



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“EFECTOS DE ALFA-TOCOFEROL SOBRE EL  
CONTROL METABÓLICO Y EL ESTADO OXIDATIVO EN  
MUJERES SANAS Y CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA**

**P R E S E N T A**

**M EN C JORGE LUIS BLE CASTILLO**

**Director: Dr José Domingo Méndez Francisco. IMSS**

**Codirector: Dr Roberto Medina Santillán. IPN**



MEXICO D.F. 2006

Este trabajo fue realizado en el Hospital General de Zona No 46 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Sección de Estudios de Postgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y en el Centro de Investigación de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco bajo la Dirección del Dr. José Domingo Méndez y del Dr. Roberto Medina Santillán y con el apoyo del Programa de Mejoramiento al Profesorado de Educación Superior (PROMEP-103.5/03/2178-UJATAB-148) y del Instituto Mexicano del Seguro Social.

## AGRADECIMIENTOS

AL TODOPODEROSO QUIEN ME HA PRESTADO VIDA Y SALUD PARA LOGRAR ESTA META Y A QUIEN PUEDO CONTEMPLAR A TRAVES DE LA PERFECCION DE LA DINAMICA MOLECULAR DE LA VIDA.

A MI ESPOSITA ANY Y A MIS HIJAS ANY GINETTE Y KELLY POR DARME ANIMOS Y QUIENES SON MI ALEGRIA Y MI APOYO MORAL.

A MIS PADRES DON LUIS BLE Y DOÑA LILI CASTILLO QUIENES ME INSPIRARON PARA TRATAR SIEMPRE DE HACER LO MEJOR.

A LOS DOCTORES JOSE D. MENDEZ, JUAN C DIAZ ZAGOYA Y CLEVA VILLANUEVA POR SU VALIOSA AYUDA Y SU AMISTAD.

AL QUIMICO RUBEN CORDOVA USCANGA JEFE DE LABORATORIO DEL HGZ 46, IMSS, POR SU APOYO SIEMPRE INCONDICIONAL.

A LAS AUTORIDADES DE LA UJAT, DEL IMSS Y DEL IPN, QUIENES HAN BRINDADO SU APOYO ECONOMICO Y/O PROFESIONAL PARA LA CONCLUSION DE ESTE TRABAJO.

A LOS QUIMICOS ARTURO E ISELA, COMPAÑEROS DE DOLOR Y DE LUCHAS, GRACIAS POR SU AMISTAD.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE PUSIERON UN GRANITO DE ARENA PARA CULMINAR ESTE TRABAJO.

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>Glosario .....</b>	<b>7</b>
<b>Relación de figuras y tablas.....</b>	<b>8</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>9</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>14</b>
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Justificación .....</b>	<b>35</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1. Objetivo General .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2. Objetivos Particulares.....</b>	<b>37</b>
<b>6. Material y Métodos.....</b>	<b>38</b>
<b>7. Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>8. Discusión.....</b>	<b>56</b>
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>65</b>
<b>10. Perspectivas.....</b>	<b>65</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>66-74</b>
<b>12. Anexos.....</b>	<b>73-98</b>
<b>12.1. Anexo No. 1. Carta de consentimiento .....</b>	<b>75-76</b>
<b>12.2. Anexo No. 2. Artículo publicado.....</b>	<b>77-82</b>
<b>12.3. Anexo No. 3. Artículo enviado a publicación .....</b>	<b>83-105</b>

## **Glosario**

AT- Alfa-tocoferol

BHT- Butirato de Hidroxitolueno

COL- Colesterol

DM2-Diabetes mellitus tipo 2

FSH- Hormona Estimulante del Folículo

GSH- Glutación reducido

HbA1c-Hemoglobina glicada

HDL-Lipoproteínas de alta densidad

IMC-Indice de Masa Corporal

LDL-Lipoproteínas de baja densidad

MDA – Malondialdehído

PTA- Ac. Fosfotúngstico

RL-Radicales libres

ROS- Especies reactivas de oxígeno.

Se-GPX- Glutación Peroxidasa

SOD1- CuZn-Superóxido dismutasa

TBA- Acido tiobarbitúrico

TAG- Triacilgliceroles

TAS- Antioxidantes totales en suero

VLDL-Lipoproteínas de muy baja densidad

## Relación de Tablas y Figuras

Tabla 1: Características basales de las pacientes con diabetes mellitus tipo 2 perimenopausicas.....Pag 47

Tabla 2: Cambios en los marcadores de control metabólico glucémico-lipídico y en los de estrés oxidativo después de 6 semanas de suplementación con 800UI/d de alfa tocoferol.....Pag 49

Tabla 3:Características basales de un grupo de 16 mujeres sanas perimenopausicas.....Pag 51

Tabla 4:Modificación de parámetros metabólicos después de 6 y 12 semanas de suplementación con 800 UI/d de alfa-tocoferol y un periodo de lavado de 6 semanas en mujeres sanas perimenopausicas .....Pag 52

Figura 1: Efectos de la suplementación con alfa-tocoferol en mujeres con diabetes mellitus tipo 2 y perimenopausicas..... Pag 50

Figura 2: Efectos del alfa-tocoferol sobre marcadores de lipoperoxidación y estado antioxidante en mujeres sanas perimenopausicas..... Pag 55

## RESUMEN

**Introducción:** La vitamina E es el principal antioxidante en el ambiente lipídico de las células. El alfa tocoferol (AT) es el isómero de la vitamina E más activo y abundante en la sangre. La mayoría de estudios sobre el efecto del AT se han realizado en pacientes en los cuales se presenta un aumento del estrés oxidativo como son los diabéticos. Existen pocos estudios orientados a investigar el efecto de vitamina E en sujetos sanos. Hasta el momento existe controversia sobre los beneficios del consumo de esta sustancia como suplemento dietario. Existen estudios donde se han encontrado reducción de marcadores de lipoperoxidación, de inflamación y un mejor control metabólico. Otros autores han advertido que dicha vitamina puede tener actividad pro-oxidante. El año pasado se publicaron dos meta-análisis en los cuales se ha encontrado que el consumo de dosis mayores a 400 UI/d aumenta el índice de mortalidad por diferentes causas. El número de estudios enfocados al efecto de la vitamina E en mujeres es menor que el de hombres. En mujeres con edad perimenopáusica el aumento del estrés oxidativo se ha asociado con el déficit en la producción de estrógenos y el incremento del almacenamiento de hierro.

**Objetivo:** Investigar los efectos del AT sobre el estado oxidativo y el control metabólico en mujeres perimenopáusicas sanas y con diabetes mellitus tipo 2.

**Material y Métodos:** Se realizaron estudios en dos etapas: Etapa 1; (mujeres diabéticas): treinta y cuatro mujeres con DM2 perimenopáusicas entre 40 y 70 años de edad, con hiperglucemia moderada-severa, se dividieron al azar en dos grupos. Un grupo recibió placebo (800 mg/d, n=21) y el otro  $\alpha$ -tocoferol (800 IU/d, n=13) durante 6 semanas. Las

muestras de sangre se recolectaron al inicio y al final del estudio. Se realizaron determinaciones de MDA, TAS, glucosa y lípidos en suero, además, HbA1c, Se-GPX y SOD1 en eritrocitos. En la etapa 2; (mujeres sanas): dieciséis mujeres aparentemente sanas entre 40 y 70 años de edad, recibieron 800 UI/d de  $\alpha$ -tocoferol durante 12 semanas, seguido por un periodo de lavado de 6 semanas más. Se recolectaron muestras de sangre al inicio y cada seis semanas hasta el fin del experimento. Además de las determinaciones realizadas para la etapa 1, se incluyeron: citología hemática,  $\alpha$ -tocoferol, retinol, magnesio y fosfatos.

Para el análisis estadístico se utilizaron pruebas de *t* de Student y análisis de varianza (ANOVA).

**Resultados:** Etapa 1,(diabéticas): Las mujeres diabéticas mostraron niveles elevados de glucemia, HbA1c, MDA, COL y TAG con respecto a mujeres sanas. En mujeres diabéticas, la suplementación con AT produjo una disminución en los niveles de MDA eritrocitario, y un incremento en los niveles de TAS. Sin embargo, estos cambios se acompañaron de un incremento en los niveles de colesterol sérico. En la etapa 2; (sanas): la mayoría de mujeres, reportó cambios benéficos en piel y cabello después de haber recibido AT. También se observó una disminución de HbA1c, MDA sérico y Se-GPX después de AT. Estas reducciones fueron acompañadas por un incremento en los niveles séricos de AT, TAS,  $Mg^{2+}$  y SOD1 en eritrocitos. Los niveles de glucemia, lípidos, retinol y células sanguíneas no fueron afectados.

**Conclusión:** En pacientes diabéticas el suplemento con AT no mejoró el control metabólico glucémico ni lipídico, por el contrario se apreció un incremento en los niveles de colesterol sérico. Sin embargo, el suplemento con AT aumentó la resistencia de los eritrocitos a la peroxidación *in vitro*. Este último efecto podría atribuirse al incremento de AT en las membranas eritrocitarias. En mujeres sanas la suplementación con AT disminuyó los



niveles de MDA sérico y de HbA1c e incrementó la concentración de Mg sérico y de SOD1. Sin embargo, se encontró una reducción de GPX y un aumento de la relación SOD1/GPX después del tratamiento con AT. Este aumento podría estar asociado a una elevación del estrés oxidativo dentro de los eritrocitos. Los resultados muestran que el efecto de AT tanto en mujeres diabéticas como en sanas es en general benéfico sin embargo es menor para las pacientes diabéticas que presentan un metabolismo alterado. Se requieren posteriores estudios con un control dietario estricto para esclarecer los efectos del AT sobre las enzimas antioxidantes eritrocitarias.

## ABSTRACT

**Introduction:** vitamin E is the most important antioxidant in the lipid environment of cells. Alpha-tocopherol is the most active and abundant vitamin E isomer in the blood. Most of the studies about the AT effects have been carried out in patients with a prone oxidative stress condition as diabetes. There are few studies focused to the effect of vitamin E on healthy people. The information about the effects of vitamin E is controversial currently. There are reports where beneficial effects have been found, such as lipoperoxidation markers reduction, inflammation diminished and even metabolic control improved. Others have alerted about the pro-oxidant effect of vitamin E. Last year two meta-analysis studies have reported that high doses of vitamin E ( $\geq 400$  IU/d) may increase all-cause mortality. In general there are few studies oriented to women in comparison to men. Postmenopausal women are more susceptible to oxidative stress. This situation is associated with decreased estrogen production and increased iron storage.

**Objective:** The aim of this study is to evaluate the effects of alpha-tocopherol on the metabolic and oxidative stress in perimenopausal diabetic and healthy women.

**Methods:** two experiments were conducted. Stage 1 (Type 2 diabetic women): 34 female type 2 diabetics 40-70 years old up to 14 years with diabetes, under medical treatment and moderate-severe hyperglycemia were randomly divided in two groups: One group received placebo (Control group, n=21) and the other received alpha-tocopherol (800 IU/d, n=13) during 6 weeks. Blood samples were collected at the beginning and at the end of the study to measure MDA, TAS, glycemia and lipids in serum and GPx, Cu,Zn-SOD and HbA1c in erythrocytes. Stage 2: Sixteen healthy perimenopausal women, 40-60 years old, received AT, 800 IU/day during 12 weeks, followed by a 6-week washout period. Blood samples were

taken at the beginning and then every 6 weeks until the end of the study. Besides of the determinations done at the stage 1, the following assays were carried out: hemogram, AT, retinol,  $Mg^{2+}$ , and phosphates. Differences among the groups were sought using the Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA).

**Results:** Stage 1: Diabetic women: Diabetic women showed increased levels of glycemia, HbA<sub>1c</sub>, MDA, cholesterol and triacylglycerols in comparison to healthy women. Erythrocyte MDA decreased and serum-TAS increased after AT treatment ( $p < 0.0001$ ). However, an unexpected increase on cholesterol levels was observed after AT treatment. AT administration did not affect glucose, HbA<sub>1c</sub>, triacylglycerides, lipoprotein levels and serum MDA. Stage 2: Healthy women: Most of the participants (70%) noted beneficial effects on their hair texture and skin dryness after AT treatment. Moreover, AT produced a reduction in HbA<sub>1c</sub>, serum-MDA and GPx levels. These reductions were accompanied by an increase in AT, TAS and  $Mg^{2+}$  serum levels as well as erythrocyte-CuZnSOD. Glucose, lipids and retinol levels and blood cell number were not affected.

**Conclusion:** After AT treatment, no beneficial changes were observed on glycemic control or lipid metabolism. On the other hand a cholesterol level increased was observed after treatment. A minor oxidative stress in female type 2 diabetic patients after AT treatment was inferred from the reduced levels of erythrocyte MDA and the increased values of TAS. In healthy women AT resulted in a beneficial reduction in serum lipid peroxidation, and an increase in TAS, SOD activity and magnesium in serum. However, a continuous increment in the SOD1/GPx ratio was observed after AT. The effect of AT was beneficial for both groups however it was more reduced in diabetic women which have an altered metabolism. Further research with a strict dietary control should be done to evaluate the AT effects on erythrocyte antioxidant enzymes.

## INTRODUCCION

La diabetes mellitus tipo 2 se ha asociado con un incremento en el estrés oxidativo que podría estar mediado por un exceso en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o por una disminución en el sistema de antioxidantes o por ambos eventos (1). Se ha considerado que los mecanismos que contribuyen a la formación de los ROS en esta enfermedad incluyen; el incremento en la glicosilación no enzimática, la autooxidación de la glucosa, el estrés metabólico que resulta de cambios en el metabolismo energético, los niveles de mediadores de la inflamación y el estado de defensa antioxidante (2).

Estudios recientes demuestran que el factor más importante asociado con el incremento del estrés oxidativo en diabéticos es el persistente estado hiperglucémico. La hiperglucemia es capaz de aumentar los niveles de anión superóxido debido a la saturación en el flujo de equivalentes reductores que llegan a la cadena respiratoria mitocondrial (3). El exceso de superóxido puede ocasionar el incremento en la producción de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno los cuales, pueden cruzar fácilmente las membranas celulares e iniciar reacciones oxidativas.

En la etiología de la aterosclerosis la oxidación de ácidos grasos insaturados en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por ROS se ha considerado como el paso inicial en una serie de eventos. Por otro lado, este tipo de reacciones de lipoperoxidación ocurren en los ácidos grasos insaturados que constituyen las membranas celulares. Los eritrocitos por su contenido de hierro y su función de transportar oxígeno son más susceptibles a la lipoperoxidación que otras células del organismo (4). En estas células la lipoperoxidación de membranas se ha asociado con inestabilidad y pérdida de integridad. Se ha reportado que el aumento del estrés oxidativo causa una disminución en la capacidad de deformación

eritrocitaria (5). Un aumento en el grado de lipoperoxidación determinado por el incremento en la concentración de malondialdehído o de isoprostanos ha sido observado en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (6).

La vitamina E se ha considerado el más importante antioxidante de radicales peroxilo y superóxido en membranas celulares <sup>1</sup>. En México, la encuesta de nutrición de 1999 se reportó que el 30% de mujeres en edad productiva (18-46 años, n = 1,048), tenían deficiencia de alfa-tocoferol con niveles disminuidos en plasma cuando se usó un valor de corte de 600 µg/dL (7). Por otra parte, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se han reportado niveles plasmáticos disminuidos de micronutrientes antioxidantes dentro de los cuales está el alfa-tocoferol (8).

Aunque existen muchos estudios sobre vitamina E, la información continua siendo controversial ya que existen discrepancias entre los estudios epidemiológicos y los ensayos clínicos controlados (9). Por otra parte son pocos los estudios donde se incluyen marcadores del estado oxidativo junto con otras determinaciones de química clínica.

El propósito del presente estudio fue determinar comparativamente los efectos de la suplementación con alfa-tocoferol sobre marcadores del estado oxidativo y sobre el control glucémico y lipídico en mujeres sanas y con diabetes mellitus tipo 2.

## **ANTECEDENTES**

### **Diabetes mellitus**

La diabetes se considera como un importante problema de salud pública, con características de epidemia. En México esta enfermedad causa 36,000 defunciones y registra la aparición de más de 180,000 casos nuevos cada año. Otros datos a nivel mundial informan que al menos 171 millones de personas padecen diabetes y estas cifras se incrementaran más del doble para el año 2030. Este incremento ocurrirá como consecuencia del envejecimiento de la población, el incremento del índice de obesidad, las dietas insanas y el estilo de vida sedentario (10).

En México, la diabetes mellitus ha ocupado el primer lugar como causa de mortalidad general en los últimos años ascendiendo desde 10.7% en el año 2000 hasta 12.6% durante el año 2003, aumentando desde una tasa de 46.46 hasta 53.21 por cada 100,000 habitantes (11).

La diabetes mellitus es un padecimiento crónico que ocurre cuando el páncreas no produce la suficiente insulina o cuando las células no responden apropiadamente a la acción de esta hormona. La manifestación más importante de la diabetes es la hiperglucemia la cual ocurre cuando la glucosa proveniente de los alimentos o del hígado se incrementa en la sangre por arriba de los valores normales. En estas condiciones el cuerpo pierde su principal fuente de combustible ya que no puede ser aprovechada por las células aun cuando en la sangre existen grandes cantidades de ella. Además de esto en la diabetes existe una alteración en el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos (12).

Actualmente se reconoce que esta enfermedad de carácter heterogéneo y multifactorial comprende un grupo de anomalías clínicas o genéticas en las cuales la intolerancia a la glucosa es el común denominador. Todo este conjunto de alteraciones sistémicas determina en

los pacientes que padecen la enfermedad el desarrollo de daño micro y macrovascular, con la consiguiente tendencia a manifestar las complicaciones crónicas del padecimiento (13).

En la última clasificación de la Diabetes se ha dividido en diabetes tipo 1, tipo 2, y diabetes gestacional y otros tipos específicos de diabetes. En la Diabetes Mellitus tipo 1 existe una deficiencia absoluta de insulina, mientras que en la Diabetes Mellitus tipo 2 existe una resistencia a la acción de la insulina y una deficiencia relativa en su secreción (13).

La diabetes está asociada a un incremento del riesgo de muerte prematura, particularmente porque está asociada a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares. Las personas que presentan diabetes tienen además un mayor riesgo de padecer ceguera, insuficiencia renal y amputaciones de miembros inferiores (14).

Desde hace mucho tiempo se ha relacionado la acelerada aparición de complicaciones con el desequilibrio metabólico ocasionado por un mal control de glucemia, sin embargo no se han definido los mecanismos a través de los cuales el exceso de glucosa produce daño a los tejidos. Algunos reportes, han encontrado una asociación directa de los radicales libres con los procesos de deterioro celular; encontrándose así, que en los diabéticos existe un aumento del estrés oxidativo y una disminución del nivel de defensas antioxidantes (2).

Los datos de un estudio realizado por Pirart y cols. en aproximadamente 4,000 pacientes en Bélgica, con un seguimiento durante un periodo de 25 años, sugieren una fuerte correlación entre las complicaciones del diabético y el control metabólico deficiente. La prevalencia de retinopatía, nefropatía y neuropatía fue mucho mayor en pacientes con un mal control glucémico, sin embargo aproximadamente

30% de aquellos que tuvieron un mal control metabólico no presentaron retinopatía a pesar de los años de padecer diabetes (15).

La explicación más aceptada para el desarrollo de las complicaciones crónicas del diabético ha sido la deficiencia en la terapia antidiabética para normalizar el metabolismo completamente. El grado de hiperglucemia a través de los años se ha relacionado de manera directa al incremento y a la severidad de las complicaciones del diabético. Sin embargo en años recientes además del control metabólico adecuado, se ha reconocido la importancia de otros factores adicionales, o tal vez heredados, que determinan la susceptibilidad individual para las complicaciones crónicas de la diabetes, este hecho es evidente porque algunos pacientes con un mal control metabólico no desarrollan complicaciones severas, mientras que otros con un control metabólico aparentemente satisfactorio desarrollan complicaciones tempranas. Lo anterior ha conducido a los investigadores a concluir que existen numerosos factores adicionales que determinan la susceptibilidad individual a padecer complicaciones crónicas.

### **Estrés oxidativo:**

Desde hace mucho tiempo se ha dado una gran importancia a la participación de los radicales libres en las complicaciones del diabético. Numerosos trabajos científicos han reportado un aumento en los niveles de sustancias producidas como consecuencia del ataque de los radicales libres a las biomoléculas de las células (6,16). Los mecanismos que contribuyen a la formación de radicales libres la diabetes incluyen el incremento en la glicación no enzimática y autooxidativa, pero también se produce estrés metabólico que resulta de los cambios en el metabolismo energético, en los niveles de mediadores de la inflamación y en el estado de defensa antioxidante (6)



En los últimos años se han asociado los fenómenos de glicación de diferentes moléculas con las reacciones de oxidación, tanto que se ha acuñado el término de *glicoxidación*. Por ejemplo, se ha reportado que altos niveles de glucosa producen incremento en las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) en células endoteliales humanas. Por otra parte también se ha observado, que elevados valores de malondialdehído (MDA), el cual es un producto final de la lipoperoxidación, son capaces de aumentar el grado de glicación de la hemoglobina. Estos hallazgos demuestran la estrecha relación interactiva que guardan los fenómenos oxidativos con las reacciones de glicación (17).

Se ha reportado por otro lado, que los radicales libres elevados en los pacientes diabéticos pueden secuestrar el óxido nítrico e inhibir la síntesis de prostaciclina y de esta manera hacer que las propiedades vasodilatadoras y antiescleróticas del endotelio estén disminuidas en el diabético (18).

Otras líneas de investigación sugieren que los productos de glicación avanzada (PGA), están involucrados en el desarrollo de las lesiones glomerulares del diabético. Las modificaciones producidas por estas sustancias, son capaces de alterar la estructura, y la función de las diferentes proteínas y peor aún, estas proteínas modificadas pueden estimular una gran variedad de respuestas celulares a través de receptores de superficie específicos (19).

En resumen, los procesos que explican el elevado aumento del "estrés oxidativo" del diabético comprenden: autooxidación de glucosa, formación de productos finales de glicación avanzada, activación de oxidasas dependientes de NADPH, la vía de los polioles y la síntesis prostanoide (20).

Por otra parte la relación entre hiperglucemia, estrés oxidativo y complicaciones vasculares en los diabéticos ha sido mejor comprendida en años recientes a través de los trabajos de Brownlee (3). Dicho autor ha destacado el papel de la producción de radicales superóxido, por las mitocondrias de células endoteliales, durante la hiperglucemia en la patogenia de las complicaciones del diabético. Este nuevo punto de vista es consistente con las cuatro vías que están involucradas en el desarrollo de las complicaciones del diabético y que son: incremento en el flujo de la vía de los polioles, incremento en la formación de productos de glicación avanzada, activación de la protein-quinasa C y flujo incrementado de la vía de las hexosaminas. Los autores usaron células endoteliales como un modelo para analizar la respuesta vascular debido a que el transportador GLUT1 permite la rápida difusión de altas concentraciones de glucosa en estas células.

Varios sistemas enzimáticos pueden ser considerados como candidatos para la producción de radicales libres en las células, incluyendo la NADPH oxidasa, xantina oxidasa, la cascada del ácido araquidónico, y las enzimas microsomales. Sin embargo, Brownlee y cols (3), han demostrado que la fuente de radicales en las células endoteliales, incubadas con altas concentraciones de glucosa produce radicales superóxido a nivel de la coenzima Q y como consecuencia la sobreproducción de los transportadores de electrones procedentes de la glucólisis y del ciclo de Krebs, NADH y FADH<sub>2</sub>, (3). Se ha demostrado que cada uno de los cuatro sistemas enzimáticos ya mencionados se aumenta mediante la sobreproducción de aniones superóxido y que la supresión de éstos por la expresión de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn previene cada una de estas vías que provocan daño (21).

Se dice que una célula entra en un estado de "estrés oxidativo" cuando existe un exceso en la producción de radicales libres frente al cual

los “antioxidantes” del organismo resultan ser ineficientes. En algunas ocasiones este daño puede llegar a ser muy severo y conduce a la muerte celular o apoptosis (6).

### **Antioxidantes:**

Los antioxidantes han sido definidos como compuestos que protegen a los sistemas biológicos contra los efectos potencialmente dañinos de procesos o reacciones que pueden causar excesivas oxidaciones (1). Para propósitos didácticos, los antioxidantes pueden ser clasificados en los siguientes grupos:

1) Antioxidantes primarios: previenen la formación de nuevos radicales libres convirtiendo los radicales libres en moléculas menos perjudiciales, o evitando la formación de nuevos radicales libres a partir de otras moléculas, por ejemplo la superóxido dismutasa (SOD) que convierte  $O_2^{\cdot-}$  en peróxido de hidrógeno; la glutatión peroxidasa (GPX) que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Las proteínas de unión a metales (ejemplo: ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de  $Fe^{2+}$  necesario para formar el radical hidroxilo.

2) Antioxidantes secundarios: capturan los radicales, evitando la reacción en cadena. Ejemplo vitamina E (alpha-tocoferol), vitamina C (ascorbato), betacaroteno, ácido úrico, bilirrubina y albúmina.

3) Antioxidantes terciarios: reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Incluyen enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

Desde el punto de vista nutricional los antioxidantes secundarios son los que tienen mayor importancia. Dentro de este grupo se encuentran

algunas vitaminas y los betacarotenos, los cuales, no pueden ser sintetizados dentro del cuerpo humano sino que deben ser adquiridos a través de la dieta.

Las vitaminas son una parte vital de una dieta saludable. Desde el punto de vista bioquímico las vitaminas son consideradas como micronutrientes esenciales requeridos por el cuerpo en pequeñas cantidades. Las vitaminas se clasifican en liposolubles: A, D, E, K e hidrosolubles: B y C.

### **Vitamina E:**

La vitamina E fue descubierta hace 83 años como un micronutriente indispensable para la reproducción de ratas hembras (22). La vitamina E natural, es una mezcla de tocoferoles y tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol y  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocotrienol) sintetizados únicamente por las plantas. Todos constan de dos partes principales: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral alifática. Los tocotrienoles tienen una cadena insaturada mientras que los tocoferoles contienen una cadena saturada con tres centros quirales que existen en la forma natural en la configuración RRR (23).

La potencia antioxidante relativa de los tocoferoles es bastante similar siendo  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ . Sin embargo a nivel molecular se han observado efectos biológicos distintos los cuales no pueden ser consecuencia únicamente de sus diferencias en actividad antioxidante. El RRR-  $\alpha$ -tocoferol es la forma más abundante en el plasma humano (aprox 25  $\mu\text{mol/L}$ ), mientras que el  $\gamma$ -tocoferol alcanza solamente el 10% de este valor aun en lugares donde el  $\gamma$ -tocoferol es predominante en los alimentos. Esta especificidad es principalmente debida a la retención

selectiva del  $\alpha$ -tocoferol a nivel hepático o alternativamente debido a la conversión metabólica y la subsecuente eliminación de los otros análogos.

Las fuentes naturales de la vitamina E son los aceites vegetales: las semillas de girasol contienen casi exclusivamente  $\alpha$ -tocoferol, el aceite de soya es rico en  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol y el aceite de palma contiene tocotrienoles además de  $\alpha$ -tocoferol.

La vitamina E se encuentra disponible en distintas formas comerciales: una mezcla de tocoferoles y tocotrienoles naturales (extraída de fuentes naturales), como RRR- $\alpha$ -tocoferol; el  $\alpha$ -tocoferol sintético el cual es una mezcla racémica equimolar de 8 estereoisómeros (todos rac- $\alpha$ -tocoferol) o una mezcla de ésteres de tocoferol sintéticos (succinato de  $\alpha$ -tocoferol o acetato de  $\alpha$ -tocoferol).

El acetato de  $\alpha$ -tocoferol es el análogo más usado en suplementos alimenticios y productos cosméticos debido a que la esterificación le confiere estabilidad. En el intestino los ésteres de vitamina E son escindidos a su forma no esterificada por la acción de las enzimas estererasas intestinales (24).

### **Metabolismo de la vitamina E:**

En humanos la vitamina E es metabolizada junto con los lípidos de los alimentos en la parte proximal del intestino y liberada en la linfa dentro de los quilomicrones. Todas las formas de vitamina E se absorben igualmente, lo cual sugiere la ausencia de selectividad a este nivel. Después de pasar a través de la linfa vía quilomicrones, alcanza el sistema circulatorio y es hidrolizada progresivamente bajo la acción de la lipasa lipoproteica endotelial presente en los órganos blanco. Durante este proceso una parte de la vitamina E se libera en el plasma y es

captada por las células. La vitamina E es transportada de manera inespecífica dentro de las lipoproteínas y transportada a los tejidos. En el hígado los tocoferoles son capturados de los quilomicrones remanentes, principalmente vía receptor de LDL, y la proteína transportadora de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP) canaliza el  $\alpha$ -tocoferol a organelos donde se sintetizan las VLDL. Debido a la estereo-especificidad de la  $\alpha$ -TTP en las VLDL la incorporación es casi exclusiva para el RRR- $\alpha$ -tocoferol. Además la mayoría de los otros análogos del tocoferol y los isómeros sintéticos que no son reconocidos por  $\alpha$ -TTP, son metabolizados y eliminados a través de la bilis y de la orina. La afinidad relativa de la  $\alpha$ -TTP cuando se compara con la forma  $\alpha$  es: RRR-  $\alpha$ -tocoferol 100%,  $\beta$ -tocoferol 38%,  $\gamma$ -tocoferol 9%,  $\delta$ -tocoferol 2% (24).

Una gran cantidad de las VLDL secretadas son hidrolizadas por las lipoproteín- lipasas y convertidas a LDL. En la sangre el  $\alpha$ -tocoferol es rápidamente transferido entre partículas lipoproteicas de tal manera que las LDL y las HDL contienen más del 90% de los tocoferoles. Parte del tocoferol transportado en las HDL se capta una vez más por los hepatocitos. Específicamente reconocidos por la  $\alpha$ -TTP, reciclado y liberado por segunda ocasión en el plasma junto con las VLDL (24).

Se considera que la  $\alpha$ -TTP es el factor más importante para mantener los niveles adecuados de  $\alpha$ -tocoferol plasmático. En las ratas la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol modula los niveles de RNAm para  $\alpha$ -TTP en el hígado. Las mutaciones del gen  $\alpha$ -TTP r5 inducen una caída significativa en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en los tejidos y en el plasma, lo cual conduce a una enfermedad neurodegenerativa llamada ataxia por deficiencia de vitamina E. Estas observaciones subrayan la importancia del reciclamiento del  $\alpha$ -tocoferol vía  $\alpha$ -TTP. La asociación entre deficiencia de  $\alpha$ -TTP y la aterosclerosis fue estudiada en el ratón knockout para  $\alpha$ -TTP (Ttpa<sup>+/-</sup> y Ttpa<sup>-/-</sup>). En estos animales los niveles de AT se encontró

reducido tanto en el plasma como en los tejidos, el  $\alpha$ -TTP estaba ausente en los Ttpa<sup>-/-</sup> y disminuido a la mitad en los Ttpa<sup>+/-</sup> cuando se comparó con un grupo control. Además el déficit de AT se asoció con un aumento de las lesiones ateroscleróticas en la aorta proximal y con un aumento en la peroxidación lipídica. Estos resultados documentan la importancia de la vía  $\alpha$ -TTP para el mantenimiento de niveles adecuados de AT plasmáticos y su posible relevancia para disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular.

En cuanto a la distribución de la vitamina E dentro de las células, se han encontrado altos niveles en el aparato de Golgi, lisosomas, retículo endoplásmico y mitocondria mientras que los peroxisomas y el citosol tuvieron los valores más bajos de tocoferol. La  $\alpha$ -TTP está presente principalmente en el hígado, y en pequeñas cantidades dentro del cerebro, retina, linfocitos, fibroblastos y placenta. La existencia de bajos niveles de  $\alpha$ -TTP en la mayoría de tejidos sugiere la presencia de otros transportadores. Recientemente se ha identificado un grupo de proteínas llamadas proteínas asociadas al tocoferol (TAPs) que parecen estar involucradas en el tráfico intracelular del tocoferol. Otra proteína transportadora de tocoferol denominada proteína unida a tocoferol (TBP, 14.2 kDa) la cual se une a la forma  $\alpha$  podría también estar involucrada en la distribución intracelular del tocoferol (23).

El principal metabolito producido después de la oxidación del tocoferol es  $\alpha$ -tocoferil-quinona la cual puede ser reducida a  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona por las enzimas microsomales y mitocondriales dependientes de NADPH. Otros metabolitos aislados de la orina son el ácido tocoferónico y la tocoferonolactona llamados también metabolitos de Simón. Recientemente también se ha aislado el  $\alpha$ -carboxietilhidroxicromano ( $\alpha$ -CEHC) en orina humana (24).

Desde el año 2001 se ha estimado que el 70% de la población de USA consume suplementos dietarios ocasionalmente y que un 40% lo hace de manera regular (25). En el año 2002, Montuiler y cols reportaron que entre una población de médicos el 64% de ellos consume dosis mayores de 400UI/día y que el promedio de vitamina E obtenida de fuentes alimenticias es en promedio igual a 9.3 mg de equivalentes de alfa-tocoferol aproximadamente 14 UI/d (26). En 2005, Ford y cols encontraron que el 11.3% de la población consume al menos 400 UI/día de vitamina E y que la mediana de ingesta diaria es de 8.8 UI/d (27).

### **Toxicidad de vitamina E:**

Dentro del peligro potencial de consumo de altas dosis de vitamina E se pueden mencionar que esta sustancia puede desplazar a otros antioxidantes solubles en las grasas, rompiendo el balance natural del sistema antioxidante e incrementando la vulnerabilidad del daño oxidativo (28). También puede inhibir las enzimas citosólicas glutatión S-transferasas las cuales ayudan a detoxificar drogas y toxinas endógenas (29). De hecho un estudio sobre alfa-tocoferol y beta-caroteno (Alpha-Tocopherol, Beta Caroteno, Cancer Prevention Study; ATBC) demostró un significativo incremento en el riesgo de shock hemorrágico entre los participantes tratados con vitamina E (30). Datos preliminares sugieren que la vitamina E también podría afectar la conversión de beta caroteno en vitamina A y la distribución de esta última en los tejidos animales (31).

La vitamina E tiene propiedades anticoagulantes posiblemente interfiriendo con los mecanismos mediados por la vitamina K (32). En estudios recientes realizados *in vitro* se ha demostrado que la vitamina E potencia los efectos antiplaquetarios del ácido acetilsalicílico por lo que se debería tener cuidado cuando se consumen estas dos sustancias (33). Otro estudio ha encontrado una asociación entre el consumo de dosis



elevadas de vitamina E ( $\geq 400$  UI/d) durante el primer trimestre del embarazo y el bajo peso del neonato (34).

### **Controversia:**

Desde el año 2004 se publicó un meta-análisis donde no se encontró evidencia de que los suplementos antioxidantes previene el cáncer gastrointestinal y que sin embargo parecen incrementar la mortalidad (35). En este estudio se incluyeron 14 ensayos con una población total de 170,525; se incluyeron estudios con vitaminas A, C, E y Selenio. En 7 ensayos de alta calidad el modelo de efectos fijados demostró que los antioxidantes incrementan la mortalidad. Por otra parte en cuatro ensayos el selenio demostró efectos benéficos abatiendo la incidencia del cáncer gastrointestinal.

A inicios de 2005, sin embargo, se publicó un estudio sobre el amplio margen de seguridad en el empleo de los suplementos vitamínicos C y E basado en más de 20 artículos publicados a la fecha y que incluyen más de 80,000 sujetos (36). Las mejores evidencias de seguridad de estas vitaminas provienen de muchos diferentes tipos de estudios. Más de 20 ensayos clínicos publicados involucrando  $\geq 80,000$  sujetos. Se señalan algunos como el de Gillilan donde se emplearon 1,600 UI/d durante 6 meses en pacientes con angina estable (37); el de Meydani que usó hasta 800 UI/d (E sintética), durante 4 meses en 88 personas ancianas (38); el CHAOS, realizado en pacientes con enfermedad cardiovascular empleando 400 u 800 UI/d durante 510 días (39), HOPES en 9,541 pacientes con múltiples factores de riesgo de ECV (40); el DATATOP donde se usaron dosis de 2000 UI/d durante 8.2 años en pacientes con Alzheimer (41). En todos estos estudios no se mencionan casos de reacciones adversas a la vitamina E.

Esta serie de estudios demuestran que los suplementos con vitamina E y C no son dañinos para la población en general. La Food and Nutrition Board, Institute of Medicine como parte de la Academia de Medicina de USA es el organismo encargado de establecer los valores de referencia de la ingesta dietaria en USA (DRI). El DRI incluye los valores de RDA el cual corresponde a la ingesta diaria aceptable de nutrientes para una nutrición normal y para prevenir deficiencias. Para la vitamina E este valor es de 15 mg para ambos sexos. Los valores de Ingesta Máxima Tolerable (UL) corresponden a la máxima cantidad considerada adecuada para la gente sana, usada por largos periodos. Este valor por definición no tiene riesgo de efectos adversos en casi todas las personas de la población general. Para la vitamina E este valor es de es de 1000 mg (42).

En el Reino Unido, sin embargo, el organismo llamado United Kingdom's Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM) estimó un valor de UL en 800 UI de *todo-rac- $\alpha$ -tocoferol*. y 1,600 de *todo-rac- $\alpha$ -tocoferol acetate*. La European Food Safety Authority estimó su valor de UL en 300 mg sobre las bases del trabajo de Meydani que incluyó cantidades hasta de 800 UI/d.

En USA nuevas recomendaciones para vitamina E vienen expresadas en mg de equivalentes de RRR- $\alpha$ -tocoferol. De esta manera se considera que 1 mg de vitamina E sintética (*todo-rac- $\alpha$ -tocoferol*) = 1 UI de vit E = 0.45 mg RRR-  $\alpha$ -tocoferol. Por esta razón 1 mg de RRR-  $\alpha$ -tocoferol.= 1.5 UI. Cuando se recomienda 1000 mg de cualquier forma de  $\alpha$ -tocoferol esto es equivalente a 1500 UI de RRR-  $\alpha$ -tocoferol o 1000 UI de *todo-rac- $\alpha$ -tocoferol*. En USA el valor de UL para vitamina E que es de 1,600 UI/d equivale a 1,070 mg de RRR-  $\alpha$ -tocoferol.

Para la vitamina C se ha establecido un UL de 2000 mg. Para esta vitamina los reportes de reacciones adversas sólo han considerado

malestar estomacal y diarrea como consecuencia de los efectos osmóticos por las cantidades de vitamina no absorbidas. Para vitamina E las evidencias de sangrado y otras reacciones no han sido convincentes. Se concluye que para la mayoría de adultos la vitamina E en dosis  $\leq 1,600$  UI/d (que equivalen a 1073 mg de RRR- $\alpha$ -tocoferol o el equivalente molar de sus ésteres) son confiables. La vitamina C es confiable hasta dosis de  $\leq 2000$  mg/d.

### **¿La vitamina E aumenta el riesgo de mortalidad?**

En este mismo año, la controversia sobre el tema del consumo de la vitamina E se ha agudizado con la publicación de dos trabajos de investigación: uno de ellos fue el estudio HOPE-TOO el cual es una continuación del estudio HOPE. El estudio HOPE-TOO es un ensayo clínico controlado aleatorizado y doble ciego conducido durante un promedio de 7 años. Los pacientes recibieron ya sea 400 UI/d de vitamina E (acetato de alfa-tocoferol) o placebo. El número de pacientes fue de 9541 en el estudio inicial (HOPE) sin embargo en el HOPE-TOO solo 3,994 continuaron el estudio. La edad promedio fue de 66 años y el número de pacientes fue de 1,800 en la primera etapa y de 1,300 en la segunda etapa. Se determinó la incidencia de cáncer, muertes por cáncer y eventos cardiovasculares mayores. Se concluyó que en pacientes con enfermedad vascular o diabetes mellitus, la suplementación con vitamina E no previno el cáncer o los eventos cardiovasculares mayores y se sugiere que podría incrementar el riesgo de insuficiencia cardíaca (40).

El otro estudio es el meta-análisis de Miller y cols (43), donde se analizaron 19 ensayos clínicos realizados entre 1966-2004. Un total de 135,967 pacientes estuvieron incluidos. Nueve de los estudios incluyeron vitamina E sola mientras que los otros eran combinaciones de vitaminas y minerales. Los investigadores convierten las dosis de vitamina E en UI/d y

para poder comparar las diferentes sustancias empleadas en los estudios realizan una conversión de todos los compuestos con actividad de vitamina E a *todo-rac- $\alpha$ -tocoferol* de acuerdo con resultados de ensayos *in vivo*. Los autores mencionan que sus resultados no pueden extrapolarse a sujetos sanos puesto que los ensayos estudiados se realizaron en pacientes con distintas enfermedades crónicas. Su conclusión es que las altas dosis de vitamina E definidas como dosis mayores de 400 UI/d incrementan la mortalidad por cualquier causa y debieran ser evitadas. Cuando se emplearon dosis menores a 400 UI/d se encontró una disminución de la mortalidad aunque esta no fue significativa.

#### **Criticas al meta-análisis de Miller:**

Debido a los procedimientos empleados y a las conclusiones presentadas por los autores de este meta-análisis se presentaron una serie de críticas por parte de muchos científicos de las cuales se resumen las principales (44).

Se combinaron datos de diferentes tipos de moléculas con actividad de vitamina E. El RRR- $\alpha$ -tocoferol y el *todo-rac- $\alpha$ -tocoferol*. Esto no es apropiado debido a que los diferentes estereoisómeros no son bioequivalentes y por lo mismo tampoco son equivalentes desde el punto de vista terapéutico. Ellos expresan los suplementos como UI/d de vitamina E, sin embargo, la definición de unidades internacionales se refiere solo a la potencia de RRR- $\alpha$ -tocoferol para prevenir o tratar síntomas de la deficiencia de vitamina E. Las unidades que deberían emplearse son mg. Ellos excluyeron de su estudio 12 ensayos clínicos que reportan menos de 10 muertes cada uno con lo cual se introduce mucho sesgo.

Los autores no estimaron la adherencia al tratamiento por medio de determinaciones plasmáticas de alfa-tocoferol. De todos los ensayos

incluidos solamente el estudio CHAOS incluye determinaciones de vitamina E a los sujetos. En este estudio se encontró que solamente 6 de los 38 casos de muerte cardiovascular encontrados en el grupo con vitamina E realmente tenían adherencia al tratamiento, 21 sujetos no demostraron adherencia y en 11 casos no se conoció la magnitud de ésta. Sin embargo en el estudio CHAOS también se encontró que el riesgo de muerte se incrementó con dosis mayores a 400 UI/d. De esta manera se reportan los siguientes porcentajes de muerte cardiovascular: 2% con dosis de 400 UI/d, 2.4% en el grupo placebo y 3.1 % en el grupo de 800 UI/d. Infarto al miocardio no fatal: 0.2% con 400 UI/d y 2.0 % con 800 UI/d.

El trabajo de Miller incluye un grupo muy heterogéneo de sujetos en los cuales es muy difícil establecer comparaciones. No se pueden comparar los efectos de dos sustancias diferentes: en este caso en la mayoría de estudios incluidos fue alfa-tocoferol sintético el cual tiene propiedades diferentes a la vitamina E natural. Los diferentes isómeros de vitamina E tienen propiedades únicas que influyen en forma diferente en las diferentes vías metabólicas. Aunque el alfa-tocoferol tiene altas concentraciones en los suplementos, los alimentos contienen predominantemente  $\gamma$ -tocoferol el cual esta presente a una concentración 4 veces mayor a la de  $\alpha$ -tocoferol. La alta ingesta de AT podría disminuir los niveles de  $\gamma$ -tocoferol tanto en plasma como en tejidos. El sesgo en la selección de sujetos contribuyó para que no se incluyeran 2 estudios donde claramente se demuestran los beneficios de la combinación de vitamina E y C: el estudio de suplementación con antioxidantes en la prevención de la aterosclerosis (ASAP) donde se incluyen 440 pacientes hipercolesterolémicos seguidos durante 6 años y el estudio de Aterosclerosis Asociada a Trasplantes. En la mayoría de estudios se han omitido las determinaciones de marcadores de estrés oxidante y de inflamación. Durante el año 2004, la American Heart Association revisó la

relación entre enfermedades cardiovasculares y suplementos vitamínicos y concluyó que la vitamina E no aumenta la mortalidad (45).

### **Mujeres y etapa perimenopáusica:**

La mayoría de estudios sobre vitamina E se han enfocado a la prevención de la enfermedad cardiovascular en hombres (23). Esto se debe parcialmente al hecho de que antes de la vejez la incidencia de enfermedades cardiovasculares es más frecuente en hombres que en mujeres. Sin embargo en años recientes esta situación ha sido reconsiderada, debido a que se ha incrementado la incidencia de estas enfermedades en mujeres y la recuperación después de un evento cardiovascular es mucho menor en ellas (46).

La etapa de la menopausia en la mujer se ha definido como la ausencia de períodos menstruales durante doce meses. La perimenopausia según la OMS y la Sociedad Americana de Menopausia es el periodo de 2 a 8 años antes de la menopausia y un año después de la última menstruación (47). Este periodo está marcado por síntomas físicos y emocionales. La perimenopausia puede en realidad durar hasta 10 años. Para la menopausia se ha estimado una edad promedio de 51 años. La perimenopausia generalmente ocurre entre 1 y 6 años antes de la menopausia, sin embargo puede iniciar a edades tan tempranas como los 41 años o antes (48).

Durante la perimenopausia ocurren los siguientes procesos dentro del cuerpo: los ovarios secretan óvulos menos frecuentemente, los ovarios producen menos estrógenos y otras hormonas, la fertilidad disminuye, los ciclos menstruales se acortan, hay menos ovulaciones y más irregularidades en el ciclo, los niveles de estrógeno y progesterona en

sangre se reducen notablemente, los andrógenos se reducen, la testosterona disminuye.

La perimenopausia es causada por la declinación de la función de los ovarios. La ovulación puede volverse errática y luego parar por completo. La duración del ciclo menstrual y el flujo pueden volverse irregulares hasta por 10 años antes del último periodo menstrual (48).

La duración de la fase folicular es el mayor determinante de la duración del ciclo. A nivel hormonal, se observa en ella un aumento en las concentraciones de FSH y una disminución de la inhibina, con valores normales de LH. Los niveles de estradiol no disminuyen en los años anteriores a la menopausia, sino que permanecen dentro del rango normal o levemente por encima del valor normal, por 6 meses a un año, antes del cese del crecimiento y desarrollo folicular. Es más, estas mujeres pueden presentar niveles altos de estrógenos por el aumento en la respuesta folicular debido al aumento en la secreción de FSH.

Durante los 2 a 8 años previos a la menopausia, los folículos presentan una tasa acelerada de pérdida que comienza cuando el número total de folículos llega a los 25,000. Esto sucede normalmente a los 37 a 38 años de edad. La correlación en el laboratorio está dada por el aumento en la FSH y la disminución de la inhibina (49). La pérdida acelerada es probablemente secundaria al aumento de la estimulación con FSH.

Estos cambios, incluyendo el aumento de la FSH, reflejan una disminución en la calidad ovocitaria y la disminución en la secreción de FSH hipofisiaria. Tanto la inhibina A como la inhibina B pueden estar involucradas. Los niveles de inhibina A en la fase lútea y los de inhibina B

en la fase folicular disminuyen con la edad y pueden preceder al aumento en la FSH (49).

La estrecha relación inversa entre la FSH y la inhibina indican que la inhibina es un marcador sensible de la respuesta ovárica y a su vez, que los valores de FSH son la manifestación clínica de los niveles de inhibina. Por lo tanto, la disminución en la inhibina que lleva al aumento en la FSH refleja la disminución en la actividad ovárica. Esta disminución en la secreción ovárica de inhibina comienza a los 35 años pero se acelera a partir de los 40 y se refleja en la disminución de la fertilidad.

En la perimenopausia los niveles de FSH pueden ser  $\geq 20$  IU/L y sin embargo, la paciente puede continuar con sus menstruaciones. Los niveles de LH permanecen normales. Ocasionalmente, se forma el cuerpo lúteo y la mujer puede quedar embarazada. Incluso con valores de FSH  $> 20$  UI/L y de LH  $> 30$  UI/L, hay fluctuaciones con periodos de falla ovárica seguidos con función ovárica normal (50).

Los síntomas más comunes de la perimenopausia son: cambios en el estado de ánimo, dificultad para concentrarse, cambios en el deseo sexual, dolores de cabeza, sudores nocturnos, bochornos, resequedad de la piel, disminución de lubricación vaginal, problemas para dormir, dolor muscular o articular, aumento de la grasa visceral, incontinencia urinaria y problemas de concentración y memoria.



## JUSTIFICACION

De acuerdo con lo anteriormente mencionado la mayoría de estudios apoya el hecho del aumento del estrés oxidativo en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2. Por otra parte existe discrepancia entre estudios experimentales y ensayos clínicos. Aparentemente los estudios de laboratorio han encontrado efectos benéficos de la vitamina E, principalmente por su capacidad para reducir la lipoperoxidación. Algunos estudios clínicos han mostrado que el AT tiene efecto antiinflamatorio, anticoagulante y que puede mejorar el control glucémico de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, existen reportes, donde se recomienda ser precavidos con el consumo de altas dosis de alfa-tocoferol principalmente porque puede tener una acción pro-oxidativa. A pesar de esto, en la actualidad las diferentes formas de vitamina E son consumidas en una forma indiscriminada en todo el mundo. En el caso de las mujeres, los estudios son escasos y sin embargo se ha comprobado que con el incremento de la edad se aumenta el grado de estrés oxidativo debido a los cambios hormonales y al manejo del hierro. Ante esta situación el presente trabajo se ha enfocado al estudio del efecto del alfa tocoferol sobre el control glucémico y lipídico y sobre el estado oxidativo en mujeres sanas y con diabetes mellitus de tipo 2.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

**¿CUÁLES SON LOS EFECTOS DEL ALFA-TOCOFEROL SOBRE EL CONTROL METABÓLICO Y EL ESTADO OXIDATIVO EN MUJERES SANAS Y CON DM TIPO 2?**

## **HIPOTESIS**

**EL SUPLEMENTO CON ALFA-TOCOFEROL MEJORA EL CONTROL METABÓLICO Y EL ESTADO OXIDATIVO EN MUJERES SANAS Y CON DM TIPO 2.**

## **OBJETIVO GENERAL**

**INVESTIGAR LOS EFECTOS DEL ALFA-TOCOFEROL SOBRE EL CONTROL METABÓLICO Y EL ESTADO OXIDATIVO EN MUJERES SANAS Y CON DM 2.**

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

**INVESTIGAR EFECTOS SOBRE NIVELES DE GLUCEMIA Y HEMOGLOBINA GLICADA. (CONTROL GLUCÉMICO)**

**INVESTIGAR EFECTOS SOBRE COLESTEROL, TAG Y LIPOPROTEÍNAS (CONTROL LIPÍDICO)**

**INVESTIGAR EFECTOS SOBRE MDA Y ENZIMAS ANTIOXIDANTES SOD1 Y GPX (ESTADO OXIDATIVO).**

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Aspectos éticos:**

El Estudio se llevó a cabo siguiendo los ordenamientos de la buena práctica clínica, así como lo establecido en el reglamento de la Ley Federal del Salud en materia de investigación para la salud.

Este trabajo se realizó en el Hospital general de Zona No. 46 del IMSS en Villahermosa, Tabasco. El protocolo experimental fue autorizado por el comité de investigación y de bioética del hospital. A cada paciente se le solicitó firmar carta de consentimiento donde se les notificó de las ventajas, complicaciones y posibles complicaciones del tratamiento.

### **Plan de investigación**

En los dos experimentos del presente trabajo (fase 1 y 2) se trata de ensayos clínicos controlados, aleatorizados, experimentales, abiertos, longitudinales y prospectivos.

### **Etapa 1: Estudio en mujeres con diabetes mellitus tipo 2.**

### **Sujetos de experimentación**

#### Criterios de inclusión

1. Proporcionar carta de consentimiento informado
2. Tener diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2
3. Tener entre 5 y 13 años de evolución
4. Tener un IMC menor de 30.
5. Ser mujer con edad entre 40 y 70 años
6. Haber recibido tratamientos previos con hipoglucemiantes orales (monoterapia con Glibenclamida 20 mg/d) o tener solo control dietario.

7. Tener niveles de glucemia descontrolada a pesar de haber estado en tratamiento médico con el hipolucemiante oral. (Glucemias entre 200 y 400 mg/dL).
8. Mantener la terapia con el hipoglucemiante oral durante el periodo experimental.

Criterios de no inclusión:

1. Tener diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1
2. Tener enfermedad cardíaca o hepática
3. Tener insuficiencia renal
4. Tener obesidad (IMC > 30)
5. Tener hábitos de alcoholismo o tabaquismo.
6. Consumir suplementos vitamínicos (desde 3 meses antes del estudio).
7. Recibir tratamiento con insulina
8. Recibir terapia hormonal de reemplazo

Criterios de exclusión:

1. Recibir tratamiento con suplementos vitamínicos.
2. Recibir tratamiento con insulina.
3. Recibir tratamiento con Metformina.
4. Recibir tratamiento con fármacos del grupo AINES.
5. Recibir tratamiento con Probucol.

Criterios de eliminación

1. Pacientes que por voluntad propia deseen salir del estudio.
2. Pacientes que presenten reacciones adversas al tratamiento con alfa-tocoferol.
3. Irregularidad en la administración del alfa-tocoferol. (Falta de más de 10 días de su consumo).

Se seleccionaron 46 sujetos con las características descritas en criterios de inclusión. Las pacientes se reclutaron del servicio de medicina familiar del Hospital General de Zona 46 del IMSS, Tabasco. Se utilizó una lista de números aleatorizados para asignar los pacientes a dos diferentes grupos de 23 cada uno. El grupo control recibió como placebo 800 mg de almidón de maíz por día y el otro grupo de alfa-tocoferol (AT) recibió 800 UI de alfa-tocoferol/d. Ambos tratamientos se administraron durante 6 semanas. Tanto el placebo como el alfa-tocoferol se administraron en dosis de 400 mg dos veces al día después de los principales alimentos.

Las muestras de sangre se recolectaron al inicio y al final del periodo experimental de 6 semanas. En ambos casos las muestras se obtuvieron después de un periodo de ayuno de 12 horas y entre 7 y 8 de la mañana. Las determinaciones en eritrocitos se realizaron el mismo día de la recolección. Las alícuotas de suero o plasma se conservaron en congelación a  $-70^{\circ}$  C hasta por 15 días antes de realizar otras determinaciones.

Después del inicio de la experimentación, 3 pacientes del grupo de AT fueron eliminadas por iniciar tratamiento con metformina. Otras tres pacientes de este grupo se retiraron por no presentarse a la segunda cita de la experimentación. Cuatro pacientes recibieron tratamientos con diferentes productos de tipo naturista (nopal, chaya y hoja de aguacate). Del grupo control, dos pacientes fueron eliminadas por consumir productos naturistas (derivados de nopal y ácido gálico). Al final el número de pacientes que concluyeron el estudio fueron 21 para el grupo control y 13 para el grupo de alfa-tocoferol.

## Etapa 2: Estudio en mujeres sanas

### Sujetos de experimentación

Cálculo del tamaño de muestra:

Para determinar el tamaño de la muestra se trabajó sobre la hipótesis nula que establece que: “No existe diferencia estadística entre el promedio de glucemia antes y después del tratamiento con alfa-tocoferol”.  $\mu_0 = \mu_1$ . Se empleó la variabilidad de los niveles de glucemia que en un estudio piloto se calcularon con un promedio de 96.14 y una desv. estándar de 9.657. Posteriormente se estableció como crítica para el estudio, una diferencia de un 10% en el tamaño del efecto esperado. Esta cantidad se calculó en 9.614 mg/dL. Se aceptó una probabilidad de error tipo 1 ( $\alpha$ ) de 0.05 y una probabilidad de error tipo 2 ( $\beta$ ) de 0.20. Es decir una potencia de prueba estadística de 80%. Para determinar el valor de los sujetos se consultó una tabla estadística para determinar tamaño de muestras cuando se utiliza prueba de  $t$  para comparar dos medias de poblaciones con variables continuas. Dichas tablas han sido construidas basándose en la siguiente fórmula:

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 + (s_1^2 + s_0^2)}{(\mu_1 - \mu_0)^2} = 16 \text{ sujetos en cada grupo}$$

Criterios de inclusión:

1. Mujeres aparentemente sanas
2. Edades entre 40 y 60 años.
3. Ausencia de periodo menstrual o periodos irregulares.
4. Niveles de FSH > 30  $\mu$ U/ml
5. Existencia de uno o dos ovarios
6. IMC < 30

#### Criterios de no inclusión

1. Tener diabetes o hipertensión
2. Tener enfermedades hepáticas, cardíacas o renales.
3. Tener hábitos de fumar o alcoholismo.
4. Tener IMC >30
5. Consumir suplementos vitamínicos (desde 3 meses antes del estudio).
6. Consumir productos derivados de plantas (nopal, chaya, hoja de aguacate, ajo etc.)
7. Recibir terapia de reemplazo hormonal.

#### Criterios de exclusión:

1. Recibir suplementos vitamínicos
2. Recibir terapia de reemplazo hormonal.
3. Recibir tratamiento con AINES
4. Recibir tratamiento con hipolipemiantes
5. Consumir productos derivados de plantas.

#### Criterios de eliminación:

1. Renunciar voluntariamente al estudio.
2. Presentar reacciones adversas al tratamiento con alfa-tocoferol.
3. Irregularidad en la administración del alfa-tocoferol. (Falta de más de 10 días de su consumo).

El estado de salud de las participantes se determinó mediante historia médica, examen físico y resultados normales de las pruebas rutinarias de laboratorio clínico. Se realizó una evaluación dietaria por un Licenciado en Nutrición, al inicio del experimento. Se recomendó a las participantes no modificar sus hábitos dietarios ni sus actividades a través del periodo experimental. Las participantes recibieron 800 UI/d de alfa-tocoferol



durante un periodo de 12 semanas y posteriormente siguió un periodo de lavado de otras 6 semanas. Se recolectaron muestras de sangre periférica en todas las participantes al inicio, a las 6 semanas y a las 12 semanas del tratamiento con alfa-tocoferol y al final del periodo de lavado.

### **Sustancias y reactivos**

El alfa-tocoferol que se empleó fue obtenido de Nutricia Manufacturing USA, distribuido en México por la casa General Nutrition Company. Las cápsulas contienen 360 mg de D-alfa-tocoferol equivalente a 400 UI de vitamina E. Otros reactivos como ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido sulfúrico, ác. Fosfotúngstico se adquirieron de Sigma-Aldrich, (Toluca, Estado de México). En todos los ensayos de enzimas y antioxidantes se ocupó agua desionizada de la marca SIGMA.

### **Métodos analíticos**

Los ensayos hematológicos se realizaron en un equipo marca Cell-Dyn 3700 de Beckmann-Coulter. La determinación de glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y triacilgliceroles se realizó en autoanalizador de química clínica SYNCHRON de Beckmann Coulter, del HGZ No 46 del IMSS. Las técnicas empleadas se basan en reacciones enzimático-colorimétricas y presentan un coeficiente de variación menor al 5%. El equipo sigue un programa de control de calidad diario que es supervisado por la casa Falcón de México SA de CV. En el caso del colesterol se empleó el método de Allain (51) . Para triacilgliceroles se usó el método enzimático acoplado a peroxidasa (52). Para la determinación de HDL-colesterol se empleó el método de precipitación de LDL y VLDL.

El HDL se cuantifica en el sobrenadante después de centrifugación (53). Para la determinación de LDL-Col se usó la formula de Friedewald para valores de TAG menores de 400mg/dl (54). Cuando los valores

fueron mayores, se usó el método de precipitación selectiva de las de LDL con polímeros de alto peso molecular. En el sobrenadante se determina el colesterol de HDL y VLDL. El valor del LDL se calcula por diferencia (55). La determinación de Hemoglobina glicada (HbA1c) se realizó mediante el método de inhibición turbidimétrica en el equipo Synchron CX7 de Beckamnn-Coulter según sus especificaciones. En esta reacción, los anticuerpos contra HbA1c se combinan con esta molécula para formar complejos antígeno-anticuerpo solubles. Los polihaptenos del reactivo se unen con el exceso de anticuerpo y el complejo aglutinado que resulta se mide por turbidimetría. La determinación de Magnesio en suero se realizó por medio del método del Magón: 1-azo-2-hidroxi-3-(2,4-dimetilcarboxanilido) naftaleno-1'-(2-hidroxibenceno).

Para la medición de MDA en suero se usó la técnica de Yagi que se ha sido modificada en nuestro laboratorio (56). Este método se basa en la reacción con TBA en medio ácido después de una precipitación proteica con ácido sulfúrico y ácido fosfotúngstico. Para prevenir la auto-oxidación artificial durante la fase de calentamiento se agregó BHT hasta una concentración de 15  $\mu$ moles/L. Para mejorar la extracción del aducto TBA-MDA se agregó HCl 5 M según ha sido propuesto por Wasowicz (57). Para la medición del MDA producido por eritrocitos después de incubarlos 2 horas con peróxido de hidrógeno se usó una adaptación del método de Stocks y Dormandy (58). Las determinaciones de hemoglobina se realizaron en equipo automatizado marca Cell-Dyn 3500. Los resultados de MDA se expresaron como nanomoles/ml para suero y nanomoles de equivalentes de MDA/g de Hb/2h para eritrocitos. La curva estándar para ambos métodos se preparó usando el 1,1,3,3, tetraetoxipropano de la casa Sigma-Aldrich de México con valores entre 0.4 y 5.0 nanomoles/ml.

La determinación de Glutati3n-Peroxidasa se realizó mediante el método de Paglia y Valentine (59), donde la GPX cataliza la reacción de

oxidación del glutatión (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. En la presencia de Glutatión reductasa (GR) y NADPH el Glutatión-oxidado (GSSG) se convierte a la forma reducida con la concomitante oxidación del NADPH a NADP<sup>+</sup> y una reducción en la absorbancia a 340 nm.

La superóxido dismutasa acelera la dismutación de radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Para medirla se empleó el método de McCord y Fridovich (60). En este estudio, la xantina y la xantina-oxidasa (XOD) reaccionan para generar radicales superóxido. El superóxido a su vez reacciona con el cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio para formar el colorante rojo formazán. La actividad de la SOD se mide por el grado de inhibición de esta reacción a 505 nm.

La estimación del estado de antioxidantes totales en suero representa el efecto acumulado de todos los antioxidantes presentes. El método se basa en la habilidad de los antioxidantes en la muestra para inhibir la oxidación del ABTS® (2,2'-azino-di-[3-etilenbenzotiazolina sulfonato] a ABTS®•+ causada por la mioglobina. La supresión de la producción de un color azul-verde es proporcional a la concentración de antioxidante (61).

### **Análisis estadístico**

**Etapa 1:** las diferencias entre los valores basales de las variables entre el grupo placebo y el grupo alfa-tocoferol se investigaron empleando la prueba de *t* de Student no pareada. Para investigar las diferencias entre los dos grupos investigados en cuanto a sus cambios respecto a los valores basales para los diferentes parámetros se usó un ANOVA. Cuando una diferencia entre los grupos fue significativa del valor basal se usó una prueba de *t* pareada para determinar si los cambios respecto al valor basal

en cada grupo era significativa. Todas las pruebas fueron de dos colas y se aceptó una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

**Etapas 2:** Se realizó una ANOVA de medidas repetidas para el componente tiempo del experimento. Una post-prueba de Tukey-Kramer se usó para analizar las diferencias entre los grupos. Se aceptó una  $p < 0.05$  como significativa.

## RESULTADOS

### Etapa 1: Estudio en mujeres diabéticas

En la Tabla 1 se presentan las características basales de todas las participantes. Después de una prueba de *t* no pareada entre los grupos control y tratado con AT, se pudo observar que los dos grupos de pacientes presentaron características similares tanto en los parámetros clínicos (Tabla 1) como en los principales indicadores bioquímicos (Tabla 2). Sin embargo para el caso de las lipoproteínas de baja densidad se obtuvo un valor límite significativo ( $p = 0.046$ ), y para el caso de los niveles de SOD la variación fue significativa ( $p < 0.001$ ) por lo cual no se obtuvieron conclusiones confiables para SOD y no se incluyeron los valores en las tablas.

Tabla 1–Características basales de las pacientes con DM tipo 2 perimenopausicas..

Variable	Grupo Control	Grupo AT
Edad (años)	55.33 ± 11.6	51.31 ± 14.03
Peso corporal (Kg)	63.37 ± 7.85	67.52 ± 10.39
Estatura (m)	1.526 ± 0.06	1.563 ± 0.07
Indice de Masa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	27.29 ± 3.66	27.83 ± 5.23
Presión sistólica (mmHg)	126.7 ± 14.60	128.5 ± 17.72
Presión diastólica (mmHg)	73.3 ± 7.30	80.77 ± 6.40
Tiempo de evolución (años)	9.73 ± 4.50	10.94 ± 2.18
En tratamiento farmacológico	19	12
Control dietario	2	1

Promedio Los resultados se expresan como Promedio ± D.E. AT = alfa-tocoferol,  $n = 21$  y  $13$  para el grupo control y el grupo AT, respectivamente.

En la Tabla 2 se muestran los valores observados antes y después de las seis semanas de tratamiento con 800 UI/d de alfa-tocoferol o placebo. No se observaron diferencias significativas entre los valores basales y los niveles después del suplemento con AT para glucemia, HbA1c, urea, creatinina, ácido úrico, LDL y MDA sérico. En la Figura 1 se puede observar una reducción en los niveles de MDA eritrocitarios y además un incremento en los valores de TAS ( $p < 0.0001$ ), después de la suplementación con AT. La disminución en los niveles de MDA eritrocitario en el grupo que recibió AT, fue de un 46% con respecto a los valores basales, en comparación con una disminución del 10% que se observó en el grupo control (Fig 1).

Se apreció un incremento en los niveles de colesterol sérico en las pacientes que recibieron AT ( $p = 0.012$ ) (Fig 1), por otra parte no se pudieron sacar conclusiones con respecto a los niveles de SOD en eritrocitos debido a que se observó exagerada variación entre los valores basales de los sujetos del grupo control y del grupo tratado con AT.

## **Etapa 2: Estudio en mujeres sanas.**

Aspectos clínicos:

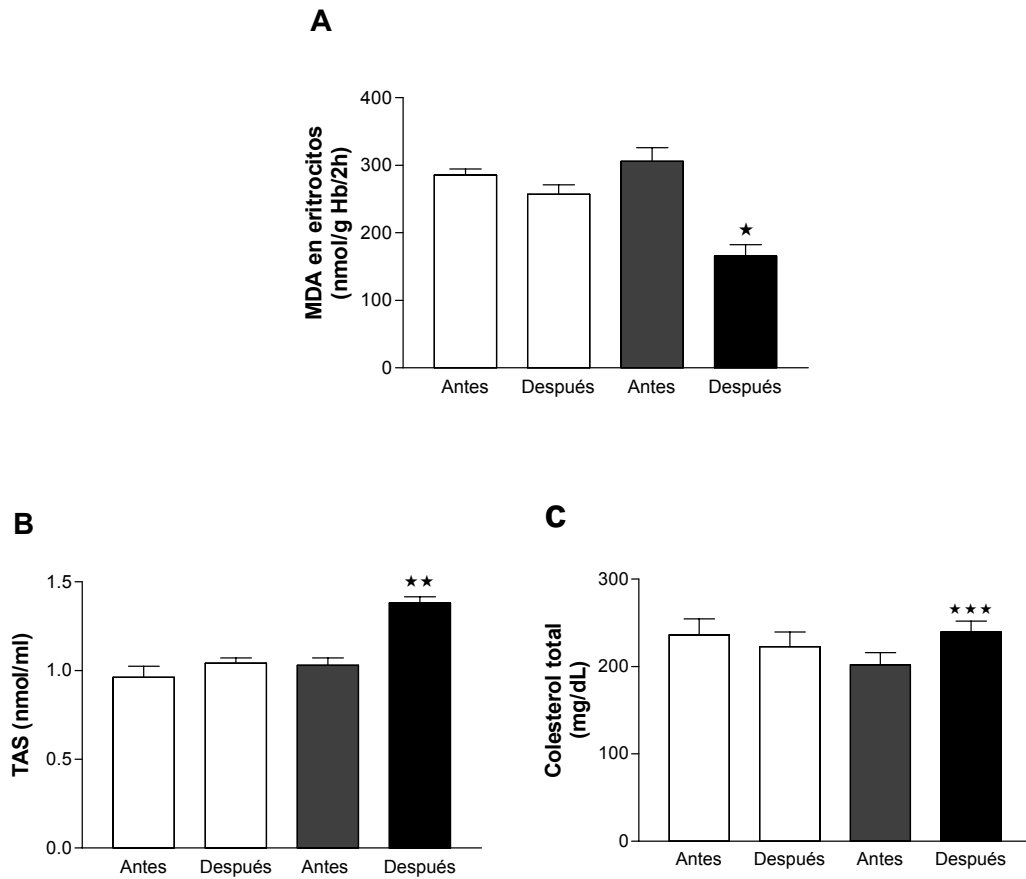
La Tabla 3, muestra las características clínicas basales de los pacientes incluidos en la etapa 2 de este trabajo. Como se puede observar las participantes mostraron un IMC dentro del rango de sobrepeso leve y sin signos de hipertensión arterial. El rango de edad corresponde al periodo de perimenopausia. Según la evaluación dietaria todas las participantes mantenían una dieta apropiada que les proporcionaba suficientes cantidades de vitamina E. Esta observación se pudo comprobar mediante la determinación de los valores basales de vitamina E que correspondieron a  $1204 \pm 343.2 \mu\text{g/dL}$  (Fig 2). Se considera que cifras menores a  $600 \mu\text{g/dL}$  corresponden a deficiencia plasmática de esta vitamina. Como era de suponerse las concentraciones de AT se incrementaron

significativamente después del tratamiento con AT ( $p < 0.001$ ) y descendieron cuando se suspendió la suplementación durante el periodo de lavado ( $p < 0.001$ ). Estos datos confirman la adherencia al tratamiento (Fig 2).

Tabla 2- Cambios en los marcadores del control metabólico glucémico-lipídico y en los de estrés oxidativo después de las 6 semanas de suplementación con 800 UI/d de AT.

	CONTROL			ALFA-TOCOFEROL		
	ANTES	DESPUES	P	ANTES	DESPUES	P
<b>Glucosa</b>	264.8±28.41	231.9±17.55	0.4691	194.2±19.43	211.3±20.88	0.0790
<b>HbA1c %</b>	10.52±0.52	10.12±0.53	0.2602	10.88±0.79	10.25±0.58	0.4360
<b>Urea</b>	35.62±3.80	37.14±4.69	0.5063	38.77±6.10	33.77±1.98	0.4772
<b>Creatinina</b>	0.84±0.14	0.61±0.08	0.0244	0.5308±0.04	0.5615±0.03	0.4363
<b>Acido Urico</b>	4.82±0.45	5.67±0.45	0.0756	4.423±0.34	4.746±0.35	0.0839
<b>LDL</b>	146.9±14.83	133±15.90	0.0995	103.5±12.02	115.6±23.44	0.5140
<b>Triacilgliceroles</b>	231.7±18.35	239.5±18.10	0.7719	300.6±60.71	446.2±136.8	0.2266
<b>HDL</b>	42.83±1.59	41.75±2.02	0.5397	38.41±2.86	34.82±2.33	0.0720
<b>MDA-sérico nmol/ml</b>	5.829±0.24	5.150±0.29	0.1397	6.038±0.27	5.912±0.57	0.8455
<b>Se-GPX U/g Hb</b>	52.66±3.83	36.72±3.52	0.0798	45.30±2.60	51.52±3.34	0.1929

Grupo AT ( $n = 13$ ) o grupo placebo ( $n = 21$ ). El tratamiento fue administrado durante 6 semanas. Las muestras de sangre se recolectaron después de un periodo de ayunas de 12 horas, al inicio y al final del periodo experimental. Los datos representan el promedio  $\pm$  E.E.M. Se presentan valores de la prueba de *t*. pareada (postratamiento vs valores basales). Las concentraciones de glucemia, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, LDL, triacilgliceroles y HDL se expresan como mg/dL.



**Figura 1.** Efectos de la suplementación con AT. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  E.E.M. El MDA en eritrocito (A) disminuyó después del tratamiento con AT (\* $p < 0.0001$ , comparado con valores basales). Los niveles de TAS (B) y colesterol total (C) se incrementaron después del tratamiento con AT (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.05$  comparados con valores basales, respectivamente). Las barras en blanco representan el grupo control y en negro el grupo que recibió AT.



Tabla 3–Características basales de un grupo de 16 mujeres sanas perimenopausicas

Parámetros	Promedio ± D.E.
Edad (años)	51.8 ± 4.47
Peso corporal (Kg)	61.59 ± 6.775
Estatura (m)	1.534 ± 0.0386
Índice de Masa Corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	26.18 ± 2.855
Presión sistólica (mmHg)	112.5 ± 8.563
Presión diastólica (mmHg)	71.13 ± 8.563
FSH (mIU/ml)	57.90 ± 32.65

En la Tabla 4, se puede apreciar que los valores basales de los distintos parámetros en las participantes se encuentran dentro del rango de referencia normal.

En la entrevista médica las pacientes reportaron una buena tolerancia al suplemento, no se presentó ningún síntoma de efectos tóxicos como desordenes digestivos que pudieran ser atribuidos a la vitamina E. Por el contrario la mayoría de pacientes reportaron beneficios que expresaron como mejoría en la resequedad de su piel, o en la textura del cabello (62.5%). Otras participantes reportaron mejor grado de lubricación vaginal (12.5%) y disminución de manchas en la piel (25%).

#### Perfil metabólico:

No se observaron cambios en la glucemia después de la suplementación con AT (Tabla 4). Sin embargo los niveles de HbA1c disminuyeron significativamente después del tratamiento con AT (semanas 0 vs 6, 0 vs 12, 6 vs 12,  $p < 0.001$ ). Después del periodo de lavado (semana 18), no se apreciaron cambios significativos con respecto a los observados después de 12 semanas de AT (semana 12 vs 18,  $p > 0.05$ ).

Tabla 4: Modificación de parámetros metabólicos después de 6 y 12 semanas de suplementación con 800 UI/d de alfa-tocoferol a un grupo de mujeres sanas perimenopausicas ( $n = 16$ ). Después del tratamiento se agregó un periodo de lavado de otras 6 semanas (semana 18).

Parámetro	Semana 0	Semana 6	Semana 12	Semana 18	p
Glucosa	96.88±6.722	98.38±6.479	97.13±5.427	93.81±8.183	NS
HbA1c (%)	3.894±0.217	3.625±0.274	3.131±0.241	3.244±0.159	0 vs 6, p <0.001 0 vs 12, p <0.001 0 vs 18, p <0.001 6 vs 12, p <0.001 6 vs 18, p <0.001 12 vs 18, p >0.05
Acido úrico	4.669±0.641	4.325±0.591	4.281±0.755	4.594±0.841	NS
Colesterol	196.9±33.75	192.2±36.60	196.7±35.11	194.0±42.52	NS
LDL	108±33.28	107.2±34.96	110.6±34.90	117.2±41.38	NS
HDL	56.50±13.36	53.06±9.19	53.19±9.955	48.75±11.76	NS
Col/HDL	3.614±0.768	3.718±0.5099	3.823±0.997	4.129±0.970	NS
TAG	162.1±66.18	159.80±72.71	164.7±66.98	140.2±48.73	NS
Fosfatos	3.650±0.547	3.494±0.763	3.869±0.490	3.40±0.4351	NS
Magnesio	2.089±0.2157	2.104±0.1120	2.305±0.1423	2.024±0.2055	0 vs 12, p <0.01 6 vs 12, p <0.05 12 vs 18, p <0.001
Retinol	45.86±7.966	44.60±7.682	47.6±8.1	43.5±6.9	NS

Los datos representan promedio ± D.E. Las concentraciones de glucosa, ácido úrico, colesterol, LDL, triacilglicérols y HDL se expresan como mg/dL mientras que las de Mg sérico como Meq/L y las de retinol como µg/dL. Las muestras de sangre se recolectaron después de un periodo de 12 horas de ayuno al inicio, después de la semana 6, al final del tratamiento con AT (semana 12) y después del periodo de lavado (semana 18).

El perfil de lípidos incluyendo las lipoproteínas no se modificaron después del tratamiento con AT. Sin embargo los niveles séricos de  $Mg^{2+}$  se incrementaron después de la semana 12 de suplementación con AT (semana 0 vs 12,  $p < 0.01$ ). Después de periodo de lavado (semana 18), los niveles de  $Mg^{2+}$  disminuyeron de nuevo a valores similares a los basales, (semana 0 vs 18,  $p > 0.05$ ).

#### Marcadores de Estrés oxidativo:

La Figura 2, muestra los efectos de AT sobre marcadores de estrés oxidativo. Los niveles de MDA sérico se redujeron después del tratamiento con AT en la semana 12 y con respecto a los niveles basales ( semana 0 vs 12,  $p < 0.05$ ).

Los niveles de AT en suero se duplicaron después de la semana 6 de la suplementación (Fig 2), pero en la semana 12 solamente se observó un aumento de un 30% con respecto a este último valor (semana 0 vs 6,  $p < 0.001$ ; semana 6 vs 12,  $p < 0.01$ ). Como era de esperarse después de suspender la suplementación se observó una reducción de la concentración de AT con respecto a la semana 12, sin embargo todavía se conservaron valores más elevados que los valores basales (semana 12 vs 18,  $p < 0.05$ , semana 0 vs semana 18;  $p < 0.01$ ). Por otro lado no se observaron modificaciones en los niveles de retinol sérico durante los tiempos estudiados (Tabla 4).

El nivel de antioxidantes totales en suero (TAS), mostró una tendencia a incrementarse después de tratamiento con AT, sin embargo solo alcanzó significancia hasta la semana 12 (semana 0 vs 12,  $p < 0.001$ ). Estos niveles elevados de TAS permanecieron elevados después del periodo de lavado (semana 0 vs 18,  $p < 0.001$ ). Fig 2.

Los niveles de SOD1 se incrementaron después del tratamiento con AT (semana 0 vs 6,  $p < 0.001$ ; semana 0 vs 12,  $p < 0.001$ ). Después del periodo de lavado los niveles de SOD1 retornaron a sus niveles basales (semana 0 vs 18,  $p > 0.05$ ). Fig 2.

Los niveles de Se-GPX mostraron una reducción continua a través del tiempo de tratamiento con AT (semana 0 vs 6,  $p < 0.01$ ; semana 0 vs 12,  $p < 0.001$ ). Los valores disminuidos de Se-GPX se mantuvieron hasta después del periodo de lavado (semana 12 vs 18,  $p > 0.05$ ; semana 0 vs 18;  $p < 0.001$ ). Fig 2.

Cuando se analizaron los datos de la relación SOD1/Se-GPX se apreció un incremento continuo de esta relación a través del periodo de suplemento pero que se conserva aun después del periodo de lavado (semana 0 vs 6,  $p < 0.001$ ; semana 6 vs 12,  $p < 0.001$ ; semana 12 vs 18,  $p > 0.05$ ). Fig 2.

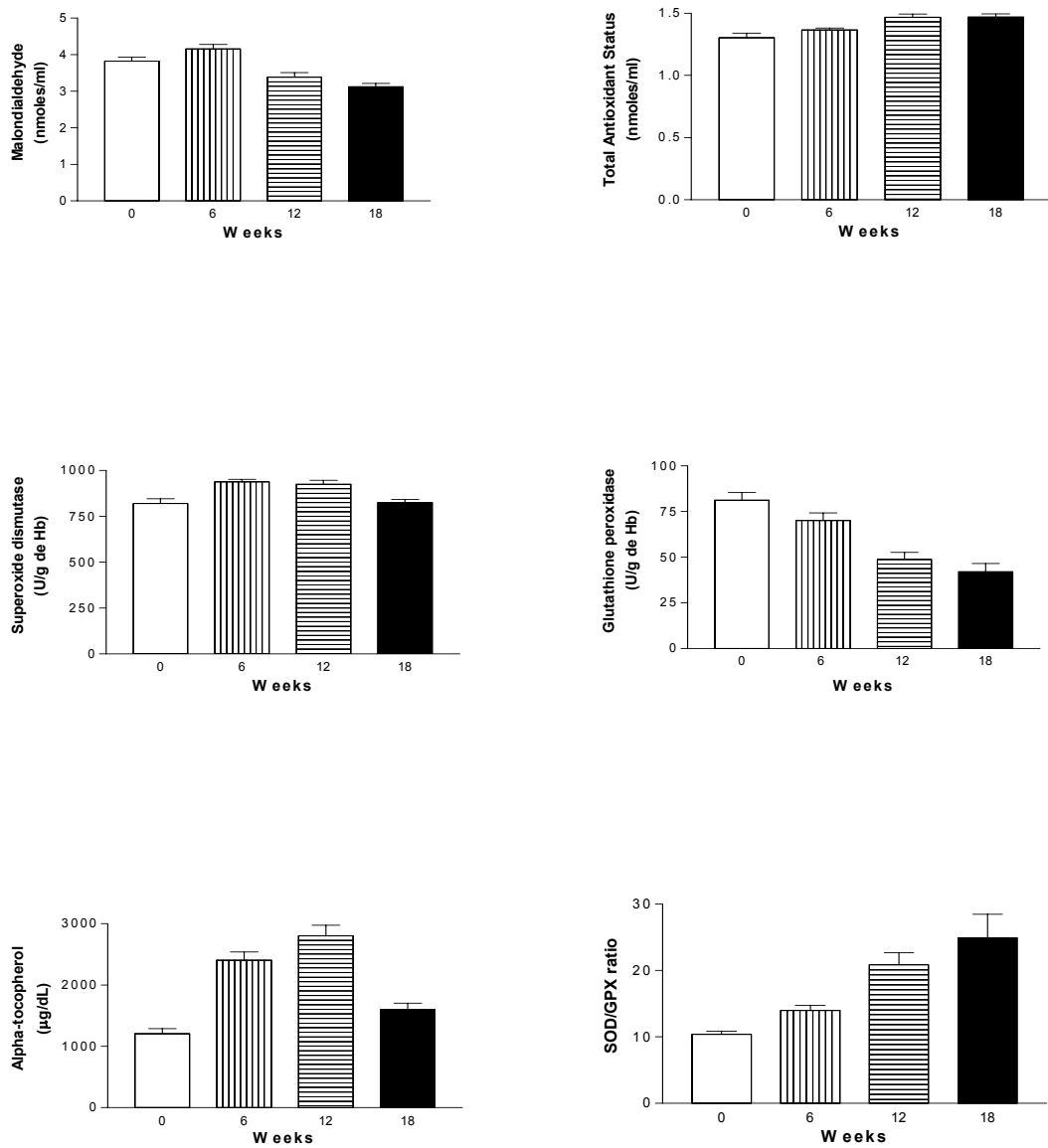


Figura 2. Efectos del alfa-tocoferol sobre los marcadores de lipoperoxidación y estado antioxidante. MDA sérico: semana 0 vs 12,  $p < 0.05$ ; semana 0 vs 18,  $p < 0.001$ . TAS: semana 0 vs 12,  $p < 0.001$ ; semana 0 vs 8,  $p < 0.001$ ; semana 6 vs 18,  $p < 0.05$ . SOD1: semana 0 vs 6,  $p < 0.001$ ; semana 0 vs 12,  $p < 0.001$ ; semana 0 vs 18,  $p > 0.05$ . Se-GPX: semana 0 vs 6,  $p < 0.01$ ; semana 0 vs 12,  $p < 0.001$ ; semana 0 vs 18,  $p < 0.001$ . Alfa-tocoferol : semana 0 vs 6,  $p < 0.001$ ; semana 0 vs 12,  $p < 0.001$ ; semana 12 vs 18,  $p < 0.05$ . Relación SOD1/Se-GPX (SOD/GPX): semana 0 vs 12 and semana 0 vs 18,  $p < 0.001$ ; semana 6 vs 12,  $p < 0.05$ ; semana 6 vs 18,  $p < 0.001$ .  $n = 16$ .

## DISCUSION

El empleo de suplementos vitamínicos ha llegado a ser parte del estilo de vida en personas sanas y enfermas de todo el mundo. En un estudio realizado en 4,609 adultos norteamericanos se encontró que el 11.3% consume suplementos de vitamina E en concentraciones mayores o iguales a 400 UI/d (27). Entre una población de médicos se reportó que el 29% consume suplementos nutricionales, y de ellos el 64% consumen vitamina E a dosis mayores a 400 UI/d (26).

La mayoría de estudios sobre vitamina E se ha orientado al estudio de sus efectos preventivos sobre la enfermedad cardiovascular y generalmente han incluido un mayor número de hombres. En años recientes se ha comprendido mejor la diferente respuesta fisiológica entre sexos y han aparecido más estudios realizados en mujeres (27,46).

La edad perimenopáusica se caracteriza por cambios hormonales asociados a la disminución de la función ovárica. Los datos clínicos y epidemiológicos en este periodo, son limitados ya que durante mucho tiempo las investigaciones se han orientado más hacia la etapa posmenopáusica (62). En la primera parte de este estudio se estudiaron los efectos del alfa-tocoferol en mujeres diabéticas perimenopáusicas.

### ETAPA 1: MUJERES DIABETICAS

Las pacientes con DM2 que se incluyeron en este estudio presentaron niveles elevados de glucemia y de hemoglobina glicada al inicio del experimento (Tabla 1). De acuerdo con las sociedades nacionales e internacionales de diabetes la meta del control glucémico es mantener a los pacientes debajo de 140 mg/dl de glucemia y de 7.5% de hemoglobina

glicada. En nuestro medio es muy difícil alcanzar esta meta a pesar del tratamiento farmacológico. En muchos de los casos los pacientes no se sujetan al tratamiento mientras que en otros no mantienen una dieta apropiada.

En el presente estudio la eficacia del suplemento con AT para reducir la lipoperoxidación fue comprobada mediante su acción para reducir la susceptibilidad de los eritrocitos a la oxidación mediada por el peróxido de hidrógeno. Se observó una disminución de un 46% en los niveles de MDA producido por los eritrocitos en el grupo tratado con AT ( $p < 0.0001$ ) en contraste con solo un 10% que observó en el grupo control ( $p = 0.3614$ ). En un estudio similar realizado en pacientes con DM1 se reportó una reducción de un 25% después de 12 semanas de tratamiento con 750 IU/d de AT (63). La misma tendencia ha sido observada en otros estudios clínicos y experimentales (64,65). La mayor resistencia observada a la peroxidación *in vitro* en estos estudios, podría estar relacionada a un incremento en la concentración de AT en las membranas eritrocitarias por la suplementación.

Se conoce muy bien que las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus están asociadas a un aumento en el grado de estrés oxidativo. Como células transportadoras de oxígeno los eritrocitos son blanco de radicales libres los cuales atacan los lípidos de membrana resultando cambios que incluyen alteraciones en la estabilidad y la integridad de las membranas. Estas alteraciones, pueden dar lugar a una disminución de la resistencia al estrés físico, a la hemólisis y una reducción de la vida media (5). Sin embargo, las implicaciones clínicas de una disminución en el grado de lipoperoxidación no se conocen completamente.

También existe evidencia de que en los pacientes diabéticos tipo 2 existe una disminución de las defensas antioxidantes con respecto a los

sujetos sanos. Sin embargo, reportes sobre los cambios en los niveles de enzimas antioxidantes muestran gran variación. Algunos investigadores reportan valores normales de CuZn-SOD1 y GPx en diabéticos descontrolados y recién diagnosticados (5,66), mientras que otros han encontrado niveles elevados de CuZn-SOD1 y reducidos de GPx en diabéticos con y sin enfermedad cardiaca (67,68).

En este trabajo se observó aumento en los niveles de TAS, y ninguna modificación en los de GPx, después de la suplementación con AT. Otros reportes tampoco han encontrado cambios en los niveles de GPx en diabéticos tipo 1 después de un año de tratamiento con 750 IU/d de AT (63). En sujetos sanos no fumadores se observó que un tratamiento con 280 mg/d durante 10 semanas incrementó los niveles de GPX (69). Por otra parte, dosis altas de vitamina E provocaron una disminución en los niveles de enzimas antioxidantes en ratas (70,71). En este estudio, Debido a las diferencias entre los niveles de SOD en los grupos control y tratado no fue posible obtener inferencias estadísticas objetivas en relación a esta enzima.

Contrario a lo que se esperaba, no se observaron diferencias significativas en los niveles de MDA sérico después de AT. Otros estudios previos han mostrado que el AT sí reduce los niveles de MDA sérico (72). En sujetos ancianos 1,000 UI/d de vitamina E durante 12 semanas provocaron un aumento en los niveles de MDA sérico después de un periodo de ejercicio físico (73). Otros autores también reportaron que altas dosis de vitamina E (hasta de 2,000 UI/d, durante 6 semanas), no modifican el índice de lipoperoxidación sérico (74). Estos resultados contradictorios reflejan la dificultad para controlar las variables que afectan este tipo de ensayos.



Existe gran evidencia de la existencia de deficiencia de micronutrientes antioxidantes en el plasma de pacientes diabéticos (75). Reportes recientes muestran niveles disminuidos de AT plasmático en diabéticos con respecto a sujetos sanos (76, 77) Otros autores han encontrado que los niveles de AT disminuyen progresivamente con la edad (78). Aunque se conoce que los niveles de AT plasmático no reflejan exactamente su contenido a nivel de eritrocitos, la estimación del nivel de AT en estudios de suplementación es muy importante para comprobar la adherencia al tratamiento. Una de las limitaciones de la primera etapa de este trabajo fue no medir los niveles plasmáticos de AT. Sin embargo, el apego al tratamiento fue estimado por medio de llamadas telefónicas una vez por semana y el conteo de las cápsulas al final del periodo experimental.

En estudios previos se ha reportado que una dosis de 800 UI/d durante 30 días aumenta los niveles de AT plasmático en un 300%. En esos estudios la concentración de AT alcanzó su nivel más elevado a los 15 días de iniciado el tratamiento y se mantuvo dentro de un rango limitado aun con el suministro continuo de AT. Los niveles en plasma se incrementaron de 20 hasta 60  $\mu\text{mol/L}$  (79). La capacidad limitada del plasma para alcanzar mayor concentración de AT a pesar de la continua ingesta del suplemento ha sido confirmada por otros autores (80).

En relación al efecto de AT sobre la glucemia la mayoría de trabajos reportan efectos negativos (81,82). Sin embargo algunos autores reportan efectos benéficos sobre la glucemia (83) y sobre hemoglobina glicada (84,85). En un estudio reciente en ratas sometidas a dieta aterogénica y glutamato monosódico, se demostró que el AT a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal durante 90 días disminuyó los niveles de lípidos, el índice aterogénico y la glucemia (86).

En el presente estudio no se observaron cambios en los niveles de glucemia ni de hemoglobina glicada en las mujeres diabéticas pero sí en las mujeres sanas. Aunque usualmente se considera que para observar un efecto en hemoglobina glicada debe considerarse un periodo experimental mayor al de la vida media de los eritrocitos (120 días); es importante recordar que el periodo de 6 semanas en este estudio es suficiente para lograr la incorporación de vitamina E en las membranas celulares (87). Por otra parte, ya que el tamaño de muestra usado para el grupo AT es reducido pudo haber incidido sobre el error de tipo 2 ( $\beta$ ) es decir la probabilidad de concluir que no hubo efecto de AT sobre la glucemia cuando en realidad si existe. Efectivamente en el análisis post hoc para glucemia, (fijando un  $\alpha$  de 0.05, un valor de  $\beta$  e 0.20, y una potencia de 80%) se encontró que se necesita una muestra de 50 sujetos para encontrar una diferencia de 40 mg/dL entre el grupo AT y el control. Con el número de sujetos empleados en este estudio ( $n = 13$ ), solo se alcanzarían a detectar una diferencia mínima de 80 mg/dL entre ambos grupos. Por esta razón se recomienda incrementar el tamaño de la muestra para inferencias más exactas.

El perfil de lípidos de los pacientes diabéticos al inicio del experimento mostró niveles elevados de TAG y de LDL y disminuidos de HDL. No se observaron cambios benéficos después del tratamiento con AT en los lípidos séricos. Al contrario se apreció un aumento significativo en los niveles de colesterol sérico ( $p < 0.0127$ ) aunque este aumento no se reflejó en las fracciones lipoproteicas. Aun cuando no tenemos una explicación exacta de este hecho, consideramos que pudiera ser atribuido a cambios dietarios no informados.

Para el estudio de los efectos de AT en mujeres sanas se incluyó una muestra de 16 participantes en edad perimenopáusica. Entre ellas se incluyeron doctoras, enfermeras y secretarias, todas trabajadoras del

Hospital General de Zona 46 del IMSS en Villahermosa, Tabasco. Por sus características laborales y académicas se considera que dichas participantes tienen los conocimientos de salud general para responder adecuadamente en la entrevista médica. Esto es relevante debido a que ellas reportaron un efecto benéfico del consumo de AT. Un gran porcentaje (70%) informó cambios benéficos reportados como la mayor tersura de la piel (menor resequedad), mayor textura del cabello, mejor lubricación vaginal y disminución de manchas en la piel. No se realizó ninguna determinación bioquímica-clínica para evaluar tales resultados. Por otra parte no se reportó ninguna clase de efectos adversos, incluyendo molestias gastrointestinales debidas al suplemento.

Según la encuesta dietaria de un día todos los pacientes estaban ingiriendo alimentos con suficiente alfa-tocoferol al inicio del experimento según la dosis diaria recomendada o RDA (88). La ingesta energética diaria calculada fue de 1,600 Kcal/d. Las participantes no tuvieron limitaciones específicas durante el periodo de este estudio.

De acuerdo con la teoría del desarrollo de la placa ateromatosa, la formación de las LDL oxidadas son uno de los primeros eventos que desencadenan la formación de las células espumosas y la aparición de las primeras lesiones vasculares. Por esta razón los efectos preventivos de los suplementos con antioxidantes deberían esperarse en las etapas tempranas previas al establecimiento de la enfermedad (23). En la segunda etapa de este trabajo con mujeres sanas se pretendió observar los cambios bioquímicos después de AT y durante un periodo de lavado posterior al tratamiento.

## ETAPA 2: MUJERES SANAS

No se observaron cambios en los niveles de glucemia después de AT, sin embargo como ya se señaló previamente, se apreció una

reducción en los niveles de hemoglobina glicada a través del periodo de tratamiento. Los niveles reducidos se mantuvieron aún después del periodo de lavado.

No se tiene una explicación objetiva sobre por que disminuyó la hemoglobina glicada y no la glucemia. Sin embargo, en los intervalos no evaluados pudieron existir niveles menores de glucemia que condicionaron la disminución en el grado de glicación de la hemoglobina.

Aun cuando algunos estudios experimentales en ratas han mostrado cambios en los niveles de lípidos, en nuestro estudio con mujeres sanas no se observaron modificaciones en el perfil lipídico después de la suplementación con AT.

En relación a los niveles de MDA sérico se observó una reducción a partir de la semana 12 de suplementación con AT. Los valores bajos de MDA se mantuvieron aún después del periodo de lavado. El método empleado para medir MDA se basa en la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y es el método más extensamente usado para evaluar la lipoperoxidación lipídica. Para disminuir la formación de lipoperóxidos artificiales durante la reacción, se adicionó BHT y para mejorar la recuperación del aducto MDA-TBA se agregó HCl antes de la extracción con n-butanol (57).

Un aumento significativo en los niveles de  $Mg^{2+}$  sérico se observó después de las 12 semanas de tratamiento con AT ( $p < 0.005$ ). Sin embargo, después del periodo de lavado los valores retornaron a sus niveles basales. No se conoce totalmente cual es la relación que existe entre los niveles de  $Mg^{2+}$  y el estrés oxidativo pero se ha demostrado que en cultivos celulares y en animales de experimentación la deficiencia de  $Mg^{2+}$  se asocia con la susceptibilidad al estrés oxidativo (89,90) . Por otra

parte la suplementación con  $Mg^{2+}$  ha resultado benéfica en varias enfermedades que incluyen a la diabetes mellitus (91), enfermedades cardiacas, asma y fatiga crónica (92). En los pacientes con fatiga crónica la suplementación con  $Mg^{2+}$  produjo un aumento de las concentraciones de vitamina E (93). Por otra parte el tratamiento con vitamina E provocó un incremento de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  intracelulares en pacientes con DM2 (94).

Debido a estas observaciones es posible que la acción de la vitamina E pueda estar mediada por el contenido de cationes intracelulares. Además, las modificaciones en los niveles de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  se han postulado como una vía final común para regular la homeostasis de glucosa, la sensibilidad a insulina, el tono vascular periférico y la presión sanguínea (91).

Las concentraciones de AT plasmático, aumentaron proporcionalmente al tiempo bajo tratamiento ( $p < 0.005$ ) y se redujeron después del periodo de lavado ( $p < 0.05$ ) Figura 1. Este comportamiento confirmó el apego al tratamiento por parte de las participantes. Los niveles de TAS se incrementaron después de AT. Este incremento fue moderado después de la semana 6 pero más elevado en la semana 12 (sem 0 vs 12,  $p < 0.001$ ). Después del periodo de lavado no se observó disminución respecto a la semana 12. El aumento en los niveles de TAS podría explicarse por el aumento en los niveles de AT ya mencionado.

En relación a las enzimas antioxidantes del eritrocito, el aumento de los niveles de CuZnSOD se acompañó de una reducción en la actividad de GPx después del tratamiento con AT. De estos cambios se desprende que la relación de CuZnSOD/GPx se incremento progresivamente (Figura 2). Como es bien conocido, la CuZnSOD cataliza la dismutación del anión superóxido a  $H_2O_2$  y la GPx convierte el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ . Cualquier aumento

en la actividad catalítica de la CuZnSOD produce un exceso de  $H_2O_2$  que debe ser eficientemente neutralizado por la GPx. El desequilibrio entre la concentración de ambas enzimas antioxidantes ha sido propuesto como un marcador de estrés oxidativo en células aisladas (95,96). En cultivos de células transfectadas la elevación de este índice se ha asociado al envejecimiento celular (97). En los eritrocitos de sujetos con síndrome de Down se encuentra una actividad de la enzima CuZnSOD aumentada con respecto a los de GPX, por lo que en estos sujetos se encuentran niveles elevados de  $H_2O_2$  (98).

Al parecer el tipo de dieta es importante en la respuesta de las enzimas antioxidantes a la vitamina E. En un estudio realizado en ratas alimentadas con aceite de salmón, la administración de dosis elevadas de vitamina E disminuyeron las actividades de GPx y catalasa en eritrocitos (71). Los autores comentan la importancia del tipo de grasa consumida durante el experimento. Se sugiere que la reducción en la expresión de enzimas antioxidantes puede ser consecuencia de la disminución de peróxidos lipídicos provocada por el aumento de la concentración de vitamina E en las membranas de eritrocitos inmaduros de la médula ósea. En el caso de los eritrocitos la situación es diferente ya que estas células carecen del material nuclear necesario para la síntesis *de novo* de estas enzimas.

## **CONCLUSIONES**

El alfa tocoferol fue bien tolerado a la dosis empleada en este estudio. Los cambios bioquímicos mostraron beneficios clínicos potenciales como lo es la reducción de la lipoperoxidación sérica, el incremento en el nivel de TAS, de CuZnSOD y de Mg<sup>2+</sup>. Por otra parte la relevancia e implicaciones del desbalance entre las enzimas antioxidantes eritrocitarias no son muy claras y requieren investigaciones posteriores.

## **PERSPECTIVAS**

El empleo de suplementos de vitamina E ofrece la facilidad de estandarizar las dosis administradas sin embargo una mejor opción en posteriores experimentos es realizar estudios empleando alimentos regionales con un contenido importante de vitamina E.

El empleo de métodos más específicos para valorar el grado de estrés oxidativo podría mejorar la confiabilidad de los estudios.

En posteriores experimentos podría realizarse un control dietario más estricto con el propósito de evitar sesgos.

La investigación del estado oxidativo podría complementar el estudio del efecto de los fármacos y los cambios en el estilo de vida sobre el control metabólico de los pacientes con DM2.

## Referencias

---

- 1 Halliwell B, Gutteridge JMC: Free Radicals in Biology and Medicine. 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford Oxford University Press. New York 1999.
- 2 Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
- 3 Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-820.
- 4 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*.1989;320:915-924.
- 5 Urano S, Hashi-Hashizuma M, Tochigi N, Matsuo M, Shikari M, Ito H: Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 1991; 26:58-61.
- 6 Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Schernthaner G, Mueller MM. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98:469-475
- 7 Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Secretaría de Salud. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/nutrición.pdf> Accesado septiembre 2006.
- 8 Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY, Prost J, Moutairou K, Chabane-Sari N and Khan NA: Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22:15-27.
- 9 Prior WA: Vitamin E and heart disease: from basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 2000;28:141-164.
- 10 WHO. Diabetes programme [www.int.who.int/diabetes/commoncondition](http://www.int.who.int/diabetes/commoncondition). Accesado septiembre 2006.
- 11 INEGI/Secretaria de Salud. Dirección General de Información en Salud. En [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx)



- 
- 12 Nacional Diabetes Information Clearinghouse (NDIC). A service of The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK). [//diabetes.niddk.nih.gov/](http://diabetes.niddk.nih.gov/)
  - 13 National Diabetes Data Group. The Expert committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.
  - 14 Stratton IM, Adler AI, Neil HAW, Matthews DR, Manley SE, Cull CA et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000; 321:405-412
  - 15 Pirart J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,4000 patients observed between 1947 and 1973, *Diabetes Care*, 1:168-188, 252-263, 1978.
  - 16 Mooradian AD, Dickerson F, Smith TL. Lipid order and composition of synaptic membranes in experimental diabetes mellitus. *Neurochem Res.* 1990;15:981-985.
  - 17 Ceriello,A. Dello Russo P.,Amstad, P. And Cerutti, P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. *Diabetes* 45:471-476, 1996
  - 18 Rösen P. Du X and Tschöpe D. Roles of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart; prevention by alpha tocopherol. *Mol Cell Biochem* 1998;188:103-11
  - 19 Horie, K., Miyata, T., Maeda, K. et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation in diabetic renal glomerular lesions. *J Clin Invest.* 1997;100: 2995-3004
  - 20 Giugliano,D.,Ceriello,A,Paolisso,G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19: 257-267
  - 21 Nishikawa T, Edelstein D, Du X-L, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek M, Beebe D, Oates P, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature* 2000; 404:787-790
  - 22 Evans HM, Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 1922; 56:650-1
  - 23 Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Sing JM, Azzi A: The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 703-16.

- 
24. Munteanu A, Zingg JM, Azzi A: Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality? *J Cell Mol Med* 2004; 8:59-76.
  - 25 Council for Responsible Nutrition. Supplement usage patterns of U.S. adults: consumer survey conducted by Ipsos-Reid. Washington, DC: Council for Responsible Nutrition, 2001
  - 26 Muntwyler J, Hennekens CH, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM. Vitamin supplement use in a low-risk population of US male physicians and subsequent cardiovascular mortality. *Arch Intern Med.* 2002;162:1472-6. [PMID: 12090883]
  - 27 Ford ES, Ajan UA, Mokdad AH. Brief communication: the prevalence of high intake of vitamin E from the use of supplements among U.S. adults. *Ann Intern Med* 2005; 143:116-20
  - 28 Huang HY, Appel LJ. Supplementation of diets with alpha-tocopherol reduces serum concentrations of gamma- and delta-tocopherol in humans. *J Nutr.* 2003;133:3137-40. [PMID: 14519797]
  - 29 van Haafden RI, Haenen GR, van Bladeren PJ, Bogaards JJ, Evelo CT, Bast A. Inhibition of various glutathione S-transferase isoenzymes by RRR-alpha-tocopherol. *Toxicol In Vitro.* 2003;17:245-51. [PMID: 12781202]
  - 30 The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med.* 1994;330:1029-35. [PMID: 8127329]
  - 31 Bieri JG. Effect of excessive vitamins C and E on vitamin A status. *Am J Clin Nutr.* 1973;26:382-3. [PMID: 4694018]
  - 32 Dowd P, Zheng ZB. On the mechanism of the anticlotting action of vitamin E quinone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8171-5. [PMID: 7667263]
  - 33 Gonzalez-Correa JA, Arrebola MM, Guerrero A, Munoz-Marin J, Ruiz-Villafranca D, Sanchez de la Cuesta F, De la Cruz JP. Influence of vitamin E on the antiplatelet effect of acetylsalicylic acid in human blood. *Platelets* 2005; 16:171-9
  - 34 Boskovic R, Gargaun L, Oren D, Djulus J, Koren G. Pregnancy outcome following high doses of vitamin E supplementation. *Reprod Toxicol* 2005; 20:85-8

- 
- 35 Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2004; 364:1219-28
- 36 Hatchcock JN, Azzi A, Blumberg J, Bray T, Dickinson A, Frei B, Jialal I, Johnston CS, Kelly FI, Kraemer K, Packer L, Parthasarathy S, Sies H, Traber MG. Vitamin E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr* 2005;81:736-45
- 37 Gillilan RE, Mondell B, Warbasse JR. Quantitative evaluation of vitamin E in the treatment of angina pectoris. *Am Heart J* 1977;93:444-9
- 38 Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB *et al.* Assessment of the safety of supplementation of different amounts of vitamin E in healthy older adults. *Am J Clin Nutr* 1998; 63:311-8
- 39 Stephens NG, Parsons A, Schofield PM *et al.* Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347:781-6
- 40 Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM *et al.* Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;293:1338-47 (American Medical Association).
- 41 The Parkinson Study Group. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 1993;328:176-83
- 42 Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. A report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
- 43 Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005; 142: 37-46.
- 44 Blatt DH, Pryor WA; Jialal I, Devaraj S; Carter T; Baggott JE; Possolo AM; Meydani SN *et al*; De Zee KJ *et al*; Lim WS *et al*; Marras C *et al*; Krishnan K *et al*; Hemila H. High-dosage vitamin E supplementation and all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 2005 Jul 19;143(2):150-5; authors replies 156-8.

- 
- 45 Jialal I, Devaraj S. High-Dosage vitamin E supplementation and all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005; 143(2): 155; author reply 156-8.
- 46 Harris DJ, Douglas PS. Enrollment of women in cardiovascular clinical trials funded by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *N Eng J Med* 2000; 343:475-80.
- 47 North American Menopause Society: Clinical challenges of perimenopause: consensus opinion of the North American Menopause Society. *Menopause* 2000; 7:5-13
- 48 WebMD Medical Reference in collaboration with the Cleveland Clinic. <http://my.webmd.com/content/article/51/40623.htm>. Accesado. Octubre 2006.
- 49 Overlie I, Morkrid L, Andersson AM, Skakkebaek NE, Moen MH, Holte A. Inhibin A and B as markers of menopause: a five-year prospective longitudinal study of hormonal changes during the menopausal transition. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84:281-5
- 50 Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:257-75
- 51 Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470-5.
- 52 Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973; 19: 476-82.
- 53 Finley PR, Schiffman RB, Williams RJ, Lichti DA. Cholesterol in high-density lipoprotein: use of Mg<sup>2+</sup> dextran sulphate in its enzymatic determination. *Clin Chem* 1978; 24: 931-33.
- 54 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
- 55 Seidel, D. Human plasma lipoproteins: biochemical and clinical aspects. *Ann Clin Biochem* 1982; 19:278-83
- 56 Yagi, K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids* 45:337-351,1987.
- 57 Wasowicz W, Neve J, Peretz A: Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993;39:2522-26.

- 
- 58 Stocks J, Dormandy TL. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 1971; 20:95-111
- 59 Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
- 60 McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
- 61 Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407-12.
- 62 Cheung AM, Chaudhry R, Kapral M, Jackevicius C, Robinson G. Perimenopausal and postmenopausal health. *BMC Womens Health* 2004; 25;4 suppl 1:S23
- 63 Manuel y Keenoy B, Shen H, Engelen W, Vertommen J, Van Dessel G, Lagrou A, De Leeuw I: Long-term pharmacological doses of vitamin E only moderately affect the erythrocytes of patients with type 1 diabetes mellitus. *J Nutr* 131:1723-1730,2001
- 64 Chung TW, Yu JJ, Liu DZ: Reducing lipid peroxidation stress of erythrocyte membrane by alpha-tocopherol nicotinate plays an important role in improving blood rheological properties in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Diab Med* 15:380-385, 1998
- 65 Yerer MB, Aydogan S. The in vivo antioxidant effectiveness of alpha-tocopherol in oxidative stress induced by sodium nitroprusside in rat red blood cells. *Clin Hemorheol Microcirc* 30:323-329, 2004
- 66 Sekeroglu MR, Sahin H, Dulger H, Algun E: The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 33:669-674, 2000
- 67 Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C: Lipid peroxidation and antioxidant enzymes status in type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract* 53:33-39,2001
- 68 Sailaja YR, Baskar R, Saralakumari D: The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. *Free Radic Biol Med* 35:133-139, 2003

- 
- 69 Brown KM, Morrice PC, Arthur JR, Duthie GG: Effects of vitamin E supplementation on erythrocyte antioxidant defense mechanisms of smoking and non-smoking men. *Clin Sci* 91:107-111, 1996
- 70 Atalay M, Laaksonen DE, Khanna S, Kaliste KE, Hanninen O, Sen CK: Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish oil and acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32:601-607,2000
- 71 Eder K, Flader D, Hirche F, Brandsch C: Excess dietary vitamin E lowers the activities of antioxidative enzymes in erythrocytes of rats fed salmon oil. *J Nutr* 132:3400-3404,2002
- 72 Sharma A, Kharb S, Chugh SN, Kakkar R, Singh GP: Effect of glycemic control and vitamin E supplementation on total glutathione content in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Nutr Metab* 44:11-13, 2000
- 73 Satchek JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB: Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med* 34:1575-1588, 2003
- 74 Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA: Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *JAMA* 285: 1178-1182, 2001
- 75 Will J, Ford E, Bowman B: Serum vitamin C concentration and diabetes: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. 1998-1994. *Am J Clin Nutr* 70: 49-52, 1999
- 76 Ahmad M, Khan MA and Khan AS. Naturally occurring antioxidant vitamin levels in patients with type-II diabetes mellitus. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 15:54-57, 2003
- 77 Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY, Prost J, Moutairou K, Chabane-Sari N and Khan NA. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 22:15-27, 2003
- 78 Polidori MC, Mecocci P, Stahl W, Parente B, Cecchetti R, Cherubini A, Cao P, Sies H, Senin U: Plasma levels of lipophilic antioxidants in very old patients with type 2 diabetes: *Diabetes Metab Res Rev* 16:15-19, 2000
- 79 Evans WJ: Vitamin E, vitamin C and exercise. *Am J Clin Nutr* 72:647-652, 2000

- 
- 80 Dimitrov NV, Meyer C, Gilliland D, Ruppenthal M, Chenoweth W, Malone W: Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *Am J Clin Nutr* 53:723-729, 1991
- 81 Fuller CJ, Chandalia M, Garg A, Grundy SM, Jialal I: RRR-alpha-tocopherol acetate supplementation at pharmacological doses decreases low-density-lipoprotein oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 63:753-759, 1996
- 82 Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B, Bosch J, Dagenais G, Mann JF, Gerstein HC: HOPE Study; MICRO-HOPE-Study. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes. *Diabetes Care* 25:1919-1927, 2002
- 83 Gokkusu C, Palanduz S, Ademoglu E, Tamer S. Oxidant and antioxidant systems in niddm patients:influence of vitamin E supplementation: *Endocr Res* 27: 377-386, 2001
- 84 Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ: Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetes complications? *Diabetes Care* 14:68-72, 1991
- 85 Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Gliugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F: Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care* 16: 1433-1437, 1993
- 86 The effect of alpha-tocopherol on lipid profile and blood sugar level on rats with atherogenic diet and monosodium glutamate. *Indian Journal of medical Sciences*. In press 2006.
- 87 Chopra RK, Bhagavan HN: Relative bioavailabilities of natural and synthetic vitamin E formulations containing mixed tocopherols in human subjects. *Int J Vitam Nutr Res* 69:92-95, 1999.
- 88 Ble-Castillo, J.L.; Carmona-Díaz, E.; Mendez, J.D.; Larios-Medina, F.J.; Medina-Santillan, R.; Cleva-Villanueva, G.; Diaz-Zagoya, J.C. Effect of  $\alpha$ -tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female type 2 diabetics. *Biomed. Pharmacother.* 59:290-295; 2005.
- 89 Rasmussen, H.S.; McNair, P.; Goransson, L.; Balslov, S.; Larsen, O.G.; Aurup, P. Magnesium deficiency in patients with ischemic heart disease with and without acute myocardial infarction uncovered by intravenous loading test. *Arch. Intern. Med.* 148:329-332; 1988.

- 
- 90 Paolisso, G.; Scheen, A.; D'Onofrio, F.; Lefebvre, P. Magnesium and glucose homeostasis. *Diabetologia* **33**:511-514; 1990.
- 91 Rodríguez-Morán, M.; Guerrero-Romero, F. Oral Magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* **26**:1147-1152; 2003.
- 92 McLean, R.M. Magnesium and its therapeutic uses. *Am. J. Med.* **96**:63-76; 1994.
- 93 Manuel y Keenoy, B.; Moorkens, G.; Vertommen, J.; Noe, M.; Nève, J.; De Leeuw, I. Magnesium status and parameters of the oxidant-antioxidant balance in patients with chronic fatigue: Effects of supplementation with Magnesium. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**: 374-382; 2000.
- 94 Paolisso, G.; Tagliamonte, M.R.; Barbieri, M.; Zito, G.A.; Gambardella, A.; Varricchio, G.; Ragno, E.; Varricchio, M. Chronic vitamin E administration improves brachial reactivity and increases intracellular Magnesium concentration in Type II diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**:109-115; 2000.
- 95 Sun, A.Y.; Chen, Y.M. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *J. Biomed. Sci.* **5**:401-414; 1998.
- 96 Mehta, J.L.; Li, D. Epinephrine upregulates superoxide dismutase in human coronary artery endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **30**:148-53; 2001.
- 97 de Haan, J.B.; Cristiano, F.; Iannello, R.; Bladier, C.; Kelner, M.J.; Kola, I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum. Mol. Genet.* **5**:283-292; 1996.
- 98 Pastor, M.C.; Sierra, C.; Dolade, M.; Navarro, E.; Brandi, N.; Cabré, E.; Mira, A.; Seres, A. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. *Clin. Chem.* **44**:924-929; 1998.



---

Anexo No 1

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**“EFECTOS DE ALFA-TOCOFEROL SOBRE EL CONTROL**  
**METABÓLICO Y EL ESTADO OXIDATIVO DE MUJERES SANAS Y**  
**CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

Fecha: \_\_\_\_\_

El que suscribe \_\_\_\_\_  
en pleno uso de mis facultades, manifiesto que se me ha invitado a participar en un estudio de investigación que el Instituto Politécnico Nacional, la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco y el Instituto Mexicano del Seguro Social, realizan sobre el efecto de la vitamina E (alfa-tocoferol) en mujeres con diabetes mellitus tipo 2 y mujeres sanas, ambas en edad perimenopausica.

Los investigadores me han informado de manera detallada todos y cada uno de los pasos del estudio, el objetivo a cumplir y las implicaciones clínicas así como los efectos adversos que pudieran presentarse. También se me ha informado que antes de entrar al estudio se me realizará una valoración clínica y de laboratorio, para evaluar si soy candidato al estudio. Se me ha informado que si soy seleccionado, debo de cumplir con las indicaciones médicas que se me indiquen, asistir a mis consultas y a la toma de muestras en las fechas indicadas, estoy enterado que la toma de muestras de sangre podrá ocasionarme alguna molestia. Sé que el beneficio que este estudio puede brindarme es lograr un mejor control de mi enfermedad y evitar sus complicaciones, sin embargo puede ser el caso de no lograr este objetivo.

Se me ha informado que para la toma de muestras en el laboratorio solo se utilizaran jeringas y agujas nuevas y desechables y que toda la información recopilada durante este estudio es confidencial, en conformidad con la ley.

Se que mi médico puede dar por terminada mi participación en este estudio si no sigo las instrucciones del mismo, si se considera que es por propio beneficio o en el caso de ser cancelado este estudio por las instituciones mencionadas.

Tengo el conocimiento de que mi participación es voluntaria y que en el momento en que yo lo decida puedo retirarme del estudio sin que con esto me vea afectado en cuanto a la atención médica que recibo por parte del IMSS.

He leído cuidadosamente éste documento y he solicitado se me aclaren todas mis dudas, mi participación en la investigación es voluntaria, se que constantemente recibiré información sobre lo relacionado a esta vitamina aunque esto, afecte mi decisión de seguir participando en el estudio.

---

Estoy de acuerdo en que el Dr. Jorge Luis Blé Castillo utilicen mi reporte de resultados de manera anónima, para futuras investigaciones médicas. Estoy enterado(a) que en caso de alguna urgencia deberé comunicarme con el Dr. Jorge Luis Blé Castillo al teléfono 9931 16 00 99 .

---

Nombre y firma del paciente

---

Nombre y firma del Investigador Principal

---

Testigo 1 (Nombre y firma)

---

Testigo 2 ( Nombre y firma)

Dossier: Diabetes: Basic research and clinical approach. Part II

## Effect of $\alpha$ -tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female type 2 diabetics

Jorge L. Ble-Castillo<sup>a,b,d,\*</sup>, Elizabeth Carmona-Díaz<sup>b</sup>, José D. Méndez<sup>c</sup>,  
Francisco J. Larios-Medina<sup>d</sup>, Roberto Medina-Santillán<sup>d</sup>, Guadalupe Cleva-Villanueva<sup>d</sup>,  
Juan C. Díaz-Zagoya<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> Hospital General de Zona No. 46, IMSS, Prolongación de Avenida Universidad Km 2.5, Colonia Casa Blanca, 86060 Villahermosa Tabasco, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Investigación DACS, UJAT, Villahermosa Tabasco, Mexico

<sup>c</sup> Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, Mexico D.F., Mexico

<sup>d</sup> Escuela Superior de Medicina, IPN, Mexico D.F., Mexico

<sup>e</sup> Facultad de Medicina, UNAM, Mexico D.F., Mexico

Received 22 February 2005

Available online 23 May 2005

### Abstract

In this study we evaluate the effects of  $\alpha$ -tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female patients with type 2 diabetes mellitus. Thirty-four female type 2 diabetics 40–70 years old up to 14 years with diabetes, under medical treatment, were randomly divided in two groups. One group received placebo (Control group,  $n = 21$ ) and the other received  $\alpha$ -tocopherol (800 IU/day,  $n = 13$ ) during 6 weeks. Blood samples were collected at the beginning and at the end of the study to measure malondialdehyde production, glycated hemoglobin, selenium dependent-glutathione peroxidase, Cu,Zn-superoxide dismutase in erythrocytes and total antioxidant status, glucose, lipid and lipoproteins in serum. Erythrocyte malondialdehyde decreased and serum-total antioxidant status increased after  $\alpha$ -tocopherol treatment ( $P < 0.0001$ ). However, an unexpected increase on cholesterol levels and a reduced erythrocyte-Cu,Zn-superoxide dismutase activity was observed after  $\alpha$ -tocopherol treatment.  $\alpha$ -Tocopherol administration did not affect glucose, glycated hemoglobin, triacylglycerides, lipoprotein levels and serum malondialdehyde.

A minor oxidative stress was observed in female type 2 diabetic patients after  $\alpha$ -tocopherol treatment inferred from the reduced levels of erythrocyte malondialdehyde and the increased values of total antioxidant status. On the other hand, no beneficial changes were observed on glycemic control or lipid metabolism.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Diabetes mellitus; Vitamin E; Alpha-tocopherol; Oxidative stress; Antioxidant status; Lipoperoxidation

### 1. Introduction

Type 2 diabetes is associated with increased oxidative stress, which probably results both from excess generation of reactive oxygen species and decreased antioxidant defenses [1,2]. In recent years, it has been known that, the most important factor to increase the free radicals production in diabetes is the hyperglycemic status, which can induce damage through overproduction of superoxide radical in the mitochondrion [3]. Superoxide is converted to hydroperoxyls, which can dif-

fuse through membranes and initiate lipoperoxidation. The oxidation of unsaturated lipids has implications not only for atherosclerosis, but also for stability and integrity of the red cell membranes [4,5]. Increased levels of lipoperoxidation as evidenced by breakdown products like malondialdehyde, have been found in erythrocytes and plasma of type 2 diabetic patients [6–8]. Supplementation with antioxidants, is therefore, an attractive potential therapy.

It is known that  $\alpha$ -tocopherol is a scavenger of superoxide and peroxy radicals, and it is considered the most important inhibitor of lipoperoxidation, protecting polyunsaturated fatty acids from oxidation [9]. It has been reported that plasmatic  $\alpha$ -tocopherol is lower in type 2 diabetic patients compared to

\* Corresponding author. Tel.: +52 9931 16 0099; fax: +52 9933 54 3238.  
E-mail address: [jblecastillo@cis.gob.mx](mailto:jblecastillo@cis.gob.mx) (J.L. Ble-Castillo).

healthy people [10,11].  $\alpha$ -Tocopherol supplementation has been used to delay the long-term complications of diabetes. It is postulated that  $\alpha$ -tocopherol has beneficial effects on metabolic control of diabetes due to its antioxidant activity, which influences lipid oxidation, protein glycation and insulin sensitivity [12]. Moreover, recent research has revealed that  $\alpha$ -tocopherol has precise molecular actions influencing the activity of several enzymes by gene expression modulation [13]. However, the information regarding the benefit of supplementation is conflicting and there are quantitative discrepancies between epidemiological data and intervention studies. These uncertainties raise doubts about the ability of  $\alpha$ -tocopherol to increase the antioxidant defense mechanisms and leave many unanswered questions [14–18].

The purpose of this study was to evaluate the beneficial effects of  $\alpha$ -tocopherol upon lipoperoxidation as well as glucose and lipid metabolism in a group of female type 2 diabetics.

## 2. Research design and methods

### 2.1. Chemicals

Alpha tocopherol was purchased from Nutricia Manufacturing USA as capsules containing D- $\alpha$  tocopherol acetate equivalent to 400 IU of Vitamin E. 2-thiobarbituric acid, 1,1,3,3,-tetraethoxypropane, sulfuric acid, phosphotungstic acid, and other chemical substances were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Patient selection

Thirty-four female type 2 diabetics, 40–70 years old, up to 14 years with the disease, were recruited from the General Hospital No 46 of the Mexican Institute of Social Security (IMSS) in Villahermosa Tabasco, Mexico. Subjects were admitted with moderate to severe hyperglycemia and under treatment with diet or hypoglycemic agents alone. Patients were divided in two groups: One received placebo (Control group, 800 mg of corn starch per day,  $n = 21$ ) and the other received alpha-tocopherol ( $\alpha$ -tocopherol group, 800 IU/day,  $n = 13$ ) during 6 weeks. The placebo consisted in 400 mg of corn starch administered twice a day after breakfast and dinner, in the same way as the  $\alpha$ -tocopherol capsules. All subjects gave informed consent and the study protocol was approved by the Institutional Review Board.

Exclusion criteria included insulin treatment, hypertension, hormonal therapy, smoking and ingestion of antioxidant supplements at least 3 months before the experiment, ingestion of hypolipidemic and non-steroidal anti-inflammatory drugs, intake of garlic or fish oil, renal or liver dysfunction, poorly accessible veins and alcohol consumption.

### 2.3. Blood sample collection

Venous blood samples were obtained from patients at the beginning and at the end of the experimental study. Samples

were taken after a 12 h fasting period. Erythrocyte and serum malondialdehyde assays were done the same day samples were collected and other serum aliquots were preserved at  $-70^{\circ}\text{C}$  for up to 15 days for other determinations.

### 2.4. Biochemical determinations

Glucose, lipids and lipoproteins were measured using enzymatic routine clinical methods on a Synchron C  $\times$  7 autoanalyzer, from Beckmann Coulter. Glycated hemoglobin was determined by an ion capture assay according to Abbott Laboratories for an IMx analyzer.

Malondialdehyde production by erythrocytes was measured by the method of Bigger and Jaeger, based on the previous work done by Stocks and Dormandy [19,20]. Malondialdehyde in serum was determined by reaction with thiobarbituric acid. To prevent artificial autooxidation, butylated hydroxytoluene in a final concentration of 15  $\mu\text{mol/l}$  was added to the reaction mixture. To improve the extraction step of the malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in *n*-butanol, 5 M HCl was used as proposed by Wasowicz et al. [21]. In both cases a 1,1,3,3-tetraethoxypropane hydrolyzed solution was used to prepare a standard curve. The final reading at 532 nm was done on a microplate reader image spectra rainbow sunrise of Tecan.

Total antioxidant status in serum represents the cumulative effects of all antioxidants present in serum. It was measured by a commercial kit (Randox Lab., Grumlin, UK) based on the ability of antioxidants in the sample to inhibit the oxidation of ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) to ABTS<sup>®+</sup> by metmyoglobin. The suppression of a stable blue green color production is proportional to the total antioxidant concentration [22].

Selenium dependent-glutathione peroxidase in erythrocytes was measured by a commercial kit (Randox Lab.), based on the method of Paglia and Valentine using cumene hydroperoxide as substrate [23]. Cu,Zn-superoxide dismutase activity from erythrocytes was measured by a commercially available kit (Randox Lab.), based on the method of McCord and Fridovich [24]. In this assay the degree of inhibition of the reaction to form a red formazan dye was determined. This latter substance is produced from a reaction between tetrazolium salt (INT) and the superoxide radical generated by xantine and xantine-oxidase. Both enzymes were expressed as U/g hemoglobin and the final reading was obtained from a 550 Express autoanalyzer of Ciba Corning. The hematological determinations of hemoglobin and blood cells were carried out in a Cell-Dyn 3500 of Abbott Laboratories.

### 2.5. Statistical analysis

Differences in baseline variables between the placebo and  $\alpha$ -tocopherol groups were sought using the Student's unpaired *t*-test. Two-way ANOVA was used to test the differences between  $\alpha$ -tocopherol and placebo-treated groups in the change from baseline in the main outcome measures. When a

difference between groups was significant from baseline, a paired *t*-test was used to determine whether the change from baseline in each group was significant. All tests were two-tailed and a  $P < 0.05$  was accepted as significant.

### 3. Results

Baseline characteristics of subjects are summarized in Table 1. Before treatment the two patient groups (Table 2) analyzed for an unpaired *t* value in clinical and biochemical parameters were not different from each other, except for low density lipoproteins which had a borderline value. Table 2 also shows the responses to 6 weeks of treatment (placebo or  $\alpha$ -tocopherol). There were not significant differences between the baseline values and posttreatment values for glycemia, glycosylated hemoglobin, urea, creatinine, uric acid, high density lipoprotein and serum-malondialdehyde. Fig. 1 shows a reduction on the malondialdehyde produced by erythrocytes and an increase of total antioxidant status levels ( $P < 0.0001$ ) after  $\alpha$ -tocopherol treatment. A reduction of 46% on the baseline erythrocyte malondialdehyde values was observed in the  $\alpha$ -tocopherol group in comparison with only 10% in the control group. An increment in cholesterol levels ( $202.1 \pm 49.51$  to  $239.6 \pm 44.37$  mg/dl,  $P = 0.012$ ) and a reduction in erythrocyte Cu,Zn-superoxide dismutase activ-

ity was observed after  $\alpha$ -tocopherol treatment;  $1083 \pm 295.3$  to  $876.4 \pm 46.60$ ,  $P < 0.0001$ .

### 4. Discussion

The patients included in this study had an uncontrolled status with moderate hyperglycemia and a high level of glycosylated hemoglobin. According to International Boards the goal of the treatment is to keep glycosylated hemoglobin under 7.5%, in order to avoid complications. In our community, it is very difficult to get this objective, in spite of the pharmacological treatment. In some cases people refuse to use hypoglycemic agents and sometimes they prefer trying diets or traditional therapy. In other cases they do not follow a proper diet even when they take hypoglycemic drugs. Many studies have shown that in hyperglycemic patients exist an increment in lipid peroxidation [1–3].

In this work the efficacy of  $\alpha$ -tocopherol against lipid peroxidation was apparent through the reduction of the susceptibility of erythrocytes to hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation. A lowered erythrocyte malondialdehyde level of 46% ( $P < 0.0001$ ) was observed after  $\alpha$ -tocopherol treatment in contrast with only 10% ( $P = 0.3614$ ) in the control group, in both cases respect the baseline values. A similar study on type 1 diabetics has reported 25% reduction after

Table 1  
Initial clinical characteristics of female type 2 diabetics

Variable	Control group	$\alpha$ -tocopherol group
Age (years)	55.33 $\pm$ 11.6	51.31 $\pm$ 14.03
Body weight (kg)	63.37 $\pm$ 7.85	67.52 $\pm$ 10.39
Height (m)	1.526 $\pm$ 0.06	1.563 $\pm$ 0.07
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	27.29 $\pm$ 3.66	27.83 $\pm$ 5.23
Systolic blood pressure (mmHg)	126.7 $\pm$ 14.60	128.5 $\pm$ 17.72
Diastolic blood pressure (mmHg)	73.3 $\pm$ 7.30	80.77 $\pm$ 6.40
Diabetes duration (years)	9.73 $\pm$ 4.50	10.94 $\pm$ 2.18
On pharmacologic control	19	12
With no pharmacological control	2	1

Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. Control group;  $n = 21$ .  $\alpha$ -Tocopherol group;  $n = 13$ .

Table 2  
Changes in glycaemic-lipid metabolites and oxidative markers following 6 weeks of oral supplementation with 800 IU/day of  $\alpha$ -tocopherol

Biochemical parameter	Control group		<i>P</i>	$\alpha$ -Tocopherol group		<i>P</i>
	Before treatment	After treatment		Before treatment	After treatment	
Glucose	264.8 $\pm$ 28.41	231.9 $\pm$ 17.55	0.4691	194.2 $\pm$ 19.43	211.3 $\pm$ 20.88	0.0790
Glycosylated hemoglobin (%)	10.52 $\pm$ 0.52	10.12 $\pm$ 0.53	0.2602	10.88 $\pm$ 0.79	10.25 $\pm$ 0.58	0.4360
Urea	35.62 $\pm$ 3.80	37.14 $\pm$ 4.69	0.5063	38.77 $\pm$ 6.10	33.77 $\pm$ 1.98	0.4772
Creatinine	0.84 $\pm$ 0.14	0.61 $\pm$ 0.08	0.0244	0.5308 $\pm$ 0.04	0.5615 $\pm$ 0.03	0.4363
Uric acid	4.82 $\pm$ 0.45	5.67 $\pm$ 0.45	0.0756	4.423 $\pm$ 0.34	4.746 $\pm$ 0.35	0.0839
Low density lipoproteins	146.9 $\pm$ 14.83	133 $\pm$ 15.90	0.0995	103.5 $\pm$ 12.02	115.6 $\pm$ 23.44	0.5140
Triacylglycerides	231.7 $\pm$ 18.35	239.5 $\pm$ 18.10	0.7719	300.6 $\pm$ 60.71	446.2 $\pm$ 136.87	0.2266
High density lipoproteins	42.83 $\pm$ 1.59	41.75 $\pm$ 2.02	0.5397	38.41 $\pm$ 2.86	34.82 $\pm$ 2.33	0.0720
Serum-malondialdehyde (nmol/ml)	5.829 $\pm$ 0.24	5.150 $\pm$ 0.29	0.1397	6.038 $\pm$ 0.27	5.912 $\pm$ 0.57	0.8455
Selenium dependent-glutathione peroxidase (U/g hemoglobin)	52.66 $\pm$ 3.83	36.72 $\pm$ 3.52	0.0798	45.30 $\pm$ 2.60	51.52 $\pm$ 3.34	0.1929

$\alpha$ -Tocopherol group ( $n = 13$ ) or placebo ( $n = 21$ ). Treatment was given during 6 weeks. Blood was collected after a 12 h fasting period, at the beginning and at the end of the study. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. and values of a paired *t*-test (posttreatment vs. baseline). Serum glucose, urea, creatinine, uric acid, cholesterol, low density lipoproteins, triacylglycerides and high density lipoprotein concentrations are expressed as mg/dl.

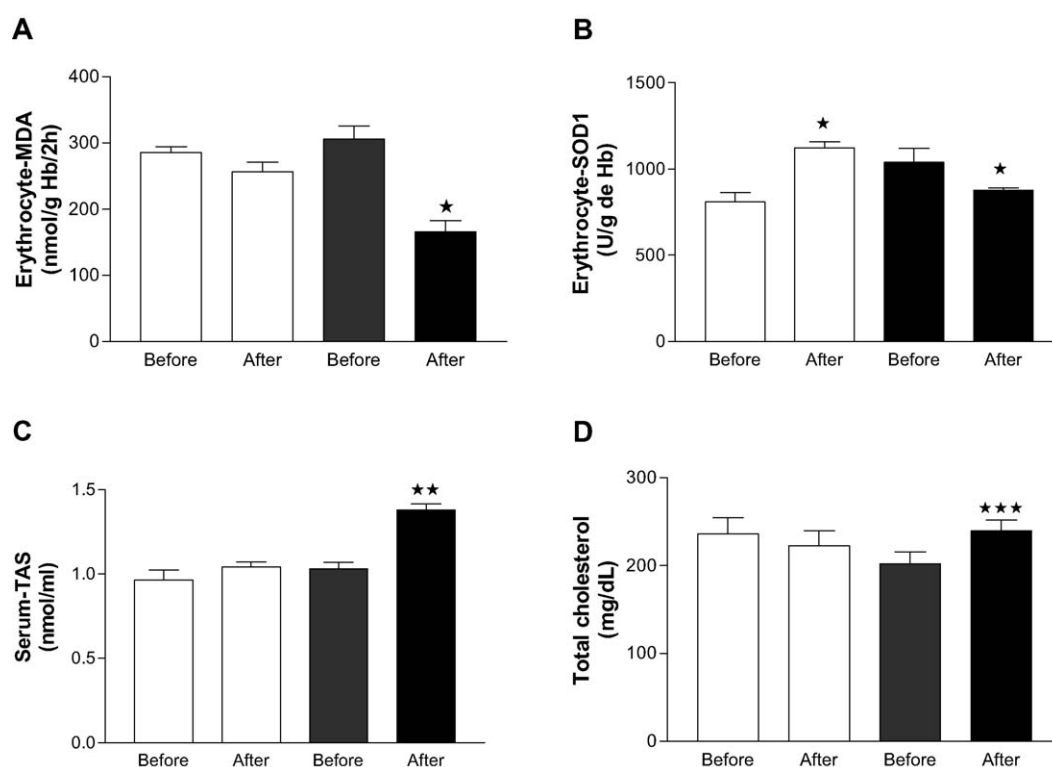


Fig. 1. Effect of  $\alpha$ -tocopherol (AT) supplementation or placebo treatment. (A) Erythrocyte-malondialdehyde (MDA) and (B) erythrocyte-superoxide dismutase (SOD1) decreased after  $\alpha$ -tocopherol treatment ( $*P < 0.0001$ , compared to baseline). (C) Serum total antioxidant status (TAS) and (D) total cholesterol increased after  $\alpha$ -tocopherol treatment ( $**P < 0.001$ ,  $***P < 0.05$  compared to baseline, respectively). In control group erythrocyte-superoxide dismutase (SOD1) (B), increased after placebo treatment ( $*P < 0.0001$ ). White bars represent placebo group and black bars  $\alpha$ -tocopherol group. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

3 months with  $\alpha$ -tocopherol 750 IU/day [25]. The same tendency has been observed in other clinical and experimental studies [26,27]. The major resistance observed in these studies to peroxidation in vitro might be related partially to an increase in  $\alpha$ -tocopherol concentration in the erythrocyte after the supplementation. There are not studies exclusively oriented to  $\alpha$ -tocopherol effects on the female type 2 diabetic patients.

It is well known that long-term complications of diabetes which are associated to the oxidation process include alterations in the stability and integrity of membranes and shortened life span of erythrocytes [5]. The clinical implications of a reduction in membrane peroxidation in vitro are not clear. However, it is accepted that erythrocytes with damaged membranes may have decreased resistance to physical stress, to hemolysis and a shorter life span.

It has been generally accepted that antioxidant defenses are reduced in type 2 diabetic patients respect to normal patients. However, the reports about antioxidant erythrocyte enzyme levels show great variance. Some researchers have reported normal values for erythrocyte-Cu,Zn-superoxide dismutase and selenium dependent-glutathione peroxidase in newly diagnosed and uncontrolled diabetics, respectively [28,29]; increased Cu,Zn-superoxide dismutase [30], and reduced selenium dependent-glutathione peroxidase in patients with and without coronary heart disease [31,32], compared to healthy controls.

In this study, an increase in serum-total antioxidant status, a reduction in the erythrocyte Cu,Zn-superoxide dismutase levels ( $P < 0.0001$ ) and no changes on the erythrocyte-selenium dependent-glutathione peroxidase enzyme activity were observed after  $\alpha$ -tocopherol supplementation. Similar results on selenium dependent-glutathione peroxidase activity were observed by other authors after  $\alpha$ -tocopherol 750 IU/day during a year in type 1 diabetic patients [25]. In healthy non-smoking men  $\alpha$ -tocopherol 280 mg/day by 10 weeks increased selenium dependent-glutathione peroxidase and reduced Cu,Zn-superoxide dismutase activity levels [33]. In experimental studies, high doses of vitamin E have been found to reduce erythrocyte antioxidant enzymes in rats [34,35]. It is not known if the reduction in human erythrocyte antioxidant enzymes could have clinical implications. On the other hand, we do not have an explanation for the increased erythrocyte-Cu,Zn-superoxide dismutase in control group after placebo treatment.

Contrary to our expectations, no changes were observed on serum malondialdehyde values after  $\alpha$ -tocopherol treatment. Previous reports have demonstrated that  $\alpha$ -tocopherol reduces serum malondialdehyde levels [36] but others are in contrast. In old healthy men vitamin E (1000 IU/day, during 12 weeks) increased serum malondialdehyde post-exercise [37]. Meagher et al. [38], reported that healthy people treated with high doses of vitamin E (up to 2000 IU/day, during 6 weeks), do not change their index of lipid peroxidation.

Such contradictory results may reflect the difficulty of controlling all the variables affecting the outcome.

There is a body of evidence supporting the poor plasma status of different antioxidant micronutrients in diabetic people [39]. Recent reports have found significant lower levels of  $\alpha$ -tocopherol in diabetics when compared to control healthy people [10,11]. Other authors have reported this substance and other lipophilic antioxidant concentrations in plasma to be negatively correlated to age [40]. Although the plasma  $\alpha$ -tocopherol levels might not be reflecting its content in erythrocytes, the estimation of this substance is important to confirm adherence to treatment. Indeed, one of the limitations of the present study was not measuring  $\alpha$ -tocopherol. The compliance was confirmed by phone calling once a week and pill counts at the end of the study. Previous studies on healthy people have estimated that 800 IU/day of all-rac-alpha-tocopherol (30 days) increased plasma  $\alpha$ -tocopherol in about 300%. In those studies plasma concentrations reached its peak 15 days after the initiation of supplementation, and were maintained at a plateau in spite of continuous oral supplementation.  $\alpha$ -tocopherol values increased since 20–60  $\mu\text{mol/l}$  [41]. The limited capacity of the plasma to reach higher  $\alpha$ -tocopherol concentration irrespective of the amount or duration of supplementation has been confirmed by others [42].

There is controversy about the role of  $\alpha$ -tocopherol on serum glucose and glycated hemoglobin, while some reports indicate a decreasing effect on glucose [43], and on glycated hemoglobin [44,45], in this study, we did not find a reduction in both parameters. Most reports on  $\alpha$ -tocopherol inform no effect on these biochemical parameters [46,47]. We recognize that a longer time of experimentation could be necessary for having a best effect on glycated hemoglobin considering the 120-day red blood cells life span. However, the period used in this study (6 weeks) is sufficient to achieve steady-state incorporation into cell membranes [48].

The lipemic profile in the patients was typical of a poorly controlled diabetes with increased triacylglyceride, low density lipoprotein and decreased high density lipoprotein concentrations. No beneficial effect was observed after  $\alpha$ -tocopherol treatment, instead of that, cholesterol raised ( $P < 0.0127$ ), but, this increase was not observed in lipoprotein fractions. This is an unexpected result and we do not have an exact explanation for this increase. In a certain way it might be attributed to non-informed dietary changes. We do not know if the difference in low density lipoprotein baseline levels between the groups ( $P = 0.0486$ ) affected these results.

Recently, the controversy about the benefit of vitamin E supplementation has increased. It comes mostly from the contrast between experimental and clinical trials. While experimental trials report great cellular and biochemical beneficial actions, clinical trials fail to support them. Among clinical trials, the discrepancies have been attributed to differences in selection of individuals, dosage, chemical forms of vitamin E, duration of treatment, stage of the disease and geographical area [15,18]. Because of these variables, the comparison among different studies continues being difficult.

Many of the vitamin E trials look for an antiatherosclerotic effect. Some studies have considered vitamin E not only as a potent antioxidant but also as a modulator of cellular signaling and transcriptional regulator as well as an inductor of apoptosis. There are clinical trials considering  $\alpha$ -tocopherol for prevention of lipoperoxidation, and also for other effects such as anti-inflammatory action, inhibition of smooth muscle cell proliferation and platelet aggregation. Long trials, however, have failed to demonstrate that vitamin E has cardiovascular protective effects [13,17,18].

In conclusion, our results showed mixed effects of  $\alpha$ -tocopherol supplementation on middle aged type 2 female diabetic patients with moderate to severe hyperglycemia. The treatment had beneficial effects on the antioxidant defense by increasing both the resistance to hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in vitro and serum-total antioxidant status. However, no changes in the metabolic control were noticed. The increase in cholesterol levels and the decrease in erythrocyte-Cu,Zn-superoxide dismutase level could represent harmful effects of  $\alpha$ -tocopherol in diabetic patients who are not metabolically controlled. We recommend being careful in using vitamin E in such high doses without a full understanding of the consequences.

## Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Fondo de Fomento a la Investigación of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, FP 2003/052). Jorge L. Blé Castillo is a member of the “Programa para el Mejoramiento del Profesorado de Educación Superior” (PROMEP-103.5/03/2178-UJATAB-148) and a doctoral fellow at the ESM, IPN, México D.F.

## References

- [1] Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. *Diabetes* 1991;40:405–12.
- [2] Tribe RM, Poston L. Oxidative stress and lipids in diabetes: a role in endothelium vasodilator dysfunction? *Vasc Med* 1996;1:195–206.
- [3] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813–20.
- [4] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915–24.
- [5] Urano S, Hoshi-Hashizume M, Tochigi N, Matsuo M, Shiraki M, Ito H. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 1991;26:58–61.
- [6] Aguirre F, Martin I, Grinspon D, Ruiz M, Hager A, De Paoli T, et al. Oxidative damage, plasma antioxidant capacity, and glycemic control in elderly NIDDM patients. *Free Radic Biol Med* 1998;24:580–5.
- [7] Gallou G, Ruelland A, Campion L, Maugendre D, Le Moullec N, Legras B, et al. Increase in thiobarbituric acid-reactive substances and vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Metab* 1994;20:258–64.

- [8] Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995;98:469–75.
- [9] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press; 1999.
- [10] Ahmad M, Khan MA, Khan AS. Naturally occurring antioxidant vitamin levels in patients with type-II diabetes mellitus. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2003;15:54–7.
- [11] Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY, Prost J, et al. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 2003;22: 15–27.
- [12] O'Connell B. Select vitamins and minerals in the management of diabetes. *Diabetes Spectrum* 2001;14:133–48.
- [13] Munteanu A, Zingg JM, Azzi A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E—myth or reality? *J Cell Mol Med* 2004;8:59–76.
- [14] Hensley K, Benaksas EJ, Bolli R, Comp P, Grammas P, Hamdheydari L, et al. New perspectives on vitamin E:  $\gamma$ -tocopherol and carboxyethylhydroxymethan metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1–15.
- [15] Prior WA. Vitamin E and heart disease: from basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 2000;28:141–64.
- [16] Heinecke JW. Is the emperor wearing clothes? Clinical trials of vitamin E and the LDL oxidation hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1261–4.
- [17] Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E 80th anniversary: a double life. *Not Only Fighting Radicals IUBMB Life* 2001;2:71–6.
- [18] Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Sing JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 2002;76:703–16.
- [19] Bidder TG, Jaeger PD. Malondialdehyde production by erythrocytes from alcoholic and non-alcoholic subjects. *Life Sci* 1982;30:1021–7.
- [20] Stocks J, Dormandy TL. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 1971;20:95–111.
- [21] Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993;39:2522–6.
- [22] Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84:407–12.
- [23] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158–69.
- [24] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049–55.
- [25] Manuel y Keenoy B, Shen H, Engelen W, Vertommen J, Van Dessel G, Lagrou A, et al. Long-term pharmacological doses of vitamin E only moderately affect the erythrocytes of patients with type 1 diabetes mellitus. *J Nutr* 2001;131:1723–30.
- [26] Chung TW, Yu JJ, Liu DZ. Reducing lipid peroxidation stress of erythrocyte membrane by alpha-tocopherol nicotinate plays an important role in improving blood rheological properties in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Diab Med* 1998;15:380–5.
- [27] Yerer MB, Aydogan S. The in vivo antioxidant effectiveness of alpha-tocopherol in oxidative stress induced by sodium nitroprusside in rat red blood cells. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004;30:323–9.
- [28] Roussel AM, Kerkeni A, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Anderson RA. Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 2003;22:316–21.
- [29] Sekeroglu MR, Sahin H, Dulger H, Algun E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2000;33:669–74.
- [30] Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2001;34:65–70.
- [31] Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes status in type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;53:33–9.
- [32] Sailaja YR, Baskar R, Saralakumari D. The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. *Free Radic Biol Med* 2003;35:133–9.
- [33] Brown KM, Morrice PC, Arthur JR, Duthie GG. Effects of vitamin E supplementation on erythrocyte antioxidant defense mechanisms of smoking and non-smoking men. *Clin Sci* 1996;91:107–11.
- [34] Atalay M, Laaksonen DE, Khanna S, Kaliste KE, Hanninen O, Sen CK. Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish oil and acute exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:601–7.
- [35] Eder K, Flader D, Hirche F, Brandsch C. Excess dietary vitamin E lowers the activities of antioxidative enzymes in erythrocytes of rats fed salmon oil. *J Nutr* 2002;132:3400–4.
- [36] Sharma A, Kharb S, Chugh SN, Kakkar R, Singh GP. Effect of glycemic control and vitamin E supplementation on total glutathione content in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Nutr Metab* 2000;44:11–3.
- [37] Sacheck JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R, Blumberg JB. Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1575–88.
- [38] Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *J Am Med Assoc* 2001;85:1178–82.
- [39] Will J, Ford E, Bowman B. Serum vitamin C concentration and diabetes: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. 1988–1994. *Am J Clin Nutr* 1999;70:49–52.
- [40] Polidori MC, Mecocci P, Stahl W, Parente B, Cecchetti R, Cherubini A, et al. Plasma levels of lipophilic antioxidants in very old patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16:15–9.
- [41] Evans WJ. Vitamin E, vitamin C and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000;72:647–52.
- [42] Dimitrov NV, Meyer C, Gilliland D, Ruppenthal M, Chenoweth W, Malone W. Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *Am J Clin Nutr* 1991;53:723–9.
- [43] Gokkusu C, Palanduz S, Ademoglu E, Tamer S. Oxidant and antioxidant systems in niddm patients: influence of vitamin E supplementation. *Endocr Res* 2001;27:377–86.
- [44] Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetes complications? *Diabetes Care* 1991;14:68–72.
- [45] Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Gliugliano D, Varrichio M, et al. Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care* 1993;16:1433–7.
- [46] Fuller CJ, Chandalia M, Garg A, Grundy SM, Jialal I. RRR-alpha-tocopherol acetate supplementation at pharmacological doses decreases low-density-lipoprotein oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1996;63:753–9.
- [47] Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B, et al. MICRO-HOPE-Study: effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1919–27.
- [48] Chopra RK, Bhagavan HN. Relative bioavailabilities of natural and synthetic vitamin E formulations containing mixed tocopherols in human subjects. *Int J Vitam Nutr Res* 1999;69:92–5.



**ORIGINAL ARTICLE**

Effects of  $\alpha$ -tocopherol on oxidative status and metabolic profile in healthy perimenopausal women.

<sup>a,b,c</sup> Jorge L. Ble-Castillo, <sup>c</sup> Guadalupe Cleva-Villanueva, <sup>c</sup> Roberto Medina-Santillán, <sup>b,d</sup> Juan C. Díaz-Zagoya. <sup>e</sup> José D. Méndez.

<sup>a</sup>*Hospital General de Zona 46, IMSS, Villahermosa Tabasco, México.*

<sup>b</sup>*Centro de Investigación DACS, UJAT, Villahermosa Tabasco, México.*

<sup>c</sup>*Escuela Superior de Medicina, IPN, México D.F., México.*

<sup>d</sup>*Facultad de Medicina, UNAM, México D.F., México.*

<sup>e</sup>*Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, México D.F., México.*

Address reprint request to: M en C Jorge L. Blé-Castillo, Hospital General de Zona 46, IMSS. Prolongación de Avenida Universidad Km 2.5, Colonia Casa Blanca, 86060. Villahermosa, Tabasco México. Tel. 9931 16 00 99. Fax. 9933 54 32 38. E-mail: [jblecastillo@cis.gob.mx](mailto:jblecastillo@cis.gob.mx)

## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

*Background.* Oxidative stress plays a role in the pathophysiology of several diseases. Nowadays, people autoprescribe vitamins and there are not enough data to determine what are the effects of  $\alpha$ -tocopherol supplementation on healthy people. The aim of this study was to investigate the effects of  $\alpha$ -tocopherol (AT) on the oxidative status and metabolic profile in healthy women.

*Methods.* Sixteen healthy women, 40-60 years old, received AT, 800 IU/day during 12 weeks, followed by a 6-week washout period. Blood samples were taken at the beginning and then every 6 weeks until the end of the study. AT, retinol, malondialdehyde (MDA), total antioxidant status (TAS), selenium-dependent glutathione peroxidase (GPx) and CuZn-superoxide dismutase (SOD) were quantified to evaluate the oxidative stress. The metabolic profile was evaluated by measuring glycated hemoglobin (HbA1c) in erythrocytes and glucose, phosphate, magnesium, lipid and lipoproteins concentrations in serum.

*Results.* AT caused a reduction in HbA1c, serum-MDA concentrations and erythrocyte GPx activity. These decrements were accompanied by an increase in AT, TAS and  $Mg^{2+}$  concentrations in serum and in erythrocyte SOD activity. Glucose, lipids and retinol concentrations, as well as blood cells count were not affected.

*Conclusions.* AT reduced lipid peroxidation and improved serum antioxidant status. However, the imbalanced response observed between erythrocytes SOD and GPx activities, could affect normal response to oxidative stress.

---

*Key Words:*  $\alpha$ -Tocopherol, vitamin E, oxidative stress, lipid peroxidation.

## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

### Introduction:

In the last decade the role of oxidative stress on the pathophysiology of several chronic diseases and its complications has been well established (1-3). Alpha-tocopherol (AT), is recognized as an important inhibitor of membrane lipid peroxidation, protecting polyunsaturated fatty acids from oxidation (1). Accordingly, most of the studies have been oriented toward understanding the effects of AT on diseases with oxidative stress (4-6). AT has been shown to increase the LDL's resistance to oxidation (7), reduce lipid peroxidation levels (8), inflammation markers (9) and platelet aggregation (10).

Few studies have been focused on the effects of AT on healthy people, particularly in women. In a study including healthy women it was showed that high doses of AT decreased C-reactive protein and monocyte interleukin-6 (11). However, other study, administering AT 200-2000 IU/d for 8 weeks failed to reduce lipid peroxidation (12). These studies did not include the evaluation of oxidative stress.

In spite of a widespread consumption of vitamin E supplementation by healthy people, there is not a complete understanding of its potential benefit (13,14) or its effects on the oxidative stress or metabolic profile. Some *in vitro* studies have shown that AT can act as a pro-oxidant molecule, promoting lipid peroxidation when no other co-antioxidant substrates are available (15, 16). In the last year, one study showed AT safety across a broad range of doses (17), while a pair of meta-analysis concluded that high doses of this substance may increase the risk of mortality (18, 19).

The association between an increased oxidative stress and age in women has been attributed to a progressive deficit in estrogen production and to an increase in iron storage (20). In Mexico the prevalence of AT deficiency among productive-aged women is high (30%) (21);

## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

which suggest that understanding of AT effects on middle-aged healthy women could be important. Moreover, some studies have shown the difficulty in getting appropriate AT plasma concentrations from foods (22). The situation could be worse if we consider that vegetable oils and other vitamin E-rich food are hypercaloric and not recommended to reduce energy intake.

Despite these observations there is a paucity of studies about the effects of AT on the oxidative/antioxidant status and metabolic changes in healthy people.

The aim of this study was to investigate the effect of AT on the oxidative status and metabolic profile in a group of middle-aged healthy women.

## **Material and Methods**

### *Subjects*

Ethical permission for all studies was obtained from the General Hospital # 46 of the Mexican Institute of Social Security (IMSS) Research Ethics Committee in Villahermosa Tabasco, México and investigations were conducted according to Declaration of Helsinki principles. Subjects gave written informed consent before participation. Sixteen healthy female participants, between 40-60 years old, with the characteristics shown in Table 1 were recruited from workers at the hospital. All the studied subjects were healthy as determined by a medical history questionnaire, physical examination, and normal results from clinical laboratory tests. Additional criteria included menstrual period cessation or irregular menstruation, elevated follicle stimulating hormone levels ( $\geq 30$   $\mu\text{U/ml}$ ), body mass index (BMI; in  $\text{Kg/m}^2$ ) between 21 and 30, hot flashes and one or both ovaries remaining. Exclusion criteria included hormonal therapy; cardiovascular, hepatic, gastrointestinal, or renal diseases; diabetes, hypertension, obesity, hyperlipidemia, supplemental vitamin use at least three months before the start of the study, intake of garlic or fish oil, alcoholism, smoking, or poorly accessible veins.

A dietary evaluation was conducted by a dietitian at the beginning and the end of the study. All participants completed a 1-day food record and dietary intake was calculated. Subjects were encouraged to maintain their diet and activities without modification throughout the study period. Participants received alpha-tocopherol, 800 IU/day, during 12 weeks, followed by a 6-week washout period.

### *Reagents*

AT was purchased from Nutricia Manufacturing, USA, in capsules containing 400 IU of vitamin E as D- $\alpha$ -tocopherol acetate. 2-thiobarbituric acid, 1,1,3,3,-tetraethoxypropane, sulfuric acid,

phosphotungstic acid and other chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA).

*Blood sample collection*

Venous blood samples were obtained from participants at the beginning of the study, at 6 and 12 weeks of the AT treatment and at the end of the washout period (18 weeks). In all cases, blood samples were taken between 7:00-8:00 A. M. after a 12 h fasting period. Blood routine clinical determinations and erythrocyte enzyme activities were determined the same day of sample collection. Serum aliquots were preserved at  $-70^{\circ}\text{C}$  for up to 10 days for other determinations.

*Clinical chemistry*

Hemoglobin and blood cells counting were measured using a Cell-Dyn 3700 counter from Abbott Diagnostics. Plasma triglycerides were assayed by the peroxidase-coupled method (23), total plasma cholesterol was measured by the Allain enzymatic method (24). High density lipoproteins (HDL) cholesterol was determined after precipitation of LDL, very low-density lipoproteins and chylomicrons using  $\text{MgCl}_2$  and dextran sulphate (25). LDL-cholesterol concentration was calculated from the above data using the Friedewald formula (26).

Glycated hemoglobin (HbA1c) was measured by a turbidimetric immunoinhibition method. In the reaction, HbA1c antibodies were combined with hemoglobin A1c from the sample to form soluble antigen-antibody complexes. Polyhapten from the reagent were bound with the excess of antibodies and the resulting agglutinated complex was measured turbidimetrically. Serum  $\text{Mg}^{2+}$  was determined by a spectrophotometric method using Magon, 1-azo-2-hydroxy-3-(2, 4-dimethylcarboxanilido)naphthalene-1'-(2-hydroxybenzene). All the mentioned and other routine clinical assays were performed on a Synchron CX7 Clinical System, from Beckman Coulter with a daily quality control program for precision.

## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

Human follicle stimulating hormone (FSH) was measured by enzymatic immunoassay on a Abbott AxSYM System (Abbott Laboratories, USA).

### *Oxidative stress*

The oxidative stress evaluation included the measurement of endogenous antioxidant capacity as well as biomarkers of lipid peroxidation. Total antioxidant status (TAS) in serum represents the cumulative effects of all antioxidants. It was measured by a commercial kit (Randox Lab., Grumlin, UK) based on the ability of antioxidants in the sample to inhibit the oxidation of ABTS® (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate] to ABTS®●+ by metmyoglobin. The suppression of a stable blue green color production is proportional to the total antioxidant concentration (27).

Selenium dependent-glutathione peroxidase (GPx) activity in erythrocytes was measured by a commercial kit (Randox Lab), based on the method of Paglia and Valentine using cumene hydroperoxide as substrate (28). CuZn-superoxide dismutase (SOD) activity from erythrocytes was measured by a commercially available kit (Randox Lab), based on the method of McCord and Fridovich (29). In this assay the degree of inhibition in forming a red formazan dye was determined. This last substance was produced from a reaction between tetrazolium salt and the superoxide radicals generated by xantine and xantine-oxidase. Both enzymes were expressed as U/g Hb and the final reading was obtained from a 550 Express autoanalyzer of Ciba Corning. AT and retinol concentrations were measured in serum by the high performance liquid chromatography (HPLC) method of Sowell *et al* (30), after a lipid extraction with a hexane-ethanol mixture.

Malondialdehyde (MDA) in serum was determined by its reaction with thiobarbituric acid (TBA). To prevent artificial autooxidation, butylated hydroxytoluene (BHT) in a final

## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

concentration of 15  $\mu\text{mol/L}$  was added to the reaction mixture. To improve the extraction of the MDA-TBA adduct, 5 M HCl was used before the extraction with *n*-butanol according to Wasowicz *et al* (31). A 1,1,3,3 tetraethoxypropane hydrolyzed solution was used to prepare a standard curve and a microplate reader to measure the absorbance at 532 nm.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed with the use of GRAPH-PAD PRISM (version 3.0; GraphPad Software, San Diego). A one way repeated measures analysis of variance (ANOVA) for the time component of the experiment was performed. Tukey post-hoc analysis was used where appropriate to test the differences between the groups. A value of  $p < 0.05$  was accepted as significant.



## Results

### *Clinical characteristics*

Table 1 shows the baseline clinical characteristics of the patients included in this study. As can be observed, obesity and hypertension did not exist among participants. From the dietary evaluation it was deduced that all subjects had a sufficient ingestion of vitamins and minerals, including AT from the diet. The calculated daily energy intake was 1600 Kcal/d.

Figure 1, shows basal normal levels of AT ( $1204 \pm 343.2 \mu\text{g/dL}$ ). As expected, AT concentration increased after supplementation ( $p < 0.001$ ) which confirmed a good compliance of the participants. Table 2 shows normal baseline values of glycemic-lipidic metabolites in the subjects. From the clinical interview a good tolerance to AT was observed. No patients reported digestive disorder that could be attributed to this substance.

### *Metabolic profile*

No changes in glucose concentrations were observed after AT supplementation (Table 2). However, HbA1c levels decreased time-dependently during the 12-weeks period of AT supplementation. (week 0 vs 6, and week 0 vs 12, week 6 vs 12,  $p < 0.001$ ). During the washout period AT values remained low (week 12 vs week 18,  $p > 0.05$ ; week 0 vs week 18,  $p < 0.001$ ), (Table 2). The lipid profile, including lipoprotein concentration, was not modified after AT treatment. Serum  $\text{Mg}^{2+}$  increased slightly at week 6 but was significantly different at week 12 of AT treatment (week 0 vs 6,  $p > 0.05$ ; week 0 vs 12,  $p < 0.01$ ). During the washout period, values returned near to baseline concentrations (week 0 vs 18,  $p > 0.05$ ; week 12 vs 18  $p < 0.001$ ).

### *Oxidative stress markers*

Figure 1 shows the effects of AT on oxidative stress biomarkers. Serum concentration of MDA was not different from baseline at week 6 but was significantly less at week 12 after AT treatment

## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

(week 0 vs week 6,  $p > 0.05$ ; week 0 vs week 12,  $p < 0.05$ ). After the washout period it remained low with respect to baseline value (week 0 vs week 18,  $p < 0.001$ ).

AT serum concentrations were duplicated after week 6 of supplementation, but only a 30% higher value was observed at week 12 (week 0 vs week 6,  $p < 0.001$ ; week 6 vs week 12,  $p < 0.01$ ). As expected, a reduction occurred at the end of the washout period (week 12 vs week 18,  $p < 0.05$ ). Serum retinol concentrations were not modified during the experimental period (data not shown).

TAS concentrations in serum showed a tendency to increase after AT treatment (Figure 1).

However, this increase was only significant until week 12 (week 0 vs week 12,  $p < 0.001$ ). The increased levels remained high after the washout period (week 0 vs week 18,  $p < 0.001$ ).

Erythrocyte SOD activity, increased after the AT treatment at week 6, and this level was maintained until week 12 (week 0 vs week 6,  $p < 0.001$ , week 0 vs week 12  $p < 0.001$ ). After the washout period these levels diminished near to baseline values (week 0 vs week 18,  $p > 0.05$ ), (Figure 1). A continuous reduction in erythrocyte GPx activity was observed throughout the AT treatment (week 0 vs week 6,  $p < 0.01$ , week 0 vs week 12,  $p < 0.001$ ). These diminished values remained the same after the washout period. As a result of the SOD increase and GPx reduction, the ratio of SOD/GPx in erythrocytes progressively augmented while under AT treatment, (weeks: 0 vs 12 and 0 vs 18,  $p < 0.001$ ; weeks: 6 vs 12,  $p < 0.05$ ; weeks: 6 vs 18,  $p < 0.001$ ), Fig 1.

### *Discussion*

The use of vitamin E as a supplement is a worldwide practice. Healthy people autoprescribe vitamin E oftenly. However, there are only few studies focused on the effects of this substance on

## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

healthy people. The present study included 16 healthy women which were nurses, secretaries and medical doctors. Due to their academic background it was considered they had enough health expertise to answer medical questionnaires. This is relevant in view of the findings from the questionnaire applied to the subjects at the end of the study. About 70% of the volunteers reported beneficial results from their AT supplementation, such as improvement of skin dryness, hair texture and vaginal lubrication. However, not clinical determinations were performed to confirm these observations.

Different reports have concluded that the best effect of AT supplementation could result from its intake before the onset of chronic diseases (13). In cardiovascular disease lipid peroxidation is assumed to be an early key event in the atherogenic process. Vitamin E may reduce the occurrence of these lesions through the prevention of the initial oxidation. In spite of this theory, most studies on the effects of AT have been conducted on patients with an already diagnosed disease and usually involving complications (14). The intention of this study was to understand biochemical changes on healthy female subjects after AT treatment and also after a washout period.

We did not find a reduction on serum glucose levels, however, HbA1c percentage diminished in a time-dependent fashion along the AT treatment and it remained low at the end of the washout period. HbA1c has become the routine test to evaluate glucose control in diabetic patients. The potential benefit of AT on glycemic control could also be important for people with increased risk of type 2 diabetes. When consuming diets with high glycaemic index, hyperglycemia is observed during the postprandial period even in healthy people. Postprandial hyperglycemia is already accepted as an independent risk factor of vascular disease (32). In addition, it is known that hyperglycemic events can increase oxidative stress not only in diabetics

(33), but also in healthy people (34). The effects of AT on glycemic control of diabetics is unclear, while some studies have reported a HbA1c reduction after AT treatment (35, 36) other authors do not support this result (37, 38). In female patients with uncontrolled type 2 diabetes mellitus, it was not found beneficial effect on glycemic control after 6 weeks of 800 UI/d AT supplementation (37).

A serum MDA reduction was observed beginning on week 12 of AT treatment. This decreasing tendency was maintained after the washout period. Our results agree with other studies showing reductions in lipoperoxidation after AT supplementation (39, 40), while other reports are in contrast (12, 41). The determination of MDA by the TBA reaction is the most extensive method reported in the literature to evaluate lipid peroxidation. In this study, BHT was used as an antioxidant to inhibit the artifact formation of lipid peroxides during the assay and acidification was used before the extraction of the MDA-TBA adduct to improve recuperation (31).

An increment on serum  $Mg^{2+}$  levels after 12 weeks of AT supplementation was observed. At the end of the washout period these values decreased to baseline levels. The importance of this finding is derived from the knowledge that  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  are cations that participate as a final common pathway to regulate cellular glucose homeostasis, insulin sensitivity, peripheral vascular tone, and blood pressure (42). An increased susceptibility to oxidative stress has been shown in cell cultures and in experimental animals with extreme  $Mg^{2+}$  deficiency (43, 44). Moreover  $Mg^{2+}$  supplementation has been beneficial in a wide range of conditions including type 2 diabetes mellitus (42), ischemic heart disorders, asthma and chronic fatigue (45). In patients with chronic fatigue,  $Mg^{2+}$  supplementation produced an increment in serum vitamin E (46), whereas vitamin E treatment increased intracellular  $Mg^{2+}$  concentration in type 2 diabetic patients (47). It has been

hypothesized that the effect of AT on intracellular magnesium content leads to a reduction in intracellular calcium content, thus resulting in improved smooth vascular cell relaxation.

Participants in this study exhibited AT normal plasma levels at the baseline. During AT supplementation these levels were increased depending on time (Fig 1), confirming the compliance of the participants. The observed increment in serum TAS levels after AT could be attributed to the increased AT concentration.

An increase in erythrocyte SOD and a reduction in GPx activities were observed after AT supplementation in this study. An increase in the SOD/GPx ratio was also found. It is known that SOD catalyzes the dismutation of superoxide anion to hydrogen peroxide and GPx, the conversion of  $H_2O_2$  to  $H_2O$ . Any increase in SOD catalytic activity produces an excess of  $H_2O_2$  that must be efficiently neutralized by GPx. The accumulation of  $H_2O_2$  when it is not efficiently converted to  $H_2O$  may be detrimental to cells. For this reason, a disequilibrium between SOD and GPx activity ratio has been proposed as a marker of oxidative stress (48, 49). In transfected cell lines an elevation in SOD/GPx ratio, was proposed to induce cellular senescence (50). It is also important to note that something similar happens in patients with Down's syndrome; erythrocytes from these patients, display increased activity of SOD relative to GPx, resulting in increased basal levels of  $H_2O_2$  (51).

In this study we expected that increased plasma AT levels, would reserve the consumption of GSH and GPx enzyme in erythrocytes, which would result in the increase in GPx and GSH erythrocyte levels. It has been reported that vitamin E (280 mg/d) for 10 weeks increased GPx and glutathione reductase activities but decreased SOD activity and GSH content in erythrocytes from non-smoking men (52). Some studies have shown no effect of vitamin E: in adolescents with type 1 diabetes mellitus, vitamin E supplementation (600 mg twice daily during three

months) was not effective to modify the defective intracellular antioxidant enzymes production in skin fibroblasts (53). In addition, a potential prooxidative effect of excessive vitamin E has been shown in an experimental study in rats fed salmon oil, high doses of vitamin E diminished the activities of erythrocyte GPx and catalase (54). In that study the importance of the type of dietary fat was highlighted and it was suggested that the formation of lipid peroxides in membranes of immature erythrocytes in the bone marrow was reduced by increasing vitamin E concentration. For this reason, the expression of antioxidant enzymes in immature erythrocytes could also be reduced in these rats. Mature erythrocytes however are anucleate and no induction of antioxidant enzymes is possible.

Similar to the present study, most studies reported in the scientific literature have been conducted without strict dietary control. This condition should be included in future research in order to understand the interactions among oxidative stress, AT supplementation and the activities of antioxidant enzymes in cells.

In conclusion, at the doses used here, AT was well tolerated and participants reported beneficial results. In addition biochemical determinations showed potential clinical benefits from the reduction on serum lipid peroxidation, the increase in serum TAS, SOD activity and serum  $Mg^{2+}$ . However, the implications of the imbalance between SOD and GPx activities are not clear and require further research, because it could eventually affect the normal response of healthy people to oxidative stress. Because a complete understanding of the cellular effects of high doses of AT is not available, it would be wiser to try with a well balanced nutrition instead of pill supplementation.

**Acknowledgements**

This study was supported by a grant from the Fondo de Fomento a la Investigación of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, FP 2003/052). Jorge L. Blé Castillo is a member of the “Programa para el Mejoramiento del Profesorado de Educación Superior” (PROMEP-103.5/03/2178-UJATAB-148) and a fellow doctor at the ESM, IPN, México D.F. The authors thank chemist Irene Montalvo Velarde, chemist Ruben Cordova Uscanga and biologist Elizabeth Carmona Díaz for their technical assistance.

## References

1. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 2<sup>nd</sup> Ed. New York, Oxford University Press. 1999.
2. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. *Diabetes* 1991;40: 405-412.
3. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21:361-370.
4. Munteanu A, Zingg JM, Azzi A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E-myth or reality? *J Cell Mol Med* 2004; 8:59-76.
5. Farvid MS, Jalali M, Siassi F, Saadat N, Hosseini M. The impact of vitamins and/or mineral supplementation on blood pressure in type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr* 2004;23: 272-279.
6. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347:781-786.
7. Jialal I, Fuller CJ, Huet BA. The effect of alpha-tocopherol supplementation on LDL-oxidation. A dose-response study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:190-198.
8. Cracowski JL, Girolet S, Imbert B, Seinturier C, Stanke-Labesque F, Bessard J, et al. Effects of short-term treatment with vitamin E in systemic sclerosis a double-blind randomized, controlled clinical trial of efficacy based on urinary isoprostane measurement. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 98-103.
9. Devaraj S, Jialal I. Low density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of alpha-tocopherol supplementation. *Circulation* 2000;102:191-196.
10. Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, Keaney JF Jr.  $\alpha$ -tocopherol inhibits aggregation of human platelets by protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation* 1996; 94:2434-2440.
11. Devaraj S, Jialal I. Alpha tocopherol supplementation decreases serum C-reactive protein and monocyte interleukin-6 levels in normal volunteers and type 2 diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 2000;29:790-792.



## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

12. Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach JR, FitzGerald GA. Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *JAMA* 2001;285:1178-1182.
13. Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Sing JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 2002;76:703-716.
14. Prior WA. Vitamin E and heart disease: from basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 2000;28:141-164.
15. Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem Sci* 1999;24:219-223.
16. Brown KM, Morrice PC, Duthie GG. Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and nonsmokers. Dose response to vitamin E supplementation. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:496-502.
17. Hatchcock JN, Azzi A, Blumberg J, Bray T, Dickinson A, Frei B, et al. Vitamin E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:736-745.
18. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2004; 364:1219-1228.
19. Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005;142:37-46.
20. Berge LN, Bona KH, Nordoy A. Serum ferritin, sex hormones and cardiovascular risk factors in healthy women. *Arterioscler Thromb* 1994;14:857-861.
21. Mexico Department of Health. Nutrition. National Survey 1999. Nutritional status of children and women in Mexico (ENN-99). Internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/nutrición.pdf> (accessed March 10, 2006).
22. McGavin JK, Mann JI, Skeaff CM, Chisholm A. Comparison of a vitamin E-rich diet and supplemental vitamin E on measures of vitamin E status and lipoprotein profile. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:555-561.
23. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973; 19: 476-482.

24. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20: 470-475.
25. Finley PR, Schiffman RB, Williams RJ, Lichti DA. Cholesterol in high-density lipoprotein: use of  $Mg^{2+}$  dextran sulphate in its enzymatic determination. *Clin Chem* 1978;24: 931-933.
26. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
27. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; 84:407-412.
28. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-169.
29. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244: 6049-6055.
30. Sowell AL, Huff DL, Yeager PR, Caudill SP, Gunter EW. Retinol, alpha-tocopherol, lutein/zeaxanthin, beta-cryptoxanthin, lycopene, alpha-carotene, trans-beta-carotene and four retinyl esters in serum, determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelength detection. *Clin Chem* 1994; 40:411-416.
31. Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993;39:2522-2526.
32. Levitan EB, Song Y, Ford ES, Liu S. Is nondiabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease?: a meta-analysis of prospective studies. *Arch Int Med* 2004; 164:2147-2155.
33. Sampson MJ, Gopaul N, Davies IR, Hughes DA, Carrier MJ. Plasma  $F_2$  Isoprostanes. Direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:537-541.
34. Marfella R, Quagliario L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest* 2001;4: 635-636.

35. Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Giugliano D, Varricchio M, et al. Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care* 1993;16:1433-1437.
36. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetes complications? *Diabetes Care* 1991;14:68-72.
37. Ble-Castillo JL, Carmona-Díaz E, Mendez JD, Larios-Medina FJ, Medina-Santillán R, Cleva-Villanueva G, et al. Effect of  $\alpha$ -tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female type 2 diabetics. *Biomed Pharmacother* 2005;59:290-295.
38. Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B, et al. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care* 2002; 25:1919-1927.
39. Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Sant Vitacolonna E, et al. In vivo formation of 8-Iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99:224-229.
40. Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, Packer L, Jialal I. Comparison of the effects of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1114-1121.
41. Simons LA, vonKonigsmark M, Simons J, Stocker R, Celermajer DS. Vitamin E ingestion does not improve arterial endothelial dysfunction in older adults. *Atherosclerosis* 1999;143:193-199.
42. Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects. A randomized double-blind controlled trial. *Diabetes Care* 2003;26:1147-1152.
43. Rasmussen HS, McNair P, Goransson L, Balslov S, Larsen OG, Aurup P. Magnesium deficiency in patients with ischemic heart disease with and without acute myocardial infarction uncovered by intravenous loading test. *Arch Intern Med* 1988;148:329-332.
44. Paolisso G, Scheen A, D'Onofrio F, Lefebvre P. Magnesium and glucose homeostasis. *Diabetologia* 1990;33:511-514.
45. McLean RM. Magnesium and its therapeutic uses. *Am J Med* 1994;96:63-76.

46. Manuel y Keenoy B, Moorkens G, Vertommen J, Noe M, Nève J, De Leeuw I. Magnesium status and parameters of the oxidant-antioxidant balance in patients with chronic fatigue: Effects of supplementation with magnesium. *J Am Coll Nutr* 2000;19: 374-382.
47. Paolisso G, Tagliamonte MR, Barbieri M, Zito GA, Gambardella A, Varricchio G, et al. Chronic vitamin E administration improves brachial reactivity and increases intracellular magnesium concentration in Type II diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:109-115.
48. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-248.
49. Mehta JL, Li D. Epinephrine upregulates superoxide dismutase in human coronary artery endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:148-153.
50. de Haan JB, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner MJ, Kola I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet* 1996;5:283-292.
51. Pastor MC, Sierra C, Dolade M, Navarro E, Brandi N, Cabré E, et al. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. *Clin Chem* 1998;44:924-929.
52. Brown KM, Morrice PC, Arthur JR, Duthie GG. Effects of vitamin E supplementation on erythrocyte antioxidant defense mechanisms of smoking and non-smoking men. *Clin Sci* 1996; 91:107-111.
53. Chiarelli F, Santilli F, Sabatino G, Blasetti A, Tumini S, Cipollone F, et al. Effects of vitamin E supplementation on intracellular antioxidant enzyme production in adolescents with type 1 diabetes and early microangiopathy. *Ped Res* 2004; 56: 720-725.
54. Eder K, Flader D, Hirche F, Brandsch C. Excess dietary vitamin E lowers the activities of antioxidative enzymes in erythrocytes of rats fed salmon oil. *J Nutr* 2002;132:3400-3404.

**Table 1**—Baseline characteristics of healthy women (n = 16 )

Characteristic	Mean $\pm$ SD
Age (years)	51.8 $\pm$ 4.47
Body weight (Kg)	61.59 $\pm$ 6.77
Height (m)	1.534 $\pm$ 0.04
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	26.18 $\pm$ 2.85
Systolic blood pressure (mmHg)	112.5 $\pm$ 8.56
Diastolic blood pressure (mmHg)	71.13 $\pm$ 8.56
FSH (mIU/ml)	57.90 $\pm$ 32.65

## The Effects of $\alpha$ -tocopherol on Healthy Women

**Table 2:** Modification of biochemical metabolic markers following 6 and 12 weeks of oral supplementation with alpha-tocopherol 800 IU/day to healthy female women (n = 16). A washout period of 6 weeks followed the AT treatment..

	Week 0	Week 6	Week 12	Week 18 (Washout)	<i>p</i>
Glucose (mg/dL)	96.88±6.722	98.38±6.479	97.13±5.427	93.81±8.183	NS
Glycated hemoglobin (%)	3.894±0.2175	3.625±0.274	3.131±0.2414	3.244±0.1590	0 vs 6, <i>p</i> <0.001 0 vs 12, <i>p</i> <0.001 0 vs 18, <i>p</i> <0.001 6 vs 12, <i>p</i> <0.001 6 vs 18, <i>p</i> <0.001 12 vs 18, <i>p</i> >0.05
Uric Acid (mg/dL)	4.669±0.6416	4.325±0.591	4.281±0.7556	4.594±0.8410	NS
Cholesterol (mg/dL)	196.9±33.75	192.2±36.60	196.7±35.11	194.0±42.52	NS
Low density lipoproteins (mg/dL)	108±33.28	107.2±34.96	110.6±34.90	117.2±41.38	NS
High density lipoproteins (mg/dL)	56.50±13.36	53.06±9.19	53.19±9.955	48.75±11.76	NS
Cholesterol/High density lipoproteins (mg/dL)	3.614±0.768	3.718±0.5099	3.823±0.9976	4.129±0.970	NS
Triglycerides (mg/dL)	162.1±66.18	159.80±72.71	164.7±66.98	140.2±48.73	NS
Phosphates (mg/dL)	3.650±0.547	3.494±0.763	3.869±0.490	3.40±0.4351	NS
Magnesium (mEq/L)	2.089±0.2157	2.104±0.1120	2.305±0.1423	2.024±0.2055	0 vs 12, <i>p</i> <0.01 6 vs 12, <i>p</i> <0.05 12 vs 18, <i>p</i> <0.001
Retinol (µg/dL)	45.86±7.966	44.60±7.682	47.6±8.1	43.5±6.9	NS

Data represent the mean ± S.D. A one way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey post-hoc test was used where appropriate for all comparisons. Blood was collected after a fasting period at the beginning, at week 6, at the end of the  $\alpha$ -tocopherol treatment (week 12) and after the washout period (week 18).

Figure legends

**Figure 1.** Effects of AT supplementation on lipoperoxidation and TAS markers. Serum MDA: Wk 0 vs wk 6,  $p > 0.05$ ; 0 vs 12,  $p < 0.05$ ; 0 vs 18,  $p < 0.001$ . Serum TAS: Wk 0 vs wk 12,  $p < 0.001$ ; 0 vs 18,  $p < 0.001$ ; 6 vs 18,  $p < 0.05$ . Erythrocyte Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD): Wk 0 vs wk 6,  $P < 0.001$ ; 0 vs 12,  $p < 0.001$ ; 0 vs 18,  $p > 0.05$ . Erythrocyte Se-GPx (GPx): Wk 0 vs wk 6,  $p < 0.01$ ; 0 vs 12,  $p < 0.001$ ; 0 vs 18,  $p < 0.001$ . AT levels: Wk 0 vs wk 6,  $p < 0.001$ ; 0 vs 12,  $p < 0.001$ ; 12 vs 18,  $p < 0.05$ . SOD/GPx ratio: Wk 0 vs wk 12 and 0 vs 18,  $p < 0.001$ ; 6 vs 12,  $p < 0.05$ ; 6 vs 18,  $p < 0.001$ .  $n = 16$ .