receptor LDL en hígado y revierte el efecto inhibitor de las grasas saturadas sobre la función del receptor LDL (140). Por su parte, la mejoría de la sensibilidad insulínica tanto en humanos (141) como en ratas (142) se ha sugerido que puede estar relacionada con la captación por el músculo esquelético de la glucosa plasmática. Sin embargo, otros estudios realizados en ratas diabéticas por STZ a las que se les administró por vía intravenosa una emulsión de DHA, no encontraron variaciones en la sensibilidad insulínica aunque sí disminuyeron los niveles de glucosa plasmática en ayunas (143).

2.3 Alimentos funcionales

En la actualidad, las evidencias científicas que relacionan la alimentación con la salud han impulsado el rápido desarrollo de los alimentos funcionales. El cada vez mayor interés de los consumidores por mantener o mejorar el estado de salud mediante el consumo de alimentos suplementados con ingredientes bioactivos ha sido determinante para el desarrollo de numerosos alimentos funcionales. En los últimos años existe un gran interés en la obtención de ingredientes alimentarios con propiedades funcionales obtenidos de fuentes naturales como plantas, frutas, pescado, carne y productos lácteos. Uno de los aspectos a considerar en la actualidad se refiere al establecimiento de las evidencias científicas de su efecto beneficioso en el organismo (144).

Por tanto, y teniendo en cuenta todo lo que se ha expuesto hasta ahora, surge la necesidad de intervenir en la alimentación del diabético en lo que concierne a los dos aspectos fundamentales que se han tratado: mejorar el estrés oxidativo mediante el empleo de antioxidantes y la modificación del cociente ω -6/ ω -3.

2.3.1 El interés de los ingredientes alimentarios con propiedades antioxidantes.

En los últimos años ha aumentado extraordinariamente el interés general por los antioxidantes de uso alimentario ya que parecen desempeñar un importante papel en relación con la salud. Ya se ha comentado que en los procesos metabólicos que tienen lugar en el cuerpo humano se producen continuamente, de forma natural, especies oxidantes que constituirían una seria amenaza para la salud de no ser por las defensas naturales del cuerpo humano contra ellas. Estas defensas, que se basan fundamentalmente en sistemas enzimáticos, minimizan los efectos tóxicos de los radicales libres (145), pero van perdiendo efectividad con la edad.

Además de las fuentes endógenas de radicales, hay múltiples fuentes exógenas en las que la exposición es alta (contaminantes ambientales, radiación solar, ejercicio, etc.) y que van en aumento. Por tanto, las defensas naturales contra lo que se denomina *estrés oxidativo* son cada vez más insuficientes. Aunque se necesita mucha más investigación al respecto, en la actualidad existen ya evidencias de la implicación de los radicales libres en el desarrollo de procesos tumorales, de diabetes (146), de arteriosclerosis cardiovascular y, aunque menos grave pero también importante, en la formación de cataratas (147).

Recientemente se ha demostrado la acción sinérgica de algunos antioxidantes naturales con varias enzimas endógenas, como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, que potencian el efecto inhibitor de las mismas a los procesos degenerativos de las células (148). Por tanto, se tiene el convencimiento de que es posible reforzar la protección natural del cuerpo contra los efectos del estrés oxidativo mediante un aumento de antioxidantes en la dieta (149). Lo que interesa determinar es cuáles son los antioxidantes individuales y las dosis adecuadas de los mismos que proporcionan los beneficios óptimos para la salud. El aumento de antioxidantes en la dieta puede no ser suficiente y, en ocasiones, es conveniente reforzar los alimentos con suplementos de antioxidantes en determinadas situaciones fisiopatológicas. Como consecuencia, el consumo de alimentos y bebidas ricos en antioxidantes se generaliza entre las recomendaciones nutricionales y comienza a ser frecuente el diseño de alimentos con funcionalidad antioxidante.

a) Los antioxidantes del romero. Los antioxidantes de uso alimentario más interesantes son los que proceden de fuentes naturales, en particular, de plantas como el romero (*Rosmarinus officinalis* L.). Ya en 1955 se descubrió la actividad de esta especie (150) y, en la actualidad, se conocen bien los compuestos responsables de la misma. En 1966 se aisló el

carosol (151) y se atribuyeron a este diterpeno fenólico las propiedades antioxidantes de la planta. Su estructura y la del ácido carnósico fueron confirmadas en 1982 (152) y en ese mismo año se identificaron el rosmanol y el ácido rosmarínico (153). A continuación, el rosmadial (154), el epirosmanol e isorosmanol (155), el rosmaridifenol (156) y la rosmariquinona (157). La estructura química de algunos de estos compuestos se presenta en la Figura 15. Además de los compuestos mencionados anteriormente, el romero posee también flavonoides con actividad antioxidante (158).

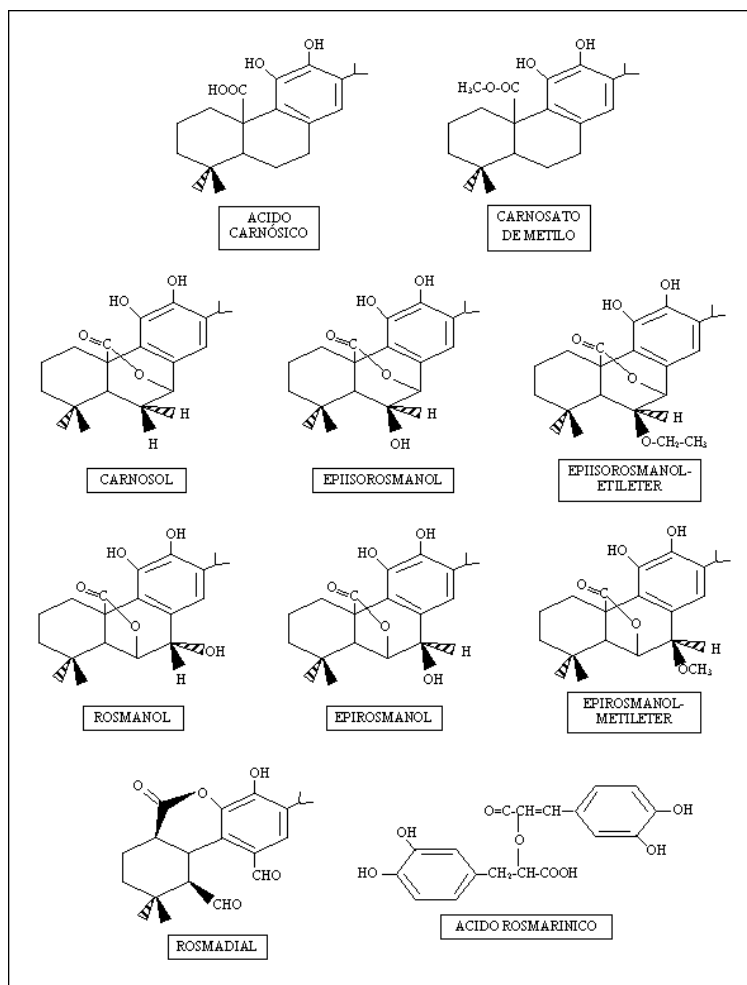


Figura 15. Estructuras químicas de algunos compuestos antioxidantes del romero.

El principal compuesto responsable de la actividad antioxidante es un diterpeno, el ácido carnósico (159), y es también el compuesto antioxidante más abundante en las hojas de romero. Cuvelier y colaboradores (160) también encontraron en el ácido carnósico la mayor actividad antioxidante, seguido de carnosol, ácido rosmarínico, rosmanol y rosmadial. El ácido carnósico es un antioxidante lipofílico que neutraliza el radical de oxígeno, los radicales hidroxilo y los radicales peroxilo lipídicos, previniendo así la peroxidación lipídica y el daño en las membranas biológicas (159, 161). La actividad frente a los radicales libres del carnósico sigue un mecanismo análogo al de otros antioxidantes como α -tocoferol y está causado por la presencia de dos grupos hidroxilo en orto del anillo fenólico (posiciones C11 y C12, ver la Figura 15) (162)

El carnosol llegó a ser detectado como compuesto mayoritario, con un 90% respecto del total de los extractos, pero hoy se cree que su origen puede ser la oxidación del ácido carnósico durante el proceso de extracción (163). En su degradación, el carnósico puede sufrir también deshidrogenación enzimática a carnosol (164), seguida de ataque por radicales libres dando lugar a diterpenos altamente oxidados como rosmanol o isorosmanol (165, 166)

Los compuestos fenólicos del romero actúan como antioxidantes primarios y también poseen efecto sinérgico con otras sustancias. En los últimos años se ha comprobado que su mecanismo de acción es similar al de otros antioxidantes fenólicos. Los antioxidantes del romero actúan en la fase de propagación reduciendo los radicales libres formados, y convirtiéndose ellos mismos en radicales libres mucho menos reactivos por su capacidad de estabilizar el electrón desapareado por deslocalización en el anillo aromático (161, 167, 168).

Es importante destacar la capacidad de estos extractos de actuar de forma sinérgica con otros antioxidantes. Así, se ha podido comprobar cierta acción sinérgica entre el extracto de romero y el α -tocoferol (169, 170). Incluso se ha observado este efecto entre determinados compuestos como el ácido carnósico y el α -tocoferol (171). En este caso se cree que podría existir un mecanismo parecido al del ácido ascórbico y el α -tocoferol, en el que el radical formado al reducir el α -tocoferol al radical peroxilo, es posteriormente estabilizado por la acción del ascórbico, provocando así la regeneración de la vitamina E (véase Figura 6).

Existen a su vez otros estudios *in vitro* sobre la relación de estos compuestos con enzimas, y así, en un trabajo de Seok y colaboradores (172) se puso de manifiesto que la actividad era similar a la de la superóxido dismutasa, enzima que cataliza en las células la neutralización de los radicales superóxido. Recientemente, se descubrió que los diterpenos fenólicos del romero tienen efectos sinérgicos con las enzimas glutatión reductasa y NADPH-quinona reductasa, regenerándolas y aumentando el efecto bloqueante de radicales libres que ejercen. A estas sinergias con las mencionadas enzimas se atribuyen los efectos protectores ante agentes cancerígenos en pulmón, hígado y estómago que se han puesto recientemente de manifiesto en estudios con ratones (173). A continuación se presenta una tabla donde se recogen algunos ensayos *in vitro* o *in vivo* realizados con romero o alguno de sus componentes desde el año 1990.

Tabla 5. Ensayos in vitro e in vivo realizados con romero o alguno de sus componentes

Autores	Año	Tipo de sustrato	Efecto encontrado
Joyeux y col.	1990	Extracto de romero.	Antilipoperoxidante, antihepatotóxico en hepatocitos de rata.
Agel, M.B.	1991	Aceite volátil de romero.	Relajante del músculo liso bronquial en tráquea de conejo y cerdo.
Singletary y col.	1991	Extracto de romero en dieta.	Inhibición de tumores inducidos en mama.
Paris y col.	1993	Carnosólico, carnosol, rosmanol, metilrosmanol, etilrosmanol, dimetilcarnosol.	Inhibición de la proteasa del HIV.
Tawfiq y col.	1994	Extractos de romero.	Induce la actividad de la quinona reductasa en células de hepatoma de ratones.
Huang y col.	1994	Extracto en metanol de romero, carnosol y ursólico.	Inhibición de tumoraciones en piel de ratones vivos.
Offord y col.	1995	Extracto de romero, carnosólico y carnosol.	Decrece la activación y aumentan la detoxificación de un importante carcinogénico humano en células epiteliales bronquiales.
Haraguchi y col.	1995	Ácido carnosólico, carnosol, rosmanol y epirosmanol.	Protegen los sistemas biológicos contra el estrés oxidativo. El ácido carnosólico además inhibe la hemólisis oxidativa de los glóbulos rojos.
Chan y col.	1995	Carnosol, cúrcuma y epigallocatequín galato.	Inhiben la producción de nitrito inducida por inflamación en células peritoneales de ratón.

Autores	Año	Tipo de sustrato	Efecto encontrado
Kim y col.	1995	Extracto de romero y otros antioxidantes.	El extracto de romero presenta actividad similar a la de la superóxido dismutasa.
Singletary, K. W.	1996	Extracto de romero y carnosol en inyección intraperitoneal o en la dieta.	El extracto de romero intraperitoneal o en la dieta y carnosol intraperitoneal aumentan la actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa y quinona reductasa en ratas.
Singletary y col.	1996	Extractos de romero, carnosol y ursólico.	Romero y carnosol inhiben las tumores de mama inducidas por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) y la formación en vivo de aductos de DNA en ratas.
Amagase y col.	1996	Polvo molido de romero comercial.	Reducción en la unión de metabolitos de DMBA al DNA de la célula mamaria de rata.
Siurin, S.A.	1997	Aceite esencial de romero y otras plantas.	Efecto antioxidante en plasma y glóbulos rojos de pacientes con bronquitis crónica.
Singletary y col.	1997	Extracto de romero.	Protección del hígado y estómago de ratón frente a agentes tóxicos o carcinogénesis.
Offord y col.	1997	Extracto de romero, carnosol y ácido carnósico.	Efecto anticarcinogénico debido a la inhibición de la activación de procarcinógenos y a la activación de la vía de detoxificación de la glutatión-S-transferasa.
Babu y col..	1999	Extracto de romero en la dieta.	Presenta efecto positivo sobre el sistema inmunitario de ratas aunque no en todos los casos.
Asai y col..	1999	Extracto de romero en hexano, extracto supercrítico de pimiento y extracto de cúrcuma.	El romero impide la hidroxidación de los fosfolípidos de membrana de los glóbulos rojos en ratones alimentados con el extracto.
Fahim y col.	1999	Aceite esencial y extracto alcohólico de romero.	Efecto hepatoprotector del extracto alcohólico en ratas y antimutágeno del aceite esencial en ratones.

Autores	Año	Tipo de sustrato	Efecto encontrado
Plouzek y col.	1999	Extracto de romero.	Inhibe la actividad de la glicoproteína P, que es responsable de la resistencia a los fármacos en el cáncer de mama.
Kuzmenko y col.	1999	RoseOx(suplemento nutricional ácido carnósico).	RoseOx reduce <i>in vivo</i> la peroxidación lipídica inducida por radicales libres.
Makino y col.	2000	Ácido rosmarínico.	Inhibición de la proliferación de células mesangiales.
Dörrie J y col.	2001	Carnosol.	Efecto protector en líneas de células leucémicas.
Steiner y col.	2001	Ácido carnósico.	Efecto antiproliferativo en células leucémicas.
Offord y col.	2002	Ácido carnósico.	Potencial fotoprotector en fibroblastos humanos irradiados con UVA.
Lo y col.	2002	Carnosol.	Acción anti-inflamatoria y quimioprotectora.
Sotelo-Félix y col.	2002	Carnosol.	Prevención de daño hepático agudo.
Fawcett y col.	2002	Carnosol.	Mejora la acción de los inhibidores de acetilcolinesterasa, posible utilidad en el tratamiento y prevención del Alzheimer.

b) Métodos de obtención de antioxidantes de romero. Aplicación de nuevas tecnologías medioambientalmente limpias. En general, los métodos empleados en la industria para la extracción de antioxidantes de plantas de la familia de las Labiadas son: la extracción con disolventes (174-176), la extracción acuosa alcalina (177), la extracción con aceites vegetales y/o mono o diglicéridos (178), la destilación en corriente de vapor y la destilación molecular. Los problemas fundamentales asociados a estos métodos son la falta de selectividad de los disolventes, que proporcionan extractos de menor actividad que los antioxidantes sintéticos. Se ha demostrado también que estos métodos tradicionales de extracción pueden causar la degradación térmica y oxidativa del ácido carnósico (179). Además, los disolventes orgánicos empleados (hexano, acetona o cloruro de metilo) pueden dejar residuos en los alimentos que deben ser eliminados. En algunos casos pueden estar prohibidos por la legislación de algunos países para su empleo en alimentos destinados al consumo humano. Además de su toxicidad, el uso industrial de disolventes genera no pocos problemas de manejo y vertidos, por lo cual se tiende a sustituir las tecnologías que los utilizan por otras alternativas sin disolventes. Las propiedades de los fluidos sub- y supercríticos son la base para el desarrollo de nuevas tecnologías adecuadas para la extracción de plantas.

El empleo de tecnologías basadas en los fluidos supercríticos (SFE) para extraer compuestos bioactivos presenta numerosas ventajas, comparadas con los procesos de extracción convencionales, como, por ejemplo, el procesado en condiciones suaves y no oxidantes, que permite la obtención de extractos bioactivos sin residuos tóxicos (180). Además, la SFE ofrece la posibilidad de ajustar el poder solvente del agente extractante mediante ligeras variaciones de la presión y/o temperatura de extracción. Por tanto, seleccionando las condiciones de extracción (y, en definitiva, la densidad del CO₂) es posible llevar a cabo extracciones más o menos selectivas por familias de compuestos a partir de la matriz vegetal. La utilización de un proceso más complejo en el que la extracción vaya acompañada de un fraccionamiento en cascada en dos separadores, va a permitir la precipitación selectiva de dos extractos con características químicas y de solubilidad diferentes; de esta forma, por ejemplo, va a ser posible llevar a cabo el fraccionamiento de la oleoresina de romero en dos extractos, uno conteniendo los compuestos solubles a mayores densidades (formados principalmente por compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes) y otro conteniendo el aceite esencial, mucho más soluble a bajas densidades. Otras ventajas son el empleo de disolventes reconocidos como seguros (Generally Recognized As Safe, GRAS) y la mayor eficacia del proceso de extracción (en términos de rendimientos y tiempos de extracción). De hecho, la SFE se ha propuesto en numerosas ocasiones para la extracción de antioxidantes del romero (179-185).

Los extractos supercríticos de romero obtenidos aplicando los procesos comentados anteriormente son altamente resistentes al calor, fácilmente solubles en distintos alimentos (182) y no afectan negativamente a las propiedades sensoriales (color, sabor y aroma) de las matrices a las que se añaden como suplemento. En este sentido es importante destacar que un fraccionamiento apropiado de la oleoresina de romero permite la obtención de un extracto antioxidante sin residuos de aceite esencial y, por tanto, sin aroma residual (186, 187). Asimismo, los extractos de romero obtenidos con fluidos supercríticos presentan elevadas actividades antioxidantes (188), incluso a bajas concentraciones (189-191).

c) Situación legal de los antioxidantes de romero. Un aspecto que debe tenerse en cuenta es la situación legal de los extractos de romero en la actualidad, que está considerado como un producto natural 100 % aprobado por la FDA (FDA Revision of 21 Code of Federal Regulation 21 CFR, Part 182-20), FEMA (GRAS 3001 and 2992) y la Comunidad Económica Europea (CEE 88/388/ECC and 88/344/ECC list 1 n° 406).

2.3.2 El interés de una relación equilibrada entre ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-6/omega-3.

El proceso inflamatorio se caracteriza por la producción de mediadores, como las prostanglandinas y los eicosanoides, a partir de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular. La modulación de la duración e intensidad de la respuesta inflamatoria de estos mediadores depende de cual sea el ácido graso del que proviene. Los derivados del ácido araquidónico (AA) de la serie ω -6, como tromboxano A₂ (TXA₂) y leucotrieno B₄ (LTB₄), son

potentes agentes con un marcado efecto inflamatorio, mientras que los derivados del eicosapentaenoico (EPA), de la serie ω -3 son inflamatorios débiles. Existe por tanto, una competencia en la formación de estos precursores químicos por las dos series de ácidos grasos, la ω -6 y ω -3 ya que ambos son sustratos de la cicloxigenasa (COX) (vía de las prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina) y de lipoxigenasa (LOX) (vía de los leucotrienos). La ingesta de pescado, ricos en ácidos grasos n-3, o suplementos ricos en EPA disminuye el contenido de AA, inhibe su metabolismo e inhibe su oxigenación por la COX, por lo que la respuesta inflamatoria disminuye debido a la presencia de mediadores menos activos (95). Además, también se ha descrito como el control del índice ω -3, grado de estratificación EPA/DHA, produce efectos beneficiosos anti-inflamatorios (192) en las personas que manifiestan su alteración. La dieta, por tanto, juega un papel muy importante en la prevención y tratamiento de las alteraciones inflamatorias de las personas con diabetes mellitus tipo 1 (193).

Actualmente los especialistas en Nutrición recomiendan mejorar el valor nutricional de la ingesta de productos cárnicos combinándolos con pescados u otros productos derivados que, básicamente, constituyen una importante fuente de ácidos grasos omega-3. Existen numerosas evidencias científicas que demuestran los efectos beneficiosos para la salud de una relación equilibrada entre ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-6/omega-3 (194). Como se ha comentado, los PUFA omega-3 y omega-6 son muy distintos desde el punto de vista funcional y metabólico y poseen funciones fisiológicas opuestas. Mientras ambos son precursores de productos metabólicos como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas, éstos se producen en mayor cantidad a partir de los PUFA omega-6 siendo, asimismo, biológicamente activos a muy bajas concentraciones. Si estos compuestos se producen a elevadas concentraciones pueden contribuir a la formación de trombos y ateromas, a la aparición de reacciones alérgicas o inflamatorias y a la proliferación celular (95, 96). Además, cantidades excesivas de PUFA omega-6 y elevadas relaciones omega-6/omega-3 desequilibran el balance redox celular (derivándolo a condiciones de mayor oxidación) alterando, a su vez, la expresión de las proteínas reguladoras y promoviendo la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades inflamatorias o autoinmunes(96). Por tanto, una relación equilibrada entre los PUFA omega-6 y omega-3 proporciona un mejor estado fisiológico en términos de expresión génica, de metabolismo de eicosanoides y de producción de citoquinas(195).

Los productos cárnicos convencionales poseen una relación omega-6/omega-3 superior a 15 mientras que los efectos saludables se asocian, como ya se ha referido, a relaciones inferiores a 4 (95). Las evidencias científicas basadas en ensayos de intervención controlada en humanos sugieren recomendaciones dietéticas de omega-6/omega-3 en función de las situaciones fisiológicas concretas (adultos con diferentes patologías, niños, recién nacidos, etc.) (95). Por tanto, la mejor estrategia para optimizar la relación omega-6/omega-3 en productos cárnicos consiste en la adición de una cantidad apropiada de PUFA omega-3, siendo los más convenientes los de cadena larga como el EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico) (95, 196, 197).

a) Situación legal del aceite de pescado empleado para equilibrar la relación omega-6/omega-3 en los productos cárnicos diseñados. El enriquecimiento de diversos alimentos que no contienen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con aceites de origen marino ricos en estos LC-PUFA es una práctica habitual y avalada por numerosos estudios científicos. En España, el empleo como alimento de los aceites marinos está autorizado específicamente desde 1981 por la Reglamentación Técnica Sanitaria para elaboración de grasas comestibles (REAL DECRETO 1011/1981), que refrendó el uso habitual de los aceites de pescado y de otros animales marinos. Posteriormente, la Unión Europea ha autorizado otras fuentes, como las microalgas, para la obtención de aceites ricos en LC-PUFA aptos para uso como nuevos ingredientes alimentarios (DOCE 12/6/2003)

2.3.3 Productos cárnicos diseñados con una relación omega-6/omega-3 equilibrada y extractos antioxidantes de romero.

El producto patentado (198) y que va a ser utilizado en nuestro ensayo clínico, consiste en una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga y diversos antioxidantes,

entre ellos un extracto de romero obtenido mediante extracción con CO₂ supercrítico. Este producto ha sido aplicado a los productos cárnicos del Grupo Frial. El objetivo de la incorporación a dichos productos cárnicos de la mezcla objeto de la patente es equilibrar el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-6/omega-3 de la carne de cerdo y de la de ave y aportarles antioxidantes naturales de acción sinérgica. Los productos mencionados están comercializados desde hace más de 2 años con Registro Sanitario 10.05771/M.

3. ENSAYOS CLÍNICOS RELEVANTES CON PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1

Ya se ha comentado que existe un mayor estrés oxidativo en la diabetes mellitus, tanto en animales como en humanos, y que esta situación se puede producir bien porque la formación de radicales libres esté aumentada en los pacientes diabéticos, bien porque las defensas antioxidantes están disminuidas, o por una combinación de ambos cambios (21). Y aunque la mejor terapia para evitar las complicaciones es el control metabólico debido a que el aumento de la excreción urinaria de 8-isoprostanos se puede llegar a normalizar mediante un riguroso control glucémico (31), éste puede no ser suficiente. Otros estudios amplían este último planteamiento concluyendo que, pese a un buen control metabólico, hay muchos otros parámetros, como el gluatión reducido, el MDA, el α -tocoferol o la actividad de enzimas antioxidantes, que disminuyen pronto y definitivamente tras la aparición de la diabetes y que, salvo en los comienzos, no llegan a ser similares pese a que el paciente siga fielmente el tratamiento (70, 76, 199).

En lo que se refiere al perfil lipídico, también se ha comentado que, aunque éste suele normalizarse tras la terapia insulínica, permanecen alteraciones lipoproteicas que conllevan la perpetuación del riesgo cardiovascular (114-116).

Por este motivo, para conseguir paliar los efectos a largo plazo de este estrés oxidativo y de la alteración lipoproteica, viene planteándose la necesidad de recurrir a una terapia antioxidante en combinación con una dieta rica en ω -3:

Respecto al primer punto, la **terapia antioxidante**, ya se ha comentado que es notable el número de ensayos clínicos que se han llevado a cabo para demostrar el efecto beneficioso de una terapia antioxidante con suplementación de, por ejemplo, α -tocoferol, ácido ascórbico o beta-caroteno en situaciones de estrés oxidativo y, en concreto, en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 y tipo 2. Se pueden encontrar revisiones sobre este tema en Caimi et al (200) y Faure (201). Sin embargo, la mayoría de los estudios observacionales y clínicos que sugieren un papel protector potencial de la suplementación con antioxidantes no muestran resultados concluyentes acerca del papel terapéutico de la dieta para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la diabetes, ni acerca de los biomarcadores indicadores de la incidencia o progresión de enfermedades asociadas al estrés oxidativo como la aterosclerosis. Costacou et al, citan numerosos informes que intentan encontrar justificaciones a los datos contradictorios en ensayos aleatorizados (202) y se permiten afirmar que las discrepancias se deben, en buena parte, a la falta de uniformidad en los estudios: las poblaciones estudiadas, las definiciones de aparición de eventos, la variedad de determinaciones de antioxidantes individuales o combinaciones de ellos, las dosis de suplementación, la frecuencia de administración y duración del tratamiento o si las dosis se tomaron como parte de la dieta para optimizar la absorción.

Respecto al segundo punto, **dieta rica en ω -3**, también son numerosos los estudios clínicos realizados que abordan a la diabetes tipo 1 o a sus complicaciones más habituales (los trastornos en el metabolismo y transporte de los lípidos y colesterol, los trastornos en el metabolismo de la glucosa, la obesidad y la hipertensión) mediante un aumento en la ingesta de ácidos grasos ω -3, asociada o no al consumo de antioxidantes. La modificación en los hábitos alimenticios con la introducción de dietas con componentes biosaludables, cardioprotectores y antiinflamatorios como son éstos, han demostrado claramente ayudar al mejor manejo de estas alteraciones regulando el metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, disminuyendo el riesgo cardiovascular, mejorando el control del índice glucémico, disminuyendo los efectos de las alteraciones de los procesos inflamatorios y previniendo la aparición de la obesidad y de la hipertensión tanto en las personas con diabetes como en la población general (90, 93, 94, 203-209).

Por último, diversos estudios establecen que **ambas intervenciones en combinación**,

concretamente una dieta rica en ω -3 acompañada de antioxidantes del romero, actuarían sobre la modulación de la inflamación, la activación plaquetaria, la tasa de crecimiento de la placa aterosclerótica y las modulaciones de la función endotelial, de la presión arterial y el control de la microalbuminuria en la diabetes (123, 210-212).

Queda claro, por tanto, que el control metabólico de la glucosa y de los lípidos juega un papel muy importante en la prevención de la aparición de las complicaciones que siguen a la diabetes mellitus tipo 1 (213, 214) pero, en lo que respecta a la terapia antioxidante, parece interesante seguir explorando esta vía como forma de prevención o retardo en la aparición de síntomas relacionados a estrés oxidativo en pacientes diabéticos. Así pues, y más concretamente refiriéndose al modelo de niños diabéticos, podríamos permitir mejorar su status antioxidante para que, a largo plazo, se pueda prevenir en mayor o menor grado la aparición de las complicaciones derivadas de padecer Diabetes Mellitus tipo 1.

II. JUSTIFICATIVA

NECESIDAD DE ESTUDIOS ADICIONALES

Ensayos clínicos con pacientes diabéticos (Diabetes Mellitus tipo 1). La existencia de un estrés oxidativo y de alteraciones lipoproteicas en la diabetes mellitus ha sido ampliamente demostrada tanto en animales como en humanos. Puesto que se trata de fenómenos muy precoces, fundamentalmente la caída de la capacidad antioxidante en pacientes con diabetes recién diagnosticada, y dado que los ensayos clínicos realizados con terapia antioxidante hasta el momento parecen contradictorios, creemos necesario seguir explorando esta vía como forma de prevención o retardo en la aparición de síntomas relacionados con el estrés oxidativo de pacientes con diabetes mellitus tipo 1.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Principal

El presente estudio está dirigido a evaluar el potencial efecto antioxidante de la ingesta diaria un producto cárnico funcional enriquecido con extracto de romero y PUFAs omega-3 durante 12 meses, en un grupo de niños diabéticos tipo 1 preadolescentes, con edades comprendidas entre 6-10 años, comparados con otro grupo de niños diabéticos de iguales características, que consumirán el mismo producto sin extracto de romero ni PUFAs, y a su vez, con un tercer grupo de niños sanos a los que se les administrará la misma dosis del producto funcional enriquecido.

2. Objetivos Secundarios

a) Se pretende demostrar que el antioxidante natural (extracto de romero) y los PUFAs, como ingredientes de un alimento funcional en la forma de productos cárnicos de la gama Frialvida®, pueden modificar el perfil lipídico y glucémico, mejorando, además, otros parámetros bioquímicos de estrés oxidativo.

b) Asimismo, se quiere valorar la seguridad, adherencia y tolerancia al consumo de los productos que contienen extracto de romero y PUFAs, sin desplazar otros grupos de alimentos de su ingesta habitual.

IV. PLAN DE INVESTIGACIÓN

1. Diseño del Estudio

Se trata de un ensayo clínico prospectivo de 12 meses de duración, doble ciego y distribución aleatoria, en el Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil La Paz de Madrid (España).

2. Población del Estudio

Participarán individuos prepuberes, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 6 y 9 años para las niñas y 6-10 años para los niños, divididos en tres grupos de tratamiento. La muestra será reclutada en el Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil La Paz de Madrid.

- *Grupo 1:* niños diabéticos tipo 1 consumirán 100 g/día durante 3 días/semana de producto cárnico enriquecido con antioxidantes naturales y PUFAs, de la línea Frialvida®
- *Grupo 2:* niños diabéticos tipo 1 consumirán 100 g/día durante 3 días/semana de producto cárnico sin enriquecer de la misma gama.
- *Grupo 3:* niños sanos, consumirán 100 g/día durante 3 días/semana de producto cárnico enriquecido con antioxidantes naturales y PUFAs, de la línea Frialvida®

El tamaño muestral calculado necesario para cada grupo es de 15 pacientes, esperando encontrar diferencias significativas con $\alpha=0.05$ y una potencia del 80% para la comparación entre grupos.

2.1 Criterios de selección

2.1.1. Criterios de inclusión

- Niños diabéticos tipo 1, prepuberes cuando se inicie el ensayo.
- Niños no diabéticos hermanos de los anteriores, prepuberes cuando se inicie el ensayo.
- Edad comprendida entre 6-9 años para niñas y 6-10 años para niños.
- Firmada la autorización por parte de padres o representante legal del consentimiento informado.
- Que puedan seguir con su dieta habitual sin necesidad de restricciones de nutrientes

2.1.2. Criterios de exclusión

- Niños diabéticos con cetoacidosis
- Patología grave asociada: Insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca
- Presencia de Trastorno de la Conducta Alimentaria: Anorexia / Bulimia
- Presencia de alteraciones psicológicas graves: Esquizofrenia y otros trastornos bipolares

3. Tratamientos

Se considerará que se ha cumplido el tratamiento cuando se documente una ingesta del alimento de, al menos, el 50% del pactado.

a) Tratamiento en investigación

El alimento de la investigación estará enriquecido con 0,02 % de extracto de romero y 0,3 % de PUFAs (Vidalim®) y será suministrado por Cárnicas Frial, S.A.

b) Tratamiento placebo

El placebo constará de un producto de igual matriz que el anterior, presentando composición nutricional similar al mismo, pero sin contener extracto de romero ni PUFAs y también será suministrado por Cárnicas Frial, S.A.

3.1 Presentación de los productos

Los individuos recibirán los productos de la gama Vidalim®, suministrados por Cárnicas Frial, S.A. Los productos serán facilitados en envases monodosis, cuya composición nutricional está definida en el **ANEXO I**. Los envases de ambos productos deberán ser iguales, y se distinguirán por el número de lote. Poseerán etiquetas en las que figuren las condiciones de conservación y la fecha de caducidad.

3.2 Régimen posológico

Los pacientes recibirán, en cada día de visita, el número justo de productos para ser administrado hasta la siguiente consulta, sean de la gama Frialvida® con Vidalim® o de los productos placebo. La empresa Cárnicas Frial, S.A. se encargará de proporcionar los productos cárnicos a los Médicos responsables del Estudio para su posterior distribución a los pacientes.

3.3 Vía y método de administración

Tanto los productos de la gama Frialvida® con Vidalim® como los productos placebo se administrarán por vía oral, como parte de una comida, respetando dos puntos fundamentales:

- consumir 100 g/día de producto durante 3 días/semana (de lunes a viernes)
- administrar la toma a lo largo del día, sustituyendo otro tipo de alimento de intercambio.

3.4 Asignación del tratamiento

Durante la visita 1 (Mes 0), a los pacientes que cumplan todos los criterios de inclusión se les asignará el “número de tratamiento” de acuerdo con una tabla de aleatorización disponible en orden secuencial. Este número será un número de aleatorización de 3 dígitos, y figurará en el producto que se suministre al paciente, así como en la página del Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) correspondiente.

3.5 Enmascaramiento

El enmascaramiento del estudio se conseguirá mediante el uso de envases idénticos, tanto para productos de la gama Frialvida® con Vidalim® como para el producto placebo, que los pacientes abrirán y consumirán en su domicilio

El procedimiento de aleatorización se llevará a cabo empleando un sistema validado SPSS que asigna aleatoriamente y de forma automática los grupos de tratamiento a los números de aleatorización, y que será proporcionado por la Unidad de Investigación del Hospital La Paz. El esquema de aleatorización consta de una tabla estratificada por género.

Los datos de aleatorización son estrictamente confidenciales; sólo tendrán acceso a ellos las personas autorizadas, hasta el momento del desenmascaramiento. Una vez que se haya completado el estudio, verificado el archivo de datos y determinado cualquier violación del protocolo, se abrirán los códigos para proceder al análisis de los datos.

3.6 Tratamiento de continuación

a) *Cumplimiento terapéutico*

A lo largo del periodo experimental, los individuos realizarán visitas al pediatra para llevar a cabo un estricto control clínico, y evaluar el grado de cumplimiento del protocolo. Se instruirá a los pacientes para que registren su consumo del producto en su Diario (ANEXO II). Durante las visitas programadas, el investigador o la persona designada revisarán el Diario del paciente para comprobar que ha utilizado los productos de estudio según las instrucciones.

b) *Tratamientos concomitantes*

En cada visita, se documentará en el CRD todos los medicamentos concomitantes.

3.7 Interrupción o supervisión del tratamiento

Se documentará los motivos que puedan haber llevado algún de los individuos no seguir en el estudio, que pueden ser razones personales o por cualquiera siguientes:

- a. Acontecimientos adversos (como por ejemplo enfermedades, muerte, etc.)
- b. Pérdida de contacto durante el seguimiento
- c. Violación del protocolo

Se registrarán la fecha y las razones de cualquier abandono prematuro del ensayo.

En este estudio, los pacientes que abandonen o que sean retirados del mismo no serán reemplazados y no se recogerá ninguna información adicional sobre ellos.

4. Programa de visitas y valoraciones

El estudio y seguimiento de los pacientes se llevará a cabo en el Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil de la Paz.

Calendario de visitas:

Mes 0 Visita 1	Mes 3 Visita 2	Mes 6 Visita 3	Mes 9 Visita 4	Mes 12 Visita 5
-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	--------------------

Visita 1 (Mes 0)

Se evaluará a los individuos para ver si cumplen los criterios básicos de inclusión/exclusión y, a los indicados, se evaluará su disponibilidad, su motivación y su aceptación, para tener acceso a los resultados de las analíticas de sangre y para ser distribuido de forma aleatoria en cualquiera de los grupos experimentales.

Se les informará verbalmente y por escrito sobre el estudio, debiendo ser firmado el consentimiento informado por su representante legal, al ser menores de edad (**ANEXO III**), tras haber recibido y comprendido la información mencionada.

Una vez obtenido el consentimiento informado, se procederá a adjudicar el número de aleatorización que será el siguiente número disponible en la tabla de aleatorización.

Se recogerán datos de la historia clínica, tiempo de duración de la diabetes, patologías asociadas, edad cronológica, edad ósea, sexo, estadio de Tanner. Tensión arterial. Antropometría: peso, talla, percentiles de IMC, PCT, velocidad de crecimiento.

Se realizará bioquímica en sangre: Hemograma completo, glucemia basal, HbA1c, colesterol total, HDL-Col, Triglicéridos. Creatinina, urea, proteínas totales.

Se analizarán parámetros oxidativos tanto en sangre como en orina. Microalbuminuria de 8 horas, cetonuria y glucosuria.

Se realizará una Encuesta Nutricional Completa (Frecuencia de Consumo Alimentario, Registro Alimentario Habitual)

Se facilitará el material que deberá ser cumplimentado y entregado en la próxima consulta:

- un diario para que registre cada día la ingesta del producto y cualquier síntoma que experimente
- un diario donde registrará 3 días de su alimentación habitual

Los individuos recibirán los envases del producto necesarios hasta la siguiente visita.

Visita 2, 3 y 4 (Mes 3,6 y 9)

Estas visitas serán realizadas trimestralmente. En cada tiempo se evaluará la adherencia y tolerancia al tratamiento, confirmando en el CRD el consumo y la cantidad total del producto ingerido. Recogerá el material facilitado en la visita anterior, que deberá estar debidamente rellenado.

Se realizará una Encuesta Nutricional Completa (Frecuencia de Consumo Alimentario, Registro Alimentario Habitual), Estadío de Tanner, Tensión Arterial, Antropometría (peso, talla, perpercentiles de IMC y PCT), glucemia basal.

El medico realizará una exploración física completa y garantizará la buena marcha del proceso.

Se realizará bioquímica en orina: Cetonuria y glucosuria.

Se analizarán parámetros oxidativos en orina.

Se facilitará el material que deberá ser cumplimentado y entregado en la próxima consulta:

- un diario para que registre cada día la ingesta del producto y cualquier síntoma que experimente
- un diario donde registrará 3 días de su alimentación habitual

En esta misma visita también se concertarán las fechas y horarios para las demás visitas

programadas, correspondientes a las visitas 3, 4 y 5.

Los individuos recibirán los envases del producto necesarios hasta la siguiente visita.

Visita 5 (mes 12)

Se repetirán todos los análisis listados para la visita 1. Finaliza el estudio.

V. PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGIA

1. Variables utilizadas en el estudio (datos):

1.1 Datos personales, anamnesis, medicación concomitante y hábitos nutricionales

Se recogerán los siguientes datos personales: fecha de nacimiento, sexo, fecha de diagnóstico de la diabetes y enfermedades asociadas.

Toda la medicación concomitante tomada en el momento de ingresar en el estudio y durante; deberá registrarse con su nombre comercial. La información recogida especificará indicación y fecha de inicio.

Se aplicará una encuesta dietética completa cada tres meses, anotando todos los alimentos ingeridos a lo largo del día y por semana (consumo semanal de grupos de alimentos) (**ANEXO V**). Estos datos nos darán información sobre la alimentación realizada por el paciente y serán evaluados cualitativamente, clasificando la dieta en cuanto a diversidad y equilibrio siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC 2004).

1.2. Exploración física

Antropometría: peso, altura, índice de masa corporal (IMC), pliegue cutáneo tricipital (PCT) y estadio puberal (Tanner). En todas las visitas, se medirá la tensión arterial percentilada según la NHBPEP 2004.

- Peso

Expresado en kilogramos, el peso corporal se mide mediante una báscula digital de uso clínico (capacidad 0 – 150 kg), con la persona posicionada de espalda al visor, sin zapatos, con un mínimo de prendas de abrigo (pantalón y camiseta), talones juntos, mirada hacia frente y postura corporal recta. Se percentilará según las tablas españolas de 2008 (Carrascosa et al).

- Altura

La medición de la altura se hará mediante un tallímetro de precisión milimétrica, con la persona posicionada de espalda al mismo, sin zapatos, talones juntos, mirada hacia frente y postura corporal recta. Se percentilará según las tablas españolas de 2008 (Carrascosa et al).

- Índice de Masa Corporal (IMC)

El IMC es la relación entre el peso corporal (kg) y la altura (m) al cuadrado del individuo: $\text{Peso}/\text{Altura}^2$. Se percentilará según las tablas españolas de 2008 (Carrascosa et al).

- Pliegue Cutáneo Tricipital (PCT)

El pliegue cutáneo ciertamente es un buen parámetro para la valoración de la grasa subcutánea.

Ya se conoce el hecho de que aproximadamente $\frac{1}{3}$ de la grasa corporal está localizada en la región subcutánea, tanto en los hombres como en las mujeres. Sin embargo, hay una considerable variación biológica en los depósitos de la grasa, los cuales pueden ser subcutáneos, intermusculares, intramusculares, o intra órganos; así como también en los lípidos esenciales en la médula ósea y en el Sistema Nervioso Central. Esta variación biológica sucede, fundamentalmente, en función de la edad y sexo.

La medición del pliegue tricipital se hará mediante un calibrador de pliegues cutáneos Holtain, cuyas especificaciones se encuentran en el **ANEXO IV**. Tales medidas se harán en triplicado, cogiendo el valor, en milímetros, más cercano a la aguja del aparato tras 2 segundos de pinzado el pliegue. Para efecto de cálculo, se tomará la media de las tres mediciones de cada pliegue.

La persona evaluada debe estar de pie, se hará en el brazo no dominante a través de la compresión del pliegue con los dedos pulgar e índice de la mano derecha, tratando de separar el plano muscular mediante movimientos laterales. Una vez teniendo el pliegue

formado, se aplica el cáliper para proceder con la lectura. Se coge el pliegue, verticalmente, 1 cm arriba de la línea del punto medio del brazo, entre acromion y olécranon, con aplicación del cáliper justo en la línea determinada, en la parte posterior del brazo.

Se percentilará según las tablas españolas de 1988 (Hernández et al).

1.3. Exploraciones complementarias

Se realizará una edad ósea al principio y al final del estudio, y se evaluarán, junto con los parámetros de control metabólico (HbA1c) que se realizan habitualmente cada 3 meses, microalbuminuria de 8 horas (inicio y final del estudio) y parámetros bioquímicos, por métodos no invasivos, que permitan valorar el estrés oxidativo (cada 3 meses en orina, y al inicio y al final del estudio en sangre).

Parámetros de estrés oxidativo: En estas muestras se medirán parámetros que proporcionen información sobre estrés oxidativo (**ANEXO VI**):

- Valoración de vitamina E en plasma y su cociente con lípidos
- Valoración de malonil-aldehído mediante Tbars en plasma
- Valoración de 8-isoprostano en orina
- Determinación de perfiles metabólicos en plasma
- Determinación de perfiles metabólicos en orina (polaridad normal e invertida)

Estos análisis de control se llevarán a cabo en la Universidad San Pablo CEU, empleando los métodos puestos a punto por los investigadores de esta institución, y, en el caso de la metabólica en plasma, en el Department of BioGeoChemistry and Analytics, Institut für Ökologische Chemie, Munich (Alemania).

Se tomarán como valores de referencia los valores de isoprostanos descritos para control y diabéticos (Tabla 6) (31).

Tabla 6. Valores de referencia de 8-IP

8-IP en orina (pg/mg creatinina)	Control	Diabéticos
Media	170	375
Rango	125-275	125-625

1.4. Valoración de la eficacia y la seguridad

Parámetro de eficacia principal

Se entiende por eficacia principal del alimento a la modificación estadísticamente significativa de los parámetros bioquímicos de estrés oxidativo como vitamina E, malonil-aldehído (Tbars), 8-isoprostano y capacidad antioxidante del plasma, medidos en análisis bioquímicos de sangre y orina (empleando los procedimientos descritos en el Anexo VI) a los niños participantes en el estudio.

Parámetro de eficacia secundario

Se entiende por eficacia secundaria del alimento la modificación estadísticamente significativa del perfil lipídico y glucémico (HbA1C) de los niños participantes en el estudio, valorado mediante análisis bioquímico de sangre.

Valoración de la seguridad

Se entiende por seguridad del alimento la ausencia de acontecimientos adversos directamente asociables al mismo, así como la tolerancia al tratamiento. También se considerará seguro cuando su ingesta no implique cambios adversos en los valores hematológicos, bioquímicos y en las constantes vitales, así como en el crecimiento normal del paciente.

La seguridad se valorará según los siguientes parámetros:

1. La valoración de la seguridad consistirá en vigilar y registrar todos los **acontecimientos adversos**, incluidos los **acontecimientos adversos graves**.

2. La tolerabilidad se valorará mediante el registro de la incidencia de signos/síntomas de intolerancia gastrointestinal, como náuseas, diarrea, distensión abdominal o cualquier otra alteración gastrointestinal.
3. Además, se controlarán regularmente los valores hematológicos y de bioquímica sérica, así como las constantes vitales y el crecimiento normal del paciente.

Acontecimientos adversos

Un acontecimiento adverso es cualquier signo, síntoma o afección no deseada que aparezca tras el inicio de la administración del producto del estudio, aunque se considere que no está relacionado con el producto (o tratamiento) del estudio. Toda la información sobre los acontecimientos adversos, ya sea ofrecida por el paciente, descubierta a través de las preguntas del investigador, o detectada mediante la exploración física, las pruebas de laboratorio u otros medios, se recogerá y registrará en el CRD de acontecimientos adversos.

Las enfermedades o afecciones presentes antes de iniciar el tratamiento del estudio sólo se considerarán acontecimientos adversos si empeoran tras el inicio del mismo. Los acontecimientos adversos (pero no los acontecimientos adversos graves) que aparezcan antes de iniciarse el tratamiento de estudio pero después de la firma del consentimiento informado, se registrarán en la parte final del CRD, en el Registro de acontecimientos adversos, dejando clara la fecha de inicio de los síntomas. Las anomalías en los resultados de laboratorio o de las pruebas constituirán acontecimientos adversos sólo en caso de que provoquen signos o síntomas clínicos, se consideren clínicamente significativos o exijan tratamiento, y se registrarán en el CRD de acontecimientos adversos en el apartado correspondiente a los signos, síntomas o diagnósticos asociados.

Dentro de lo posible, cada acontecimiento adverso se describirá también por

1. su duración (fecha de inicio y fechas de continuación/finalización);
2. su nivel de intensidad (leve, moderado, intenso);
3. su relación con el producto del estudio (sí, no, es posible);
4. las medidas adoptadas, si procede.

1.5. Recogida de otros datos

Percepción y aceptabilidad de los productos. En las visitas 1, 2, 3, 4 y 5, se evaluarán la aceptabilidad y percepción del tratamiento adjudicado, aplicando un cuestionario (**ANEXO VII**) y confirmando en el CRD el consumo y la cantidad total del producto ingerido (**ANEXO II**).

Tolerancia gastrointestinal. En todas las visitas, se evaluarán los siguientes síntomas gastrointestinales, preguntando al paciente si padece alguno de ellos (**ANEXO VIII**):

- Náuseas
- Acidez
- Diarrea
- Distensión abdominal
- Halitosis

2. Gestión de los datos

2.1. Recogida de datos

El personal designado (médico) deberá introducir la información requerida por el protocolo en los cuadernos de recogida de datos (CRD).

Se enviarán los originales de los CRD al departamento de Gestión de datos de la organización de investigación. Una de las copias permanecerá en el centro de investigación y la otra quedará en manos del personal médico. Todos los CRD se comprobarán para identificar cualquier acontecimiento adverso grave.

2.2. Gestión de datos y control de calidad

El equipo investigador hará la Gestión de datos e introducirá la información de los CRD

en la base de datos del estudio a tal fin por ellos diseñada. Posteriormente, los datos introducidos serán validados sistemáticamente mediante verificaciones de edición por ordenador, verificaciones manuales y listados de depuración de datos. Las correcciones aprobadas se filtrarán mediante listados, y luego se actualizarán y documentarán en la base de datos.

Cualquier otro error, omisión o contradicción se introducirá en los impresos de solicitud de datos, que se enviarán a los monitores, y al investigador del centro si procede, para su resolución.

Se llevarán a cabo auditorias del control de calidad de todos los datos fundamentales de seguridad y eficacia de la base de datos, cuando la información de todos los pacientes esté completa y no haya solicitudes pendientes.

Los resultados de las pruebas bioquímica realizadas se llevarán a cabo en la Universidad de San Pablo CEU (parámetros de estrés oxidativo tanto de sangre como de orina) y el laboratorio del Hospital Universitario La Paz (resto de analíticas), se procesarán de forma centralizada, y los resultados se enviarán a los investigadores principales para proceder a la introducción en la base de datos. Cuando se considere que la base de datos es precisa y está completa, se bloqueará.

2.3. Tratamiento estadístico de los datos y programas utilizados

a) Los métodos estadísticos utilizados para el tratamiento de los datos serán:

- El análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y el posterior test de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparar los valores medios.
- El análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas, para contrastar de forma conjunta los efectos de los dos factores estudiados: el tiempo como factor dentro de los sujetos, con 5 niveles (inicio, 3, 6, 9 y 12 meses), y el tipo de participación como factor entre sujetos (grupos: 1.-Diabético CON antioxidante, 2.-Diabético SIN antioxidante, y 3.-Control sano CON antioxidante), y el de su interacción.
- El Análisis de Componentes Principales para examinar la relación entre las variables analizadas, previamente estandarizadas, y entre los individuos.
- El Análisis de Conglomerados para ver el agrupamiento de los individuos a partir de las variables analizadas, previamente estandarizadas.
- El Análisis Lineal Discriminante para ver la discriminación entre los grupos.
- Los métodos estadísticos utilizados en metabolómica y basados en el análisis multivariante son el PCA (Principal Component Analysis - análisis de componentes principales), PLS-DA (Partial Least Squares - análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales) y OSC-PLS (tratamiento de los datos con Ortogonal Signal Correction - corrección ortogonal de la señal, y aplicación posterior del modelo PLS). Para la validación de los resultados obtenidos con estos métodos estadísticos y, por tanto, para comprobar si las interpretaciones reflejan la realidad, se utilizarán el test de permutación y la validación cruzada Q^2 .

b) Los programas utilizados para el procesamiento de datos serán STATISTICA para Windows, versión 7.1 (StatSoft, Inc., 2005, www.statsoft.com), y SPSS para Windows, versión 15.0 (SPSS Inc. 1989-2006, www.spss.com).

2.4. Divulgación y confidencialidad

Al firmar el protocolo, el Investigador principal y los investigadores participantes aceptaron mantener la confidencialidad estricta de toda la información proporcionada.

Los documentos de estudio (protocolos, manual para los Investigadores, cuadernos de recogida de datos y otros materiales) se han almacenado adecuadamente para asegurar su confidencialidad.

Los representantes de la universidad y eventualmente las autoridades sanitarias y/o

miembros del Comité Ético de Investigación Clínica que tengan acceso a la historia clínica de los pacientes se han comprometido a la más estricta confidencialidad.

De acuerdo con la ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal los datos personales que se le requirieron a los pacientes (por ejemplo: edad, sexo, datos de salud) fueron los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecen el nombre del paciente, y su identidad no ha sido revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio.

3. Aspectos éticos

Este estudio se ha realizado de acuerdo con el protocolo y los principios de la Buena Práctica Clínica:

1. Guía ICH para la Buena Práctica Clínica (ICH Harmonised Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice) 1996.
2. Directiva 91/507/EEC, Las normas que rigen los productos medicinales en la Comunidad Europea (The Rules Governing Medicinal Products in the European Community).
3. Código 21 de las regulaciones federales de EE.UU. que trata de los estudios clínicos (incluidas las secciones 50 y 56 relativas al consentimiento informado y las regulaciones IRB).
4. Declaración de Helsinki y enmiendas, relativas a la investigación médica en humanos (Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects). Esto incluye la nota de aclaración del párrafo 29 que acompaña a la versión de Edimburgo de 2000 de la Declaración de Helsinki.

VI. RESULTADOS y DISCUSION

Son escasos los estudios que evalúan el estrés oxidativo en pacientes pediátricos con Diabetes Mellitus tipo 1, y todavía menos aquellos que ensayan prospectivamente a edades tan tempranas un tipo de terapia antioxidante con el objetivo de valorar sus posibles beneficios en lo que concierne a la reducción de las complicaciones dependientes de dicho estrés. Se pretende contribuir a este propósito evaluando el estrés oxidativo, el perfil lipídico y el control metabólico de pacientes prepuberales con Diabetes Mellitus tipo 1 ya establecida, en dos momentos diferentes: al inicio del estudio y tras doce meses de terapia antioxidante (carnósico y derivados) combinada con ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (PUFAs). De igual forma, como se verá a continuación, se examinará la seguridad, adherencia y tolerancia de la misma con la intención de no desplazar otros grupos de alimentos de la ingesta habitual.

En lo que sigue, se describirán y se comentarán conjuntamente los resultados obtenidos y se compararán con otros estudios de objetivos similares.

1. Descripción de la muestra

De acuerdo con la metodología descrita, la reclutación duró tres meses, de noviembre de 2007 a enero de 2008, lográndose un total de 50 individuos prepuberes, de ambos sexos y con edades comprendidas entre 6 y 9 años para las niñas (media de 8.33 años) y 6-10 años (8,72 años) para los niños. Fueron divididos en los tres grupos de tratamiento previamente definidos, obteniéndose 17 pacientes para el grupo 1 (diabéticos con tratamiento antioxidante), 17 para el grupo 2 (diabéticos sin tratamiento antioxidante) y 16 para el grupo 3 (pacientes no diabéticos con tratamiento antioxidante). La distribución de sexos fue casi uniforme, con predominio global del sexo varón (27 versus 23) pero sin diferencias significativas entre las dos proporciones ($p = 0.43 > 0.05$).

Muestra significativa. El estudio comenzó en febrero de 2008 y finalizó en febrero de 2009, periodo en el que hubo un abandono por lo que la muestra final objeto del análisis ulterior fue de 49 pacientes (Tabla 7). El abandono se correspondía con un paciente del grupo 1 y los motivos de dicho evento fueron ajenos a cualquier acontecimiento dependiente del propio ensayo.

Tabla 7. Muestra final

	♂	♀	Totales
Grupo 1 (D + A)	9	7	16
Grupo 2 (D + P)	9	8	17
Grupo 3 (ND + A)	9	7	16
	27	22	49

D: Diabético; ND: No diabético; A: Antioxidantes; P: Placebo

Muestra homogénea. Como ya se ha comentado, la distribución de sexos ha sido casi uniforme. Otros datos a favor de la homogeneidad son:

- Una duración de la diabetes parecida, con una media de 3.2 años (mínimo 2 años y máximo 5.3)
- El control metabólico similar entre todos los pacientes (véase más adelante).
- Un cumplimiento terapéutico homogéneo y la ausencia de acontecimientos relevantes que puedan haber interferido en los resultados (régimen dietético habitual, efectos adversos de los productos, toma de medicamentos, patología concomitante, etc). Véase siguiente apartado.

2. Registro de datos y acontecimientos que pueden interferir en la evolución del estudio e interpretación de los resultados

a) **Cumplimiento terapéutico.** Las medias de cumplimiento (%) para los distintos grupos se recogen en Tabla 8. El grupo 1 muestra una media de cumplimiento global en todo el tiempo del estudio del 83.41%, el grupo 2 del 82.78% y el grupo 3 del 86.73%, para lo que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$, ANOVA de medidas repetidas, Tabla 9). Las medias de cumplimiento totales para cada intervalo de tiempo entre las visitas son: entre los 0 y 3 meses del 86.16%, entre los 3 y 6 meses del 84.72%, entre los 6 y 9 meses del 87.22% y los últimos meses de estudio del 79.10%. Pese a esta tendencia final de menor cumplimiento, no se han obtenido diferencias significativas entre dichos periodos ($p > 0.05$, Tabla 9). La Figura 16 muestra dichas medias y la tendencia en el tiempo.

Tabla 8. Medias del cumplimiento terapéutico (%)

Grupo	Tiempo	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1. Diabético CON antioxidante	0-3 meses	83,625	4,773	74,017	93,233
	3-6 meses	82,188	5,889	70,334	94,041
	6-9 meses	86,813	4,045	78,671	94,954
	9-12 meses	81,000	6,697	67,520	94,480
2. Diabético SIN antioxidante	0-3 meses	86,000	4,631	76,679	95,321
	3-6 meses	84,235	5,713	72,735	95,735
	6-9 meses	87,059	3,924	79,161	94,957
	9-12 meses	73,824	6,497	60,746	86,901
3. Control sano (CON antioxidante)	0-3 meses	88,875	4,773	79,267	98,483
	3-6 meses	87,750	5,889	75,896	99,604
	6-9 meses	87,813	4,045	79,671	95,954
	9-12 meses	82,500	6,697	69,020	95,980

Tabla 9. ANOVA de medidas repetidas para el cumplimiento terapéutico

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	1391956	1	1391956	1257.83	0.000
Grupo	588	2	294	0.265	0.768
Error	50905	46	1107		
TIEMPO	1919	3	640	2.423	0.068
TIEMPO*grupo	611	6	102	0.386	0.887
Error	36433	138	264		

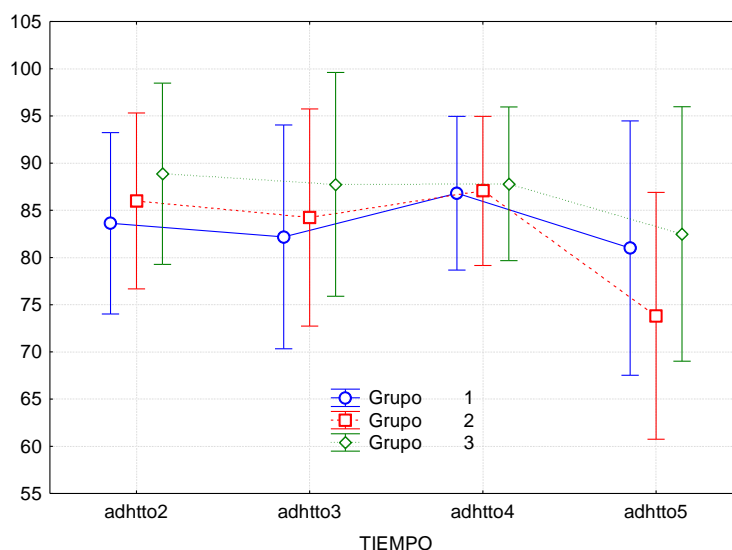


Figura 16. Medias de adherencia al tratamiento a lo largo del tiempo de estudio (adhtto2=3 meses, 3=6 meses, 4=9 meses, 5=Final)

b) Encuesta dietética. La encuesta dietética realizada al principio del estudio y cada 3 meses no mostró diferencias dentro de un mismo paciente a lo largo del mismo ni entre los grupos de pacientes diabéticos. Respecto al grupo control, dado que éste estaba constituido por los hermanos sanos de cualquiera de los grupos anteriores y puesto que esto implicaba un régimen dietético similar, tampoco se encontraron diferencias significativas con los primeros salvo por un consumo algo más elevado de hidratos de carbono de absorción rápida.

c) Registro de acontecimientos adversos. Durante el transcurso del estudio no se registraron acontecimientos adversos de ningún tipo en probable relación con la ingesta de los productos cárnicos (tolerancia gastrointestinal) ni signos o síntomas inexplicables de otra índole.

d) Percepción y aceptabilidad de los productos. La percepción y aceptabilidad de los productos se ha catalogado globalmente de un 73% sin que ello haya significado, salvo por 2 casos, una reducción significativa (<50%) de la ingesta. Tampoco hay diferencia significativa entre los grupos que consumen el producto con antioxidante (1 y 3) y el que lo consume sin antioxidante (2): 75% versus 70%.

e) Toma de medicamentos. La única medicación tomada crónicamente o durante largo tiempo del estudio por parte de algunos pacientes era levotiroxina sódica a dosis sustitutivas por tiroiditis autoinmune. Han sido tres casos (dos del grupo 1 y uno del grupo 2).

f) Enfermedades asociadas y complicaciones.

- *Enfermedad celiaca.* Se han encontrado 8 casos de enfermedad celiaca previamente diagnosticada, cuatro en el grupo 1 y cuatro en el grupo 2; todos ellos bien controlados (anticuerpos antitransglutaminasa IgA normales). Como se verá más adelante, tampoco se han encontrado diferencias entre los pacientes celíacos y los que no la padecen en lo que respecta al perfil oxidativo y el resto de las variables estudiadas, ni al principio ni al final del estudio

- *Tiroiditis autoinmune.* Tres casos, dos del grupo 1 y uno del grupo 2; todos ellos bien controlados desde el punto de vista de la función tiroidea. Tampoco existen diferencias en el perfil oxidativo ni lipídico entre estos y el resto de los pacientes del estudio.

- Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio presentaban *complicaciones* propias de la enfermedad, a saber, retinopatía, nefropatía o neuropatía diabéticas.

DISCUSION sobre el Cumplimiento y otros Factores de Confusión que pueden interferir en la interpretación de los resultados.

El nivel de cumplimiento entre grupos y a lo largo del tiempo puede considerarse elevado en nuestro estudio y relativamente constante, hechos que implican una adecuada adherencia. A esta buena adherencia contribuyen, indudablemente, la ausencia de acontecimientos adversos derivados del consumo (episodios de intolerancia gastrointestinal y signos o síntomas inexplicables de otra índole) así como la buena percepción y aceptabilidad de los productos (73 sobre 100 sin diferencias entre grupos, con y sin antioxidante). La adherencia obtenida, además, tiene más valor al tratarse de una intervención dietética de largo tiempo de evolución y llevada a cabo en niños con edades comprendidas entre los 6 y 10 años donde era esperable, a priori, que el cumplimiento fuera decayendo progresiva y considerablemente. Por último, resulta también destacable como dicha adherencia no ha supuesto una modificación de la dieta previa en lo que respecta a la proporción de los principios inmediatos, ni tampoco ha implicado efectos negativos en los parámetros analíticos básicos ni en las medidas antropométricas de los pacientes como se mencionará más adelante.

Cumplidos estos objetivos secundarios, puede proseguirse en la discusión del resto de los resultados con el fin de concluir con los demás objetivos propuestos en este estudio.

3. Evaluación de la eficacia

a) Evolución de la HbA1C.

La Tabla 10 y la Figura 3 muestran la evolución de la HbA1C para los grupos 1 y 2 (diabéticos) y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos para cada visita ni en la evolución dentro del mismo grupo ni tampoco en la evolución entre ambos grupos (ANOVA medidas repetidas, Tabla 11).

Tabla 10. Valores de la HbA1C (%)

<i>Grupo</i>	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	7.831	1.447
	3 meses	7.563	0.9229
	6 meses	7.731	1.0619
	9 meses	7.550	0.7285
	Final	7.788	0.8876
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	7.471	0.6517
	3 meses	7.394	0.7040
	6 meses	7.629	0.8680
	9 meses	7.465	0.7185
	Final	7.659	0.8882

Tabla 11. ANOVA de medidas repetidas de HbA1C.

<i>Efecto</i>	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
<i>Intercept</i>	9541.74	1	9541.74	3099	0.000
<i>Grupo</i>	1.177	1	1.177	0.382	0.540
<i>Error</i>	95.4	31	3.079		
TIEMPO	1.559	4	0.390	2.265	0.065
TIEMPO*grupo	0.411	4	0.103	0.597	0.665
<i>Error</i>	21.339	124	0.172		

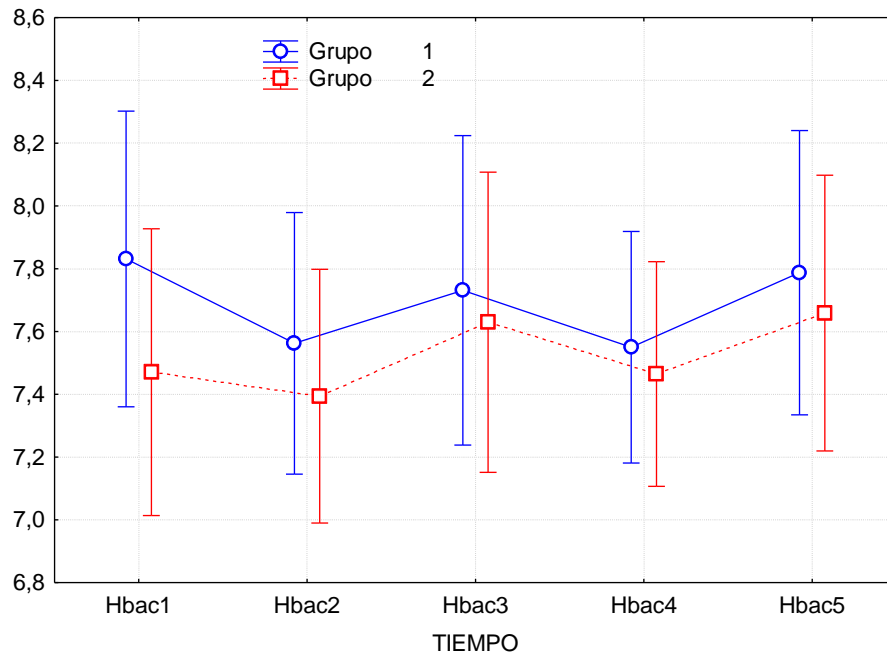


Figura 17. Medias de HbA1C a lo largo del estudio para los grupos 1 y 2 (1=Inicio, 2=3 meses, 3=6 meses, 4=9 meses, 5=Final)

DISCUSION sobre la evolución de la HbA1C en el ensayo.

Pocos estudios encuentran correlación entre algunos parámetros de estrés oxidativo (por ejemplo, Tbars (71)) y el nivel de HbA1C. En tales casos, se interpreta fácilmente que un mal control metabólico es el que determina el grado de estrés oxidativo por los mecanismos ya comentados pero, como se deduce de algunos otros estudios (72, 76), ambas situaciones no parecen ir siempre juntas de la mano. Es por ello que se podría sugerir la determinación conjunta y periódica de parámetros oxidativos y de HbA1C para evaluar mejor el riesgo de complicaciones microvasculares. En nuestro estudio, donde no se han encontrado diferencias entre las HbA1C de los grupos 1 y 2 al final del estudio ni tampoco diferencias sustanciales de HbA1C entre los pacientes diabéticos, no podemos sacar conclusiones al respecto.

b) Evolución del índice de masa corporal (IMC).

La Tabla 12 y la Figura 18 muestran la evolución del IMC para los 3 grupos y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos para cada visita ni tampoco en la evolución entre los grupos (ANOVA medidas repetidas, Tabla 13). La diferencia estadística observada en el tiempo de forma global (medias totales de los IMC en los tres grupos) no tiene relevancia por cuanto la magnitud de dicha diferencia es mínima en términos clínicos y, por tanto, no requiere interpretación alguna.

Tabla 12. Valores del IMC

<i>Grupo</i>	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	16.318	1.772
	3 meses	16.825	2.180
	6 meses	16.612	1.928
	9 meses	16.837	1.948
	Final	17.156	2.076
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	16.835	2.235
	3 meses	17.911	2.232
	6 meses	17.123	1.872
	9 meses	17.388	1.888
	Final	17.270	2.259
3. Control CON antioxidante	Inicio	17.356	2.438
	3 meses	17.781	2.260
	6 meses	17.900	1.980
	9 meses	17.750	2.024
	Final	17.987	2.379

Tabla 13. ANOVA de medidas repetidas para IMC

<i>Efecto</i>	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
<i>Intercept</i>	73014.8	1	73014.8	3687.1	0.000
<i>Grupo</i>	40.56	2	20.28	1.024	0.367
<i>Error</i>	910.93	46	19.80		
<i>TIEMPO</i>	14.22	4	3.55	4.591	0.001
<i>TIEMPO*grupo</i>	6.23	8	0.78	1.006	0.432
<i>Error</i>	142.44	184	0.77		

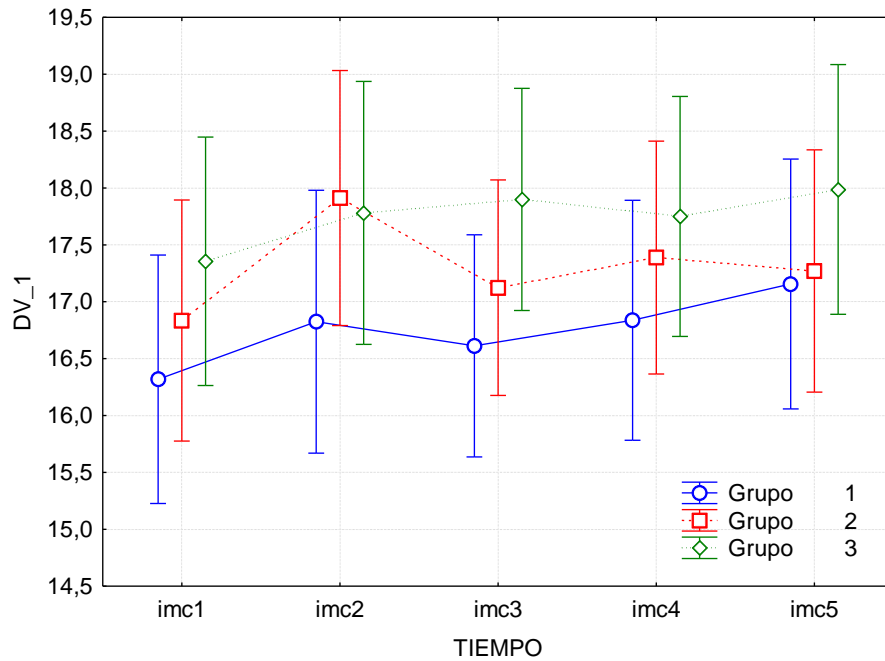


Figura 18. Medias de IMC a lo largo del estudio en los 3 grupos (1=Inicio,2=3 meses, 3=6 meses, 4=9 meses, 5=Final)

c) Evolución del pliegue tricipital.

La Tabla 14 y la Figura 19 muestran la evolución del pliegue tricipital para los 3 grupos y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos para cada visita ni en la evolución (ANOVA medidas repetidas, Tabla 15).

Tabla 14. Valores del pliegue tricipital (cm).

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	14.2	4.63
	Final	15	5.05
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	16	5.26
	Final	15.8	4.54
3. Control CON antioxidante	Inicio	16.6	8.49
	Final	16.2	8.08

Tabla 15. ANOVA de medidas repetidas para pliegue tricipital.

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	63382.18	1	63382.18	421.19	0.000
Grupo	62.36	2	31.18	0.20	0.813
Error	6922.24	46	150.48		
TIEMPO	74.57	4	18.64	2.58	0.038
TIEMPO*grupo	25.32	8	3.17	0.4391	0.896
Error	1326.6	184	7.21		

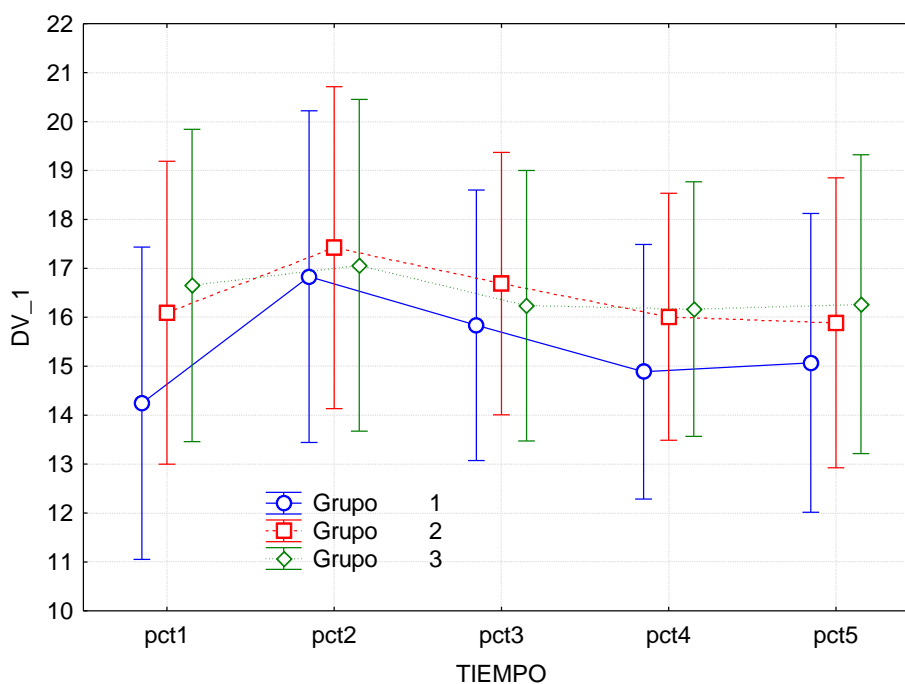


Figura 19. Medias de pliegue tricéptico a lo largo del estudio (1=Inicio, 2=3 meses, 3=6 meses, 4=9 meses, 5=Final)

d) Evolución de la tensión arterial sistólica y diastólica.

La Tabla 16 y Tabla 18, y la Figura 20 y Figura 21 muestran la evolución de la tensión arterial sistólica y diastólica para los 3 grupos y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos para cada visita ni en la evolución dentro del mismo grupo ni tampoco en la evolución (ANOVA medidas repetidas, Tabla 17 y Tabla 19). La diferencia estadística observada en el tiempo de forma global para la sistólica (medias totales de las cifras en los tres grupos) no tiene relevancia por cuanto la magnitud de dicha diferencia es mínima en términos clínicos y, por tanto, no requiere interpretación alguna.

Tabla 16. Valores de la tensión arterial sistólica (mmHg)

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	106.5	7.25
	Final	105.7	8.14
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	101.7	6.87
	Final	105.8	6.65
3. Control CON antioxidante	Inicio	102.5	11.9
	Final	110.1	7.86

Tabla 17. ANOVA de medidas repetidas para TAS.

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	2605520	1	2605520	19926.16	0.000
Grupo	242	2	121	0.92	0.404
Error	6015	46	131		
TIEMPO	1255	4	314	6.10	0.000
TIEMPO*grupo	400	8	50	0.97	0.459
Error	9473	184	51		

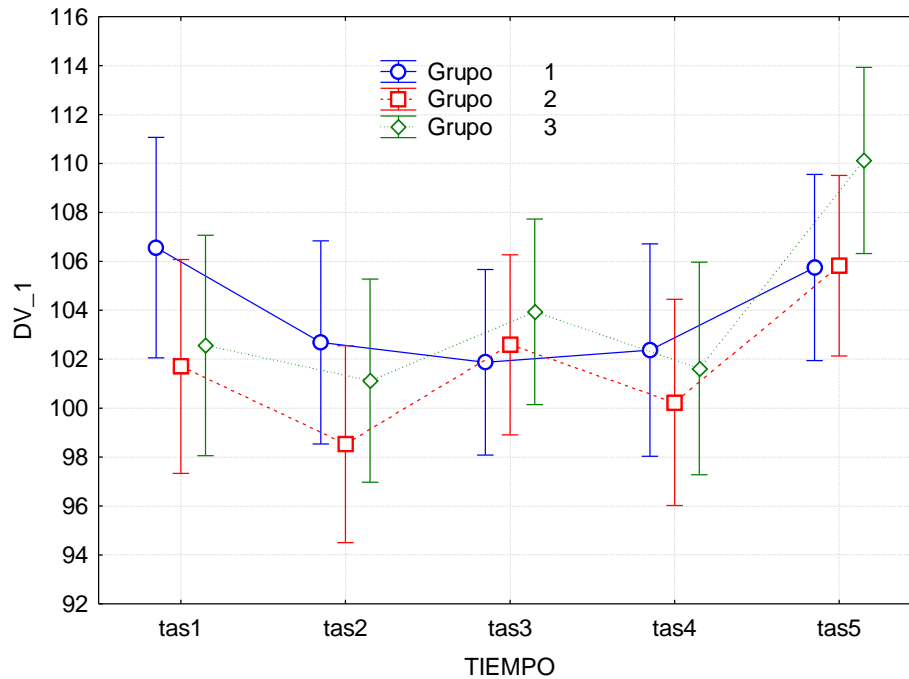


Figura 20. Medias de TAS a lo largo del estudio (1=Inicio, 2=3 meses, 3=6 meses, 4=9 meses, 5=Final)

Tabla 18. Valores de la tensión arterial diastólica (mmHg)

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	61.5	9.19
	Final	60.6	8.76
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	57	6.76
	Final	58	9.20
3. Control CON antioxidante	Inicio	58.1	7.90
	Final	61.3	9.70

Tabla 19. ANOVA de medidas repetidas para TAD

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	824300.8	1	824300.8	6583.5	0.000
Grupo	81.1	2	40.6	0.324	0.742
Error	5759.5	46	125.2		
TIEMPO	506.4	4	126.6	2.232	0.067
TIEMPO*grupo	357.0	8	44.6	0.787	0.614
Error	10435.3	184	56.7		

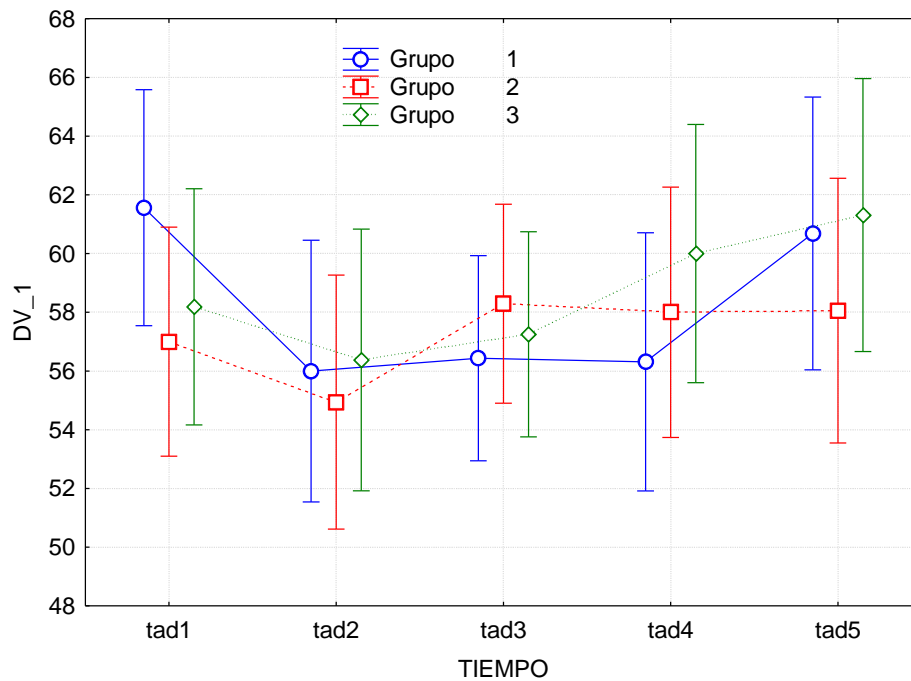


Figura X.

*Figura 21. Medias de TAD a lo largo del estudio
(1=Inicio, 2=3 meses, 3=6 meses, 4=9 meses, 5=Final)*

DISCUSION sobre la evolución de los Parámetros Antropométricos y la Tensión Arterial en el ensayo.

Una normalización de la relación $\omega 6/\omega 3$ en la dieta se ha demostrado reduce parte de los componentes que configuran el síndrome metabólico, a saber, la insulino-resistencia y el riesgo diabetógeno, el perfil lipídico, la tensión arterial y el índice de masa corporal (90, 93, 94, 123, 203-209, 215). Estos dos últimos parámetros, junto con el perfil lipídico que se analizará más adelante, han sido evaluados en nuestro estudio con motivo de la administración de $\omega 3$ en los productos utilizados, sin obtenerse diferencias significativas entre los grupos al inicio del estudio. Dado que tales parámetros entraban dentro de la normalidad en todos los pacientes, no esperabamos mejoría, como se ha comprobado, a lo largo del estudio en aquellos que tomaron el producto suplementado.

e) Evolución de la microalbuminuria.

La Tabla 20 y la Figura 22 muestran la evolución de la microalbuminuria para los 3 grupos, al principio y al final del estudio. Aunque parece existir una sutil alteración de ésta al final del estudio en el grupo de diabéticos sin tratamiento, ésta se encuentra dentro de los valores normales y, además, no se ha obtenido diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los demás grupos ni respecto al inicio del estudio (ANOVA medidas repetidas, Tabla 21).

Tabla 20. Valores de la microalbuminuria (mg/8h)

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	3.96	2.54
	Final	3.96	1.90
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	4.12	3.58
	Final	5.38	3.96
3. Control CON antioxidante	Inicio	4.34	3.01
	Final	4.13	3.33

Tabla 21. ANOVA de medidas repetidas para microalbuminuria.

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	1827.8	1	1827.8	160.70	0.000
Grupo	10.837	2	5.418	0.4764	0.062
Error	523.22	46	11.374		
TIEMPO	3.010	1	3.010	0.3557	0.553
TIEMPO*grupo	10.470	2	5.235	0.6187	0.543
Error	389.2	46	8.462		

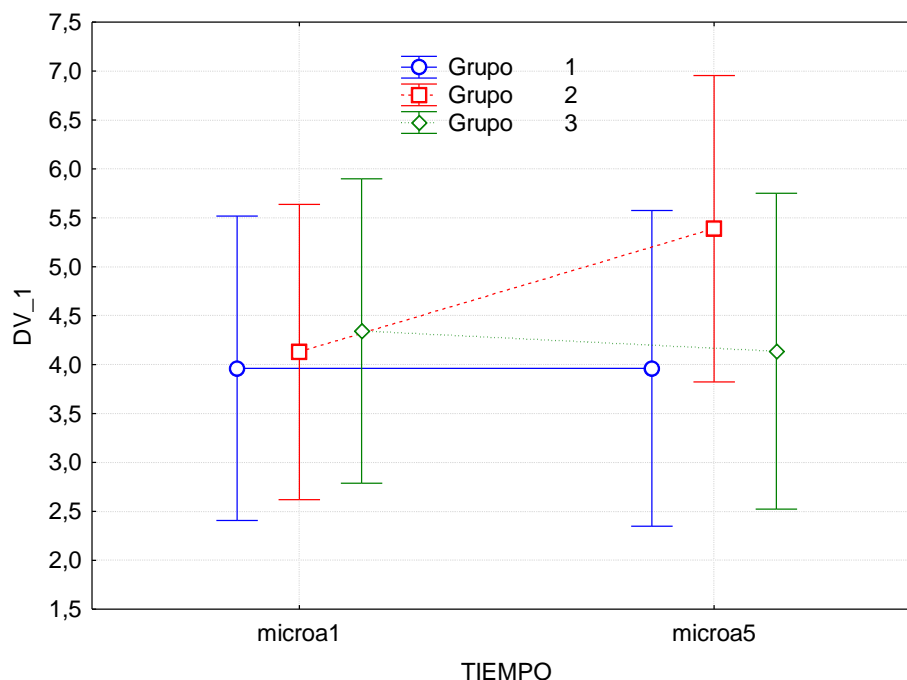


Figura 22. Medias de microalbuminuria al inicio y al final del estudio.

DISCUSION sobre la evolución de la Microalbuminuria en el ensayo.

Ninguno de nuestros pacientes presentaba alteraciones de la microalbuminuria al inicio del estudio ni, como se acaba de mostrar, modificaciones de ésta al final del mismo, por lo que no pueden sacarse conclusiones derivadas de la intervención dietética.

Es bien conocido que la microalbuminuria representa un marcador sensible y específico de lesión renal secundaria a diabetes y que cambios en el control metabólico pueden retrasar su aparición. Son, sin embargo, muy escasos los estudios, fundamentalmente en pacientes diabéticos tipo 2, que se plantean la intervención dietética como medida preventiva y/o terapéutica de esta complicación. Por ejemplo, las dietas ricas en aceite de pescado parecen haber demostrado efectos beneficiosos sobre el daño renal (126), reduciendo la microalbuminuria (124, 127) y mejorando su función (127) así como la presión arterial (124). Otros estudios han combinado una dieta rica en ω -3 con antioxidantes del romero, actuando sobre la modulación de la inflamación, la activación plaquetaria, la tasa de crecimiento de la placa aterosclerótica y la función endotelial y, por ende, sobre la presión arterial y el control de la microalbuminuria en la diabetes (123, 210-212).

f) Evolución del perfil lipoproteico.

f.1) Colesterol total:

Al inicio no se encuentran diferencias significativas (*t-student*) entre diabéticos (grupos 1 y 2) y controles sanos (grupo 3).

Tabla 22. Valores del colesterol total al inicio (mg/dL)

<i>Grupo</i>	Media	Desv típ.	p
1. Diabéticos	171.36	35.36	0.94
2. Controles sanos	179.38	34.41	

La Tabla 23 y la Figura 23 muestran la evolución del colesterol total para todos los grupos y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos para cada visita ni tampoco en la evolución entre los grupos (ANOVA medidas repetidas, Tabla 24). La diferencia estadística observada en el tiempo de forma global (medias totales de las cifras en los tres grupos) no tiene relevancia por cuanto la magnitud de dicha diferencia es mínima en términos clínicos y, por tanto, no requiere interpretación alguna.

Tabla 23. Valores del colesterol total (mg/dL)

<i>Grupo</i>	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	162.000	30.48
	Final	173.375	31.66
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	180.180	38.20
	Final	187.766	36.20
3. Control CON antioxidante	Inicio	179.380	34.41
	Final	186.630	30.45

Tabla 24. ANOVA de medidas repetidas para el colesterol total.

<i>Efecto</i>	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
<i>Intercept</i>	3110149	1	3110149	1493.5	0.000
<i>Grupo</i>	5404	2	2702	1.298	0.283
<i>Error</i>	95791	46	2082		
<i>TIEMPO</i>	1869	1	1869	9.362	0.003
<i>TIEMPO*grupo</i>	85	2	42	0.212	0.809
<i>Error</i>	9183	46	200		

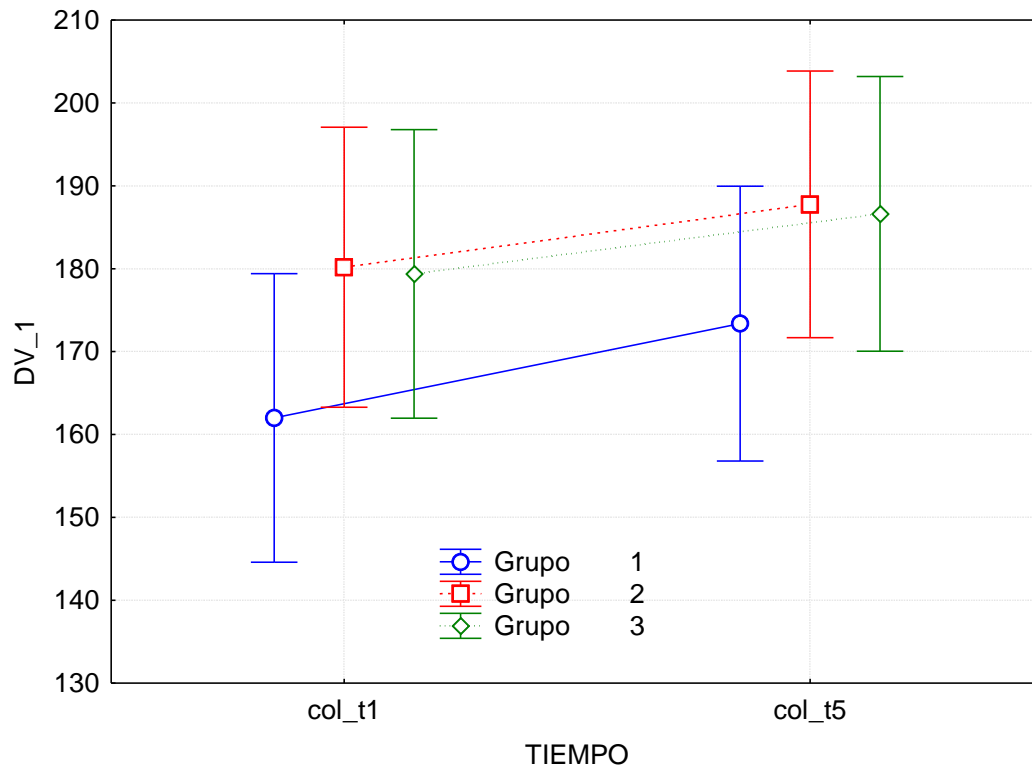


Figura 23. Medias del colesterol total (col_t) a lo largo del estudio. (1=Inicio, 5=Final)

f.2) HDL colesterol:

Al inicio no se encuentran diferencias significativas (*t-student*) entre diabéticos (grupos 1 y 2) y controles sanos (grupo 3).

Tabla 25. Valores de HDL al inicio (mg/dL)

Grupo	Media	Desv típ.	p
1. Diabéticos	63.24	9.625	0.86
2. Controles sanos	64.37	13.27	

La Tabla 26 y la Figura 24 muestran la evolución del colesterol HDL para todos los grupos y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos para cada visita ni tampoco en la evolución entre grupos (ANOVA medidas repetidas, Tabla 27). La diferencia estadística observada en el tiempo de forma global para el HDL colesterol (medias totales de las cifras de los tres grupos en cada tiempo) no tiene relevancia por cuanto la magnitud de dicha diferencia es mínima en términos clínicos y, por tanto, no requiere interpretación alguna.

Tabla 26. Valores de colesterol HDL (mg/dL)

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	60.310	9.562
	Final	60.437	9.494

2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	64.176	16.971
	Final	67.117	16.101
3. Control CON antioxidante	Inicio	64.37	13.276
	Final	65.56	13.520

Tabla 27. ANOVA de medidas repetidas para el HDL

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	400673	1	400673	1098.2	0.000
Grupo	673	2	336.6	0.923	0.404
Error	16781.9	46	364.8		
TIEMPO	16.1	1	16.1	8.905	0.004
TIEMPO*grupo	5.7	2	2.8	1.579	0.217
Error	83	46	1.8		

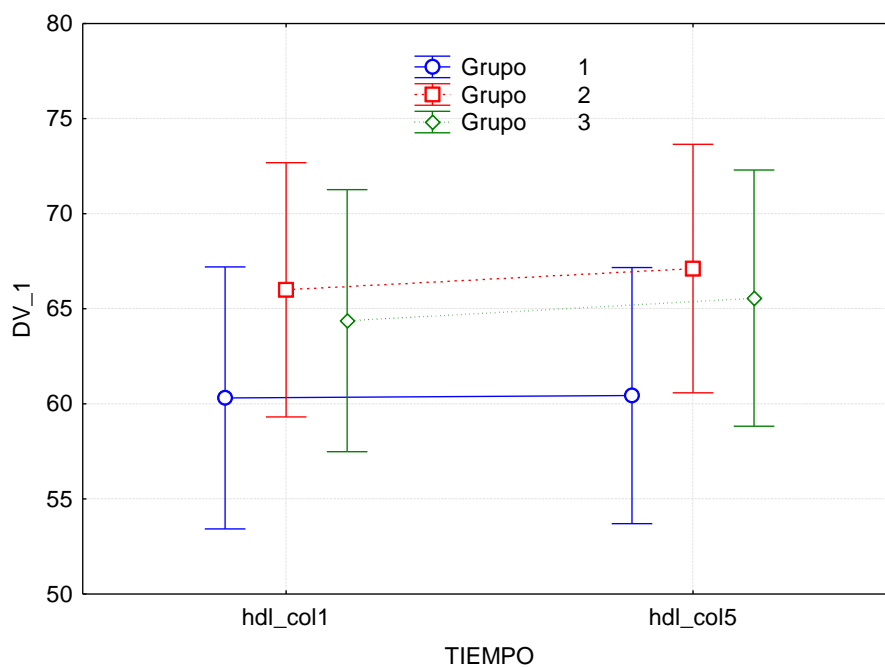


Figura 21.

Figura 24. Medias del colesterol HDL (hdl_col) a lo largo del estudio. (1=Inicio, 5=Final)

f.3) **LDL colesterol:**

Al inicio no se encuentran diferencias significativas (*t-student*) entre diabéticos (grupos 1 y 2) y controles sanos (grupo 3).

Tabla 28. Valores de LDL al inicio (mg/dL)

Grupo	Media	p
1. Diabéticos	92.55	0.77
2. Controles sanos	103.75	

La Tabla 29 y la Figura 25 muestran la evolución del colesterol LDL para todos los grupos y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos para cada visita ni tampoco en la evolución entre los grupos (ANOVA medidas repetidas, Tabla 30). La diferencia estadística observada en el tiempo de forma global para el LDL colesterol (medias totales de las cifras de los tres grupos en cada tiempo) no tiene relevancia por cuanto la magnitud de dicha diferencia es mínima en términos clínicos y, por tanto, no requiere interpretación alguna.

Tabla 29. Valores de colesterol LDL (mg/dL)

Grupo	Tiempo	Media
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	92.100
	Final	102.450
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	103.941
	Final	110.282
3. Control CON antioxidante	Inicio	103.750
	Final	109.975

Tabla 30. ANOVA de medidas repetidas para LDL

<i>Efecto</i>	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
<i>Intercept</i>	1054012	1	1054012	865.3	0.000
<i>Grupo</i>	2035	2	1018	0.833	0.440
<i>Error</i>	56029	46	1218		
<i>TIEMPO</i>	1428	1	1428	8.108	0.006
<i>TIEMPO*grupo</i>	89	2	45	0.2529	0.777
<i>DError</i>	8103	46	176		

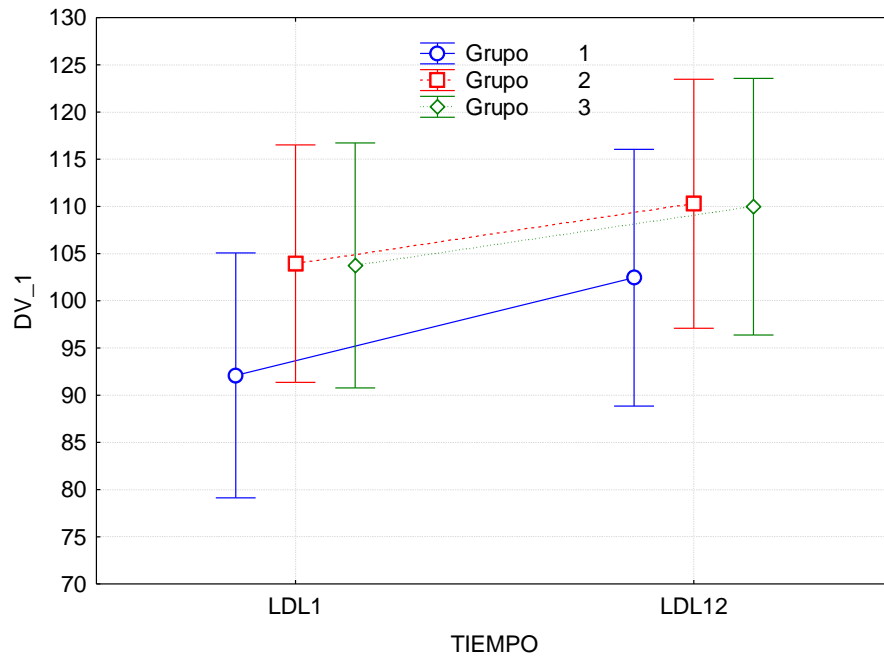


Figura 25. Medias del colesterol LDL a lo largo del estudio. (1=Inicio, 5=Final)

f.4) Triglicéridos:

Al inicio no se encuentran diferencias significativas (*t-student*) entre diabéticos (grupos 1 y 2) y controles sanos (grupo 3).

Tabla 31. Valores de triglicéridos al inicio (mg/dL)

Grupo	Media	Desv típ.	p
1. Diabéticos	49.60	19.06	0.07
2. Controles sanos	56.25	14.81	

La Tabla 32 y la Figura 26 muestran la evolución de los triglicéridos para los 3 grupos y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos para cada visita ni en la evolución dentro del mismo grupo ni tampoco en la evolución entre ambos grupos (ANOVA medidas repetidas, Tabla 33).

Tabla 32. Valores de los triglicéridos (mg/dL)

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	47.94	12.32
	Final	52.44	14.00
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	51.18	9.33
	Final	51.82	9.71
3. Control CON	Inicio	56.25	19.06

antioxidante	Final	55.44	14.81
--------------	-------	-------	-------

Tabla 33. ANOVA de medidas repetidas para los triglicéridos

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	269999	1	269999	806.8	0.000
Grupo	562.9	2	281.4	0.841	0.437
Error	15392.6	46	334.6		
TIEMPO	51.1	1	51.1	1.5904	0.213
TIEMPO*grupo	120.8	2	60.4	1.8803	0.164
Error	1478.2	46	32.1		

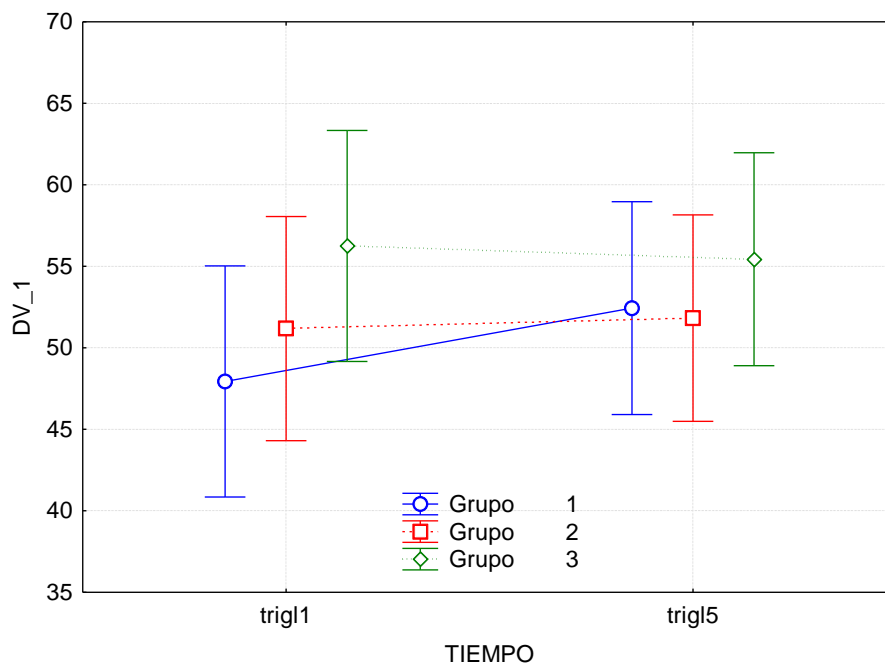


Figura 26. Medias de los triglicéridos (trigl) a lo largo del estudio. (1=Inicio, 5=Final)

DISCUSION sobre la evolución del Perfil Lipídico en el ensayo.

La suplementación con productos ricos en ω 3, como el aceite de pescado o el producto utilizado en nuestro ensayo, se utilizan porque podrían disminuir el riesgo elevado que tienen estos enfermos de padecer enfermedades cardiovasculares debido a su influjo sobre el perfil lipídico (125). La disminución observada en otros estudios (fundamentalmente en diabetes tipo 2) de los triglicéridos totales en plasma, la concentración de VLDL y la concentración de triglicéridos en las VLDL con estos productos (128-137) es consecuencia de una reducción en la síntesis y secreción hepática de VLDL (138) y una mayor eliminación de estas lipoproteínas por aumento de la LPL (139). A su vez, el enriquecimiento con aceite de pescado de la dieta de animales de experimentación aumenta significativamente la actividad del receptor LDL en hígado y revierte el efecto inhibitorio de las grasas saturadas sobre la función del receptor LDL (140).

Desde hace tiempo sabemos que la alteración típica encontrada en la Diabetes Mellitus tipo 1 consiste en la disminución predominante de HDL y, en menor grado, en la elevación de LDL y triglicéridos en pacientes recién debutados o con mal control metabólico (116-118). Este perfil suele normalizarse con un control metabólico adecuado, cuando menos aceptable. Coincidente con esta descripción podemos decir de nuestro ensayo que no se han encontrado diferencias significativas en los perfiles lipídicos de ambos grupos (diabéticos totales y controles sanos) al inicio del estudio. Era esperable, por consiguiente, que éste perfil se mantuviera sin apenas cambios ni diferencias al final del mismo en todos sus componentes (colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos). Hemos encontrado, sin embargo, que existe diferencia estadística a lo largo del tiempo en forma de un incremento en los niveles de colesterol total, HDL y LDL para los 3 grupos, si bien, esto lo hemos justificado diciendo que tales cambios carecen de significación clínica debido a que la magnitud de dicha diferencia es mínima y, desde luego, con valores que se siguen manteniendo dentro de la rigurosa normalidad. Lo que es realmente importante es la ausencia de diferencias entre grupos al final del estudio y, por tanto, en la comparación de su evolución.

Podemos concluir, por tanto, que no hay efecto de la dieta suplementada sobre el perfil lipídico de nuestros pacientes, debido a que partían de una situación basal que se encontraba dentro de la normalidad.

g) Evolución del perfil oxidativo.

g.1 Vitamina E:

La Tabla 34 y la Figura 27 muestran la evolución de la vitamina E para los 3 grupos y su evolución en el tiempo, obteniéndose diferencias significativas ($p < 0.001$) a lo largo del tiempo en los tres grupos pero ausencia de significación estadística ($p > 0,05$) si se comparan entre sí los tres grupos a tiempo 0 y final (ANOVA medidas repetidas, Tabla 35).

La elevación de la vitamina E a lo largo del tiempo en los tres grupos por igual se puede interpretar como la consecuencia de una disminución o pérdida de la vitamina E de las muestras a tiempo 0 (inicio del estudio) respecto a las del tiempo 12, considerando que todas ellas fueron analizadas al final del mismo. Por tanto, consideramos que se trata de una falsa elevación dependiente del efecto tiempo en la conservación (-80°C) de las muestras a tiempo 0.

Tabla 34. Valores de la Vitamina E (ug/mL)

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	913.2	84.3
	Final	1759.7	85.0
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	1119.8	90.2
	Final	1809.1	90.8
3. Control CON antioxidante	Inicio	1002.7	106.7
	Final	1483.7	106.5

Tabla 35. ANOVA de medidas repetidas para la Vitamina E.

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
<i>Intercept</i>	69917602	1	69917602	1462.1	0.000
<i>Grupo</i>	297860	2	148930	3.114	0.070
<i>Error</i>	812919	17	47819		
TIEMPO	4347182	1	4347182	64.922	0.000
TIEMPO*grupo	206178	2	103089	1.540	0.242
<i>Error</i>	1138317	17	66960		

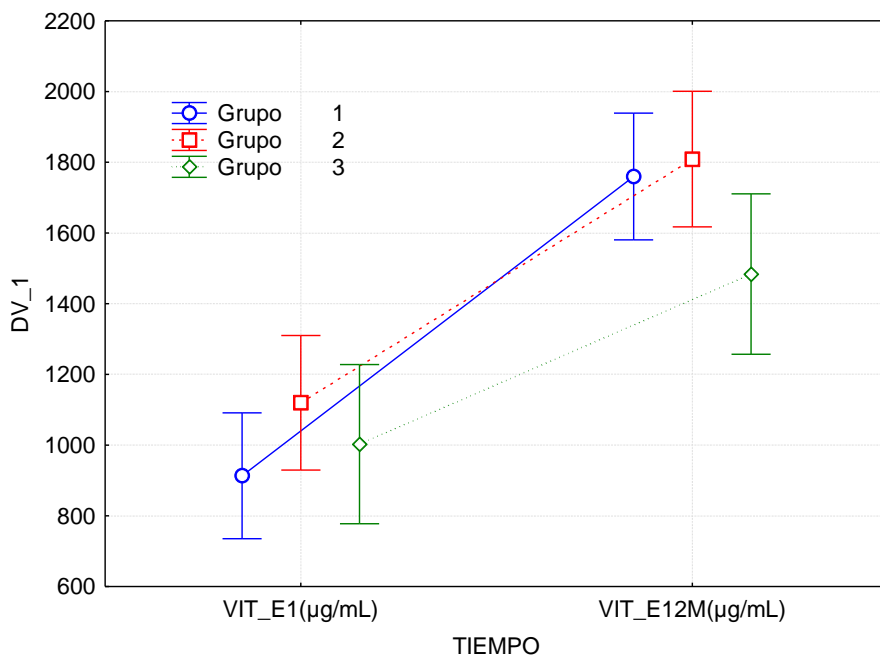


Figura 27. Medias de vitamina E a lo largo del estudio en los 3 grupos. (1=Inicio, 12=Final)

g.2 Cociente Vitamina E/Lípidos totales:

Dado que los niveles de vitamina E son dependientes de los niveles de lípidos totales, se ha realizado una comparación entre el cociente vitamina E/lípidos totales al inicio, no habiéndose obtenido diferencias significativas (*t-student*) entre diabéticos (grupos 1 y 2) y controles sanos (grupo 3).

Tabla 36. Valores del cociente Vitamina E/Lípidos totales al inicio del estudio.

Grupo	Media	Desv típ.	p
1. Diabéticos	4.67	0.75	0.21
2. Controles sanos	4.40	0.55	

La Tabla 37 y la Figura 28 muestran la evolución de dicho cociente para los 3 grupos y su evolución en el tiempo, obteniéndose diferencias significativas ($p < 0.001$) a lo largo del tiempo en los tres grupos pero ausencia de significación estadística ($p > 0,05$) si se comparan entre sí los tres grupos a tiempo 0 y final (ANOVA medidas repetidas, Tabla 38). La elevación del cociente a lo largo del tiempo en los tres grupos por igual tiene la misma interpretación que el caso anterior.

Tabla 37. Valores del cociente Vitamina E/Lípidos totales a lo largo del tiempo.

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	4.35	1.96
	Final	7.77	1.86
2. Diabético SIN	Inicio	4.84	1.89

antioxidante	Final	6.22	1.97
3. Control CON antioxidante	Inicio	4.40	1.10
	Final	6.12	2.35

Tabla 38. ANOVA de medidas repetidas para el cociente Vitamina E/Lípidos totales

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	1076.8	1	1076.8	1417.8	0.000
Grupo	3.185	2	1.592	2.097	0.153
Error	12.911	17	0.759		
TIEMPO	57.022	1	57.022	17.527	0.000
TIEMPO*grupo	8.623	2	4.311	1.325	0.291
Error	55.307	17	3.253		

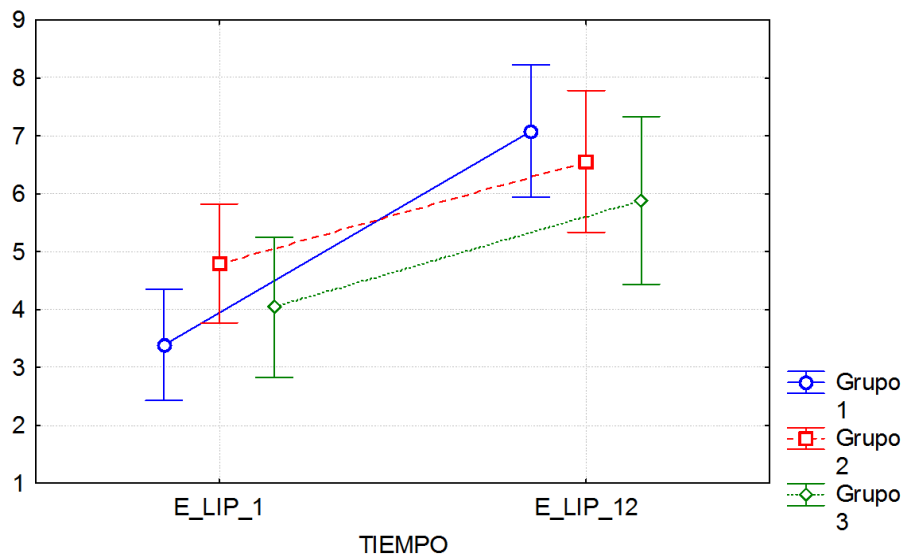


Figura 28. Medias del cociente vitamina E/lípidos totales a lo largo del estudio en los 3 grupos. (1=Inicio, 12=Final)

g.2) *8-isoprostano* en orina:

La Tabla 39 y la Figura 29 muestran la evolución del 8 isoprostano en orina para los 3 grupos y su evolución en el tiempo, no obteniéndose diferencias significativas ($p>0,05$) en cada grupo a lo largo del tiempo ni comparado entre ellos (ANOVA medidas repetidas, Tabla 40).

Tabla 39. Valores de 8-isoprostano en orina (pg/mL)

Grupo	Tiempo	Media	Error tít.	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
1. Diabético CON antioxidante	0 meses	1149.6	256.7	568.8	1730.4
	3 meses	1151.9	341.6	379.1	1924.8
	6 meses	1010.4	262.9	415.6	1605.1
	9 meses	1252.2	289.1	598.0	1906.4
	12 meses	1607.6	290.6	950.1	2265.2
2. Diabético SIN antioxidante	0 meses	1785.1	287.0	1135.7	2434.5
	3 meses	1539.6	381.9	675.5	2403.7
	6 meses	1398.9	293.9	733.9	2063.8
	9 meses	1391.7	323.3	660.4	2123.1
	12 meses	1082.0	324.9	346.8	1817.2
3. Control sano (CON antioxidante)	0 meses	1779.1	331.4	1029.3	2529.0
	3 meses	1295.6	441.0	297.9	2293.4
	6 meses	1045.2	339.4	277.3	1813.0
	9 meses	1327.1	373.3	482.6	2171.6
	12 meses	1355.7	375.2	506.8	2204.6

Tabla 40. ANOVA de medidas repetidas para 8-isoprostano en orina.

<i>Efecto</i>	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
<i>Intercept</i>	103896882	1	103896882	79.02	0.000
<i>Grupo</i>	481276	2	240638	0.183	0.835
<i>Error</i>	11832925	9	1314769		
TIEMPO	1026899	4	256725	1.308	0.285
TIEMPO*grupo	2059640	8	257455	1.312	0.268
<i>Error</i>	7061717	36	196159		

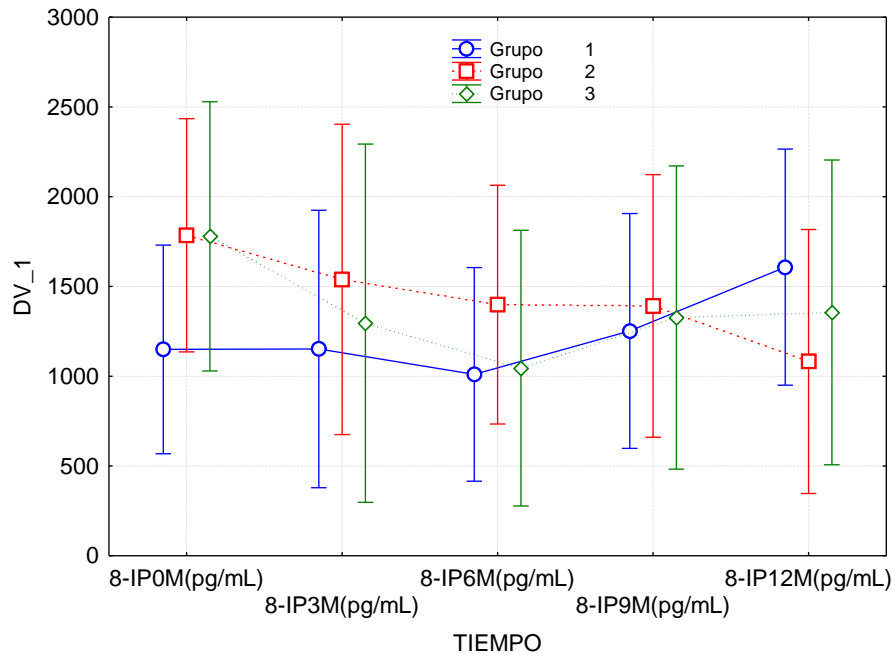


Figura 29. Medias de 8 isoprostano en orina a lo largo del estudio en los 3 grupos.

g.3) **Tbars** en plasma: La Tabla 41 y la Figura 30 muestran la evolución del Tbars (malonilaldehído) en plasma para los 3 grupos y su evolución en el tiempo, obteniéndose diferencias significativas ($p < 0.01$) a lo largo del tiempo en los tres grupos pero no comparados entre sí en ninguno de los tiempos ($p > 0.05$) (ANOVA medidas repetidas, Tabla 42).

Tabla 41. Valores de Tbars (ug/mL)

Grupo	Tiempo	Media	Desv típ.
1. Diabético CON antioxidante	Inicio	5.39	0.70
	Final	7.08	0.54
2. Diabético SIN antioxidante	Inicio	4.8	0.74
	Final	6.55	0.57
3. Control CON antioxidante	Inicio	3.31	0.88
	Final	5.88	0.68

Tabla 42. ANOVA de medidas repetidas para Tbars.

Efecto	SS	Degr. of freedom	MS	F	p
Intercept	1167.9	1	1167.9	643.2	0.000
Grupo	16.574	2	8.287	4.564	0.025
Error	30.867	17	1.1816		
TIEMPO	38.334	1	38.334	8.580	0.009
TIEMPO*grupo	1.391	2	0.696	0.155	0.857
Error	75.951	17	4.468		

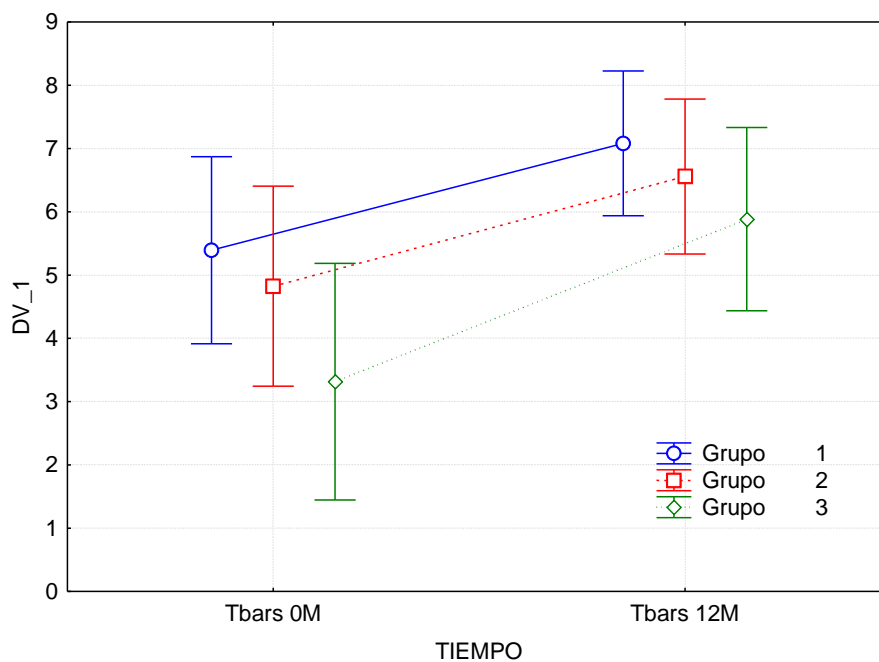


Figura 30. Medias de Tbars a lo largo del estudio en los 3 grupos.

DISCUSION sobre la evolución del Perfil Oxidativo en el ensayo.

Al inicio del estudio: No se han obtenido diferencias significativas entre el grupo de diabéticos y los controles sanos en algunos de los parámetros habituales que miden el estrés oxidativo (vitamina E y su cociente con lípidos totales, 8-isoprostano en orina, malondialdehído mediante Tbars), resultados que discrepan con otros estudios realizados en niños y adolescentes con Diabetes Mellitus tipo 1, como los de Asayama (69), Domínguez (70) y Davi (74). Estas discrepancias pueden deberse a varios motivos: en primer lugar, nuestros pacientes presentaban una media de HbA1C al inicio del estudio de 7,65% sin grandes variaciones lo que reflejaba un control metabólico aceptable si se confrontaba con el estudio de Asayama en el que la comparativa se establecía con aquellos que presentaban un verdadero mal control. En segundo lugar, nuestros niños eran todos prepuberales con una duración de diabetes mínima de 2 años (no debuts) pero no mayor de 5 años, por lo que no resultaban comparables con los del estudio de Domínguez. Por otra parte, y en pro de nuestra argumentación, nuestros resultados si coinciden con los de Jos et al (68) y, en parte, con los de Davi et al en el hecho de una tendencia a la normalización de 8-isoprostano en orina tras un control metabólico adecuado y al cabo de cierto tiempo del debut en niños prepuberales. Otros parámetros no medidos en nuestro ensayo como la actividad de la glutatión peroxidasa, también se encuentran discrepantes entre los estudios (68, 216, 217) lo que apoya más aún nuestra interpretación y la necesidad de profundizar en la investigación de estos parámetros. Por último, con el estudio de Martin-Gallan y cols. de 2007 (76), podemos concluir que nuestros pacientes se encuentran en ese periodo de transición entre el debut y la diabetes avanzada donde los parámetros de estrés oxidativo se encuentran dentro o cercanos a la normalidad.

Al final del estudio: En ausencia de diferencias significativas entre grupos al inicio del estudio para los parámetros estudiados, no esperábamos modificaciones del perfil oxidativo a favor de los que tomaron el producto suplementado (grupos 1 y 3). Con un cumplimiento medio del 84,30% a lo largo del estudio y sin diferencias entre grupos, como ya se predijo, no se han encontrado cambios con la excepción de la vitamina E y su cociente a lo largo del tiempo pero sin diferencias entre grupos. Otro argumento que pone en tela de juicio resultados favorables de otros estudios, lo constituye el hecho de que la severidad de la diabetes o de sus lesiones asociadas no se correlacionen exactamente con parámetros que se determinan habitualmente para determinar el estrés oxidativo (86, 87). Caimi et al (200) y Faure et al (201) hacen una revisión exhaustiva de los múltiples ensayos clínicos llevados a cabo y establecen que la mayoría de los estudios observacionales y clínicos que sugieren un papel protector potencial de la suplementación con antioxidantes no muestran resultados concluyentes acerca del papel terapéutico de la dieta para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la diabetes, ni acerca de los biomarcadores indicadores de la incidencia o progresión de enfermedades asociadas al estrés oxidativo como la aterosclerosis. Costacou (202) cita numerosos informes que intentan encontrar justificaciones a los datos contradictorios en ensayos aleatorizados y se permite afirmar que las discrepancias se deben, en buena parte, a la falta de uniformidad en los estudios: las poblaciones estudiadas, las definiciones de aparición de eventos, la variedad de determinaciones de antioxidantes individuales o combinaciones de ellos, las dosis de suplementación, la frecuencia de administración y duración del tratamiento o si las dosis se tomaron como parte de la dieta para optimizar la absorción.

g.4) *Perfil metabólico*

Durante el estudio (cuya fase de intervención concluyó en enero de 2009) se han recogido un total de 245 muestras de orina (correspondientes a los meses 0, 3, 6, 9 y 12) y 98 muestras de plasma (tiempo 0 y 12 meses, es decir, inicio y final de tratamiento). A partir de ese momento comenzó el análisis de las muestras de plasma tomadas al inicio y final de la intervención y de las muestras de orina recogidas periódicamente. El análisis metabólico de la orina se ha realizado en la Universidad San Pablo CEU (electroforesis capilar con detector de ultravioleta) mientras que el análisis metabólico del plasma se ha llevado a cabo en el German Research Center for Environmental Health, donde disponen de un Fourier transform ioncyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICRMS) dotado de un sistema de ionización por electrospray (ESI) capaz de trabajar con polaridad positiva y negativa. En ambos casos se ha realizado el tratamiento estadístico y bioinformático de la multitud de datos obtenidos.

La idea es aplicar distintas técnicas de “profiling”, es decir, procedimientos analíticos que proporcionen información “en bruto” sobre el mayor número posible de compuestos en las muestras analizadas, procediendo a continuación a su caracterización y/o identificación y al estudio de los perfiles obtenidos siguiendo procedimientos estadísticos.

➤ ***en orina:*** las muestras de orina a los 0, 3, 6, 9 y 12 meses se han analizado mediante electroforesis capilar (véase anexo VI en páginas 125 y 126) y son dos los modos utilizados en dicho procedimiento (polaridad normal e invertida) con objeto de ampliar el número de metabolitos detectados (neutros, aniones y cationes). Los métodos estadísticos utilizados para la interpretación de los resultados obtenidos son PCA (Principal Component Analysis - análisis de componentes principales) y PLS-DA (Partial Least Squares - análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales), si bien, solo mostraremos los resultados de este último método ya que es el único que muestra una adecuada clasificación en lo que respecta al efecto del tiempo y de la dieta.

❖ ***mediante polaridad invertida:*** En la Figura 31 se muestra el perfil metabólico general alineado de todos los grupos y en todos los tiempos.

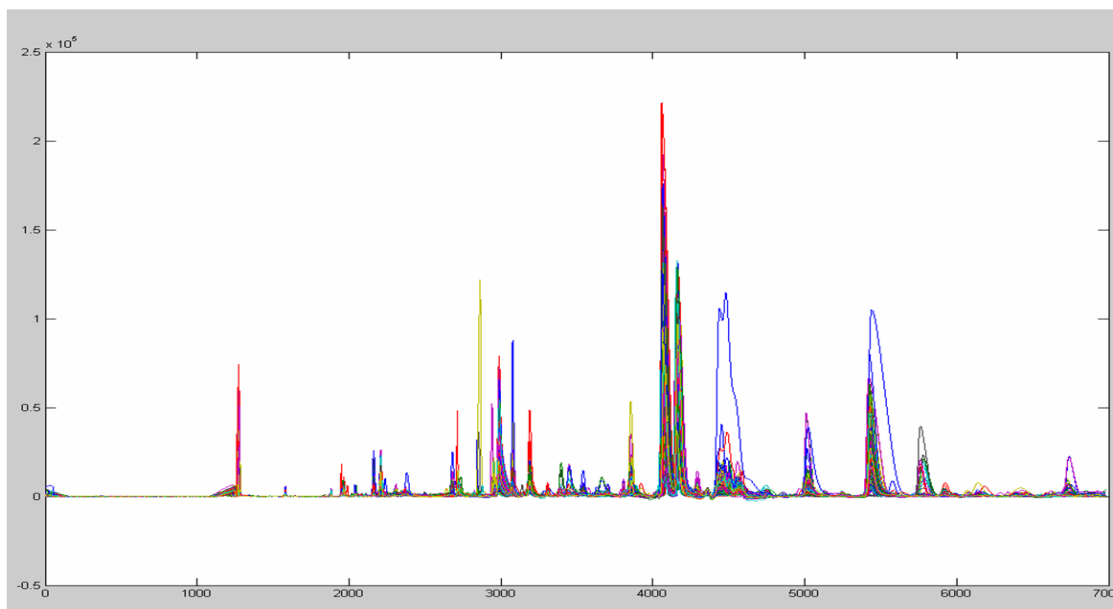


Figura 31. Perfil metabólico alineado en orina mediante polaridad invertida

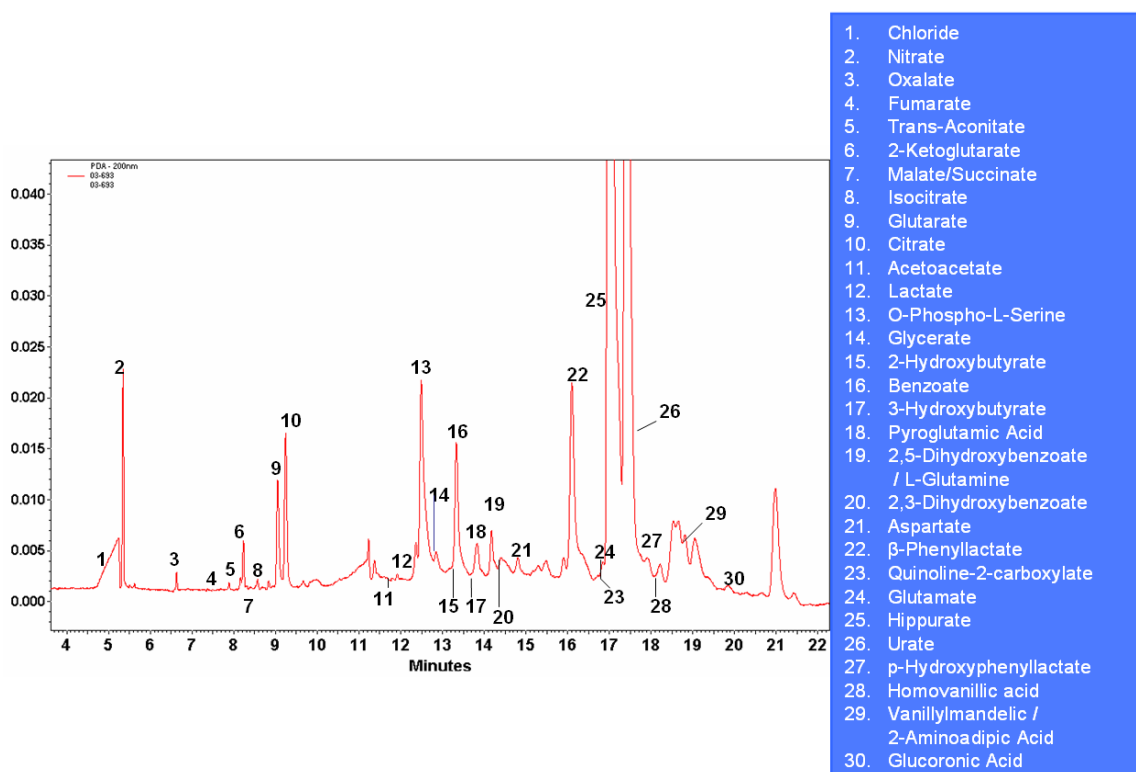


Figura 32. Modelo comparativo para la correlación entre los picos obtenidos y las sustancias detectadas en orina mediante polaridad invertida.

Aplicando el modelo de la figura anterior (Figura 32) se procede a la interpretación de los componentes obtenidos en el tiempo y por grupos. Como se muestra en el modelo (perfil metabolómico), se han identificado 30 posibles metabolitos (aniones y ácidos orgánicos de cadena corta). A continuación se procede al análisis estadístico de este perfil metabolómico obtenido para cada uno de los grupos a tiempo 0 (inicio del estudio) y 12 (final del estudio):

- A los 0 meses: Los datos para 0 meses fueron clasificados en las siguientes clases, 1: Niños diabéticos y 2: Niños sanos.

. Mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA) no se muestra separación alguna debida a la Diabetes Tipo 1 utilizando como escalados el univarianza (UV).

. Mediante el Análisis Discriminante de los Mínimos Cuadrados Parciales (PLS DA) de acuerdo con las clases antes mencionadas y comparando los escalados univariante (UV), puede observarse diferencias del perfil que se muestran en la Figura 33. La Figura 34 muestra el gráfico resultante de las diferencias en el perfil metabolómico de ambos grupos, y la Figura 35 el listado de los metabolitos diferenciadores.

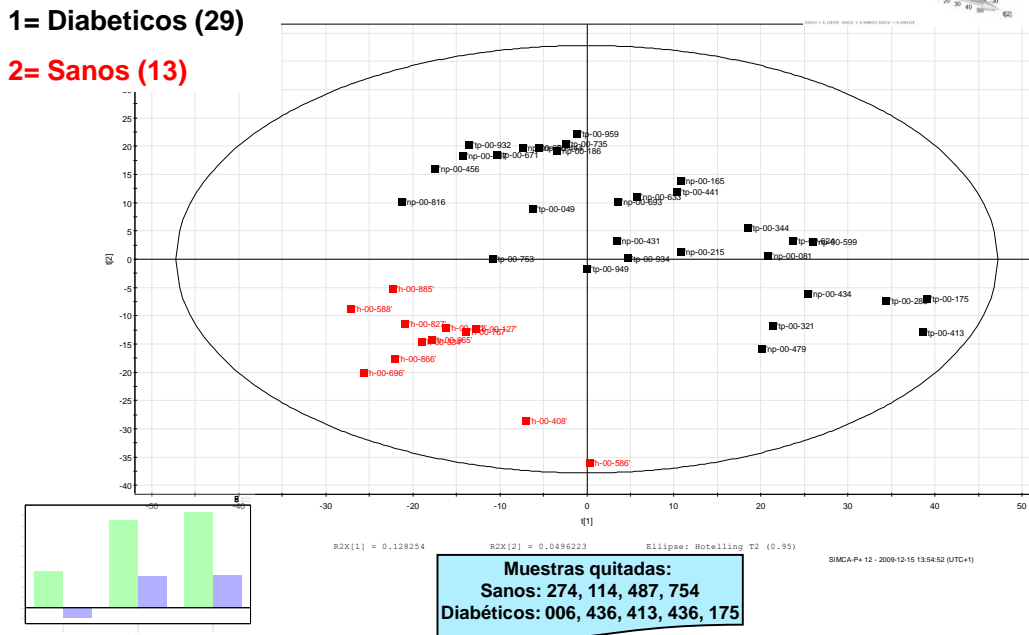


Figura 33. PLS DA a tiempo 0 entre sanos y diabéticos

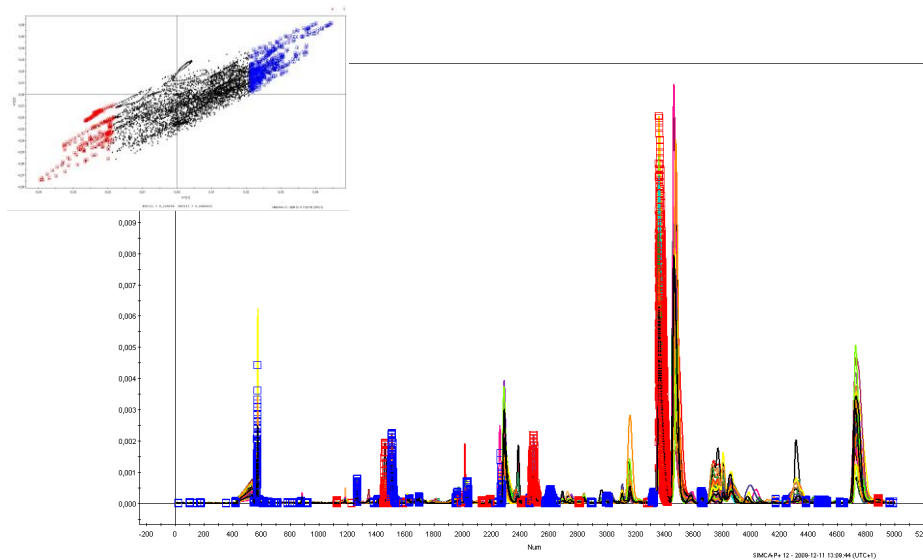


Figura 34. Picos responsables de la clasificación.

Metabolitos

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Sanos: <ul style="list-style-type: none"> - Pico desconocido 5 (+) - Glutarato (++) - Lactato (++) - Benzoato (+++) | <ul style="list-style-type: none"> • Diabeticos: <ul style="list-style-type: none"> - Nitrato (+) - Cetoglutárico (+) - Pico desconocido 8 (+) - Pico desconocido 10 (+) - Pico desconocido 4 (+) - Glutamato (+) - Ác. Homovalínico (+) - Citrato (++) - Aspartato (++) - Ác. Piroglutámico (++) - Ác. 3-Hidroxibutírico (+++) - Pico desconocido 14(+++) |
|--|--|

Figura 35. Metabolitos diferenciadores posibles entre grupos a tiempo 0.

Aplicando métodos estadísticos que permiten validar los resultados obtenidos, se puede observar en la Figura 33 que el modelo presenta una buena clasificación y separación de los grupos pero una mala predicción (Q^2). Los metabolitos aislados y que establecen diferencias entre ambos grupos son el benzoato para los sanos y el ácido β -OH-butírico para los diabéticos. La presencia del ácido β -OH-butírico (o ácido 3-hidroxibutírico) representa, como es bien conocido, un cuerpo cetónico más prevalente en sujetos diabéticos en ayunas cuyo hallazgo al inicio del estudio no requiere discusión alguna. Por otra parte, la presencia predominante de benzoato en sanos, conservante alimentario, no tiene explicación ya que la toma de los productos es ulterior a este momento del estudio. En cualquier caso, la mala predicción del modelo determina que cualquier interpretación que hagamos de este perfil tenga poca validez.

- A los 12 meses: Para el final del estudio se establecieron dos comparaciones entre los datos obtenidos:

a) *Pacientes diabéticos tratados y controles*: Al realizar un análisis a los 12 meses con el Análisis de Componentes Principales (PCA) no se observa una separación entre ambos grupos ni, por tanto, diferencias en el perfil. Por el contrario, si se encuentran diferencias al emplear gráficos del análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales (PLS DA) de acuerdo con las clases antes mencionadas y con escalado UV (Figura 36), si bien, la predicción es mala (Q^2).

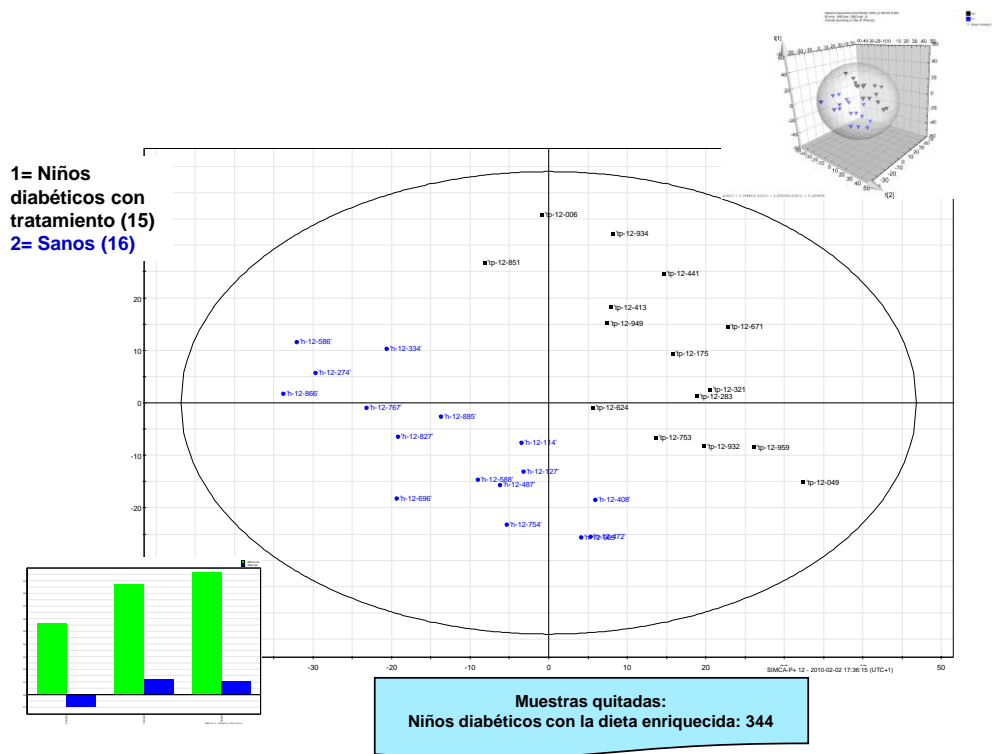


Figura 36. PLS-DA a los 12 meses entre sanos y diabéticos tratados.

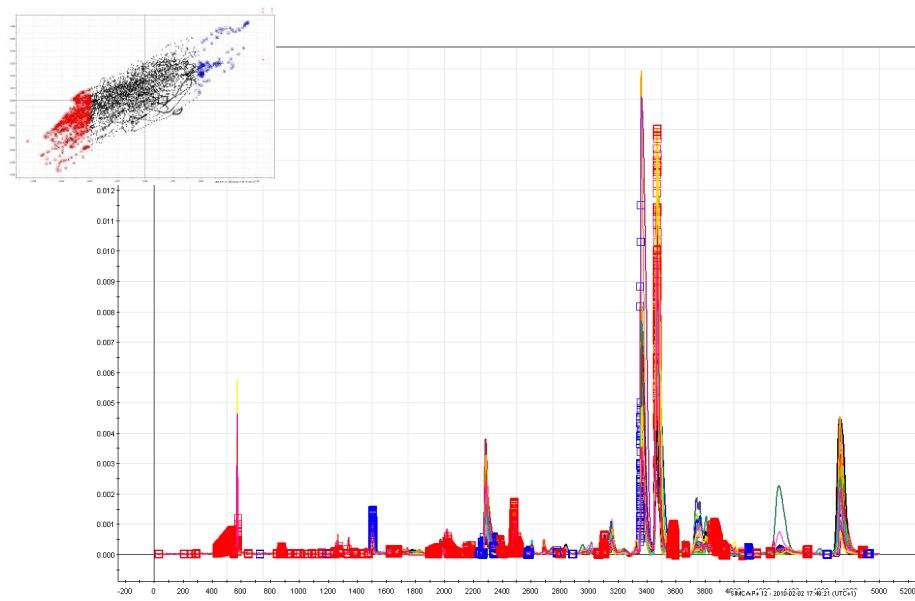


Figura 37. Picos responsables de la clasificación.

Metabolitos

- Sanos:
 - Cloruros (+)
 - Oxalico (+)
 - p-Hidroxi Fenilactico (+)
 - Ácido Glicérico (+)
 - Unknown Peak 3 (+)
 - Unknown Peak 17 (+)
 - Unknown Peak 26 (+)
 - Unknown Peak 28 (+)Ácido Benzoico (++)
 - Ácido 2-Hidroxibutirico (++)
- Niños diabéticos CON la dieta enriquecida:
 - Unknown Peak 4 (+)
 - Ácido Cítrico (+++)
 - Ácido 3-Hidroxibutirico (++++)

Figura 38. Metabolitos diferenciadores posibles entre diabéticos tratados y sanos.

Como se puede observar en la Figura 36, el modelo clasifica bien los datos, pero no tiene una buena predicción. Los metabolitos identificados como más relevantes son el Ácido 2-hidroxibutírico (sanos) y el Ácido β -hidroxibutírico (diabéticos con dieta suplementada). La interpretación de estos hallazgos y su validez es similar a la realizada a tiempo 0 (inicio del estudio).

b) *Pacientes diabéticos no tratados y pacientes diabéticos tratados*: Al realizar un análisis con el Análisis de Componentes Principales (PCA) tampoco se observa separación entre estos dos grupos. Sin embargo, si hay separación mediante el empleo de gráficos obtenidos por análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales (PLS DA) con escalado UV (Tabla 32).

1= Niños diabéticos con tratamiento (16)

2= Niños diabéticos sin tratamiento (16)

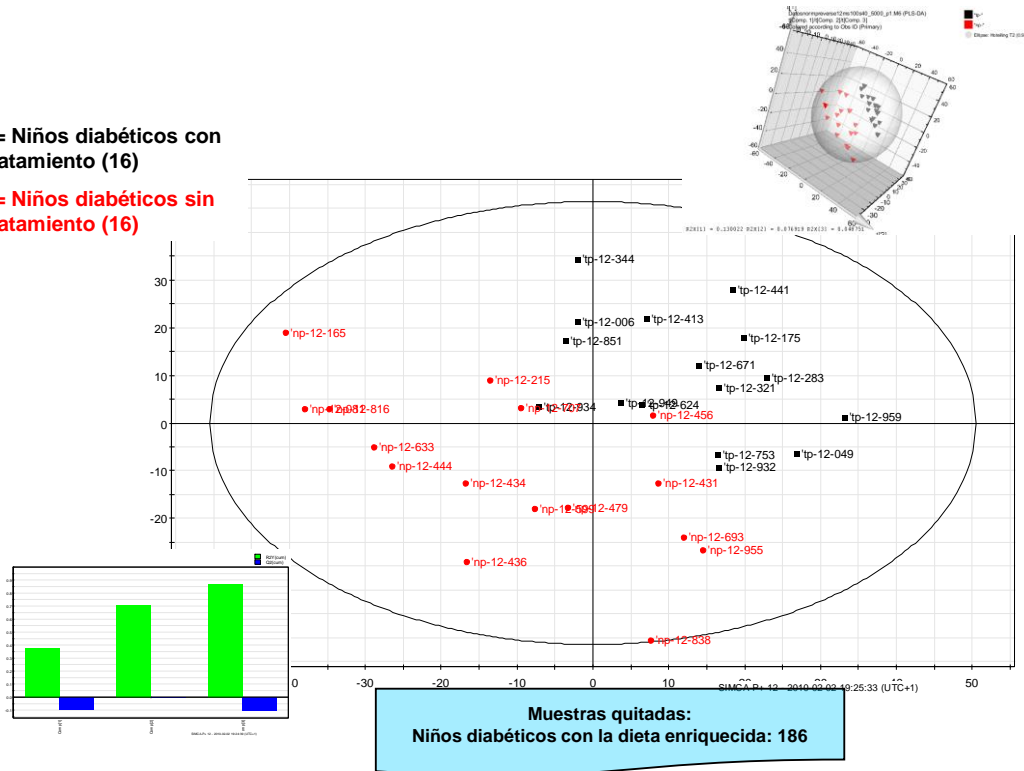


Figura 39. PLS-DA a los 12 meses entre diabéticos suplementados y no suplementados.

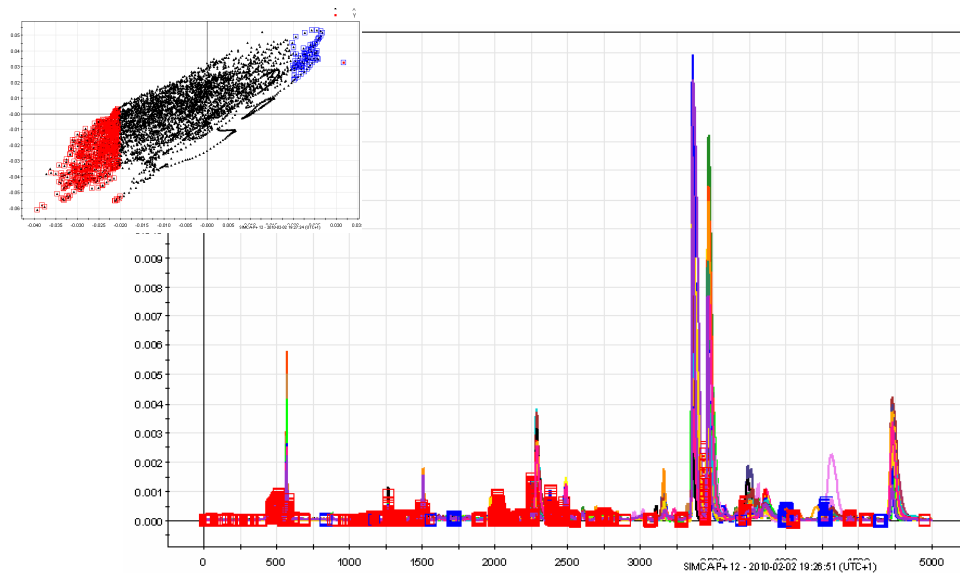


Figura 40. Picos responsables de la clasificación.

Metabolitos

- Niños diabéticos SIN la dieta enriquecida:
 - Cloruros (+)
 - Ácido Fumárico (+)
 - Ácido Cetoglutárico (+)
 - Unknown Peak 3 (+)
 - Málico/Succínico (+)
 - Ácido Maleico (+)
 - Ácido Isocítrico (+)
 - Unknown Peak 17 (+)
 - Unknown Peak 8 (+)
 - Ácido Cítrico (+)
 - Unknown Peak 10 (+)
 - Ácido Acetoacético (++)
 - Ácido Láctico (+)
 - Unknown Peak 4 (+)
 - Ácido Glicérico (+)
 - Ácido 2-Hidroxibutírico (++)
 - Unknown Peak 23 (+)
- Niños diabéticos CON la dieta enriquecida:
 - Ácido Glucurónico (+++)
 - Unknown Peak 31 (++)

Figura 41. Metabolitos diferenciadores posibles entre diabéticos suplementados y no suplementados con el producto al final del estudio.

El predominio de ácido glucurónico en sujetos diabéticos con dieta tiene una difícil interpretación, si bien, tengamos en cuenta nuevamente que el modelo estadístico presenta una mala predicción.

❖ **mediante polaridad normal:** En la Figura 42 se muestra el perfil metabolómico alineado de todos los grupos y en todos los tiempos.

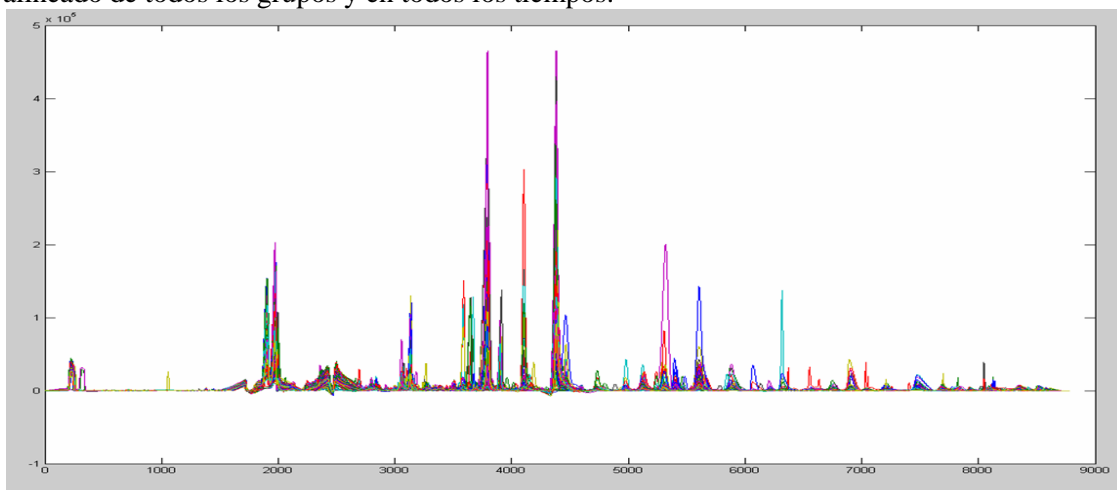


Figura 42. Perfil metabolómico alineado en orina mediante polaridad normal

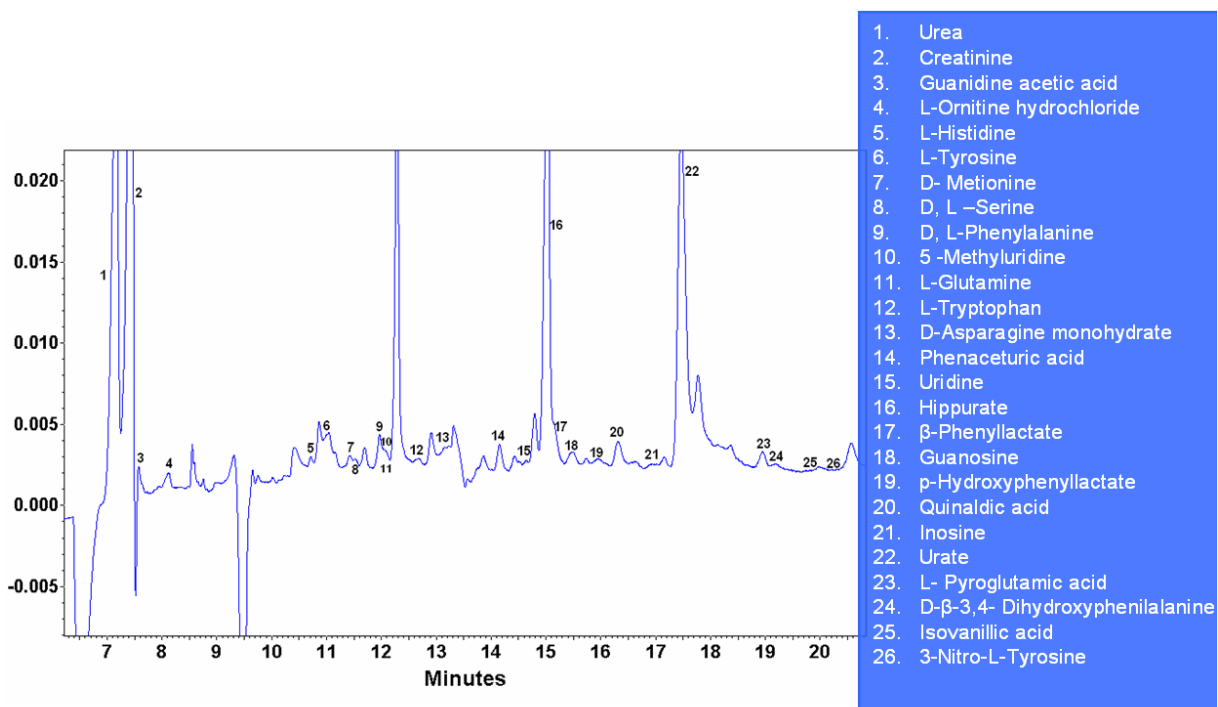


Figura 43. Modelo comparativo para la correlación entre los picos obtenidos y las sustancias detectadas en orina mediante polaridad invertida.

Aplicando el modelo de la Figura 43 se procede a la interpretación de los componentes obtenidos en el tiempo y por grupos. Como se muestra en el modelo (perfil metabolómico), se han identificado 26 posibles metabolitos. A continuación se procede al análisis estadístico de este perfil metabolómico obtenido para cada uno de los grupos a tiempo 0 (inicio del estudio) y 12 (final del estudio):

- A los 0 meses: Los datos para 0 meses fueron clasificados en las siguientes clases, 1: Niños diabéticos y 2: Niños sanos.

. Mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA) no se muestra separación alguna debida a la Diabetes Tipo 1.

. Mediante el Análisis Discriminante de los Mínimos Cuadrados Parciales (PLS DA) de acuerdo con las clases antes mencionadas puede observarse diferencias del perfil

que se muestran en la Figura 44.

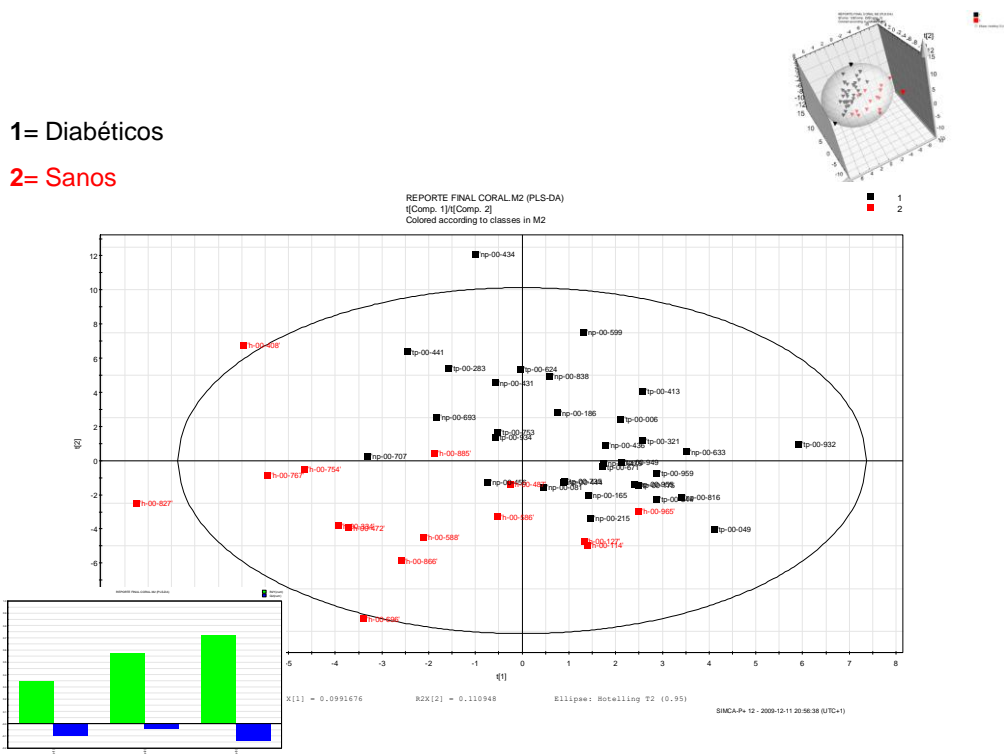


Figura 44. PLS-DA a tiempo 0 entre sanos y diabéticos.

METABOLITOS IDENTIFICADOS PN 00 MESES

- Sanos:
 - Guanidine acetic acid (++)
 - Guanosine (++)
 - Urate(+)
 - 3-Nitro-L-Tyrosine (+)
 - Hippurate(+)
 - Isonanillic acid (+)
- Pacientes:
 - Urea(++)
 - Urate(+)
 - Hippurate (+)
 - Isonanillic acid(-)

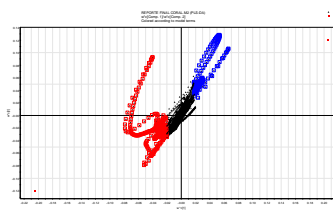


Figura 45. Metabolitos diferenciadores posibles entre sanos y diabéticos, y picos responsables de la clasificación.

Como se puede ver en la Figura 45, no hay metabolitos claramente diferenciadores y, por otra parte, aunque este modelo presenta una buena clasificación y separación de los grupos, la predicción es mala por lo que la interpretación carece de valor.

- A los 12 meses: Para el final del estudio se establecieron dos comparaciones entre los datos obtenidos:

a) *Pacientes diabéticos tratados y controles sanos*: Al realizar un análisis a los 12 meses utilizando el Análisis de Componentes Principales (PCA), no se observa separación entre ambos grupos. Sin embargo, mediante PLS-DA se logra una buena separación entre grupos (Figura 46) pero una mala predicción (Q^2).

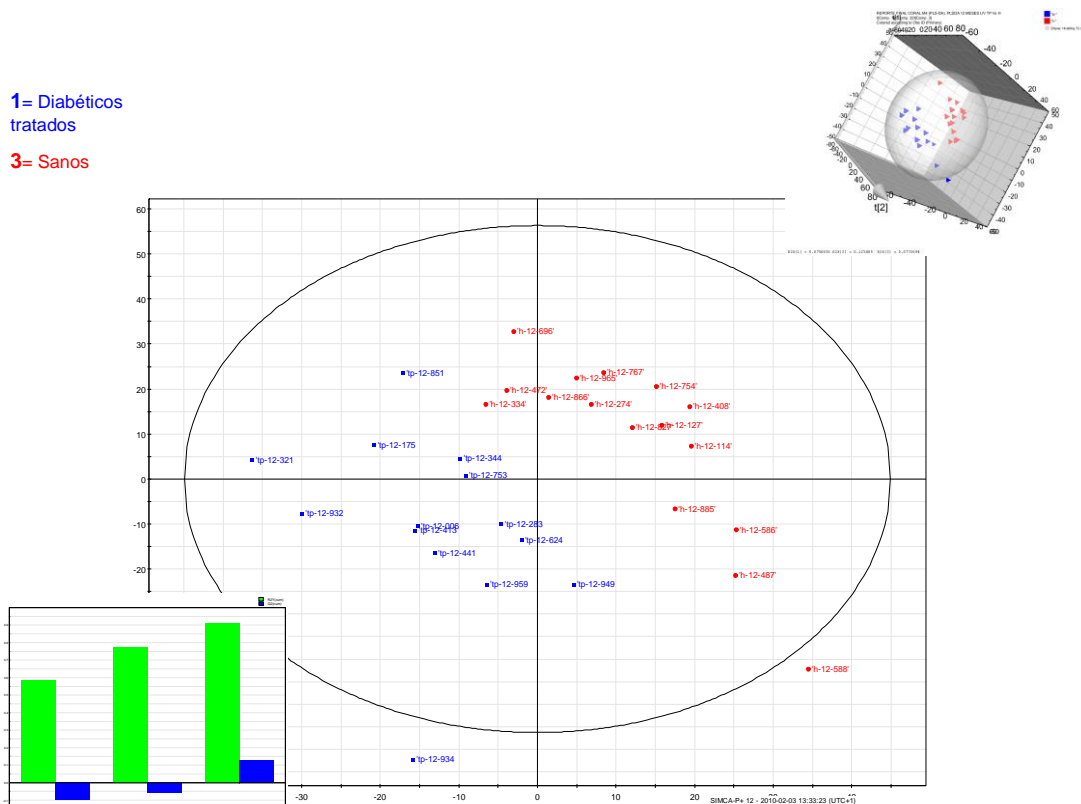


Figura 46. PLS-DA a los 12 meses entre sanos y diabéticos con producto suplementado.

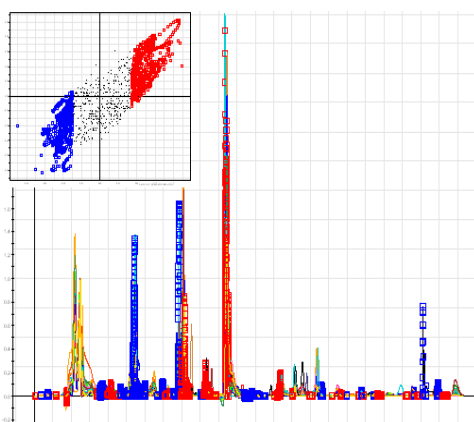


Figura 47. Picos responsables de la clasificación.

METABOLITOS IDENTIFICADOS PN 12 MESES

- Sanos:
 - β -Phenyllactate
 - p-Hydroxyphenyllactate
 - L-Tyrosine
 - 3-nitro-L-tyrosine
 - Urate
 - Hippurate
 - L-Histidine
- Diabéticos con dieta enriquecida:
 - Uridine
 - L-pyroglutamic acid
 - D-metionine
 - D-asparagine monohydrate

Figura 48. Metabolitos diferenciadores a tiempo 12 entre sanos y diabéticos tratados.

La interpretación de los compuestos diferenciadores entre estos dos grupos a tiempo 12 (final del estudio) se hará conjuntamente al final del siguiente subapartado.

b) *Pacientes diabéticos no tratados y pacientes diabéticos tratados*: Los gráficos del análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales (PLS DA) comparando los escalados UV se muestran en la Figura 49.

1= Diabéticos tratados
2= Diabéticos sin tratamiento

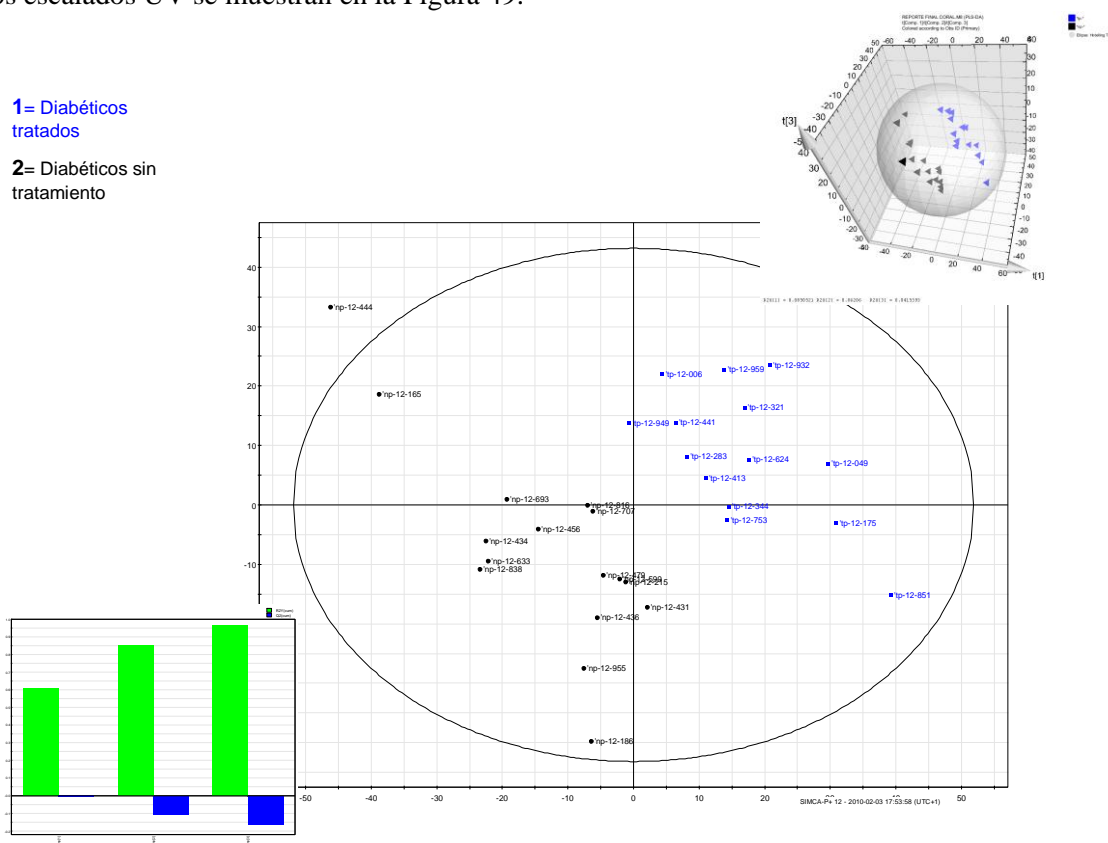


Figura 49. PLS-DA a los 12 meses entre diabéticos tratados y no tratados.

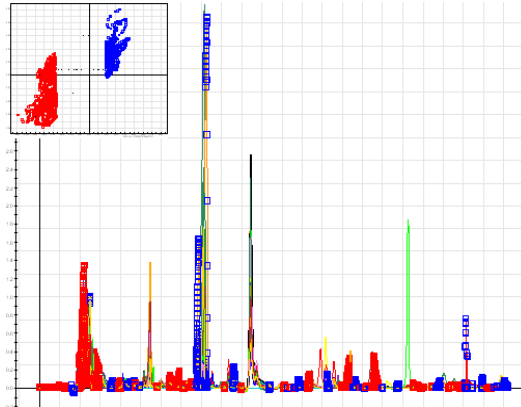


Figura 50. Picos responsables de la clasificación.

METABOLITOS IDENTIFICADOS PN 12 MESES

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Diabéticos con dieta enriquecida: <ul style="list-style-type: none"> – β-Phenyllactate – Quinaldic acid – D-metionine – Isovanillic acid | <ul style="list-style-type: none"> • Diabéticos sin dieta enriquecida: <ul style="list-style-type: none"> – Urea – D-metionine – Creatinine – Phenaceturic acid – Uridine – 3-nitro-L-tyrosine |
|--|--|

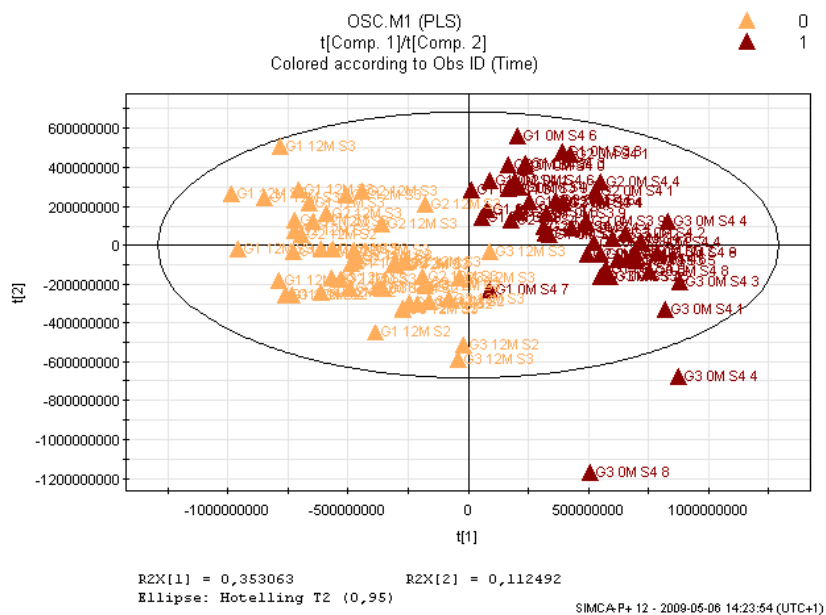
Figura 51. Metabolitos diferenciadores posibles entre diabéticos tratados y no tratados al final del estudio

Haciendo una **interpretación conjunta** con polaridad normal en orina de los tres grupos puede observarse, pese a que no se ha obtenido buena predicción con el modelo estadístico utilizado, un compuesto diferenciador que merece ser interpretado: la 3-nitro-L-tirosina. Este compuesto es un producto de la nitración de tirosina mediado por especies reactivas del nitrógeno tales como el anión peroxinitrito y dióxido de nitrógeno. Es detectado en algunas condiciones patológicas y es considerado como un marcador del estrés oxidativo dependiente de NO. A tiempo 0 (inicio del estudio) este predominio sutil se encuentra, paradójicamente, en sanos; a tiempo 12 (final del estudio) persiste este predominio en sanos si se comparan éstos con el grupo completo de diabéticos pero, analizados los diabéticos por separado (los que toman el producto frente a los que no), dicho predominio se encuentra en los que no toman el producto. Estos hallazgos contradictorios junto con la mala predictibilidad del modelo estadístico determinan que no pueda hacerse una interpretación correcta. No obstante, proponemos en un estudio ulterior, que no es objeto de este trabajo, un análisis directo en orina de dicha sustancia en las mismas muestras.

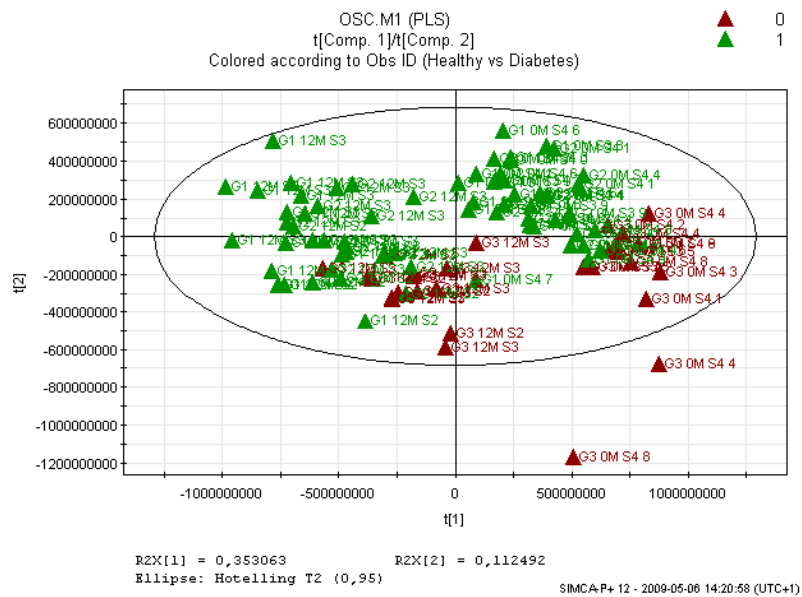
➤ **en plasma:** las muestras a los 0 y 12 meses se han analizado por espectrometría de masas (ionización por electrospray) tras una extracción en fase sólida de la muestra (véanse detalles de la técnica en el anexo de la página 124); son dos los modos utilizados en dicho procedimiento (positivo y negativo). Los métodos estadísticos utilizados son PCA (Principal Component Analysis - análisis de componentes principales), PLS-DA (Partial Least Squares - análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales) y OSC-PLS (tratamiento de los datos con Ortogonal Signal Correction - corrección ortogonal de la señal, y aplicación posterior del modelo PLS), si bien, solo mostraremos los resultados de este último método ya que es el único que muestra una adecuada clasificación en lo que respecta al efecto del tiempo y de la dieta.

❖ **modo positivo:**

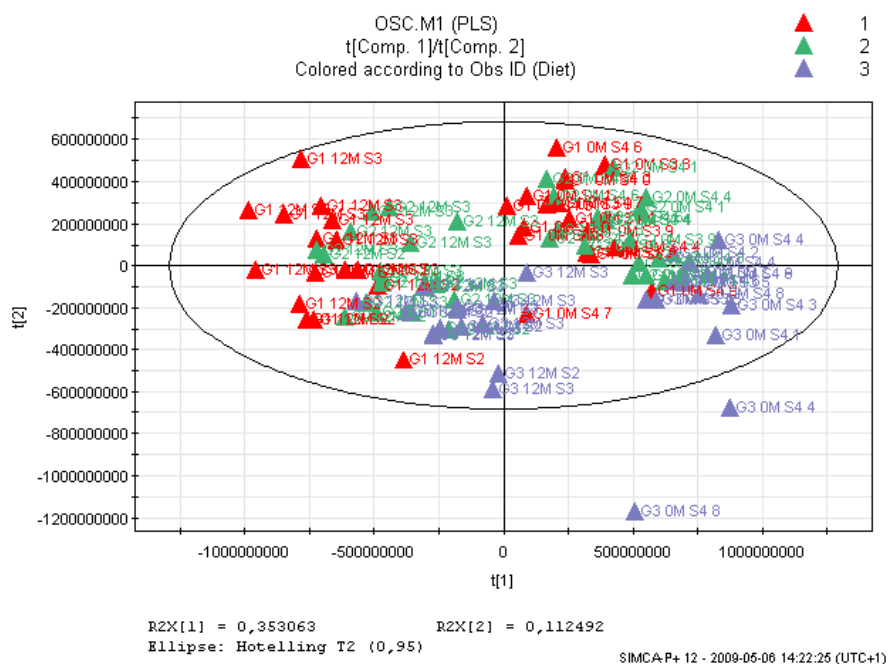
- PCA: Hay sutiles diferencias en el tiempo (0 y 12 meses) aunque sin posibilidades de diferenciación entre grupos de patología (diabéticos y sanos) ni por efecto de la dieta.
- PLS-DA: Hay claras diferencias en el tiempo (0 y 12 meses) aunque no se objetivan diferencias entre grupos de patología ni por efecto de la dieta.
- OSC-PLS:
 - TIEMPOS: Hay diferencias en el tiempo (0 meses (1): marrón y 12 meses (1): naranja):



- GRUPOS SANOS vs DIABETICOS: Aplicando colores diferentes a la misma gráfica anterior según los grupos, se observa una pequeña diferencia entre éstos (diabéticos totales (1): verde, y sanos: marrón (0)), si bien, esta diferencia se debe al efecto tiempo ya que ambos están agrupados (0 y 12 meses):

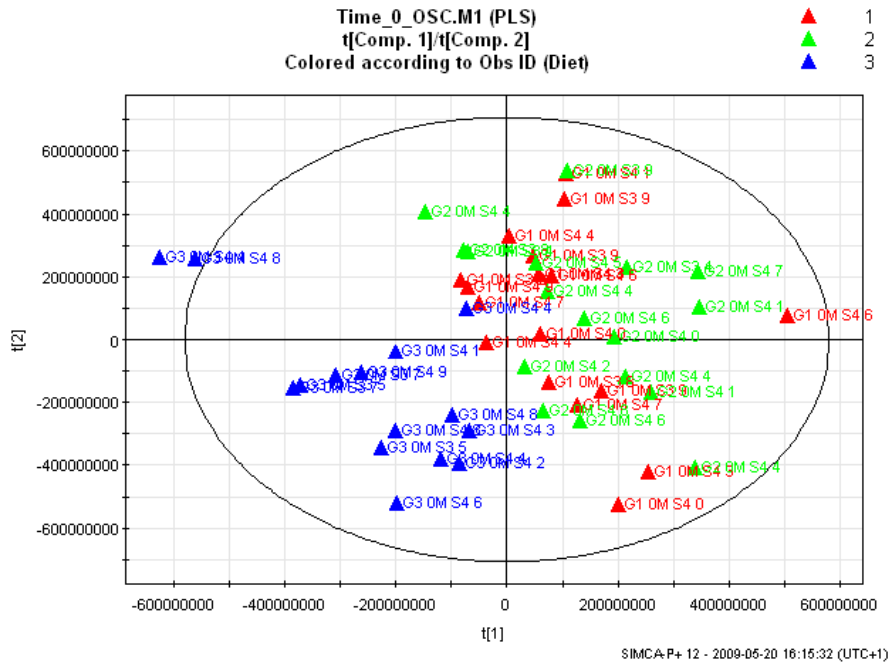


▪ EFECTO DIETA: En este caso, la misma gráfica coloreada ahora para los 3 grupos permite la obtención de mínimas diferencias entre los grupos 1 (rojo) y 3(azul) que tomaron la dieta respecto al grupo 2 (verde) que no la tomó. Dicha diferencia también se debe fundamentalmente al efecto tiempo:

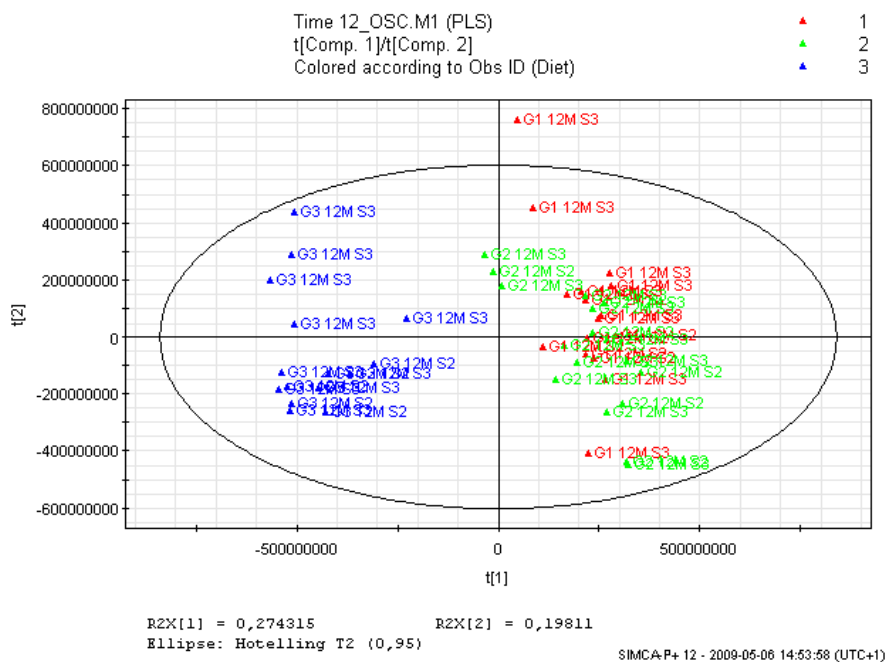


▪ ANALISIS SEPARADO de los TIEMPOS y por GRUPOS para ver EFECTO DIETA real:

- A *tiempo 0*, existe diferencia significativa ($p < 0.01$) entre sanos (grupo 3: azul) y diabéticos (grupos 1: rojo y 2: verde). Se puede comprobar como el grupo de los diabéticos totales (grupo 1 y 2) están agrupados y, por tanto, se trata de un grupo homogéneo:



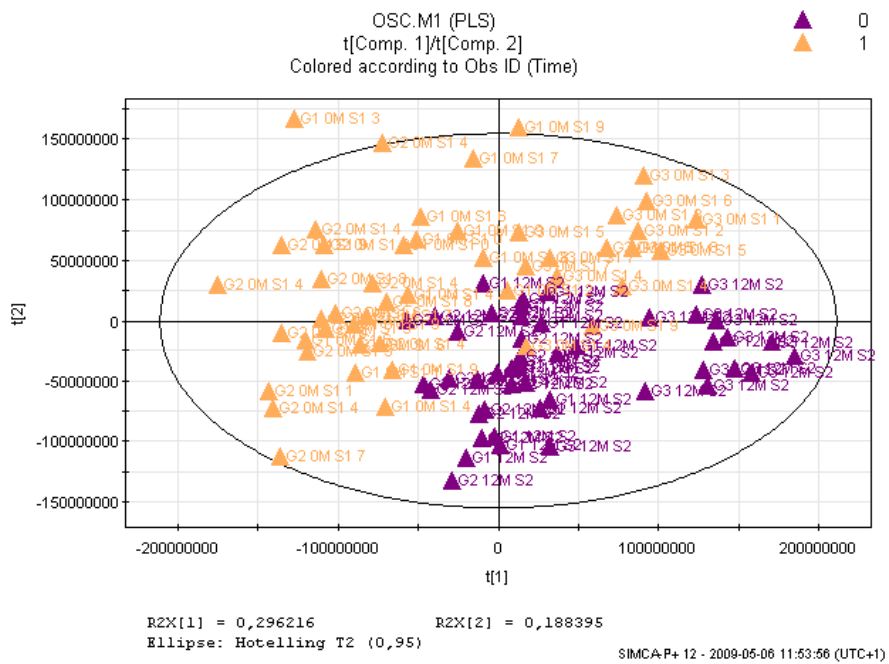
- A tiempo 12, se mantiene dicha diferencia (sanos versus diabéticos con $p < 0.001$) pero no se obtiene diferencias entre los diabéticos que han tomado la dieta (grupo 1: rojo) respecto a los que no lo hicieron (grupo 2: verde).



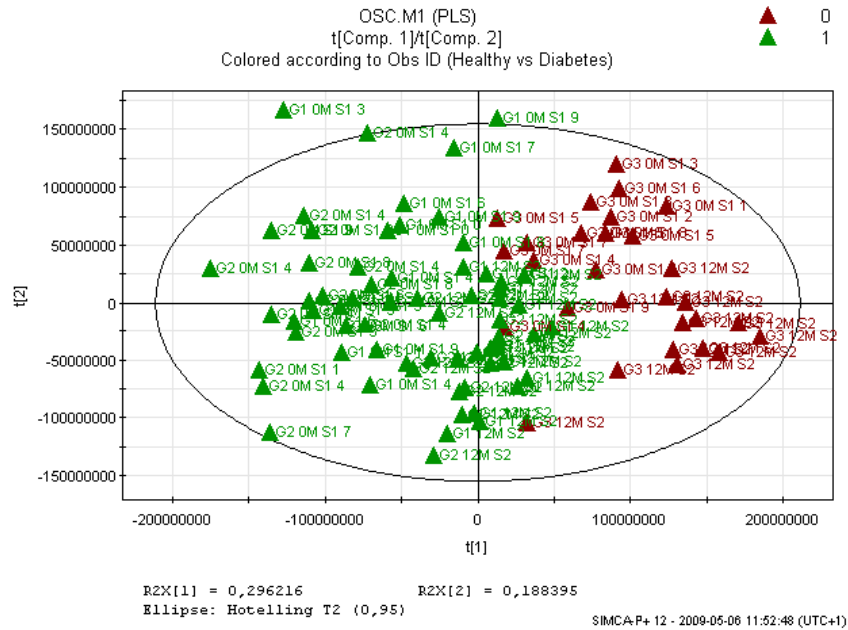
INTERPRETACION de los DATOS: Para los metabolitos obtenidos que se ionizan positivamente existen diferencias del perfil metabólico al comienzo del estudio entre diabéticos y sanos, si bien, aunque dicha diferencia se mantiene con el tiempo, el consumo del producto no implica una separación y, por tanto, un efecto de sobre dicho perfil entre los diabéticos que han tomado el producto (grupo 1) sobre los que no lo han tomado (grupo 2).

❖ **modo negativo:**

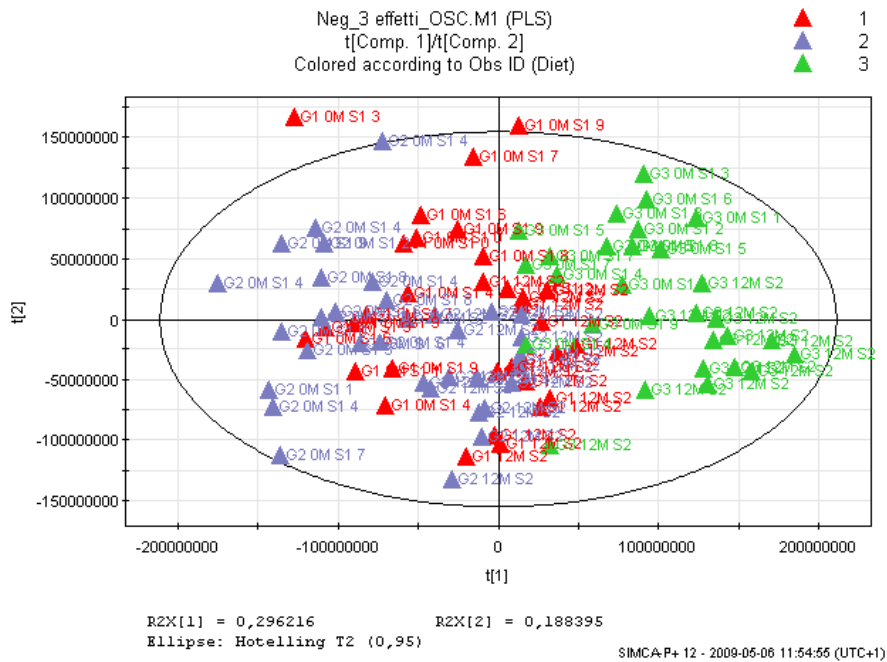
- PCA: Hay diferencias en el tiempo (0 y 12 meses) aunque sin posibilidades de diferenciación entre grupos de patología (diabéticos y sanos) ni por efecto de la dieta.
- PLS-DA: Hay diferencias en el tiempo (0 y 12 meses) y una mínima diferencia entre grupos de patología aunque no se pueden establecer diferencias por efecto de la dieta.
- PLS-OSC:
 - TIEMPOS: Hay diferencias en el tiempo (0 meses (1): marrón y 12 meses (0): violeta):



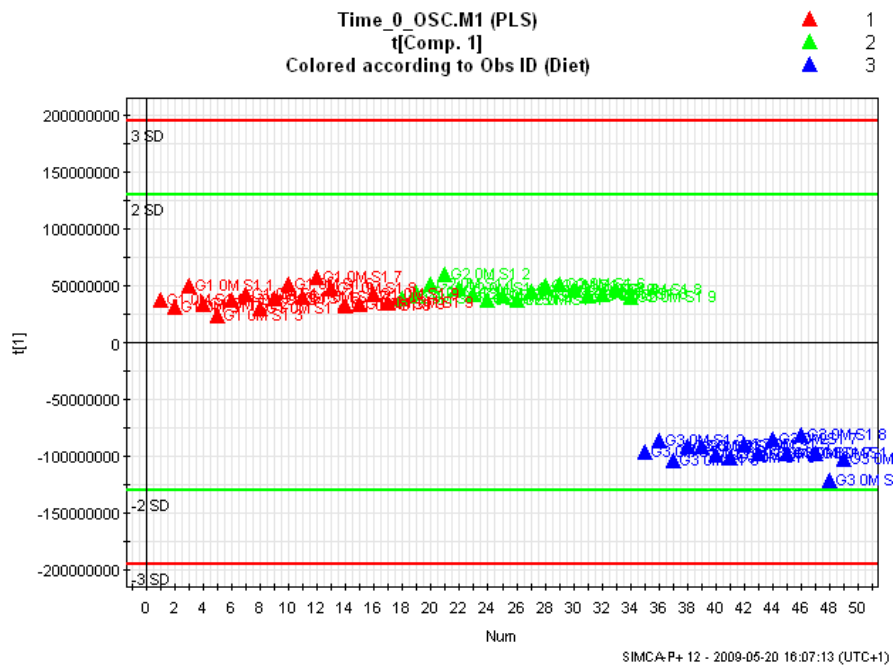
- GRUPOS SANOS vs DIABETICOS: Aplicando colores diferentes a la misma gráfica anterior según los grupos, se observa diferencia entre ambos (diabeticos totales: verde, y sanos: marrón), si bien, esta diferencia se debe al efecto tiempo ya que están agrupados los dos tiempos (0 y 12 meses):



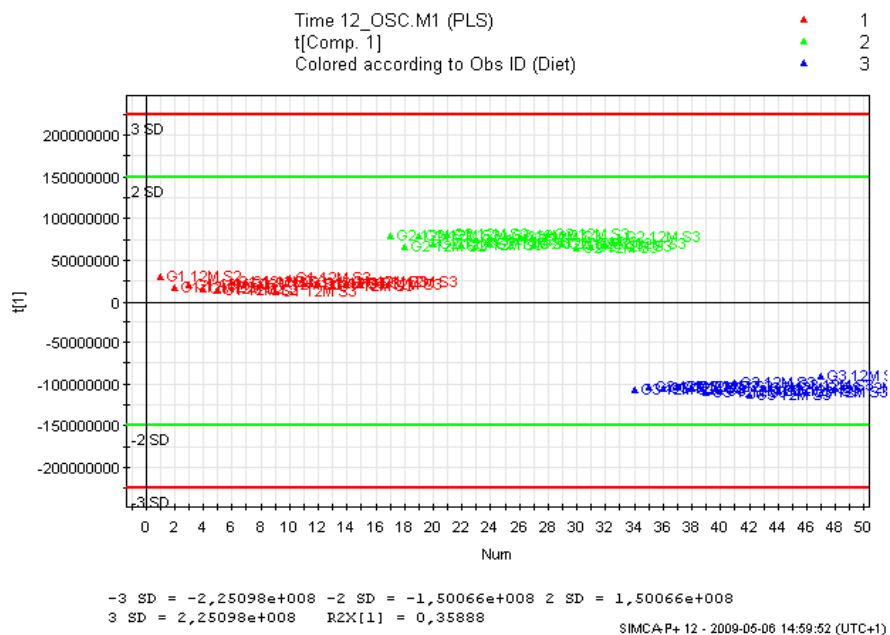
- EFECTO DIETA: En este caso, la misma gráfica coloreada ahora para los 3 grupos permite la obtención de diferencias entre los grupos 1 (rojo) y 3(verde) que tomaron la dieta respecto al grupo 2 (azul) que no la tomó, si bien, al igual que en el caso anterior, el efecto tiempo interfiere sobre este resultado:



- ANALISIS SEPARADO de los TIEMPOS y por GRUPOS para ver EFECTO DIETA real:
 - A *tiempo 0*, existe diferencia significativa ($p < 0.001$) entre sanos (grupo 3: azul) y diabéticos (grupos 1: rojo, y grupo 2: verde):



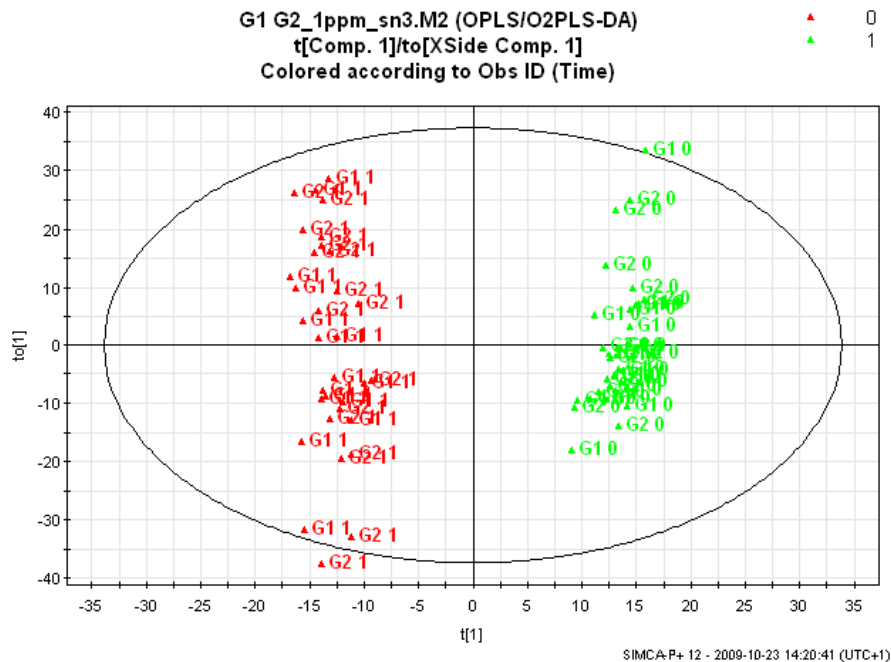
- A tiempo 12, se mantiene dicha diferencia (sanos *versus* diabéticos con $p < 0.001$) y también se observan diferencia, aunque no significativa, entre los diabéticos que han tomado la dieta (grupo 1) respecto a los que no lo hicieron (grupo 2).



INTERPRETACION de los DATOS: Para los metabolitos que se ionizan negativamente existen diferencias del perfil metabolómico al comienzo del estudio entre diabéticos y sanos. Dicha diferencia se mantiene con el tiempo y, además, se encuentra una separación mínima, aunque no significativa, de los perfiles al final del estudio por efecto de la dieta entre los diabéticos que han tomado el producto (grupo 1) y los que no lo han tomado (grupo 2). Por consiguiente, se podría deducir, pese a la ausencia de significación estadística, que el consumo de la dieta enriquecida con antioxidantes y PUFAs- $\omega 3$ produce un cambio del perfil metabolómico que acerca sutilmente los diabéticos que sí la tomaron a los sanos.

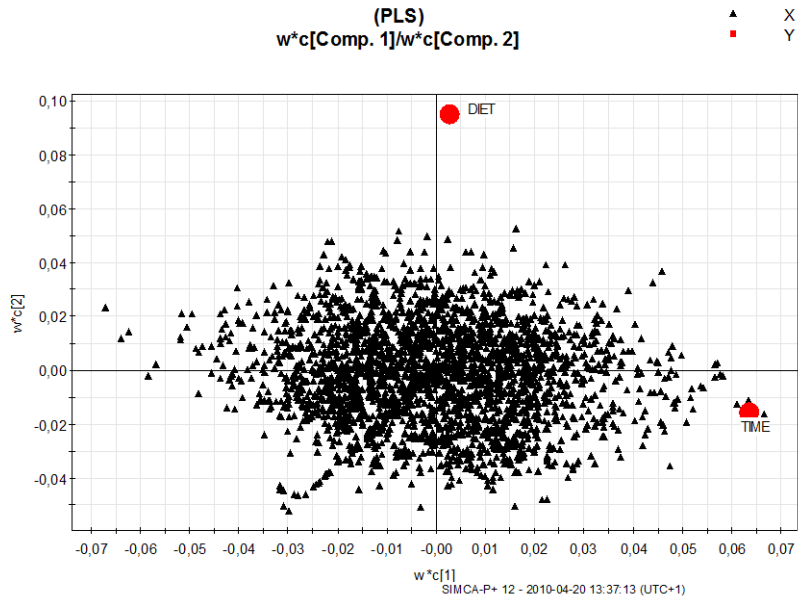
La obtención de este resultado diferenciador sin significación estadística pero de gran interés clínico obliga a la aplicación de los mismos métodos estadísticos en ausencia del grupo 3 (sanos), con objeto de eliminar la influencia teórica de la gran separación existente entre este grupo con los otros dos:

- Estudio del efecto TIEMPO mediante PLS-DA (solo grupos 1 y 2). Hay claras diferencias del perfil metabólico en el tiempo (0 meses: verde y 12 meses: rojo):

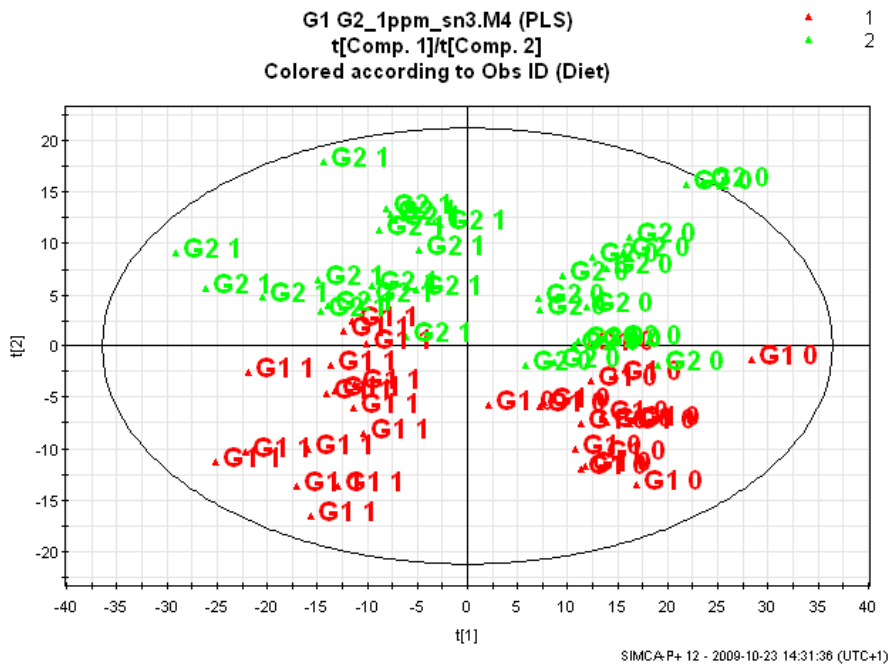


- Estudio del efecto DIETA: Ninguno de los modelos estadísticos ofrecen validez en la interpretación.
- Estudio del efecto combinado TIEMPO-DIETA mediante PLS (solo grupos 1 y 2): considerando que el tiempo y la dieta pueden compartir propiedades difíciles de separar, se decidió estudiar estadísticamente el efecto combinado de ambos (tiempo-dieta). Para ello se aplicó PLS empleando dos variables dependientes (tiempo y dieta), se obtuvieron 7 componentes por procedimiento de validación cruzada proporcionando un $R^2(Y)=0.98$ y un $Q^2(\text{cum})=0.75$. Estos parámetros definen una elevada bondad del ajuste (R^2) y de la predicción (Q^2).

En la siguiente figura se muestran las contribuciones (*loadings*) de las variables originales en las dos primeras componentes:



Finalmente, en el gráfico combinado de las muestras en el plano de las dos componentes se observa una clara separación entre los dos grupos de diabéticos (rojo: diabéticos que toman el producto, y verde: diabéticos que no lo toman):



Se estima que el efecto tiempo explica 42,3% de la variabilidad de los datos, mientras que el efecto dieta explica un 32,7%; es decir, entre ambos explican un 75% de la variabilidad. El efecto del tiempo se explica por la primera componente, mientras que el efecto de la dieta se expresa por la segunda componente.

Llegados a este punto, se procedió a determinar qué posibles metabolitos eran responsables de tales diferencias, es decir, qué compuestos cambian a lo largo del tiempo como consecuencia de la dieta entre los diabéticos que la tomaron respecto a los que no la tomaron. En este proceso se obtuvieron un total de 1253 masas/cargas de las cuales solo 205 eran metabolitos conocidos.

El siguiente paso en la secuencia del estudio metabolómico es la **identificación de los compuestos**. Como se mencionó anteriormente, sabiendo que tales masas/cargas se corresponden con un grupo amplio de metabolitos candidatos y que, además, podemos acotar la búsqueda para quedarnos con aquellos compuestos que sabemos pueden ser efecto de la dieta suplementada con antioxidantes y PUFAs- ω 3, se han asignado tentativamente los siguientes metabolitos candidatos para los diabéticos que no han tomado el producto empleando la KEGG database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), la HMDB (Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/>) y la LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org/>):

VIP	Fórmula química	Masa molecular (IFT-ICR-MS)	Diferencia de masa molecular con el compuesto sugerido (Da)	Error (ppm)	Molécula candidata	Información
1.2812	C16H30O2	253.2173	0	0	Ácido palmítoleico	Constituyente del tejido graso
1.1712	C14H26O2	225.186	0	0	Ácido 5-tetradecenoico	Intermediario de la oxidación de ácidos grasos insaturados
1.1798	C20H34O3	321.2435	0.000031	0.096500007	Ácido 15(S)-hidroxieicosatrienoico	Metabolito del ácido gamma-linolénico
1.1264	C20H30O3	317.2122	0.000031	0.09772638	Ácido 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoico	El 5-KETE es un potente quimiotáctico de neutrófilos y eosinófilos, relacionado con el metabolismo del ácido araquidónico
1.3853	C18H30O2	277.2173	0.000031	0.111825633	Ácido alfa-linolénico	Omega 3
1.0853	C17H34O2	269.2486	0.000031	0.115135232	Ácido heptadecanoico	Derivado del consumo de grasas (leche y carnes)
1.3327	C20H32O2	303.2329	0.000061	0.201165507	Ácido araquidónico	
1.4401	C16H28O2	251.2017	0.000061	0.242832752	Ácido 7,10-hexadecadienoico	Intermediario del metabolismo de ácidos grasos insaturados
1.1073	C17H34O2	315.254	0.000092	0.291828177	Ácido heptadecanoico	Ver más arriba
1.404	C21H30O5	407.2074	0.000122	0.299601628	18-hidroxicorticosterona	Síntesis de colesterol
1.1707	C18H36O3	299.2591	0.000092	0.307425906	3-hidroxioctadecanoico	Intermediario de la biosíntesis de ácidos grasos insaturados
1.1091	C14H18N2O4	277.1195	0.000122	0.440243289	N1-(alfa-D-ribosil)-5,6-dimetilbenzimidazol	Intermediario en el metabolismo de la riboflavina
1.3326	C42H82NO8P	804.5764	0.000366	0.454897757	Fosfatidil colina (20:0/14:1)	Glicerofosfolípido
1.1136	C25H40O4	403.2858	0.00039	0.967056118	MG (22:5/0:0/0:0)	Monoacilglicerol

En esta tabla se muestran los metabolitos propuestos, su importancia en el modelo (determinada por el mayor número VIP), la masa molecular obtenida mediante FT-ICRMS, la fórmula empírica de la molécula candidata, la diferencia de masa entre la molécula y la masa

molecular obtenida, su error (en ppm), y, por último, el nombre e información relevante sobre la molécula propuesta. En esta identificación tentativa deben considerarse como probables aquellas moléculas con errores menores de 1 ppm.

La mayor parte de las moléculas sugeridas como diferenciadoras entre ambos grupos son ácidos grasos de cadena larga que intervienen en la vía de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (v.g. ácido palmitoleico) así como de la oxidación de estos (ácido 5-tetradecenoico).

Un penúltimo paso de la sistemática en metabolómica, y que no es objeto del presente trabajo, es la **validación de los compuestos** identificados como candidatos, y de sus variaciones según la dieta y el tiempo. Esto es, la determinación real de los niveles de dichos compuestos empleando otras técnicas analíticas basadas en el empleo de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para terminar, por último, con la interpretación de resultados y buscar las posibles rutas metabólicas implicadas.

VII. CONCLUSIONES

A. CONCLUSIONES PRIMARIAS:

1. No se encuentran alteraciones significativas del perfil oxidativo medido según los métodos habituales en pacientes pediátricos prepuberales con Diabetes Mellitus tipo 1 comparados con la población sana. Las discrepancias con otros estudios pueden permitirnos la siguiente conclusión: el estrés oxidativo posiblemente se vea menos alterado en pacientes prepuberales con Diabetes Mellitus tipo 1 ya establecida pero no muy avanzada.
2. No se encuentran alteraciones significativas del perfil lipídico básico en pacientes pediátricos prepuberales con Diabetes Mellitus tipo 1 comparados con la población sana.
3. Tras la ingesta de productos cárnicos enriquecidos con antioxidantes derivados del aceite de romero y ácidos grasos omega-3, se han encontrado diferencias del perfil metabólico entre diabéticos de los dos grupos, observándose una tendencia hacia la normalización en pacientes diabéticos que los han consumido.
4. Los productos cárnicos enriquecidos en antioxidantes derivados del aceite de romero y ácidos grasos omega-3 son seguros, es decir, pueden ser utilizados habitualmente en la dieta de los enfermos con diabetes mellitus tipo 1 ya que son bien tolerados, no producen alteraciones en los parámetros específicos de control de la enfermedad y son bien aceptados.

B. CONCLUSIONES SECUNDARIAS:

1. Se requieren más estudios que pongan de manifiesto, en pacientes pediátricos con Diabetes Mellitus tipo 1, alteraciones más sutiles del perfil oxidativo basados en la medición de otros marcadores.
2. Son necesarios más estudios a largo plazo que evalúen la eficacia real de terapias similares en distintos estadios evolutivos de la Diabetes Mellitus tipo 1.
3. Los estudios metabólicos han permitido la obtención del perfil metabólico de sujetos sanos comparados con pacientes diabéticos, y podría permitir el descubrimiento de biomarcadores de estrés oxidativo que complementen, junto con los marcadores habituales, el grado de control de la Diabetes Mellitus tipo 1.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Asai A, Nakagawa K, Miyazawa T. Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid peroxidation and liver lipid metabolism in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*1999 Dec;63(12):2118-22.
2. Babu US, Wiesenfeld PL, Jenkins MY. Effect of dietary rosemary extract on cell-mediated immunity of young rats. *Plant Foods Hum Nutr*1999;53(2):169-74.
3. Fahim FA, Esmat AY, Fadel HM, Hassan KF. Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *Int J Food Sci Nutr*1999 Nov;50(6):413-27.
4. Kuzmenko AI, Morozova RP, Nikolenko IA, Donchenko GV, Richeimer SL, Bailey DT. Chemiluminescence determination of the in vivo and in vitro antioxidant activity of RoseOx and carnosic acid. *J Photochem Photobiol B*1999 Jan;48(1):63-7.
5. Makino T, Ono T, Muso E, Yoshida H, Honda G, Sasayama S. Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant*2000 Aug;15(8):1140-5.
6. Steiner M, Priel I, Giat J, Levy J, Sharoni Y, Danilenko M. Carnosic acid inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Nutr Cancer*2001;41(1-2):135-44.
7. Fawcett JR, Bordayo EZ, Jackson K, Liu H, Peterson J, Svitak A, et al. Inactivation of the human brain muscarinic acetylcholine receptor by oxidative damage catalyzed by a low molecular weight endogenous inhibitor from Alzheimer's brain is prevented by pyrophosphate analogs, bioflavonoids and other antioxidants. *Brain Res*2002 Sep 20;950(1-2):10-20.
8. Hasler CM. Functional foods: benefits, concerns and challenges-a position paper from the american council on science and health. *J Nutr*2002 Dec;132(12):3772-81.
9. Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis*2002 Jun;23(6):983-91.
10. Offord EA, Gautier JC, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Kramer K, et al. Photoprotective potential of lycopene, beta-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med*2002 Jun 15;32(12):1293-303.
11. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med*1994;16:383-91.
12. Baynes J. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*1991;40:405-12.
13. Nath N, Chari S, Rathi A. Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes*1984;33(6):586-9.
14. Thompson K, Godin D, Lee M. Tissue antioxidant status in streptozotocin-induced diabetes in rats. Effects of dietary manganese deficiency. *Biol Trace Elem Res*1992;35(3):213-24.
15. Sundaram R, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram K. Antioxidant status and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Colch)*1996;90:255-60.

16. Leonhardt W, Hanefeld M, Muller G, Hora C, Meissner D, Lattke P, et al. Impact of concentrations of glycated hemoglobin, alpha-tocopherol, copper, and manganese on oxidation of low-density lipoproteins in patients with type I diabetes, type 2 diabetes and control subjects. *Clin Chim Acta*1996;254:173-86.
17. Tsai E, Hirsch I, Brunzell J, Chait A. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes*1994;43:1010-4.
18. Maxwell S, Lip G. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *Br J Clin Pharmacol*1997;44:307-17.
19. Srinivasan K, Pugalendi K, Sambandam G, Rao M, Menon P. Diabetes mellitus, lipid peroxidation and antioxidant status in rural patients. *Clin Chim Acta*1997;259 183-6.
20. Thompson K, Godin D. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutr Res*1995;15(9):1377-410.
21. Rosen P, Nawroth P, King G, Moller W, Tritschler H, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*2001;17:189-212.
22. MacRury S, Lennie S, McColl P, Balendar R, MacCuish A, Lowe G. Increased red-cell aggregation in diabetes-mellitus - association with cardiovascular risk-factors. *Diabetic Medicine* 1993;10(1):21-6.
23. Nourooz Zadeh J, Tajaddini Sarmadi J. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*1995;44(9):1054-8.
24. Nourooz Zadeh J, Rahimi A. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia*1997;40(6):647-53.
25. Leinonen J, Lehtimaki T. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non- insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*1997;417(1):150-2.
26. Velazquez E, Winocour P. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabet Med*1991;8(8):752-8.
27. Nishigaki I, Hagihara M. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem Med*1981;25(3):373-8.
28. Altomare E, Vendemiale G. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabete Metab*1992;18(4):264-71.
29. Jennings P, Jones A. Increased diene conjugates in diabetic subjects with microangiopathy. *Diabet Med*1987;4(5):452-6.
30. Haffner S, Agil A. Plasma oxidizability in subjects with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance, and NIDDM. *Diabetes Care*1995;18(5):646-53.
31. Davi G, Ciabattoni G. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F2 alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*1999;99(2):224-9.

32. Dandona P, Thusu K. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*1996;347:444-5.
33. Gopaul N, Anggard E. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non- insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*1995;368(2):225-9.
34. Halliwell B, Gutteridge J, editors. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3^o ed. Oxford, UK: Clarendon Press; 1998.
35. Halliwell B, Cross C, Gutteridge J. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*1992;119:598-620.
36. Southorn P. Free radicals in medicine. II: Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc*1988;63:390-408.
37. Sies H, editor. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press; 1991.
38. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*2001 Dec 13;414(6865):813-20.
39. Menon V, Ram M, Dorn J, Armstrong D, Muti P, Freudenheim JL, et al. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabet Med*2004 Dec;21(12):1346-52.
40. Ford ES, Mokdad AH, Ajani UA, Liu S. Associations between concentrations of alpha- and gamma-tocopherol and concentrations of glucose, glycosylated haemoglobin, insulin and C-peptide among US adults. *Br J Nutr*2005 Feb;93(2):249-55.
41. Tsubouchi H, Inoguchi T, Inuo M, Kakimoto M, Sonta T, Sonoda N, et al. Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic beta-cell line, MIN6-a role of NAD(P)H oxidase in beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*2005 Jan 7;326(1):60-5.
42. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab*2000 Aug;85(8):2970-3.
43. Kunisaki M, Umeda F, Yamauchi T, Masakado M, Nawata H. High glucose reduces specific binding for D-alpha-tocopherol in cultured aortic endothelial cells. *Diabetes*1993 Aug;42(8):1138-46.
44. Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*1996 Apr;45(4):471-7.
45. Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M, Damante G, et al. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes*2000 Dec;49(12):2170-7.
46. Clapés S, Armas D, Sánchez D, Lemani M, Márquez I, Valdés M. Algunos indicadores de estrés oxidativo en niños diabeticos. *Rev Cubana Farm*2002;26(2):203-5.
47. Salardi S, Zucchini S, Elleri D, Grossi G, Bargossi AM, Gualandi S, et al. High glucose levels induce an increase in membrane antioxidants, in terms of vitamin E and coenzyme Q10, in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*2004 Feb;27(2):630-1.
48. Bellizzi MC, Dutta-Roy AK, James WP. High D-glucose does not affect binding of alpha-tocopherol to human erythrocytes. *Mol Cell Biochem*1997 May;170(1-2):187-93.
49. Smit AJ, Lutgers HL. The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Curr Med Chem*2004 Oct;11(20):2767-84.

50. Zhang WR, Hou FF, Liu SX, Guo ZJ, Zhou ZM, Wang GB, et al. [Advanced glycation end products accelerate atherosclerosis via enhancement of oxidative stress]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*2004 Jul 2;84(13):1066-72.
51. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*1990 Dec 31;173(3):932-9.
52. Shangari N, O'Brien PJ. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochem Pharmacol*2004 Oct 1;68(7):1433-42.
53. Yamagishi S, Takeuchi M. Nifedipine inhibits gene expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in endothelial cells by suppressing reactive oxygen species generation. *Drugs Exp Clin Res*2004;30(4):169-75.
54. Dettoraki A, Gil AP, Spiliotis BE. Association between serum levels of the soluble receptor (sRAGE) for advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptor (RAGE) in peripheral blood mononuclear cells of children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*2009 Oct;22(10):895-904.
55. Argiles JM, Lopez-Soriano J, Ortiz MA, Pou JM, Lopez-Soriano FJ. Interleukin-1 and beta-cell function: more than one second messenger? *Endocr Rev*1992 Aug;13(3):515-24.
56. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*2000 Oct 24;97(22):12222-6.
57. Fukase S, Sato S, Mori K, Secchi EF, Kador PF. Polyol pathway and NADPH-dependent reductases in dog leukocytes. *J Diabetes Complications*1996 Nov-Dec;10(6):304-13.
58. McClain DA, Crook ED. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes*1996 Aug;45(8):1003-9.
59. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*1998 Jan 1;101(1):160-9.
60. Wender-Ozegowska E, Kozlik J, Biczysko R, Ozegowski S. Changes of oxidative stress parameters in diabetic pregnancy. *Free Radic Res*2004 Aug;38(8):795-803.
61. Horal M, Zhang Z, Stanton R, Virkamaki A, Loeken MR. Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: involvement in diabetic teratogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*2004 Aug;70(8):519-27.
62. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Mann GE, Zhang JJ, Kohner EM. Protein kinase C beta2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes*2003 Jun;52(6):1519-27.
63. Yuan SY, Ustinova EE, Wu MH, Tinsley JH, Xu W, Korompai FL, et al. Protein kinase C activation contributes to microvascular barrier dysfunction in the heart at early stages of diabetes. *Circ Res*2000 Sep 1;87(5):412-7.
64. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*2001 Jun;44(6):659-73.
65. Rask-Madsen C, King GL. Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*2005 Mar;25(3):487-96.

66. Talior I, Tennenbaum T, Kuroki T, Eldar-Finkelman H. PKC-delta-dependent activation of oxidative stress in adipocytes of obese and insulin-resistant mice: role for NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2005 Feb;288(2):E405-11.
67. Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sekiguchi N, Kobayashi K, Matsumoto S, et al. Evaluation of oxidative stress in diabetic animals by in vivo electron spin resonance measurement--role of protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract*2004 Dec;66 Suppl 1:S109-13.
68. Jos J, Rybak M, Patin PH, Robert JJ, Boitard C, Thevenin R. [Antioxidant enzymes in insulin-dependent diabetes in the child and adolescent]. *Diabete Metab*1990 Dec;16(6):498-503.
69. Asayama K, Uchida N, Nakane T, Hayashibe H, Dobashi K, Amemiya S, et al. Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med*1993 Dec;15(6):597-602.
70. Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*1998;21(10):1736-42.
71. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest*1999 Apr;59(2):99-105.
72. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med*2003 Jun 15;34(12):1563-74.
73. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, Soucek J, Trefil L, Pomahacova R. Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications*2003 Jan-Feb;17(1):7-10.
74. Davi G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, et al. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation*2003 Jul 1;107(25):3199-203.
75. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Estimation of lipoperoxidative damage and antioxidant status in diabetic children: relationship with individual antioxidants. *Free Radic Res*2005 Sep;39(9):933-42.
76. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Oxidative stress in childhood type 1 diabetes: Results from a study covering the first 20 years of evolution. *Free Radic Res*2007 Aug;41(8):919-28.
77. Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, Cuccovillo I, Doni M, Laragione T, et al. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. *J Mol Cell Cardiol*2004 Nov;37(5):959-68.
78. Brownlee M. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest*2003 Dec;112(12):1788-90.
79. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*2004 Feb;53 Suppl 1:S110-8.
80. Kaneto H, Kawamori D, Nakatani Y, Gorogawa S, Matsuoka TA. Oxidative stress and the JNK pathway as a potential therapeutic target for diabetes. *Drug News Perspect*2004 Sep;17(7):447-53.
81. Reaven P. Dietary and pharmacologic regimens to reduce lipid peroxidation in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*1995;62(6 Suppl):1483S-9S.

82. Fuller C, Chandalia M. RRR-alpha-tocopheryl acetate supplementation at pharmacologic doses decreases low-density-lipoprotein oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*1996;63(5):753-9.
83. Jialal I, Grundy S. Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low-density-lipoprotein. *J Lipid Res*1992;33(6):899-906.
84. Borcea V, Nourooz Zadeh J. Alpha-Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. *Free Radic Biol Med*1999;26(11-12):1495-500.
85. Haffner S. Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism*2000;49(2 Suppl 1):30-4.
86. Gallou G, Ruelland A. Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta*1993;214(2):227-34.
87. Hartnett M, Stratton R. Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*2000;23(2):234-40.
88. Vessby J, Basu S. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J Intern Med*2002;251(1):69-76.
89. Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*1999 Sep;70(3 Suppl):560S-9S.
90. Berry E. Are diets high in omega-6 polyunsaturated fatty acids unhealthy? . *Eur Heart J Supplements*2001;3(suppl D):D37-D41.
91. von Schacky C, Harris W. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. . *Cardiovasc Res* 2007 73(2):310-5.
92. Marchiolo R, Barzi F, Bomba E. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acid after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo studio della sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation*2002;105:1897-903.
93. Hu F, Bronner L, Willett W. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *J Am Med Assoc*2002;287:1815-21.
94. Browning L. N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and obesity-related disease. *Proceedings of the Nutrition Society*2003;62:447-53.
95. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*2002 Oct;56(8):365-79.
96. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*2002 Dec;21(6):495-505.
97. Howard B. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res*1987;28(6):613-28.
98. Reaven E, Reaven G. Mechanisms for development of diabetic hypertriglyceridemia in streptozotocin-treated rats. Effect of diet and duration of insulin deficiency. *J Clin Invest*1974;54(5):1167-78.

99. O'Looney P, Vander Maten M, Vahouny G. Insulin-mediated modifications of myocardial lipo-protein lipase and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*1983;258.(21):12994-3001.
100. Braun J, Severson D. Lipoprotein lipase release from cardiac myocytes is increased by de-cavanadate but not insulin. *Am J Physiol*1992;262(5):E663-E70.
101. Liu L, Severson D. Endothelial binding sites for lipoprotein lipase are not diminished in per-fused hearts from diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*1996;74(11):1204-9.
102. Rodrigues B, Braun J. Regulation of lipoprotein lipase activity in cardiac myocytes from control and diabetic rat hearts by plasma lipids. *Can J Physiol Pharmacol*1992;70(9):1271-9.
103. Braun J, Severson D. Diabetes reduces heparin- and phospholipase C-releasable lipoprotein lipase from cardiomyocytes. *Am J Physiol*1991;260(3):E477-E85.
104. Ewart H, Carroll R, Severson D. Lipoprotein lipase activity in rat cardiomyocytes is stimulated by insulin and dexamethasone. *Biochem J*1997;327:439-42.
105. Ewart H, Carroll R, Severson D. Lipoprotein lipase activity is stimulated by insulin and dexamethasone in cardiomyocytes from diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*1999;77(8):571-8.
106. Ewart H, Severson D. Insulin and dexamethasone stimulation of cardiac lipoprotein lipase activity involves the actin-based cytoskeleton. *Biochem J*1999;340:485-90.
107. Redgrave T, Callow M. The effect of insulin deficiency on the metabolism of lipid emulsion models of triacylglycerol-rich lipoproteins in rats. *Metabolism*1990;39(1):1-10.
108. Swami S, Sztalryd C, Kraemer F. Effects of streptozotocin-induced diabetes on low density lipoprotein receptor expression in rat adipose tissue. *J Lipid Res*1996;37(2):229-36.
109. González Santos P, Herrera Pombo J. Dislipemia diabética: Documento de consenso de la Sociedad Española de Diabetes y la Sociedad Española de Arteriosclerosis. *Av Diabetol*1998;14(1):33-43.
110. Bar-On H, Chen Y, Reaven G. Evidence for a new cause of defective plasma removal of very low density lipoproteins in insulin-deficient rats. *Diabetes*1981;30(6):496-9.
111. Verschoor L, Chen Y, Reaven G. Why does experimental insulin deficiency lead to a decrease in removal of very low density-triglyceride from plasma? *Horm Metab Res*1984;16(2):88-91.
112. Saheki S, Hitsumoto Y. In vitro degradation of very low density lipoprotein from diabetic patients by lipoprotein lipase. *Clin Chim Acta*, 1993;217(2):105-14.
113. Tavangar K, Murata Y. Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J Clin Invest*1992;90(5):1672-8.
114. Bogalho P. [Lipid disorders in children with insulin-dependent diabetes mellitus]. *Acta Med Port*1998 Jul;11(7):683-90.
115. Verges BL. Dyslipidaemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis. *Diabetes Metab*1999 Jun;25 Suppl 3:32-40.

116. Dullaart RP. Plasma lipoprotein abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Neth J Med*1995 Jan;46(1):44-54.
117. Kiziltunc A, Akcay F, Polat F, Kuskay S, Sahin YN. Reduced lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) and Na⁺, K⁺, ATPase activity in diabetic patients. *Clin Biochem*1997 Mar;30(2):177-82.
118. Schernthaner G, Kostner GM, Dieplinger H, Prager R, Muhlhauser I. Apolipoproteins (A-I, A-II, B), Lp(a) lipoprotein and lecithin: cholesterol acyltransferase activity in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*1983 Dec;49(3):277-93.
119. Parra Pallares S, Albaladejo Oton M, Martínez Hernández P. Modificaciones cualitativas de las lipoproteínas. Implicaciones fisiopatológicas. *An Med Interna*2000;17:317-23.
120. Kris-Etherton P, Harris W, Appel L. AHA scientific statement: fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:2747-57.
121. Dietary fat Consensus Statements. *Am J Med*2002;113(Suppl. 9B):5S-8S.
122. Harris W, von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Preventive Medicine*2004;39(1):212-20.
123. Carpentier Y, Portois L, Malaisse W. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*2006;83(Suppl. 6):1499S-504S.
124. De Caterina R, Caprioli R. N-3 fatty acids reduce proteinuria in patients with chronic glomerular disease. *Kidney Int*1993;44(4):843-50.
125. Gao W, Connor H. Primary nonfunction of fatty livers produced by alcohol is associated with a new, antioxidant-insensitive free radical species. *Transplantation*1995;59(5):674-9.
126. Rossing P, Hansen B. Fish oil in diabetic nephropathy. *Diabetes Care*1996;19(11):1214-9.
127. Donadio J, Bergstralh E. A controlled trial of fish oil in IgA nephropathy. Mayo Nephrology Collaborative Group. *N Engl J Med*1994;331(18):1194-9.
128. Hendra T, Britton M. Effects of fish oil supplements in NIDDM subjects. Controlled study. *Diabetes Care*1990;13(8):821-9.
129. Popp-Snijders C, Schouten J. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Res*1987;4(3):141-7.
130. Schectman G, Kaul S, Kissebah A. Effect of fish oil concentrate on lipoprotein composition in NIDDM. *Diabetes*1988;37(11):1567-73.
131. Borkman M, Chisholm D. Effects of fish oil supplementation on glucose and lipid metabolism in NIDDM. *Diabetes*1989;38(10):1314-9.
132. Friday K, Childs M. Elevated plasma glucose and lowered triglyceride levels from omega-3 fatty acid supplementation in type II diabetes. *Diabetes Care*1989;12(4):276-81.
133. Wahlqvist M, Lo C, Myers K. Fish intake and arterial wall characteristics in healthy people and diabetic patients. *Lancet*1989;334(8669):944-6.

134. Glauber H, Wallace P. Adverse metabolic effect of omega-3 fatty acids in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med*1988;108(5):663-8.
135. Stacpoole P, Alig J. Dose-response effects of dietary marine oil on carbohydrate and lipid metabolism in normal subjects and patients with hypertriglyceridemia. *Metabolism*1989;38(10):946-56.
136. Stacpoole P, Alig J. Lipodystrophic diabetes mellitus. Investigations of lipoprotein metabolism and the effects of omega-3 fatty acid administration in two patients. *Metabolism*1988;37(10):944-51.
137. Kasim S, Stern B. Effects of omega-3 fish oils on lipid metabolism, glycemic control, and blood pressure in type II diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*1988;67(1):1-5.
138. Harris W, Connor W. Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. *J Lipid Res*1990;31 (9):1549-58.
139. Harris W, Connor W. Dietary omega-3 fatty acids prevent carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism*1984;33(11):1016-9.
140. Ventura M, Woollett L, Spady D. Dietary fish oil stimulates hepatic low density lipoprotein transport in the rat. *J Clin Invest*1989;84(2):528-37.
141. Fasching P, Ratheiser K. Metabolic effects of fish-oil supplementation in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes*1991;40(5):583-9.
142. Storlien L, Kraegen E. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science*1987;237(4817):885-8.
143. Hamazaki T, Nakamura N, Kobayashi M. Effect of intravenous administration of docosahexaenoic acid emulsion on blood glucose and insulin concentrations in diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci*,1993;683:207-12.
144. Sotelo-Felix JI, Martinez-Fong D, Muriel De la Torre P. Protective effect of carnosol on CCl(4)-induced acute liver damage in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol*2002 Sep;14(9):1001-6.
145. Langseth L. Oxidants, antioxidants and disease prevention. *International Life Sciences Institute Brussels*1995: 1.
146. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*1991 Apr;40(4):405-12.
147. Garewal HS. *Antioxidants and disease prevention*. CRC Boca Raton1997.
148. Cutler RG. Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr*1991 Jan;53(1 Suppl):373S-9S.
149. Heinonen IM, Lehtonen PJ, Hopia AI. Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors. *J Agric Food Chem*1998 Jan 19;46(1):25-31.
150. Rac M, Ostric-Matijasevic B. The properties of rosemary as an antioxidant. *Rev Fr des Corps Gras*1955;2(796).
151. Brieskorn C, Fuchs A, Bredenberg JB, McChesney J, E. W. The structure of carnosol. *J Org Chem*1966;29:2293.
152. Wu J, Lee M, CT. H, SS. C. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from Rosemary. *JAOCS*1982;59:339.

153. Inatani R, Nakatani N, Fuwa H, H. S. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary. *Agr Biol Chem*1982;46:1666.
154. Inatani R, Nakatani N, Fuwa H. Antioxidative effect of the constituents of rosemary and their derivatives *Agricultural and Biological Chemistry*1983;47:521.
155. Nakatani N, Inatani R. Two antioxidative diterpenes from rosemary and a revised structure for rosmanol. *Agr Biol Chem*1984;48:2081.
156. Houlihan C, Ho C, Chang S. Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. *JAOCS*, 611984;61.
157. Houlihan C, Ho C, Chang S. The structure of rosmariquinone. A new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *JAOCS*1985;62.
158. Okamura N, Fujimoto Y, Kuwabara S, Yagi A. High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *J Chromatogr A*1994;679:381-6.
159. Aruoma OI, Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*1992;22:257-68.
160. Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *JAOCS*1996;73:645-52.
161. Haraguchi H, Saito T, Okamura N, Yagi A. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*1995;61(4):333-6.
162. Richheimer SL, Bailey DT, Bernart MW, Kent M, Vininski JV, Anderson LD. Antioxidant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary. *Recent Research Developments in Oil Chemistry*1999;3:45-58.
163. Schwarz K, Ternes W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z Lebens Unter Fors*1992;195:99.
164. Munné-Bosch S, Alegre L, Schwarz K. The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate. *Eur Food Res Technol*2000;210:263-7.
165. Luis JG. Chemistry, biogenesis, and chemotaxonomy of the diterpenoids of *Salvia*. . In: Harborne JB, Tomas-Barberan FA, editors. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Oxford: Clarendon Press; 1991. p. 63-82.
166. Luis JG, Quiñones W, Grillo TA, Kishi MP. Diterpenes from the aerial part of *Salvia columbariae*. *Phytochem*1994;35:1373-4.
167. Basaga H, Tekkaya C, Acikel F. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebens Wissen Technol*1997;30:105-8.
168. Frankel EN, Shu WH, Aeschbatch R, Prior E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J Agric Food Chem*1996;44:131.

169. Wada S, Fang X. The synergistic antioxidant effects of rosemary extract and α -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. *J Food Proc Pres*1992;16:263.
170. Wada S, Xin F. Synergistic antioxidant effects of rosemary and α -tocopherol at different storage temperature and its application for inhibiting dried sardine meat oxidation. *J Jap Oil Chem Soc*1994;43(109).
171. Hopia A, Shu W, Schwartz K, German J, Frankel E. Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *J Agric Food Chem*1996;44:2030-6
172. Seok JK, Daeseok H, Kwang DM, Joon SR. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosc Biotechnol Biochem*1995;59:822.
173. Singletary KW, Rokusek JT. Tissue specific enhancement of xenobiotic detoxification enzymes in mice by dietary rosemary extract. *Plant Foods for Human Nutrition*1997;50:47-53.
174. Chang S, inventor. U.S. patent 3,950,266. 1973.
175. Kimura Y, Kanamori T, inventors. U.S. patent 4,380,506. 1983.
176. Aesbach R, Philipposion G, inventors. Swiss patent 672,048, A5. 1987.
177. Vinai, inventor. US. patent 4,012,531. 1977.
178. Berner D, Jacobson G, inventors. US. patent 3,732,111. 1973.
179. Nguyen U, Frakman G, Evans D, inventors; Process for extracting antioxidants from Labiatae Herbs. US patent 5017397. 1991.
180. Nguyen U, Evans D, Frakman G. Natural antioxidants produced by supercritical fluid extraction. In: SSH. R, editor. *Supercritical Fluid Processing of Foods and Biomaterials*. London: Chapman & Hall; 1994. p. 103.
181. Muehlnikel T. Extraction with carbon dioxide. Manufacture of de-aromatized rosemary antioxidant. *Food Mark & Technol*1992;6:37.
182. Gerard D, Quirin K, Schwarz E. CO₂ extracts from rosemary and sage. *Food Mark & Technol* 1995;9:46-55.
183. Ibáñez E, Cifuentes A, Crego A, Señoráns F, Cavero S, Reglero G. Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *J Agric Food Chem*2000;48:4060-5.
184. Ibáñez E, Oca A, Murga G, López-Sebastián S, Tabera J, Reglero G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different pre-processed rosemary plants. *J Agric Food Chem*1999;47:1400-4.
185. Tena M, Valcárcel M, Hidalgo P, Uebera J. Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: comparison with liquid solvent sonication. *Anal Chem*1997;69:521-6.
186. Señorans F, Ibáñez E, Cavero S, Tabera J, Reglero G. LC/MS analysis of supercritical fluid extracts of rosemary plants. *J Chromatogr A*2000;870:491-9.

187. Ramírez P, Ibáñez E, Señoráns F, Reglero G. Separation of Rosemary Antioxidant Compounds by SFC with Coated Packed Capillary Columns. . *J Chromatogr A*2004;1057:241-5.
188. Cavero S, Jaime L, Martín-Álvarez P, Señoráns F, Reglero G, Ibañez E. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *Eur Food Res Technol*2005;221(478-486).
189. Mendes R, Coelho J, Fernandes H, Marrucho I, Cabral J, Novais J, et al. Applications of supercritical CO₂ Extraction to microalgae and plants. . *J Chem Technol Biotechnol*1995;62:53-9.
190. Quirin K. SFE of natural antioxidants from rosemary and sage. . *Innov Food Technol*2003;18:186-91.
191. Lopez-Sebastián S, Ramos E, Ibáñez E, Bueno J, Ballester L, Tabera J, et al. Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide. *J Agric Food Chem*1998;46(13-19).
192. Rupp H, Wagner D, Rupp T, Schulte L, Maisch B. Risk Stratification by the “EPA+DHA Level” and the “EPA/AA Ratio”. Focus on Anti-Inflammatory and Antiarrhythmic Effects of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids. *Herz*2004;29(7):673-85.
193. Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol*2006;48(4):677-85.
194. Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci*2004;41(1):41-78.
195. Simopoulos AP. The role of fatty acids in gene expression: health implications. *Ann Nutr Metab*1996;40(6):303-11.
196. Brown AJ, Roberts DC. Fish and fish oil intake: effect on haematological variables related to cardiovascular disease. *Thromb Res*1991 Oct 15;64(2):169-78.
197. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*1999 Aug 7;354(9177):447-55.
198. Reglero G, Frial P, Señoráns F, Ibáñez E, Santoyo S, Torres C, et al., inventors; Mezcla oleosa de ingredientes bioactivos naturales para la preparación de un producto alimenticio enriquecido. Spanish patent P200402755. 2004.
199. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med*2003;34(12):1563-74.
200. Caimi G, Carollo C, Lo Presti R. Diabetes mellitus: oxidative stress and wine. *Curr Med Res Opin*2003;19(7):581-6.
201. Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus. . *Clin Chem Lab Med*2003;41(8):995-8.
202. Costacou T, Zgibor J, Evans R, Tyurina Y, Kagan V, Orchard T. Antioxidants and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes: Findings from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *J Diabetes Complications*2006;20(6):387-94.

203. Erkkilä A, Lichtenstein A, Mozaffarian D, Herrington D. Fish intake is associated with reduced progression of coronary artery atherosclerosis in postmenopausal women with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*2004;80:626-32.
204. Nettleson J, Katz R. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *J Am Diet Assoc*2005;105:428-40.
205. Ramel A, Martinez JA, Kiely M, Bandarra NM, Thorsdottir I. Moderate consumption of fatty fish reduces diastolic blood pressure in overweight and obese European young adults during energy restriction. *Nutrition* Feb;26(2):168-74.
206. Sartorelli DS, Damiao R, Chaim R, Hirai A, Gimeno SG, Ferreira SR. Dietary omega-3 fatty acid and omega-3: omega-6 fatty acid ratio predict improvement in glucose disturbances in Japanese Brazilians. *Nutrition* Feb;26(2):184-91.
207. Lichtenstein AH, Schwab US. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis*2000 Jun;150(2):227-43.
208. Rivellese AA, Lilli S. Quality of dietary fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. *Biomed Pharmacother*2003 Mar;57(2):84-7.
209. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*2004 Aug;23(4):447-56.
210. Ryan M, McInerney D, Owens D, Collins P, Jonhson A, Tomkin G. Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium dependent vasoreactivity. *QJM* 2000;93:85-91.
211. Soriguer F, Esteve I, Rojo-Martinez G, Ruiz de Adana M, Dobarganes M, García-Almeida J, et al. Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). *Eur J Endocrinol*2004;150:33-9.
212. Cárdenas C, Bordiu E, Bagazgoitia J, Calle-Pascual A, Diabetes and Nutrition Study Group SDA. Polyunsaturated fatty acid consumption may play a role in the onset and regression of microalbuminuria in well-controlled type 1 and type 2 diabetic people: a 7-year, prospective, population-based, observational multicenter study. *Diabetes Care*2004;27(6):1454-7.
213. ADA. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO; 2007.
214. Berry E. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 1997;66(Suppl. 4):991S-7S.
215. Ramel A, Pumberger C, Martinez AJ, Kiely M, Bandarra NM, Thorsdottir I. Cardiovascular risk factors in young, overweight, and obese European adults and associations with physical activity and omega-3 index. *Nutr Res*2009 May;29(5):305-12.
216. Jain SK, McVie R. Effect of glycemic control, race (white versus black), and duration of diabetes on reduced glutathione content in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism*1994 Mar;43(3):306-9.
217. Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y, Fujiwara Y, Shimada M, Kawakami Y. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism*1989 Aug;38(8):753-8.

ANEXOS

ANEXO I.

PRODUCTOS DEL ESTUDIO CLÍNICO

PRODUCTOS FRIAL (FRIALVIDA)INFORMACIÓN NUTRICIONAL**SALCHICHAS PAVO:** (valores expresados en g /100 g producto)

Valor energético:	106 Kcal
Proteínas	19
Hidratos Carbono	1
Azúcares	0.6
Grasa	2.9
Saturadas	1.2
Monoins	1.4
Poliinsat	0.3
Fibra	0.0
Na	0.5

Ingredientes: aceite de pescado azul (0,6%), Extracto de romero= 0,02 %, Vitamina E 0,001%

JAMÓN AL HORNO: (valores expresados en g /100 g producto)

Valor energético:	113 Kcal
Proteínas	19
Hidratos Carbono	0.5
Azúcares	0.5
Grasa	3.9
Saturadas	1.5
Monoins	1.9
Poliinsat	0.5
Fibra	0.0
Na	0.8

Ingredientes: aceite de pescado azul (0,6%), Extracto de romero= 0,02 %, Vitamina E 0,001%

PECHUGA DE PAVO NATURAL AL HORNO: (valores expresados en g /100 g producto)

Valor energético	106 Kcal
Proteínas (g)	19.0
Hidratos de Carbono (g)	1.0
azúcares (g)	0.6
Grasas (g)	2.9
Saturadas (g)	1.2
Monoinsaturadas (g)	1.4
Poliinsaturadas (g)	0.3
Fibra alimentaria (g)	0.0
Na (g)	0.5

(a) Ingredientes: aceite de pescado azul (0,6%), Extracto de romero= 0,02 %, Vitamina E 0,001%, humo natural

LOMO DE CERDO COCIDO: (valores expresados en g /100 g producto)

Valor energético	138 Kcal
Proteínas (g)	23.0
Hidratos de Carbono (g)	0.5
Grasas (g)	4.9
Saturadas (g)	1.95
Monoinsaturadas (g)	2.05
Poliinsaturadas (g)	0.9
Fibra alimentaria (g)	0.0
Na (g)	0.8

Ingredientes: aceite de pescado azul (0,6%), Extracto de romero= 0,02 %, Vitamina E 0,001%

TERNERA COCIDA: (valores expresados en g /100 g producto)

Valor energético	125 Kcal
Proteínas (g)	22.0
Hidratos de Carbono (g)	0.5
Grasas (g)	3.9
Saturadas (g)	1.85
Monoinsaturadas (g)	1.72
Poliinsaturadas (g)	0.33
Fibra alimentaria (g)	0.0
Na (g)	0.8

Ingredientes: aceite de pescado azul (0,6%), Extracto de romero= 0,02 %, Vitamina E 0,001%

ANEXO III

INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE Y CONSENTIMIENTO

Estudio fase IV, randomizado, doble ciego y controlado, sobre la seguridad y eficacia de la ingesta diaria de productos cárnicos con antioxidantes naturales y ácidos grasos omega 3 de cadena larga en niños con diabetes tipo 1.

1. ¿Qué es y qué persigue este estudio?

El Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil La Paz de Madrid, llevará a cabo un estudio de investigación clínica, al que invitamos a su hijo a participar, con la finalidad de comprobar los beneficios que se derivan de la ingesta de productos cárnicos enriquecidos con antioxidantes naturales (procedentes de plantas, concretamente romero) y ácidos grasos poliinsaturados, de la gama Frialvida, en comparación con la ingesta de productos cárnicos estándares.

Actualmente las evidencias científicas que relacionan la alimentación con la salud han impulsado el rápido desarrollo de los alimentos funcionales. En los últimos años existe un gran interés en la obtención de ingredientes alimentarios con propiedades funcionales obtenidos de fuentes naturales como plantas, frutas, pescado, carne y productos lácteos.

El objetivo fundamental del estudio es valorar el efecto de productos cárnicos funcionales enriquecidos con extractos de romero, como agentes antioxidantes, y una relación equilibrada de ácidos grasos poliinsaturados omega 6/omega 3, en una población de niños diabéticos, basado en la posibilidad de prevenir la aparición de enfermedades asociadas a situaciones de estrés oxidativo que suelen aparecer a largo plazo (polineuropatía, retinopatía, enfermedad cardiovascular...) y sus efectos inmediatos en la disminución de los niveles de parámetros oxidativos.

En este estudio se prevé que participen 45 niños, seleccionados desde el Servicio de Endocrinología del Hospital Infantil de la Paz, bajo la aprobación del Comité de Ética, distribuidos en tres grupos de trabajo. A un grupo de niños diabéticos se les administrará 100 g de producto funcional, a otro grupo de niños de las mismas características se les administrará el mismo tipo de alimento sin enriquecer y a un tercer grupo de niños sanos se les administrará a igual dosis el producto enriquecido. De esta forma obtendremos información científica que avale nuestra hipótesis.

El producto patentado ha sido aplicado a los alimentos cárnicos del grupo Frial (carne de cerdo y de ave) y están comercializados desde hace más de 9 meses con Registro Sanitario 10.05771/M.

En la actualidad son notables los ensayos clínicos que se han llevado a cabo para demostrar el efecto beneficioso de una terapia antioxidante como suplementación, en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2. Aunque los resultados no son concluyentes, sí parece interesante esta línea de investigación como forma de prevención o retraso en la aparición de síntomas relacionados con el estrés oxidativo en niños diabéticos, permitiendo mejorar a largo plazo la aparición de las enfermedades asociadas a esta enfermedad, como la retinopatía, enfermedad cardiovascular, neuropatía, etc.

Antes de tomar la decisión de seguir adelante, es importante que comprenda cuál es el motivo de la investigación y cual es su implicación. Debe de saber, que en el caso de que a su hijo no le corresponda tomar el alimento funcional, no se le garantiza la obtención de beneficio directo. Debe de leer detenidamente este documento, aclarar cualquier duda que se le plantee y consultar con el responsable o alguien del equipo del proyecto de investigación.

2. Como se realiza el estudio

2.1 Tratamiento que se administra

El tratamiento consistirá en la ingesta de 100 g por día de producto cárnico durante 5 días a la semana (de lunes a viernes), distribuidos a lo largo de todo el día, durante 12 meses. En el caso de que su hijo sea diabético, tiene el 50% de posibilidades de que le corresponda por azar, el producto a consumir enriquecido con Vidalim o sin él.

Es muy importante que su hijo se tome exactamente la cantidad prescrita al día. Deberá hacerlo como si se tratara de una medicina puesto que, como tal, es posible que no sea beneficiosa si se toma en grandes cantidades o, al revés, si se toma menos de lo recomendado, no produce efecto. Si su hijo no puede consumir la cantidad total prescrita, notifíquelo a su médico.

2.2 Metodología empleada

El estudio tendrá una duración de 12 meses. En la primera parte del estudio su hijo junto con uno de los padres/responsables deberá visitar a su médico, quien les explicará el estudio y responderá a las dudas que puedan tener acerca de él. Si se confirma que su hijo cumple los criterios para participar en el estudio, tras la obtención de su consentimiento podrá hacerlo (firma de este consentimiento informado)

Una vez que usted confirme la participación de su hijo en el estudio, se procederá a asignarle por un método de azar, que se realizará electrónicamente y, ni usted, ni su hijo, ni su médico sabrán si está recibiendo el producto cárnico con antioxidantes naturales y ácidos grasos poliinsaturados.

Si su hijo es diabético, tendrá una probabilidad de un 50% para que le sea adjudicado un tratamiento u otro, siendo ésta la mejor forma de poder determinar formalmente si es beneficioso en la diabetes infantil. Una vez que se conozcan los resultados de este estudio, se utilizarán para redactar un documento relativo a su valor que se publicará en una revista médica. Su nombre nunca aparecerá en las publicaciones.

Además de los análisis, en esta visita se valorarán los siguientes parámetros a su hijo:

- Tensión arterial
- se le realizará una valoración antropométrica para conocer su estado nutricional (peso, altura, índice de masa corporal) y pliegue cutáneo tricipital.
- Se recogerá información acerca de sus hábitos y frecuencia de consumo alimentario.
- Se le facilitarán a los padres/responsables dos diarios que deberán ser cumplimentados y entregados en cada consulta:
 - un diario para que registre cada día la ingesta del producto y cualquier síntoma que usted experimente
 - un diario donde registrará durante 3 días su alimentación cada 3 meses.
- Se le indicará que tome 1 envase de 100 g de producto cárnico cada día, que nosotros de suministraremos.
- Se le concertarán las próximas 4 consultas (visitas 2, 3, 4 y 5) para que complete los 12 meses de estudio
- En todas las visitas, tendrá que entregar los 2 diarios que le fueron facilitados para registrar las informaciones de la administración del tratamiento e ingesta alimentaria. Además, en esa visita: se le revisará los registros cumplimentados, se le tomarán medidas antropométricas a su hijo y se le realizará la bioquímica rutinaria protocolizada en el Servicio

En la visita 5, además se volverán a hacer los mismos análisis del principio y la valoración antropométrica de su hijo. También se recogerán todos los registros cumplimentados por usted (padre/madre/responsable).

3. ¿Cuáles son los beneficios esperables y los riesgos potenciales de este estudio?

3.1 Beneficios

Se considera que el consumo de productos cárnicos con antioxidantes naturales y ácidos grasos poliinsaturados pueden ser beneficiosos al disminuir los parámetros oxidativos asociados a la diabetes mellitus. Sin embargo, debe saber que es posible no obtener los resultados esperados.

3.2 Riesgos

Los productos del estudio, están considerados como productos naturales 100%, están comercializados desde hace 9 meses con Registro Sanitario 10.05771/M, por lo que su seguridad ha sido demostrada en la práctica médica. Debe saber que las pruebas a las que será sometido a lo largo del estudio no le supondrán ningún riesgo para su salud. Es posible, que al realizar las extracciones de sangre, pueda aparecer algún síntoma inflamatorio con enrojecimiento, dolor, en ocasiones un pequeño hematoma que suele ser transitorio.

4. Su participación es voluntaria

Si desea que su hijo participe en este estudio debe comunicárselo a su médico. Su participación es voluntaria. Debe saber que en cualquier momento puede decidir abandonar su participación, comunicándose a su médico sin tener que manifestar razón alguna para ello. En este caso, se le preguntará si su decisión está relacionada con algún acontecimiento adverso. Tanto si no quiere participar como si abandona el estudio, será tratado según la práctica clínica habitual. Su médico también podrá retirarlo de este estudio si así lo creyera conveniente; también por no acudir a las visitas previstas o por no tomar el suplemento como se le ha indicado.

5. Revisión de Documentos Originales, Confidencialidad y Protección de Datos de Carácter Personal

5.1 Confidencialidad y revisión de documentos

Usted comprende y consiente que con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos en este estudio, será preciso que representantes de la universidad y eventualmente las autoridades sanitarias y/o miembros del Comité Ético de Investigación Clínica, tengan acceso a la historia clínica de su hijo comprometiéndose a la más estricta confidencialidad.

De acuerdo con la ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal los datos personales que se le requieren a su hijo (por ejemplo: edad, sexo, datos de salud) son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá el nombre de su hijo y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada bajo condiciones de seguridad, con el propósito de determinar los resultados del estudio. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y eventualmente, a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones.

Los datos de su hijo podrán ser transferidos a otros países fuera de la Unión Europea (EEUU), garantizando la protección de dicha información incluso en aquellos países cuya legislación es menos restrictiva que la española. Los datos podrán ser también utilizados con otros fines de carácter científico. Si sus datos son usados para otros objetivos, primero se disociarán; es decir, toda la información que permita identificarle se eliminará y sólo se procesará de forma que no se pueda conocer su identidad. De acuerdo con la ley vigente tiene Vd. derecho al acceso de los datos personales de su hijo; así mismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.

6. Información que usted debe saber

6.1 Seguro

De acuerdo con la Legislación Española vigente, este tipo de estudio no requiere de ningún seguro que le proporcione cobertura frente a eventuales adversidades ya que se trata de un alimento ya comercializado.

6.2 Información adicional

Ante cualquier eventualidad que pudiera surgir mientras su hijo está participando en este estudio o para cualquier pregunta sobre el mismo que desee realizar tras leer este documento, por favor diríjase a:

Nombre del estudio	Estudio fase IV, randomizado, doble ciego y controlado, sobre la seguridad y eficacia de la ingesta diaria de productos cárnicos con Vidalim en niños con diabetes tipo 1.
Nombre del médico	Dr. Julio Guerrero Fernández
Dirección	Hospital Infantil La Paz (Madrid)

Se le entregará copia de esta información del consentimiento firmado y fechado

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Declaración del paciente

Yo, el abajo firmante, he recibido información sobre este estudio de investigación. He sido informado de los procedimientos que debe seguir mi hijo y de los posibles riesgos y beneficios que puede experimentar como resultado de su participación en él. He leído la descripción de esta investigación (o la traducción a un idioma que comprendo) y he tenido la oportunidad de formular preguntas. Comprendo que la participación de mi hijo es voluntaria y que puede retirarse del estudio en cualquier momento sin que ello suponga una pérdida de los beneficios a los que, de otro modo, pudiera tener derecho. Puedo ponerme en contacto con el Dr. Ricardo Gracia en cualquier momento para hacerle preguntas sobre este estudio.

He recibido una copia firmada de este formulario de consentimiento.

Nombre del padre/madre/responsable

Firma del padre/madre/responsable

Fecha

Nombre de la persona que dirige
la conversación sobre el consentimiento
informado

Firma de la persona que dirige
la conversación sobre el consentimiento
informado

Fecha

ANEXO IV**ESPECIFICACIONES DEL CALIPER****Whitehouse Skinfold Caliper**

Holtain Tanner: Este instrumento fue específicamente diseñado para medir con precisión los pliegues subcutáneos. Fue desarrollado en colaboración con el London University Institute of Child Health.

- Rango de medidas: 0 mm a 48 mm.
- Presión constante : 10 gr/mm².
- Peso neto: 0 4 kg
- Dial Graduation: 0 2 mm.
- Se acompaña con estuche de piel, peso : 0.5kg aprox.



ANEXO V

FORMULARIO DE REGISTRO ALIMENTARIO

Como hacer el registro alimentario

Tienes que elegir tres días habituales de tu alimentación (2 días durante la semana y un día del fin de semana), apuntando todos los alimentos ingeridos a lo largo del día. Detallar lo máximo posible cada toma o picoteos, en cuanto al tipo de alimento, cantidad y tipo de preparación.

Ejemplo:

Desayuno	Leche con cereales Pan con mantequilla	1 vaso de leche semidesnatada (250 ml) 1 trozo de pan integral (1/4 de barra) 1 cucharilla de mantequilla	En casa
Media mañana	1 manzana	1 unidad pequeña	Colegio
Comida	Guisantes con patatas Huevos fritos con pisto Tarta de fresa	1 plato de postre 2 huevos 5 cucharadas de pisto Un trozo de tarta (3 dedos de largo)	Colegio
Merienda			
Cena	Ensalada de lechuga con tomate aliñada con aceite y sal Berenjena rebozada Salmón con espárragos a la plancha	2 hojas grande de lechuga ½ tomate 1 ½ cucharada de aceite 3 rodajas de berenjena Un filete mediano (120g) 2 unidades de espárragos	En casa

Unidades de medidas de apoyo:

- Cucharadita de moka = 2,5 gramos
- Cucharadita de café = 5 gramos
- Cuchara de sopa = 10 gramos
- Cucharón de servir o cazo = 75 gramos
- Vaso normal = 200cc
- Vaso vino = 100 cc
- Vano caña = 150 cc
- Taza = 250 cc
- Tazón, bol = 300 cc
- Taza café = 100 cc
- Plato hondo lleno = 225 cc
- Plato hondo medio lleno = 150 cc

Registro Alimentario

Día: _____

Comida	<i>Alimentos</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Lugar</i>
Desayuno Horario: _____			
Media Mañana Horario: _____			
Comida Horario: _____ Primer plato Segundo plato Pan Postre			
Merienda Horario: _____			
Cena Horario: _____ Primer plato Segundo plato Pan Postre			
Antes de acostarse Horario: _____			

ANEXO VI**PROTOCOLOS ANALITICOS del PERFIL OXIDATIVO***Índice*

	<i>Página</i>
Valoración de vitamina E en plasma	<i>119</i>
Valoración de Tbars en plasma	<i>121</i>
Valoración de 8-isoprostano en orina	<i>122</i>
Determinación de perfiles metabolómicos en plasma	<i>124</i>
Determinación de perfiles metabolómicos en orina con polaridad normal	<i>125</i>
Determinación de perfiles metabolómicos en orina con polaridad invertida	<i>126</i>

VALORACIÓN DE VITAMINA E EN PLASMA

REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- α -tocopherol, Fluka (Buchs SG, Suiza).
- Tocol: cedido por Roche (Basiela, Suiza).
- H_3PO_4 al 85% (Merck) y NaOH Panreac (Montcada i Reixac, España)
- H_2O ultrapura.
- **Acetona, SDS (Peypin, Francia).**
- **Metanol, Scharlau (Barcelona, España).**
- **Etanol, Scharlau (Barcelona, España).**
- Cromatógrafo de líquidos con detectores UV y de fluorescencia.
- Espectrofotómetro.
- Centrífuga.

DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- α -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de α -tocoferol y se conserva a $-20^\circ C$.
- Tocol: el contenido del vial se diluye en etanol en matraz aforado de 25 mL y se obtiene una concentración de 8mg/mL. Esta es la disolución *stock* de Tocol y se conserva a $-20^\circ C$.
- Tampón fosfato 200 mM pH 7.4: Se pesan 2.31 mg de H_3PO_4 y se disuelven en unos 80 mL de H_2O . Se lleva la disolución hasta pH 7.4 con una disolución de NaOH 0.1 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 100 mL. Se enrasa con H_2O . Se conserva a $2-8^\circ C$ hasta el día del análisis.

VALORACIÓN

Patrones

En el día de la valoración:

- Se toman 50 μL de la disolución *stock* de α -tocoferol y se llevan a 25 mL de etanol en matraz aforado. Se enrasa con etanol. Este es el patrón para la valoración espectrofotométrica. La concentración real de α -tocoferol se determina en el patrón de trabajo con el espectrofotómetro a 294 nm, según $\epsilon = 3058 M^{-1} \cdot cm^{-1}$
- Se toman 50 μL de la disolución *stock* de α -tocoferol y se llevan a 25 mL de acetona en matraz aforado. Se enrasa con acetona. Este es el patrón de trabajo.
- Se toman 125 μL de la disolución *stock* de Tocol y se llevan a 25 mL de acetona en matraz aforado. Se enrasa con acetona. Este es el patrón de trabajo de Tocol.
- Se cogen 625 μL de tampón fosfato y se llevan a un matraz aforado de 25 con agua ultrapura. Se enrasa con agua ultrapura. Este es el tampón fosfato 5 mM de trabajo.

Procesamiento de patrones y muestras

	Tampón fosfato	Plasma	α -tocoferol	Acetona	Tocol
Patrones	50 μL	-	50 μL	100 μL	50 μL
Muestras	-	50 μL		150 μL	50 μL

Se agita en vórtex y se centrifuga a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se separa el sobrenadante que es encapsulado y llevado al cromatógrafo.

Cromatografía

- Fase móvil: Metanol:H₂O 95:5 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5 µm (Teknokroma)
- Temperatura: 35°C
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 40 µL
- Detección ultravioleta: 294-298 nm.
- Detección fluorescencia: $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ ganancia 100 o 1000.
- Tiempo total de análisis $\approx 9 \text{ min}$

VALORACIÓN DE TBARS EN PLASMA

REACTIVOS Y MATERIAL

- Ácido Tiobarbitúrico (TBA), Sigma (St. Louis, MO. EE.UU).
- Tetramethoxypropane (TMP), Aldrich (Steinhein, Alemania).
- HCl 35% Panreac (Montcada i Reixac, España).
- Ácido tricloroacético (TCA), Panreac (Montcada i Reixac, España).
- Agua ultrapura.
- Baño de agua termostatzado.
- Centrífuga.
- Fluorímetro.

DISOLUCIONES PREVIAS

- TCA 100%: Pesar 100 g de ácido tricloroacético y disolver en un poco de agua. Añadir agua hasta completar un volumen final de 100 mL.
- Reactivo TBARS: Pesar 750 mg de TBA, añadir unos 50 mL de agua, 5 mL de HCl, 30 mL de TCA y completar con agua hasta 200 mL. Disolver el TBA, agitando vigorosamente.
- Disolución A: Se pesan exactamente alrededor de 20.525 mg de TMP en matraz aforado de 50 mL, se añaden aproximadamente 40 gotas de HCl y se enrasa con agua.
- Disolución B. En un tubo se pipetea 990 μ L de agua y se mezclan con 10 μ L de la disolución A.
- Disolución C: Mezclar en un tubo 500 μ L de la Disolución B y 500 μ L de agua.

TRATAMIENTO DE PATRONES Y MUESTRAS

En tubos nuevos, pipetear (por triplicado):

	Disolución B (μ L)	Disolución C (μ L)	Plasma (μ L)	Agua (mL)
Patrón0	-	-	-	1,300
Patrón1	-	5	-	1,295
Patrón2	5	-	-	1,295
Patrón3	10	-	-	1,290
Patrón4	15	-	-	1,285
Patrón5	30	-	-	1,270
Muestras	-	-	140	1,160

Se añade a todos los tubos 1.5 mL del Reactivo TBARS previamente preparado y se agitan todos los tubos. Se calienta a 85-90 °C en baño, tomando precauciones para prevenir la luz y la evaporación durante 20 minutos. Una vez completada la reacción, se agitan vigorosamente los tubos para eliminar las burbujas y se enfrían los tubos en baño de agua. Se centrifugan a 400 g durante 10 minutos y el sobrenadante se transfiere a cubetas de fluorimetría.

Se lee la fluorescencia a $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$.

VALORACIÓN DE 8-ISOPROSTANO EN ORINA

REACTIVOS Y MATERIAL

- K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaN_3 (Merck) y $NaCl$ (Panreac).
- Etanol (Scharlau).
- Agua ultrapura.
- Kit 8-Isoprostano EIA (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, Estados Unidos):
 - Reactivos: Tampón EIA ® concentrado, tampón de lavado concentrado, tween 20, patrón de 8-isoprostano, trazador concentrado, antisuero concentrado y Reactivo de Ellman.
 - Columnas de afinidad para 8-isoprostano (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, Estados Unidos).
 - Placas de 96 pocillos para inmunoensayo.
- Evaporador centrífugo.
- Fotómetro lector de placas.

PURIFICACIÓN DE MUESTRAS

DISOLUCIONES PREVIAS

- Tampón de columna: Pesar 13.3 g de K_2HPO_4 , 3.22 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de NaN_3 y 29.2 g de $NaCl$. Trasvasar cuantitativamente a matraz aforado de 1 L, enrasando con agua ultrapura.
- Disolución de elución: Etanol:agua 95:5 (v/v)
- Tampón EIA: Disolver el contenido de un vial de tampón EIA ® concentrado con 90 mL de agua ultrapura.

TRATAMIENTO DE MUESTRA

- Destapar las columnas de afinidad y dejar eluir el tampón.
- Aplicar 1 mL de orina a la columna y lavar sucesivamente con 2 mL de tampón de columna y 2 mL de agua, desechando el líquido eluido.
- Preparar tubos para recoger la siguiente fracción y añadir dos veces 1 mL de disolución de elución, dejando eluir el primer mL antes de añadir el siguiente.
- Evaporar hasta sequedad con vacío en evaporador centrífugo.
- Regenerar las columnas lavando con 5 mL de agua y 5 mL de tampón de columna. Se tapan sin que eluya el tampón.
- Evaporar.
- Resuspender las muestras en 500 μ L de tampón EIA.

INMUNOENSAYO

DISOLUCIONES PREVIAS

- Tampón EIA: se diluye el contenido del vial con 100 mL de agua ultrapura.
- Trazador: Se reconstituye el contenido del vial del trazador concentrado (500 dtn) con 30 mL de tampón EIA. La disolución se mantiene a 4°C durante 1 mes.
- Antisuero: Reconstituir el contenido del vial de antisuero concentrado (500 dtn) con 30 mL de tampón EIA. La disolución se mantiene a 4°C durante 1 mes.
- Patrón 8-Isoprostano: Tomar 100 μ L del *stock* de 8-isoprostano y mezclar con 900 μ L de agua ultrapura. Este es el patrón de trabajo. A partir del patrón de trabajo se preparan 8 diluciones con EIA: la primera, mezclando 100 μ L de patrón con 900 μ L de tampón y las siguientes, mezclando 500 μ L de la disolución anterior con 500 μ L de tampón EIA y así sucesivamente, tomando siempre 500 μ L de la disolución inmediatamente anterior y mezclando siempre con 500 μ L de tampón EIA, hasta tener 8 disoluciones de patrón, en un rango de concentraciones entre 0.5 ng/mL y 0.4 pg/mL.

- Tampón de lavado: Diluir el contenido del vial de lavado (5 ml) en dos litros de agua ultrapura y añade 1 mL de Tween 20.
- Reactivo ELLMAN'S: disolver el contenido del vial (250 dtn) en 50 mL de agua ultrapura indicada. Este reactivo es muy inestable y ha de ser utilizado en el día en el que se prepara.

DESARROLLO DE LA PLACA

Cada placa debe contener un mínimo de 2 pocillos de blanco (B), dos de actividad total (TA), dos de unión no específica (NSB) y dos de unión máxima (Bo) y se debe analizar cada muestra y patrón en al menos dos pocillos.

Pasos	Reactivo	B	TA	NSB	Bo	Patrón/ Muestra
1. Adición de - reactivos	Tampón EIA	-	-	100 µL	50 µL	-
	Patrón/Muestra	-	-	-	-	50 µL
	Trazador	-	-	50 µL	50 µL	50 µL
	Anticuerpo	-	-	-	50 µL	50 µL
2. Incubación	Cubrir durante toda la noche					
3. Lavado	Lavar los pocillos 5 veces con el tampón de lavado					
4. adición de reactivos	Trazador	-	5 µL	-	-	-
	Ellman's	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
5. Incubación	Cubrir la placa e incubarla 60-90' a temperatura ambiente con agitación suave					
6. lectura	Leer entre 405-420nm					

DETERMINACIÓN DE PERFILES METABOLÓMICOS EN PLASMA

Los análisis fueron realizados en los laboratorios del Dr. Ph. Schmitt-Kopplin, Department of BioGeoChemistry and Analytics, Institut für Ökologische Chemie, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Ingolstaedter Landstrasse 1, 85764 Neuherberg (Alemania). www.metabolomics-and-more.de; <http://www.helmholtz-muenchen.de/ioec/biogeochemie-und-analytik/index.html>; Munich Functional Metabolomics Initiative: <http://www.nutrition.tum.de/mufumet/index.php?id=13>

1. *EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA*. Las muestras de plasma se pre-trataron empleando un cartucho de SPE de C18.

2. *ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS* a través de un Fourier transform ioncyclotron resonance (FT-ICR-MS). La fracción de plasma obtenida tras su extracción se diluyó con metanol antes de su introducción directa en el equipo de FT-ICR-MS. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en un equipo Bruker (Bremen, Alemania) APEX Qe Fourier transform ioncyclotron resonance-MS equipado con un imán superconductor de 12 T y una fuente de ionización por electrospray (ESI) Apollo II con 1000 scan (1MW) en modo positivo y 500 scan (4MW) en modo negativo. El scan se llevó a cabo entre 150–2000 m/z para ambas modalidades. Los espectros se calibraron externamente empleando arginina (10mg/l en metanol) e internamente, y de forma sistemática, con ácidos grasos (ESI(-)) y diésteres (solventes) (ESI(+)). Las muestras se inyectaron directamente a la fuente de ionización ESI utilizando una jeringa Hamilton de 250 μ l, empleando una bomba de inyección a 0.12ml/h.



3. *EVALUACIÓN DATOS*. Obtenido el perfil, se aplicaron distintos MODELOS ESTADÍSTICOS: Los espectros adquiridos mediante FT-ICR-MS se exportaron después de la calibración en listados de picos empleando una señal/ruido (S/N) = 2. Los análisis estadísticos se realizaron empleando SIMCA-P 11.5 (Umetrics, Umea, Suiza) y SAS version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, EEUU) para resumir y visualizar las propiedades más importantes de las muestras. Los métodos utilizados fueron los siguientes:

- PCA: Principal Component Analysis - análisis de componentes principales
- PLS-DA: Partial Least Squares - análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales
- OSC-PLS: tratamiento de los datos con Ortogonal Signal Correction - corrección ortogonal de la señal, y aplicación posterior del modelo PLS.

4. *IDENTIFICACIÓN*. De los modelos estadísticos es posible extrapolar listas de masas (fórmulas elementales) características de los diferentes grupos en estudio. Las fórmulas generadas se validaron empleando las reglas de determinación de fórmula empírica a partir de un valor de masa exacta (regla del nitrógeno, relación O/C < 1, elementos: hidrogeno $H < (2 + C2)$, carbono $C \leq 100$, oxígeno $O \leq 80$, nitrógeno $N \leq 5$ y azufre $S \leq 1$) y considerando solo las $12C_n$ masas en relación a los perfiles isotópicos teóricos generados automáticamente (existencia de los isótopos $12C(n-1)$). En otra aproximación, los datos de masa se incorporaron al Mass Translator into Pathways [MassTRIX] desarrollado en Helmholtz Zentrum Muenchen. Mediante esta aproximación, la masa exacta se compara directamente con la composición elemental de la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y supone un primer barrido de los datos de FT-ICR-MS.

DETERMINACIÓN DE PERFILES METABOLÓMICOS EN ORINA CON POLARIDAD NORMAL

REACTIVOS Y EQUIPOS

- SDS 98.5%, Sigma
- Tetraborato de sodio decahidratado 99.5-105%, Sigma
- Hidróxido sódico (PA), Panreac
- β -Ciclodextrina sulfatada (sal de sodio PA), Aldrich
- 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (PA), Fluka
- H₂O ultrapura
- Equipo de electroforesis capilar MDQ/UV PDA (Beckman System)
- Congelador Heraeus Kendro (-80°)
- Balanza de precisión BP 221S. SARTORIUS
- pH- metro.744 METROHM MM
- Agitador VIBROMATIC.P SELECTA

DISOLUCIONES PREVIAS

- Tampón tetraborato sódico decahidratado 25 mM, SDS 75 mM y β -ciclodextrina sulfatada 1.43% (p/v), pH 9.5: Se pesan 2.38 g de borato, 5.4 g de SDS y 3.59 g de β -ciclodextrina sulfatada y se disuelven en unos 150 ml de H₂O. Se lleva la disolución hasta pH 9.5 con una disolución de NaOH 2 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 250 mL. Se enrasa con H₂O. Cuando se va a llevar a cabo el análisis, se añade 2.25 % (v/v) de HFIP.

DETERMINACIÓN

Procesamiento de muestras

La orina procedente de individuo diabético se descongela y se agita en vórtex durante 1 minuto para homogeneizar la alícuota; posteriormente se filtra con jeringa de 1 ml y filtro de nylon de 0.2 μ m. Se traspa a viales de electroforesis y se le añade un 10 % (v/v) de tampón.

La orina procedente de individuo control se descongela y se agita en vórtex durante 1 minuto para homogeneizar la alícuota; posteriormente se filtra con jeringa de 1 ml y filtro de nylon de 0.2 μ m. A continuación, se lleva a cabo una dilución 1:10 (v/v) con agua calidad ultra-pura. Se traspa a viales de electroforesis y se le añade un 10 % (v/v) de tampón.

Condiciones electroforéticas

- Capilar de sílice fundida sin recubrir de 57 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, 75 μ m de diámetro interno y ventana de 200 μ m.
- Polaridad normal.
- Potencial positivo aplicado de 20 kV, campo eléctrico de 350 V/cm y corriente generada de 145 μ A.
- Detector PDA con canal de 200 nm.
- Inyección hidrodinámica por baja presión a 0.5 psi o 33 mbar durante 10 segundos.
- Temperatura: 20 °C.
- Frecuencia de recogida de datos: 4 Hz.

DETERMINACIÓN DE PERFILES METABOLÓMICOS EN ORINA CON POLARIDAD INVERTIDA

REACTIVOS Y EQUIPOS

- Ácido orto-fosfórico 85%, Merck
- Hidróxido sódico (PA), Panreac
- Metanol calidad HPLC, Prolabo
- H₂O ultrapura
- Equipo de electroforesis capilar MDQ/UV PDA (Beckman System)
- Congelador Heraeus Kendro (-80°)
- Balanza de precisión BP 221S. SARTORIUS
- pH- metro.744 METROHM MM
- Agitador VIBROMATIC.P SELECTA

DISOLUCIONES PREVIAS

- Tampón fosfato 200 mM, pH 6.10 y 10% metanol: Se pesan 11.529 g de ácido orto-fosfórico y se disuelven en unos 400 ml de H₂O. Se lleva la disolución hasta pH 6.10 con una disolución de NaOH 2 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 500 mL. Se enrasa con H₂O. En un vaso de precipitados de 600 ml se mezclan los 500 ml de tampón con 56 ml de metanol.

DETERMINACIÓN

Procesamiento de muestras

La orina procedente de individuo diabético se descongela y se agita en vórtex durante 1 minuto para homogeneizar la alícuota; posteriormente se filtra con jeringa de 1 ml y filtro de nylon de 0.2 µm. Se traspa a viales de electroforesis y se le añade un 10 % (v/v) de tampón.

La orina procedente de individuo control se descongela y se agita en vórtex durante 1 minuto para homogeneizar la alícuota; posteriormente se filtra con jeringa de 1 ml y filtro de nylon de 0.2 µm. A continuación, se lleva a cabo una dilución 1:10 (v/v) con agua calidad ultra-pura. Se traspa a viales de electroforesis y se le añade un 10 % (v/v) de tampón.

Condiciones electroforéticas

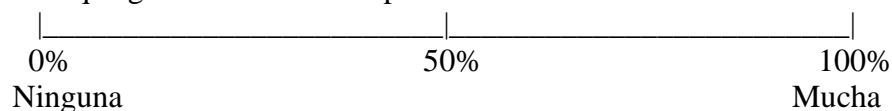
- Capilar de sílice fundida recubierto de poliacrilamida lineal de 57 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, 50 µm de diámetro interno y ventana de 800 µm.
- Polaridad invertida.
- Potencial positivo aplicado de 25 kV, campo eléctrico de 438 V/cm y corriente generada de 100 µA.
- Detector PDA con canal de 200 nm.
- Inyección hidrodinámica por baja presión a 0.5 psi o 33 mbar durante 20 segundos.
- Temperatura: 20 °C.
- Frecuencia de recogida de datos: 4 Hz.

ANEXO VII

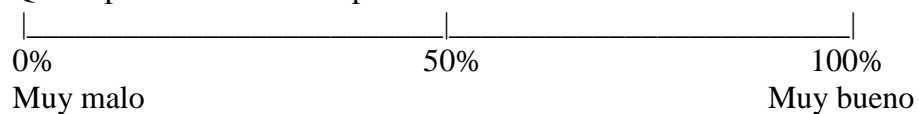
ANÁLISIS DE PERCEPCIÓN SENSORIAL DEL PRODUCTO CONSUMIDO
Unidad de Nutrición Clínica y Dietética – Hospital Universitario “La Paz”, Madrid

Sensación gustativa y olfativa

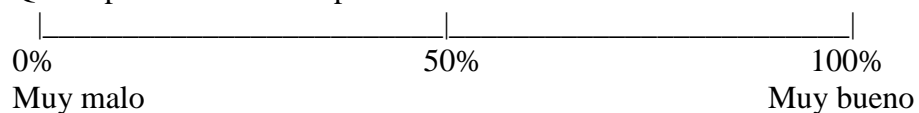
Con que gana suele tomar el producto



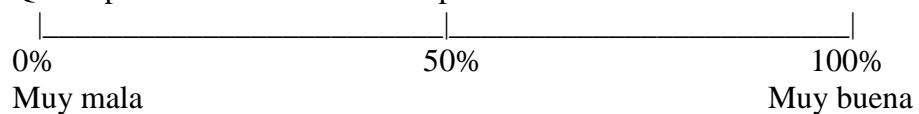
Que te parece el sabor del producto



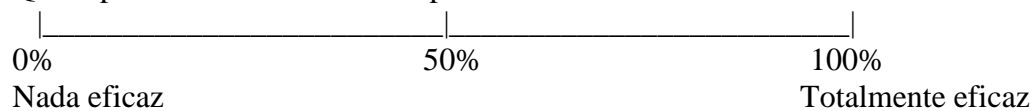
Que te parece el olor del producto



Que te parece la consistencia del producto



Que espera de la efectividad del producto



ANEXO VIII**CUESTIONARIO DE TOLERANCIA AL TRATAMIENTO*****Tolerancia***

- Náuseas
- Acidez
- Diarrea
- Estreñimiento
- Vientre hinchado
- Mal aliento

Cambios en la alimentación

- Como más
- Como igual
- Como menos