



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFFECTO DE ESPERMINA Y ESPERMIDINA SOBRE LA
INMUNOPRESENCIA DE LA CATALASA EN EMBRIONES DE RATA
SOMETIDOS A UNA CONCENTRACIÓN ELEVADA DE GLUCOSA EN
CULTIVO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

ARIANNA MAHELY HURTADO MONZÓN

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARTÍN PALOMAR MORALES



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis padres, Josefina y Ramón: porque siempre me han apoyado, sin importar el camino que he querido seguir, por guiarme y estar a mi lado en los buenos y malos ratos, por los consejos y los hermosos momentos que hemos pasado juntos y por todo su amor y confianza.

A mi hermano, Edgar: por ser mi cómplice, mi casi colega (sígueme echando ganas “ñoño”), por las pláticas y tantos momentos a tu lado, gracias por estar ahí, por apoyarme y entenderme, sabes lo mucho que te amo y lo mucho que creo en ti.

A mi familia: por todas las pláticas y momentos compartidos, porque simplemente no me pudo tocar una familia mejor, los y las amo.

A Christian: por siempre creer en mí, por compartir conmigo tantos momentos maravillosos y tanta confianza, por estar ahí cuando te necesito, por escucharme y aconsejarme, por impulsarme a seguir adelante. Gracias por compartir este camino conmigo, te amo.

A Lizbeth, Lizeth, Elena, Aldo, Miguel, Carlos, David, Ricardo: por todos los momentos que hemos pasado juntos, por aguantarnos en buenos y malos ratos, porque fuimos siempre un equipo, por ser parte de mi vida, gracias.

A mis amigos: que siguen formando parte de mi vida a pesar de los años, por escucharme y estar ahí cuando los necesito, gracias.

A mi asesor Dr. Martín y a Gladys: por sus consejos, por creer en mí, por tenerme paciencia. Porque más que ser mis asesores los considero mis amigos y me llevo mucho de ustedes, me han enseñado a ser perseverante y a confiar en que puedo lograr muchas cosas, gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Martín Palomar Morales, gracias por aceptarme en su laboratorio, por guíame durante la realización de esta tesis y por todo el apoyo brindado.

Biól. Gladys Chirino Galindo, gracias por el apoyo, por ayudarme durante los experimentos, por compartirme tu conocimiento y por todos los consejos durante la realización de la tesis.

A mis sinodales, Dr. Ricardo Mejía Zepeda, Dr. Eduardo Barrera Escorcia, M. en C. Mónica Chávez Maldonado, por brindarme su tiempo, sus consejos y orientación que permitieron hacer de esta tesis un mejor trabajo.

A mis profesores, por compartirme sus conocimientos y su tiempo, por aquellos que dieron más de sí para ayudarme a crecer.

A esta institución, por brindarme el espacio y los recursos para estudiar esta maravillosa carrera.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Diabetes Mellitus.....	2
Diabetes Mellitus y preñez en mamíferos.....	3
Poliaminas.....	5
El oxígeno y sus especies reactivas.....	7
Estrés oxidativo.....	10
Catalasa.....	10
ANTECEDENTES.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
Objetivos particulares.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Material biológico.....	17
Preparación del medio de cultivo de embriones.....	17
Cultivo de embriones.....	19
Técnica inmunohistoquímica.....	19
Cuantificación de la reacción.....	20
Análisis estadístico.....	20
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	35
REFERENCIAS.....	36

RESUMEN

La diabetes mellitus es un desorden metabólico ocasionado por la deficiencia de insulina o por la resistencia a la acción de la misma. La coexistencia de DM y gestación es una de las causas de aparición de factores de riesgo neonatal, malformaciones congénitas, retraso del desarrollo y muerte embrionaria o fetal. Las malformaciones causadas por la DM, pueden estar provocadas por el estrés oxidativo y el cambio en las enzimas antioxidantes. Asimismo se ha demostrado que las poliaminas espermidina y espermina revierten de manera significativa las malformaciones que ocasiona la DM; y se propone que el mecanismo por el cual actúan es previniendo el estrés oxidativo por medio de enzimas antioxidantes entre las que se encuentra la catalasa. Por esta razón se determinó la inmunopresencia de catalasa en embriones de rata de 10 días de edad gestacional, los cuales se obtuvieron de ratas sanas y se cultivaron por 24 horas en medio de cultivo normal, medio hiperglucémico, y medio hiperglucémico suplementado con espermidina o espermina. Los embriones cultivados se fijaron en paraformaldehído, se deshidrataron, aclararon, embebieron e incluyeron en paraplast plus, para ser cortados a 5 μm en un micrótomo de rotación. Los cortes se sometieron a inmunohistoquímica para catalasa y se contratiñeron con hematoxilina de Harris. Las laminillas se analizaron en el programa Image-Pro Plus para estimar la intensidad de reacción en tejido neural y cardíaco, y los resultados se analizaron mediante análisis de varianza simple. Se encontró que la catalasa se presenta en los tejidos nervioso y cardíaco, así como en los anexos extraembrionarios principalmente, y que su abundancia al parecer disminuye por efecto de la glucosa, y que se recupera por coincubación con las poliaminas espermidina y espermina.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico caracterizado principalmente por altas concentraciones de glucosa en sangre y por anormalidades del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas; ocasionado por la deficiencia de insulina o por la resistencia a la acción de la misma a nivel celular (The Expert Committee, 1997, 2003).

El efecto de este estado alterado es potenciado durante la gestación por las hormonas placentarias tales como los estrógenos, el cortisol, la progesterona, el lactógeno placentario, la hormona del crecimiento, así como la prolactina hipofisiaria, que tienen efectos antagónicos a la insulina (Buchanan y Kitzmiller, 1994; Reece y cols., 1994). Se sabe que la coexistencia de DM y gestación es una de las causas de aparición de factores de riesgo neonatal, malformaciones congénitas, retraso del desarrollo y muerte embrionaria o fetal (óbito y aborto) (Freinkel, 1980; Freinkel y cols., 1986).

DIABETES MELLITUS

La DM es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona pancreática que regula la concentración de glucosa en la sangre. La manifestación clínica más común de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento de la concentración de glucosa sanguínea); sus signos y síntomas incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces se presenta polifagia, que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2004; OMS, 2009).

De acuerdo a la etiología de la DM, se reconocen cuatro tipos principales (American Diabetes Association, 2004; The Expert Committee, 1997, 2003):

- 1.- Diabetes Mellitus 1 (DM1, antes conocida como diabetes insulino-dependiente o diabetes juvenil), en la cual el defecto aparente es la deficiencia de la secreción de

insulina, causada por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. Representa entre el 5 y 10% de los casos reportados.

2.- Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2, previamente llamada no insulino-dependiente o diabetes del adulto), al parecer en este tipo de diabetes no existe deficiencia en la producción de la hormona, sino que la respuesta de los tejidos a ella está disminuida, existe una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia y la deficiencia de insulina. Este tipo de diabetes representa entre el 90 y 95% de los casos reportados.

3.- Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), es aquella que aparece durante el embarazo de una mujer aparentemente sana, y se acompaña de síntomas característicos como resistencia o deficiencia relativa a la insulina, hiperglucemia de ayuno o intolerancia a la glucosa. Este tipo se presenta en entre el 3 y 5% de los embarazos. Aunque muchas mujeres con DMG regresan a una condición normal después del parto, se incrementa considerablemente el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 en el futuro (Mayer, 1998).

4.- Otros tipos específicos: Un cuarto grupo menor, que está formado por alteraciones diversas como endocrinopatías, alteraciones cromosómicas, trastornos del páncreas exocrino, cambios pancreáticos por acción de agentes químicos y otras anormalidades, donde, en contraste con la diabetes primaria, la enfermedad es secundaria. Estos casos representan entre el 1 y 2 % de los pacientes diabéticos.

DIABETES MELLITUS Y PREÑEZ EN MAMÍFEROS

La influencia de las alteraciones metabólicas del estado diabético sobre el desarrollo es distinta en la gestación complicada por diabetes previa que en la DMG (Metzger, 1991). Como ya se mencionó la asociación de la DM y el embarazo es una causa potente de fallas en el desarrollo intrauterino (Freinkel, 1980; Freinkel y cols., 1986).

Antes de la introducción de la insulina en la terapéutica médica, la coexistencia del embarazo y la DM, cuando ocurría, era causa frecuente de mortalidad materna, la que se redujo por el tratamiento profiláctico con insulina a partir de la década de 1920 (Freinkel, 1980), no así la morbilidad y mortalidad perinatal, las cuales se lograron reducir a valores cercanos a los de la población general hasta los últimos años, debido a un mejor manejo con dieta e insulina, previo a la concepción (Freinkel y cols., 1986; Ferris y Reece, 1994; Gabbe, 1985). Sin embargo, la incidencia de malformaciones y el retraso de desarrollo aún es de tres a cuatro veces más alto que en embarazos de mujeres no diabéticas (Buchanan y Kitzmiller, 1994; Danglot-Banck y Gómez-Gómez; 2004; Lesser y Carpenter, 1994; Reece y cols., 1994).

La causa de las malformaciones y el retraso del desarrollo aún es desconocida. Los estudios clínicos han demostrado que el riesgo de presentar malformaciones congénitas depende de la regulación del metabolismo de la glucosa en la sangre durante el primer trimestre, específicamente, durante las primeras siete semanas de embarazo (Buchanan y Kitzmiller, 1994), aunque también hay reportes que sugieren que no todas las malformaciones congénitas pueden prevenirse con un buen control glucémico, por lo cual se piensa que existen otros factores que participan en el proceso teratogénico durante el embarazo diabético, entre los cuales se podrían encontrar los cuerpos cetónicos, los triglicéridos y los aminoácidos de cadena ramificada (Buchanan y cols., 1994; Eriksson y cols., 2003; Shubert y cols., 1996).

Los diversos factores teratogénicos podrían actuar a través de diferentes mecanismos celulares y metabólicos en el tejido embrionario, entre los que se han propuesto las alteraciones intracelulares en el metabolismo del *mio*-inositol y del sorbitol; el metabolismo del ácido araquidónico y prostaglandinas; y la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) (Ericksson y cols., 2003), llamados incorrectamente radicales libres de oxígeno.

Estudios *in vitro* han demostrado que el suero diabético es teratogénico para embriones de roedores. La exposición de embriones de rata a un medio ambiente similar al

diabético provoca una mayor producción de ERO's y una disminución en la protección antioxidante; y en algunos casos de ambos. La suplementación con agentes antioxidantes exógenos disminuye la embriopatía diabética *in vivo* y la dismorfogénesis en embriones inducida por glucosa *in vitro* (Eriksson y cols., 2003).

Las malformaciones fetales han sido ampliamente demostradas en modelos animales *in vivo* (Eriksson y cols., 1996), pero debido a que la mayor parte de las malformaciones en humanos se producen en las primeras siete semanas de gestación y al hecho de que los roedores reabsorben los fetos muertos en lugar de abortarlos (Sivan y cols., 1997), el cultivo de embriones se ha convertido en el mejor modelo para estudiar el efecto de la hiperglucemia, de otros posibles teratógenos y de moléculas con papel protector probable sobre el desarrollo embrionario; así como los mecanismos por los cuales los factores teratogénicos llevan a cabo sus efectos. Las condiciones en cultivo no son iguales que las condiciones *in vivo*; en general, la incidencia de malformaciones es menor en condiciones naturales. Sin embargo, el uso de éste sistema permite estudiar aisladamente un probable factor o mecanismo, lo cual en condiciones *in vivo*, es más difícil (Ellington, 1997).

POLIAMINAS

Las poliaminas son compuestos que tienen un peso molecular bajo, una estructura simple (aminas alifáticas), y se encuentran cargadas positivamente en condiciones fisiológicas. Destacan tres poliaminas que se encuentran en los seres vivos, putrescina, espermidina y espermina (figura 1), aunque existen otras aminas (histamina, cadaverina, etc.) que han sido detectadas en varios sistemas biológicos (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Ochoa y cols., 2002).

Putrescina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Espermina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

Figura 1. Estructura molecular de las poliaminas modificado de Algranati y cols. (2006).

Aunque no se conoce exactamente el papel de las poliaminas, existe evidencia de que son necesarias para la división, crecimiento, proliferación y diferenciación celular, ya que los estímulos asociados con estos eventos inducen cambios en las concentraciones intracelulares de estas, mientras que la administración de inhibidores de la síntesis de poliaminas detiene dichos procesos (Bachrach y cols., 2001; Igarashi y Kashiwagi, 2000; Tabor y Tabor, 1984).

La vía de síntesis de poliaminas inicia con la conversión de ornitina en putrescina por acción de la enzima ornitina-descarboxilasa (ODC), la enzima reguladora de la vía metabólica. En mamíferos, la ornitina puede ser tomada del plasma sanguíneo, donde se encuentra en concentraciones micromolares, o ser formada a partir de la arginina por la enzima arginasa. La putrescina es convertida a espermidina mediante una reacción catalizada por la espermidina-sintasa, que conjuga a la diamina con la descarbo- S-adenosilmetionina. La espermidina, a su vez, por una acción similar, catalizada por la espermina-sintasa, se convierte a espermina (figura 2) (Morgan, 1999; Schipper y cols., 2000).

Se ha reportado que las poliaminas son depuradores endógenos de ERO's, por lo cual pueden proteger el DNA, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo; y son esenciales para la proliferación, la diferenciación y la función celular (Ha y cols., 1998; Kwon y cols., 2003).

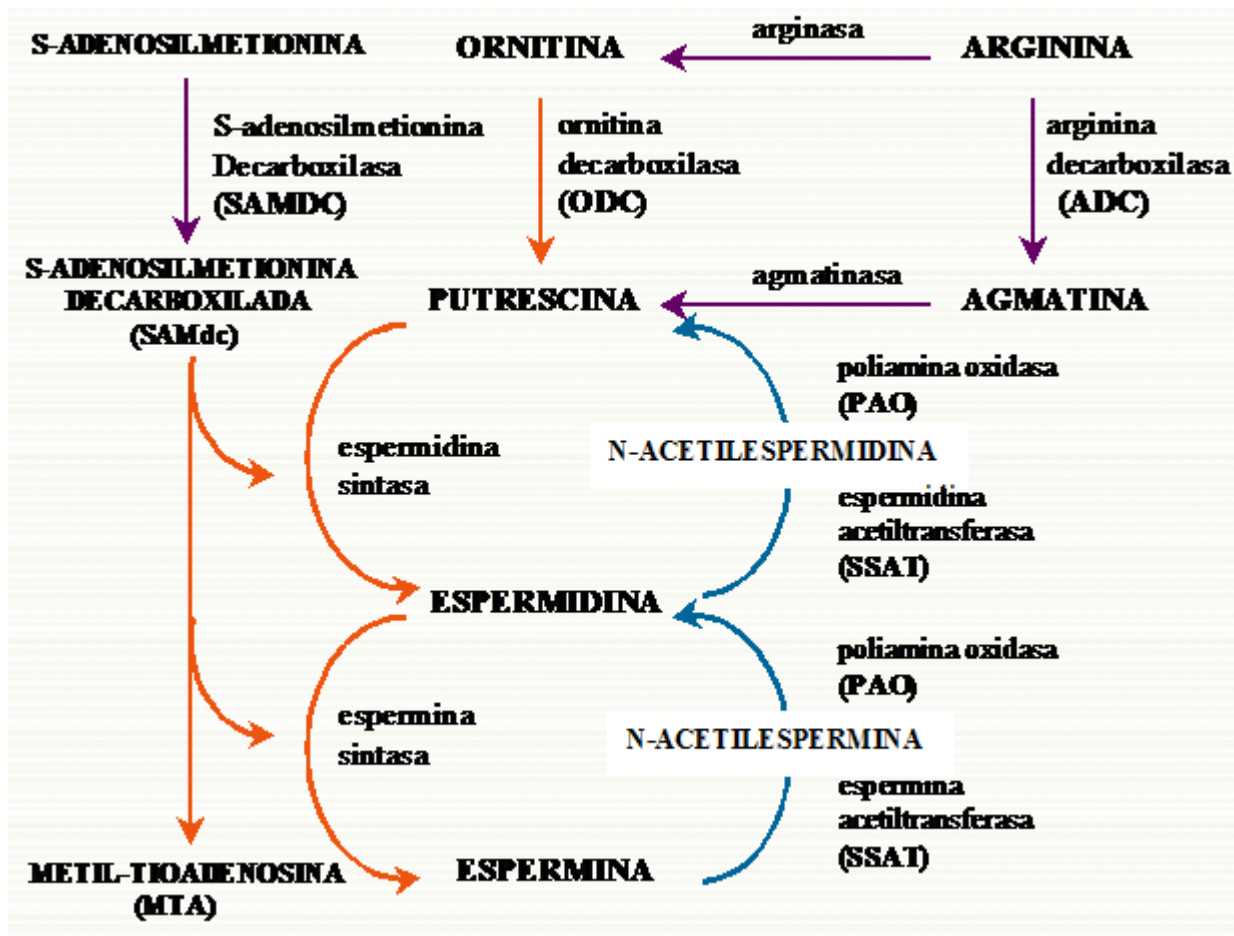


Figura 2. Metabolismo de las poliaminas; modificado de Algranati y cols. (2006).

EL OXÍGENO Y SUS ESPECIES REACTIVAS (ERO)

El 21% de nuestra atmósfera es oxígeno, este elemento fue descubierto, aislado y caracterizado independientemente por Priestley y Scheele entre 1772 y 1774. Prácticamente todo el O₂ atmosférico tiene un origen biológico: es producto de la oxidación del agua que lleva a cabo el fotosistema II de las plantas, algas y cianobacterias utilizando la energía luminosa del sol. Por otro lado, la mayoría de los organismos usan el O₂ para respirar; esto es, reducen el O₂ en agua y la energía de esta reacción la emplean para formar ATP y para transportar iones y metabolitos a través de las membranas celulares (Cascales, 1999; Hansberg, 2008).

Sin embargo el oxígeno puede ser tóxico, porque su metabolismo anormal o incompleto en las células origina formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's). La

especializadas que lo producen en grandes cantidades durante la inflamación. La toxicidad del H_2O_2 se debe en parte a que puede formar 1O_2 y OH^\cdot . El OH^\cdot se forma al reaccionar con algunos metales de transición. El OH^\cdot interacciona en el sitio donde se forma con lo que ocasiona modificaciones irreversibles en las proteínas y alteraciones en el ADN, las cuales no siempre se pueden reparar. La descomposición del H_2O_2 con el ácido hipocloroso (HOCl) o el ácido hipobromoso (HOBr) genera 1O_2 (Cascales, 1999; Hansberg, 2008).

Las ERO's se han encontrado elevadas en numerosas enfermedades, y se ha propuesto que intervienen en la teratogenicidad de la diabetes en el embarazo (Hagay y cols., 1995, Ornoy y cols., 1999). Las ERO's pueden ser perjudiciales para las principales funciones de la célula, ya que al reaccionar con los ácidos grasos insaturados en las membranas, originan peroxidación de lípidos, lo que causa disminución en la fluidez de la membrana y la formación de aldehídos reactivos, que a su vez pueden difundir a otras partes de la célula y reaccionar con macromoléculas. Los radicales de oxígeno pueden reaccionar directamente con las proteínas, dando como resultado, por ejemplo, entrecruzamiento del colágeno con el ADN, que causa daños tanto a las bases como a los azúcares (Cederberg y cols., 2000).

Hay tres tipos de resultados que indican participación del exceso de ERO's en la embriopatía diabética. Primero, la diabetes *in vivo* y la hiperglucemia *in vitro* causan un aumento de lípidos peroxidados y radicales libres en los *concepti*. Segundo, los problemas de desarrollo observados *in vivo* en ratas diabéticas preñadas y en los embriones cultivados *in vitro* a altas concentraciones de glucosa, pueden ser inducidos por la producción enzimática de iones superóxido en los sistemas de cultivo de embriones. Por último, los antioxidantes de bajo peso molecular, al ser añadidos a la dieta, disminuyen la tasa de malformaciones en el embarazo de ratas diabéticas (Cederberg y cols., 2000).

ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es una situación de desequilibrio con un aumento de oxidantes o con una disminución de antioxidantes, o ambas situaciones (Boveris y cols., 2008). El estrés oxidativo se ha relacionado con la progresión de diferentes enfermedades crónicas y con la apoptosis. Se ha demostrado que la DM es una enfermedad que cursa con estrés oxidativo, que puede causar a las células y tejidos daños profundos a través de diferentes mecanismos bioquímicos como la glicación excesiva de proteínas y la autoxidación de la glucosa; mecanismos que son desencadenados por la hiperglucemia (Ornoy y cols., 1999).

Los mecanismos de defensa antioxidante incluyen una variedad de enzimas, entre estas se encuentran la Glutación Peróxidasa (GPx), la Superóxido Dismutasa (SOD) y la Catalasa (Cat), las cuales son las principales enzimas depuradoras de ERO. Las tres difieren en la distribución subcelular y el tipo de reacción catalizada (Cederberg y cols., 2000; Ornoy y cols., 1999).

CATALASA (Cat)

Las catalasas son las enzimas que descomponen al H_2O_2 directamente en O_2 y agua. Para ello emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como oxidante. Esta reacción fue descrita por primera vez por Louis Jacques Thénard, quien en 1819, demostró que diferentes sustancias de origen animal y vegetal tenían la capacidad de transformar al agua oxigenada (H_2O_2) en agua y oxígeno. En 1901, Loew nombró como catalasa a esta “fuerza vital”, y sugirió que una enzima específica era la responsable de generarla. En 1923, Walburg demostró que dicha enzima se inhibía con cianuro, y concluyó que en su sitio activo tenía asociados átomos de hierro. Pero no fue hasta 1980 que Vainshtein y cols., obtuvieron el primer mapa de la densidad electrónica de una catalasa. En la actualidad se sabe que las catalasas son ubicuas (Cederberg y Eriksson, 1997; Peraza, 2008).

La familia de las catalasas más distribuida es la de las catalasas monofuncionales. Estas enzimas son las que exhiben la actividad de la catalasa más elevada. La mayor

parte de estas enzimas están formadas por cuatro subunidades idénticas, aunque puede haber enzimas diméricas. Cada una de las subunidades de la enzima está asociada a un grupo hemo, que en la mayor parte de los casos es el protohemo-IX (hemo-b) aunque se pueden encontrar otras formas de hemo, como el hemo-d, o una mezcla de ambos. Casi todas las catalasas tienen una masa de 50 a 65kDa (cerca de 480 aminoácidos) por subunidad (Peraza, 2008).

Los animales cuentan sólo con catalasas monofuncionales pequeñas en sus genomas. En términos generales, la expresión de la catalasa en los mamíferos es muy elevada en hígado y eritrocitos, alta en tejido adiposo y riñón, moderada en el páncreas y pulmones y baja en el suero, corazón y cerebro. La catalasa está localizada en los peroxisomas de la mayor parte de estos órganos, pero en los eritrocitos es citosólica, estas células contienen más del 98% de la catalasa de la sangre, la cual elimina el H_2O_2 extracelular y el que se genera en los tejidos con niveles bajos de catalasa. En los pulmones de fetos de rata, la actividad enzimática de la catalasa aumenta inmediatamente después del nacimiento, cuando el oxígeno es inhalado y la producción de radicales de oxígeno aumenta (Cederberg y Eriksson, 1997; Peraza, 2008).

ANTECEDENTES

Forsberg y cols. (1996) realizaron un estudio en ratas normales y diabéticas en los días 11 y 12 de gestación y evaluaron embriones de 11 días de edad gestacional, después de 48 horas de cultivo en 10 mM o 50 mM de concentración de glucosa. La diabetes materna y el cultivo en alta concentración de glucosa causaron retardo en el crecimiento y aumento en las malformaciones de los embriones, así como una tendencia a disminuir la actividad de la catalasa en embriones de día 11 de madres diabéticas comparada con los controles.

Cederberg y Eriksson (1997) compararon la actividad de la catalasa en embriones de 11 días de ratas normales y diabéticas con la relación de reabsorciones y malformaciones en el día 20 de gestación. Se usaron 2 subcepas, la H, resistente a malformaciones; y la U, propensa a malformaciones. Se detectó una diferencia en la actividad de la catalasa en embriones de las dos cepas, siendo menor en la cepa U. El riesgo de dismorfogénesis embrionaria parece aumentar sólo en la cepa con menor actividad de catalasa en los embriones.

Sivan y cols. (1997) investigaron el incremento de ERO's en embriones, como resultado de un cambio en la actividad de enzimas antioxidantes durante el embarazo complicado con diabetes materna en un modelo de ratas *in vivo*. El día 12, los fetos se examinaron por anomalías externas y el número de somitas, además se determinó la actividad de las enzimas SOD, GPx y Cat. Encontraron que el estado diabético de las madres no disminuyó la actividad de ninguna enzima antioxidante, pero si causó embriopatía. Esto indica que el mecanismo de la embriopatía no parece estar inducido por la reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes.

Ornoy y cols. (1999), estudiaron la capacidad antioxidante en embriones de rata de 10.5 días y de su saco vitelino después de cultivarlos *in vitro* por 28 h bajo condiciones que mimetizan la gestación diabética (3 mg/mL de glucosa, 2 mg/mL de β -hidroxibutirato y 10 μ g/mL de acetoacetato), comparándolos con embriones control *in vitro*. Encontraron un aumento en anomalías congénitas, disminución de crecimiento y contenido de

proteínas, así como disminución en la actividad tanto de SOD como de Cat, en los embriones incubados en el medio suplementado con glucosa, hidroxibutirato y acetoacetato, comparado con los embriones incubados en medio sin adición.

Cederberg y cols. (2000) compararon los niveles de RNAm de Cat, GPx, γ -glutamylcisteina sintetasa, glutatión reductasa y SOD (Cu/Zn-SOD y Mn-SOD) en embriones de 11 días de ratas H y U normales y diabéticas; encontrando que los niveles de RNAm de catalasa y Mn-SOD aumentaron en embriones H, resistentes a diabetes, mientras que los embriones U tienden a tener menos protección contra radicales hidroxilo cuando la madre es diabética, lo cual es opuesto a los embriones H.

Zaken y cols. (2001) estudiaron el mecanismo de defensa antioxidante en embriones cultivados bajo la influencia de antioxidantes observando una disminución en la actividad de Cu/Zn SOD y Cat en los embriones diabéticos y los sacos vitelinos, y una disminución en la concentración de antioxidantes de bajo peso molecular y de las vitaminas C y E. Después de la adición de vitamina C y E al medio de cultivo diabético, la actividad de SOD y Cat, la concentración de antioxidantes de bajo peso molecular y los niveles de vitamina C y E en los embriones y los sacos vitelinos regresaron a la normalidad.

Zangen y cols. (2002) estudiaron el papel de los mecanismos de defensa antioxidante en las anomalías inducidas por la diabetes en ratas Cohen, un modelo genético de tipo nutricional que asemeja a la diabetes mellitus tipo 2, y que se divide a su vez en dos sub-cepas, la sensible (CDs) y la resistente a la diabetes (CDr). Cuando se alimentaron a las ratas CDs y CDr con una dieta regular, había una menor tasa de embarazo y un aumento en la reabsorción embrionaria, los embriones CDs eran más pequeños que los embriones CDr; 46% estuvieron mal desarrollados y 7% presentaron defectos del tubo neural. Cuando se les alimentó con una dieta diabetógena rica en sacarosa, la tasa de embarazos se redujo, la tasa de reabsorción se incrementó considerablemente, el 47.6% de los embriones se recuperaron sin latido en el corazón, 27% mostraron defectos del tubo neural. Todos los embriones CDr eran normales cuando se

administraron los dos tipos de dietas; la actividad de la SOD y Cat no fue diferente en los embriones de ratas CDs y CDr alimentados con la dieta regular.

Gäreskog y cols. (2007) estimaron la incidencia de apoptosis en embriones de un modelo de ratas con diabetes gestacional. Expusieron los embriones a diabetes gestacional *in vivo* y a altas concentraciones de glucosa *in vitro*, y concluyeron que la exposición a medios diabéticos durante la organogénesis incrementa la apoptosis en células embriónicas y la dismorfogénesis en embriones.

Chirino-Galindo y cols. (2009) demostraron que las poliaminas espermidina y espermina revierten casi totalmente los efectos dismorfogénicos que causa la hiperglucemia sobre los embriones de rata cultivados *in vitro*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que el estrés oxidativo y el cambio en las enzimas antioxidantes pueden estar relacionados con la aparición de malformaciones del desarrollo, tanto en ratas y ratonas preñadas *in vivo* como con el uso de embriones en cultivo *in vitro* (Eriksson y Borg, 1993; Eriksson y cols., 2003; Gäreskog y cols., 2005; Ornoy y cols. 1999; Wentzel y Eriksson, 2005).

Por otra parte, Chirino-Galindo y cols. (2009) proponen que el mecanismo por el cual las poliaminas revierten los efectos dismorfogénicos causados por la hiperglucemia pudiera ser a través de la prevención del estrés oxidativo.

Por las razones anteriores, se determinó si la prevención de las malformaciones embrionarias provocadas por la glucosa, que se observan por incubación de embriones de rata en presencia de espermina o spermidina, estaba mediada por cambio en la expresión de la catalasa en los embriones en cultivo.

HIPÓTESIS

La abundancia de la catalasa embrionaria se verá afectada por la alta concentración de glucosa y por la presencia de espermidina o espermina en el medio de cultivo, debido a que el mecanismo de acción de las poliaminas para revertir los efectos dismorfogénicos causados por elevada concentración de glucosa en cultivo pudiera ser previniendo el estrés oxidativo.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la inmunorreactividad de la catalasa en embriones de rata de 10 días de edad gestacional cultivados en presencia de espermidina o espermina y una elevada concentración de glucosa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer el efecto de las poliaminas espermidina y espermina en los embriones de rata de 10 días de edad cultivados con elevadas concentraciones de glucosa.
- Determinar mediante inmunohistoquímica la presencia de catalasa en cortes histológicos, de los embriones de rata de 10 días de edad gestacional cultivados por 24 h; tomando en cuenta el tejido cardíaco y el tejido neural de cualquier posición.
- Evaluar los cambios en la inmunorreactividad de la catalasa en embriones incubados con espermidina o espermina y altas concentraciones de glucosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar, vírgenes, de 2 ½ a 3 meses de edad, con peso de 250 a 300 g, con ciclos estrales definidos, las cuales se mantuvieron en condiciones de luz, humedad y temperatura controladas (12 h luz por 12 h oscuridad; 22° C, 60% de humedad ambiental) con agua y alimentación *ad libitum* (Rodent Diet 2018S, Harlan, México). Para el apareamiento de las hembras, se colocaron toda la noche dos ratas en presencia de un macho de la misma cepa, sanas, de fertilidad comprobada y se asignó como tiempo cero la media noche anterior al día en que se detectaron espermatozoides en el lavado vaginal.

Preparación del medio de cultivo de embriones. Se utilizaron para este fin hembras pie de cría, o aquellas que después de estar tres veces consecutivas con un macho no habían sido preñadas. El procedimiento se llevó a cabo en sesiones de 10 a 15 sujetos. Las ratas donadoras se anestesiaron con éter etílico, y antes de la muerte cardíaca, se obtuvo la sangre del corazón con ayuda de una jeringa de 5 ó 10 mL, con aguja de calibre 21 x 32. La sangre se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos antes de coagular, ya que si se permite la coagulación, el crecimiento embrionario se puede deteriorar. Al suero que se obtuvo, se le denominó “inmediatamente centrifugado” (New, 1978), y se almacenó en ultracongelación a -70°C hasta el momento de la preparación del medio de cultivo.

Previo a la preparación del medio de cultivo, se descongeló el suero, y se inactivó por calentamiento a 56° C durante 30 min. El medio de cultivo control se preparó con 4.0 mL de suero inactivado, 0.5 mL de una solución concentrada de antibióticos (para dar una concentración final de penicilina 1000 UI/mL y estreptomycin 100 µg/mL), y 0.5 mL de solución salina de NaCl al 0.9%.

Para preparar medio suplementado con glucosa, se adicionó ésta hasta una concentración de 500 mg/dL (la usada por la mayoría de los autores en este campo del conocimiento). El medio control tiene una concentración de glucosa cercana a 100 mg/dL ó 1 mg/mL (Chirino, 2007), por lo que se preparó una solución de glucosa

concentrada (8.0 g/dL), al momento de uso. El medio “hiperglucémico” se preparó con 4 mL de suero, 0.5 mL de solución de antibiótico, 0.25 mL de glucosa concentrada y 0.25 mL de solución salina, dando como resultado una concentración final cercana a 5 mg/mL de glucosa (aproximadamente 1 mg de glucosa que contiene el suero de rata más 4 mg que se agregaron), lo cual es equivalente a 500 mg/dL de glucosa en suero.

Para los medios con glucosa y poliaminas (25 μ M), se agregaron 0.25 mL de solución concentrada (0.5 mM) de cada poliamina, en lugar de la solución salina. Las características de cada medio se reportan en el cuadro 1.

Cada medio preparado se filtró a través de una membrana millipore de 0.22 μ m de malla, en condiciones de esterilidad, y finalmente se volvió a almacenar a ultracongelación hasta el momento de su uso.

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE EMBRIONES (CONCENTRACIONES FINALES)				
MEDIO	SUERO DE RATA	ANTIBIOTICOS	GLUCOSA	POLIAMINA
CONTROL (CTR)	80%	Penicilina 1000 UI/mL y estreptomicina 100 μ g/mL	---	---
GLUCOSA (GLC)	80%	Penicilina 1000 UI/mL y estreptomicina 100 μ g/mL	500 mg/dL	---
GLUCOSA + ESPERMIDINA (GLC+SPD)	80%	Penicilina 1000 UI/mL y estreptomicina 100 μ g/mL	500 mg/dL	Espermidina 25 μ M
GLUCOSA + ESPERMINA (GLC + SPM)	80%	Penicilina 1000 UI/mL y estreptomicina 100 μ g/mL	500 mg/dL	Espermina 25 μ M

Cultivo de embriones. El día 10 de gestación, las ratas preñadas fueron anestesiadas con éter etílico, y antes de la muerte cardiaca, se hizo una incisión ventral (laparotomía) para obtener el útero, este se colocó en solución salina estéril, en una caja Petri a 37°C. En condiciones estériles, y con ayuda de pinzas de relojero y de tijeras curvas de oftalmología se limpió el útero de sangre y tejido graso.

Posteriormente, con ayuda de dos pinzas de relojero, se separó la decidua del útero; la cual contenía el embrión; inmediatamente después, bajo microscopio estereoscópico, se separó el embrión de la decidua y se retiró la membrana de Reichert con ayuda de agujas de chaquira, para permitir su óptimo crecimiento. Los embriones se colocaron individualmente en tubos estériles con 1.0 mL de medio de cultivo CTR, GLC, GLC+SPD, o GLC+SPM, pregasificado 3-5 minutos con una mezcla de gases (O₂/CO₂/N₂ 5/5/90), y se mantuvieron a 37°C, rotando a 30 rpm en un aparato diseñado para este fin en el Taller de Equipo para Laboratorio de Enseñanza, llamado Rotocell®, durante 24 hrs. Se incubaron por lo menos doce embriones en cada una de las condiciones.

Al término de la incubación, los embriones se obtuvieron, y enjuagaron en solución salina (NaCl 0.9%), para ser observados al microscopio estereoscópico, y con ayuda de una reglilla y un ocular micrométricos se evaluaron los cambios morfológicos.

Técnica Inmunohistoquímica. Una vez observados al microscopio, los embriones post-cultivados se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS por 24 h; se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones para posteriormente aclarar los tejidos con xilol; seguido por imbibición e inclusión en paraplast plus (Histowax, Leica Microsystems); y finalmente se cortaron en el micrótomo a 5 µm. Las secciones se extendieron sobre portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina (Sigma Chemical Co.), para adherir el tejido al vidrio.

Se realizó la técnica inmunohistoquímica para detectar la expresión de la catalasa de la siguiente manera: las laminillas se desparafinaron con xilol, se trataron con metanol

suplementado con H₂O₂ 0.3% durante 30 min, se rehidrataron con alcohol etílico a diferentes concentraciones. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4° C, seguido por incubación con el anticuerpo secundario, se incubaron con el complejo avidina-biotina peroxidasa durante 1 h; 3,3'-Diaminobencidina (DAB) fue usada como cromógeno. El anticuerpo primario utilizado fue el antiCat-505 1:250 anti-humano monoclonal de ratón (Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri), y el secundario, el IgG 1:200 anti-ratón de cabra con biotina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California).

Con el fin de comprobar que la reacción observada se debía a la catalasa y no a las peroxidases endógenas inespecíficas, se realizaron dos controles negativos, en uno se agregó DAB a las muestras después de tratarlas con metanol adicionado con H₂O₂ 0.3%; y en el segundo se omitió el anticuerpo primario. Por último las laminillas se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron de nuevo con alcoholes a diferentes concentraciones, se transfirieron a xilol y se montaron con medio de montaje para inmunohistoquímica (Palomar-Morales y cols., 2010).

Cuantificación de la reacción. Un día después se observaron las laminillas al microscopio, se tomaron fotos, y se cuantificó la cantidad de gránulos inmunorreactivos por área de medición y la diferencia de color en las imágenes obtenidas (Palomar-Morales y cols., 2010) con el programa Image Pro Plus 6.0, con el fin de convertir la intensidad del color café a un valor numérico entre 0 (blanco) y 255 (negro). Se analizaron los campos visuales con tejido cefálico o cardíaco. De cada embrión se obtuvo un solo valor, promedio de estas determinaciones. A su vez estos promedios fueron colectados.

Análisis Estadístico. Los resultados obtenidos se evaluaron mediante ANOVA simple seguido por prueba de Tukey cuando fue necesario, en el paquete estadístico Sigma Stat 3.0.

RESULTADOS

Se cultivaron por lo menos 12 embriones bajo cada una de las cuatro condiciones establecidas en la metodología; sin embargo, durante el proceso de deshidratación algunos se perdieron, y durante el proceso de corte, de otros no se obtuvieron secciones adecuadas para poder realizar la técnica inmunohistoquímica, por lo cual se describen los resultados obtenidos en ésta para 8 determinaciones en el caso de los embriones incubados en condiciones control o en glucosa más espermina, y 9 en el caso de los embriones incubados en glucosa o glucosa más espermidina.

La morfología de los embriones de rata de diez días de edad gestacional cultivados por 24 h fue diferente en los cuatro grupos estudiados (figura 4). Los embriones cultivados en el medio control presentan la morfología normal de la especie. Por otro lado los embriones cultivados en una concentración elevada de glucosa presentan una alteración del desarrollo al grado que la morfología es anormal; mientras que los embriones cultivados en una elevada concentración de glucosa y suplementados con espermidina o espermina presentan una reversión de la alteración en el desarrollo y su morfología es similar a la mostrada por los embriones cultivados en medio control. El análisis morfométrico demostró que hay un retraso del crecimiento y un efecto profundo sobre el desarrollo (figura 4). Tanto la longitud céfalocaudal, el número de somitas, el diámetro del saco vitelino, y la longitud de la cabeza, indicadores de crecimiento, son menores estadísticamente en embriones cultivados en medio con glucosa a una concentración de 500 mg/dL (cuadro 2); la adición de espermidina o espermina restaura los valores morfométricos a los normales.

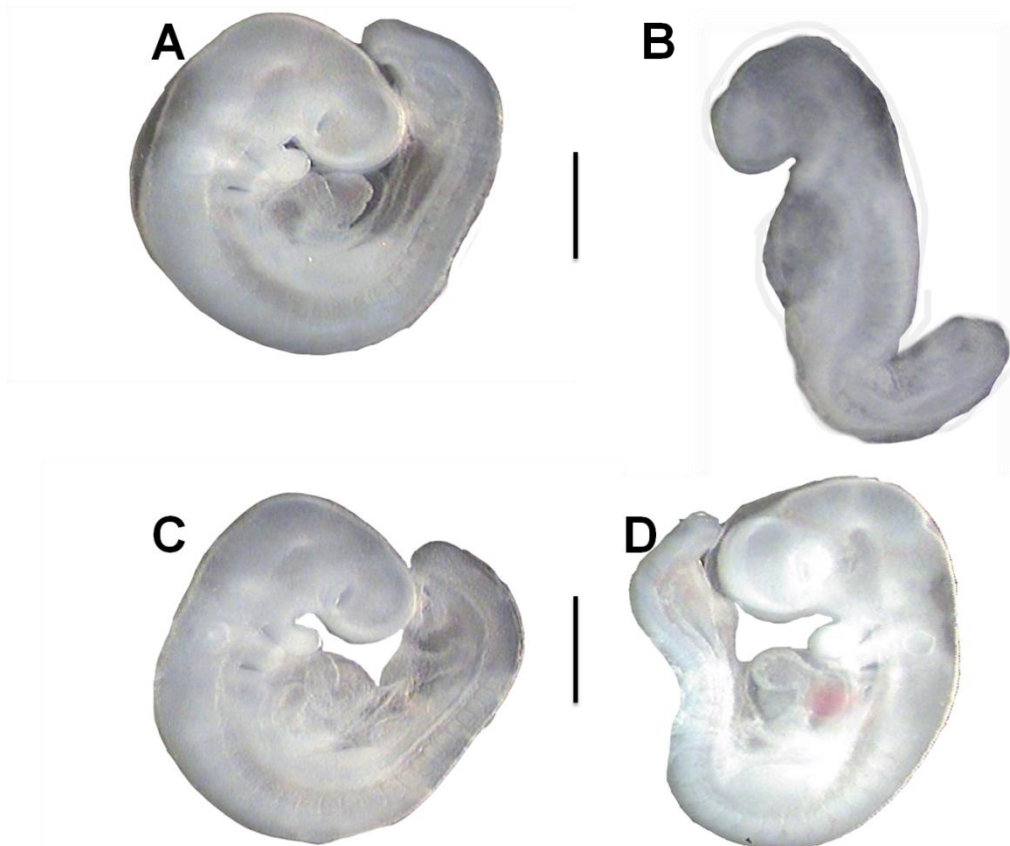


Figura 4. Comparación directa entre un embrión representativo, de cada incubación. A: embrión cultivado en medio control; B: embrión cultivado en presencia de glucosa 500 mg/dL; C: embrión cultivado en presencia de glucosa 500 mg/dL y espermina 25 μ M; D: embrión cultivado en presencia de glucosa 500 mg/dL y espermidina 25 μ M. La barra entre los embriones A y B; C y D representa 1 mm.

CUADRO 2. Efecto de la glucosa y las poliaminas sobre el crecimiento de los embriones de rata de diez días de edad gestacional, cultivados por 24 horas.

	LONGITUD CEFALOCAUDAL (mm)	NUMERO DE SOMITAS	DIAMETRO DE SACO VITELINO (mm)	LONGITUD DE LA CABEZA (mm)
CTR	3.58 ± 0.09	25.80 ± 0.89	4.55 ± 0.09	1.83 ± 0.05
GLC	2.23 ± 0.07 ^a	18.57 ± 0.51 ^a	3.15 ± 0.051 ^a	1.14 ± 0.05 ^a
GLC+SPD	3.71 ± 0.07	28.00 ± 0.65	4.70 ± 0.07	1.94 ± 0.05
GLC+SPM	3.77 ± 0.05	28.71 ± 0.46	4.77 ± 0.05	1.97 ± 0.05
^a P < 0.05 con respecto al control				

En los cortes embrionarios (figuras 5, 6, 7 y 8) se puede observar la manifestación del color café, el cual es determinado por la presencia de la Catalasa. Independientemente de la incubación a la que se someten los embriones, la catalasa se localiza en el tubo neural, tejido cardíaco, y en los tejidos extraembrionarios principalmente (figuras 5, 6, 7 y 8).

Tanto la intensidad del color café, (figura 9) como la cantidad de gránulos inmunorreactivos por área de medición (píxeles) (figura 10), determinados con el programa Image Pro Plus 6.0 están relacionados de manera directa con la cantidad de Catalasa. No se observa diferencia en la intensidad del color, ni en la cantidad de gránulos inmunorreactivos por área de medición (píxeles). Sin embargo, por observación directa (semicuantitativa) se observa que hay una reacción disminuida en los embriones incubados en presencia de glucosa sin suplemento con poliaminas, con respecto a los controles; mientras que los embriones incubados en presencia de poliaminas muestran una reacción similar a la de los embriones control; esto se puede observar contrastando las figuras 5, 6, 7 y 8 entre sí; sin embargo, no se puede reportar que la glucosa reduzca la inmunorreactividad, pues estos resultados son subjetivos y no son correlativos con los resultados obtenidos con Image Pro Plus.

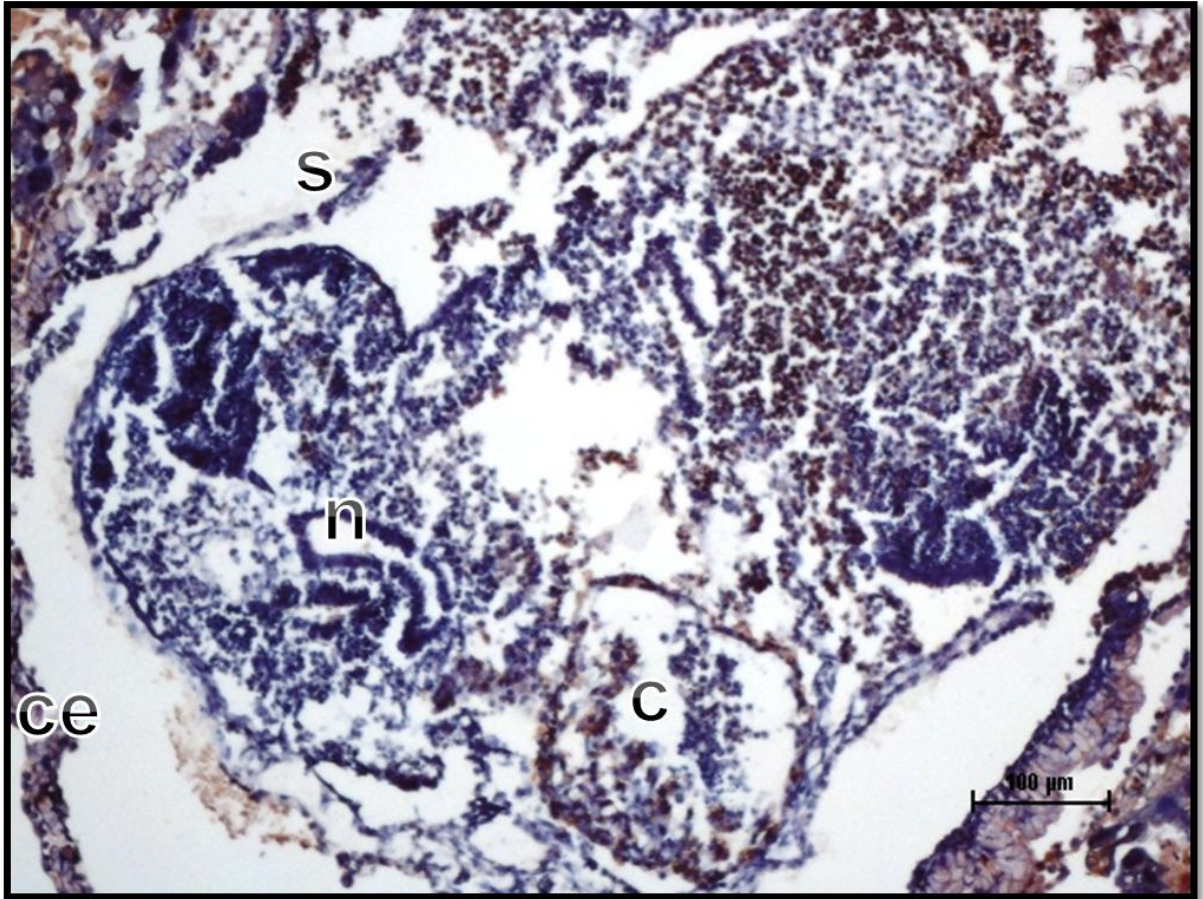


Figura 5. Corte transversal de embrión de 10 días, cultivado en medio control; **n**, tubo neural, que está cerrado; **c**, tejido cardíaco; **ce**, cono ectoplacentario; **s**, saco vitelino. Contratinción con H, barra de 100 μm .

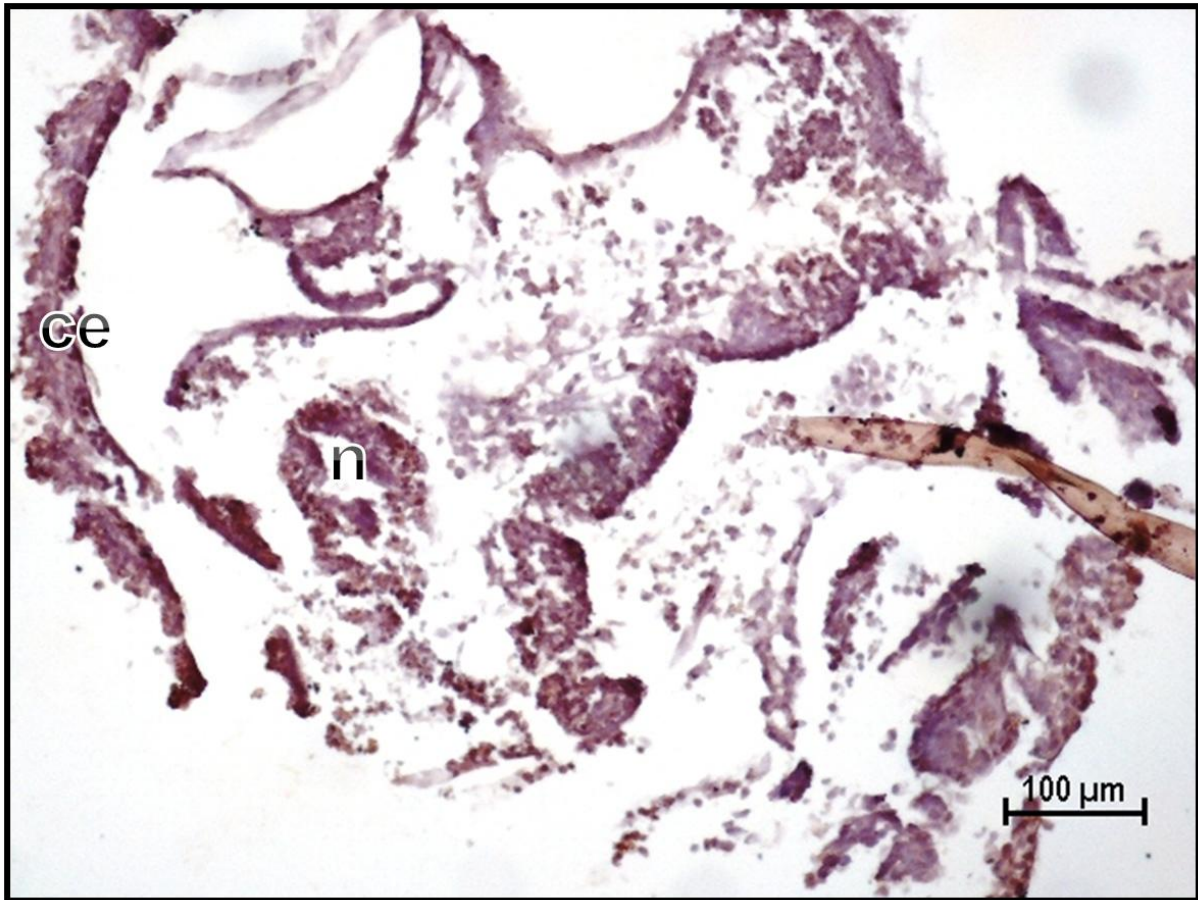


Figura 6. Corte transversal de embrión de 10 días, cultivado en presencia de glucosa ca. 500 mg/dL. La estructura embrionaria está alterada, hay dispersión de tejidos debido a la alta concentración de glucosa; **n**, tubo neural, el cual no está cerrado; **ce**, cono ectoplacentario. Contratinción con H, barra de 100 μm .

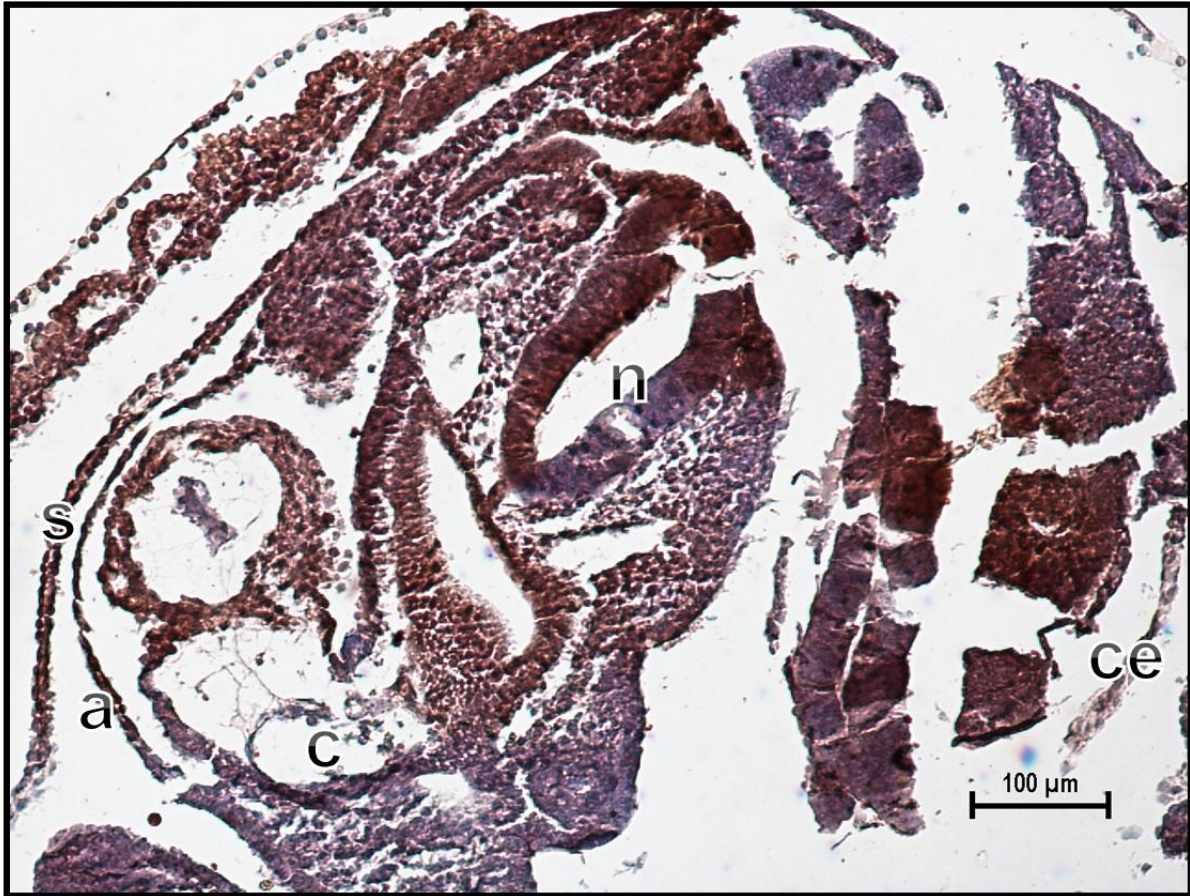


Figura 7. Corte transversal de embrión de 10 días, cultivado en presencia de glucosa ca. 500 mg/dL y suplementado con espermidina; **n**, tubo neural, que está cerrado; **c**, tejido cardíaco; **ce**, cono ectoplacentario; **s**, saco vitelino; **a**, amnios. Contratinción con H, barra de 100 µm.

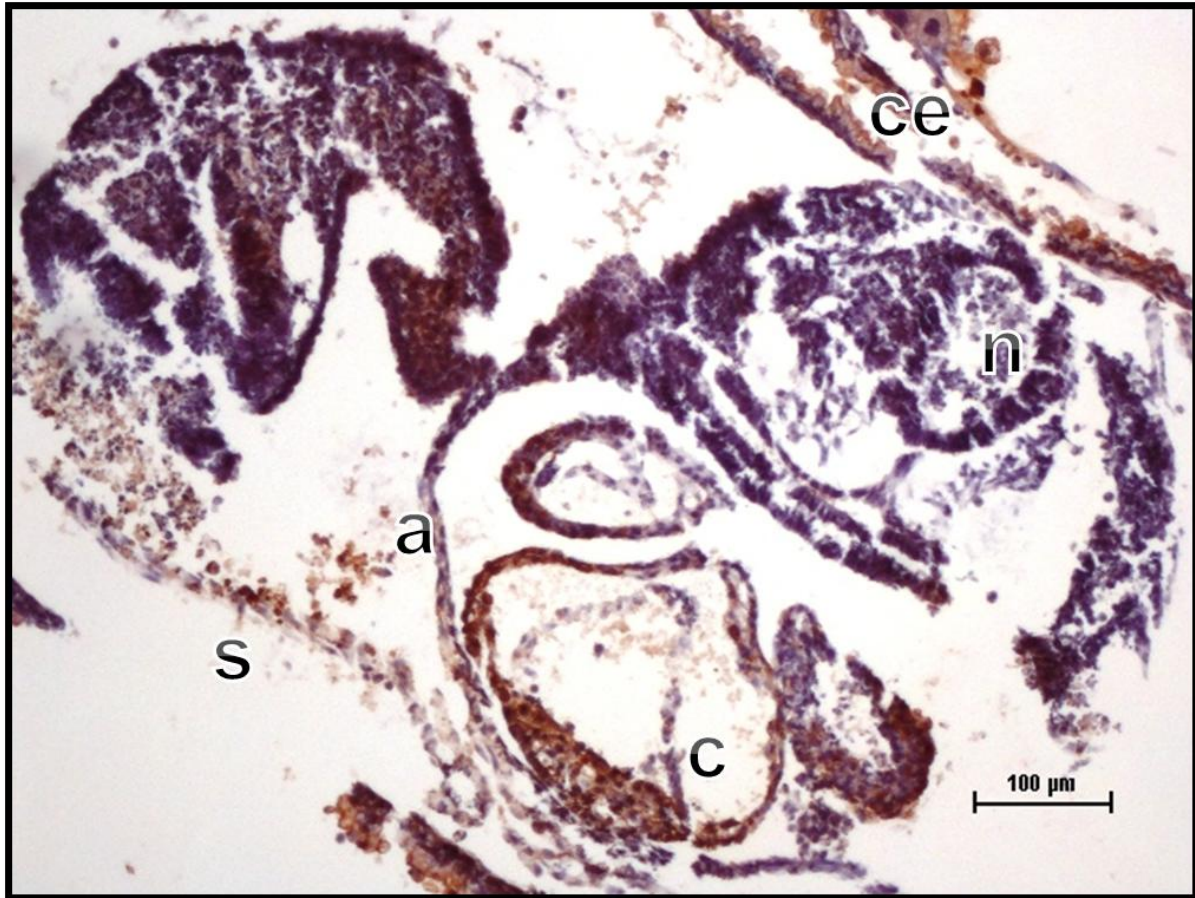


Figura 8. Corte transversal de embrión de 10 días, cultivado en presencia de glucosa ca. 500 mg/dl y suplementado con espermina; **n**, tubo neural, que está cerrado; **c**, tejido cardíaco; **ce**, son el cono ectoplacentario; **s**, saco vitelino; **a**, amnios. Contratación con H, barra de 100 µm.

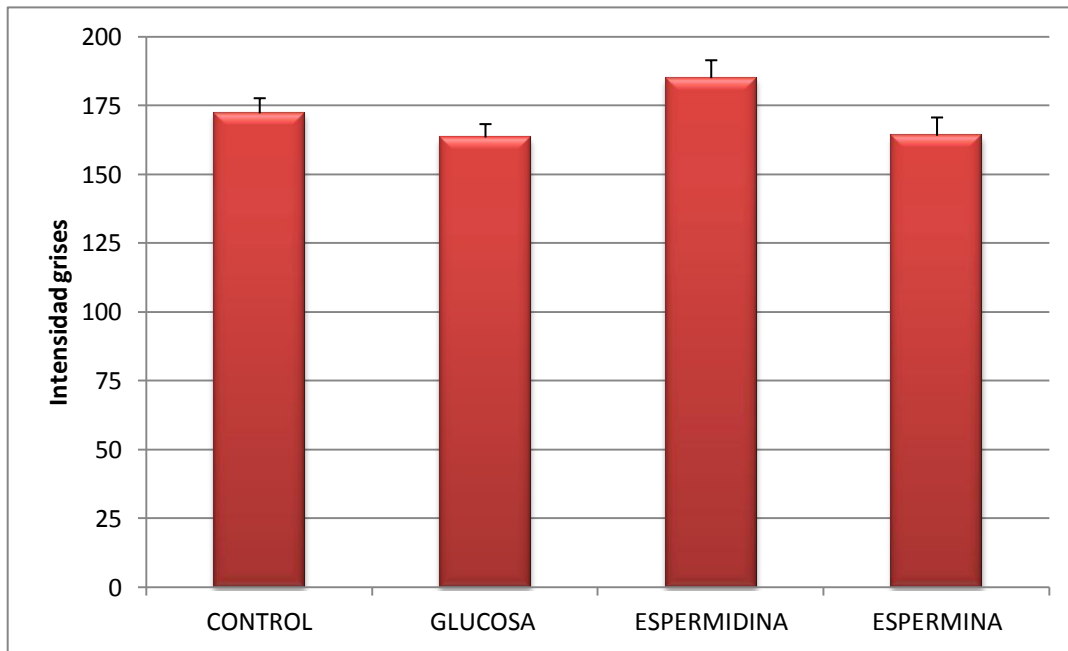


Figura 9. Intensidad del color café determinada con Image Pro Plus 6.0 en una escala de 0 a 255 (0 es blanco y 255 negro). Promedio \pm EEM. de 8 o 9 determinaciones. No hay diferencia estadística.

I

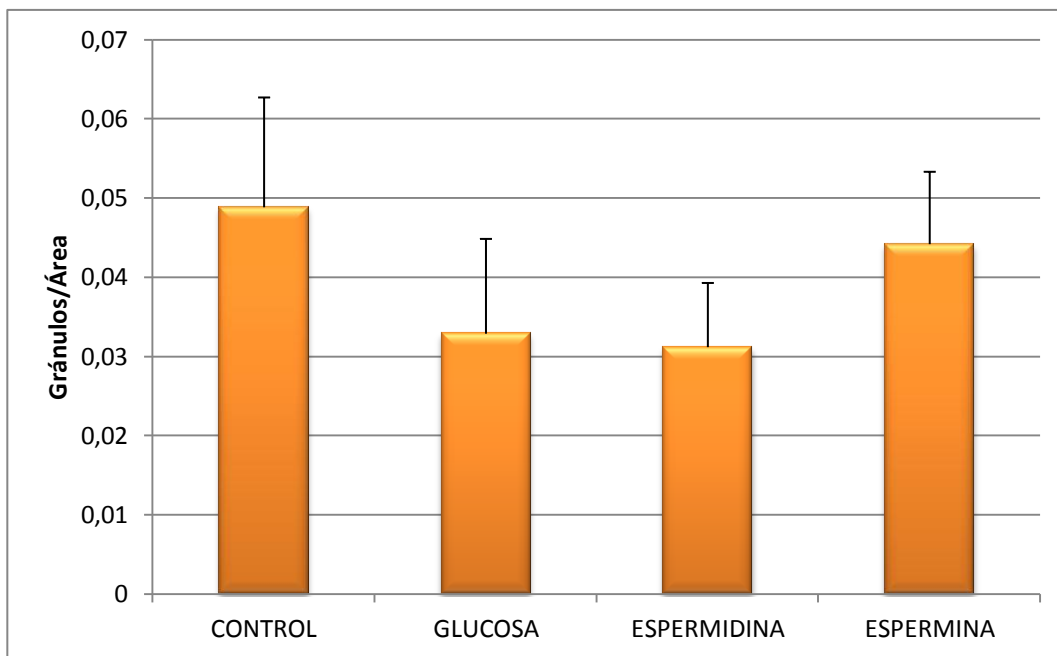


Figura 10. Número de gránulos inmunoreactivos por píxeles; determinados con Image Pro Plus 6.0. Promedio \pm EEM: No hay diferencia estadística entre grupos.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que el estrés oxidativo y el cambio en la actividad o expresión de las enzimas antioxidantes pueden estar relacionados con la aparición de malformaciones del desarrollo, tanto en ratas y ratonas preñadas *in vivo* como con el uso de embriones en cultivo *in vitro* (Eriksson y Borg, 1993; Eriksson y cols., 2003; Gäreskog y cols., 2005; Ornoy y cols. 1999; Wentzel y Eriksson, 2005). Recientemente se demostró que las poliaminas espermidina y espermina revierten casi totalmente los efectos dismorfogénicos que causa la hiperglucemia sobre los embriones de rata (Chirino-Galindo y cols., 2009). Sin embargo, no se sabe el mecanismo por el cual las poliaminas manifiestan estos efectos, aunque se propone que pudiera ser mediado por prevención del estrés oxidativo. Por esta razón, se planteó medir la presencia de catalasa en embriones de rata cultivados en presencia de espermina o espermidina, por medio de inmunohistoquímica.

El cultivo de embriones aporta evidencia sustancial acerca de los mecanismos mediante los cuales los factores teratogénicos ejercen sus efectos nocivos sobre la progenie; pero también es un acercamiento muy utilizado para poder estudiar el posible efecto protector de sustancias o moléculas antiteratogénicas sobre la DM (hiperglucemia) o sobre otros factores teratogénicos (Chirino, 2007; Ellington, 1997)

Los embriones cultivados en medio control presentaron un crecimiento normal con longitud cefalocaudal, longitud de cabeza, diámetro de saco vitelino y número de somitas similares a los reportados para embriones normales de 10 días de edad gestacional cultivados por 24 h (Chirino-Galindo y cols., 2009).

La morfología anormal presentada por los embriones cultivados en medio suplementado con glucosa, está sustentada con la evidencia que señala que la DM 1 mal controlada, la hiperglucemia experimental, o la incubación de embriones en medio con elevada glucosa, produce en la progenie alteración del crecimiento (productos con bajo peso al nacer o fetos menos desarrollados) y del desarrollo (malformaciones en

neonatos o en fetos; dismorfogénesis en cultivo) (Eriksson y cols., 2003; Forsberg y cols. 1996; Ornoy y cols. 1999).

Una concentración elevada de glucosa causa exceso en la producción de radicales libres y estrés oxidativo en distintos tipos de células (Allen y cols., 2005). La generación de superóxido por el aumento de la concentración de glucosa se origina en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. La elevada concentración de glucosa causa una interrupción en el complejo III, provocando que la coenzima Q reduzca el O₂ a superóxido (Brownlee, 2001). Otros mecanismos de generación de especies reactivas son la autooxidación de glucosa, la vía de polioles y la glicación de proteínas (Baynes, 1991; Ceriello y cols., 2000; Ornoy y cols., 1999).

La relación de las ERO's con las malformaciones producidas por la diabetes fue sugerida por primera vez por Eriksson (1991) quien encontró que la adición de SOD a medio de cultivo diabético, redujo la cantidad de malformaciones en embriones de 10.5 días. Así mismo se ha demostrado tanto en embriones de rata en cultivo como *in vivo*, que la adición de antioxidantes, de las vitaminas C y E y del ácido fólico reducen la cantidad de malformaciones producidas por una elevada concentración de glucosa en cultivo y por diabetes en ratas gestantes (Cederberg y cols., 2001; Cederberg y Eriksson, 2005; Eriksson y Borg, 1993; Gäreskog y cols., 2005; Wentzel y Eriksson, 2005; Zaken y cols., 2001).

Por otra parte se ha encontrado que en embriones cultivados con una concentración elevada de glucosa existe una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes, como SOD y Cat; y de antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA por sus siglas en inglés) (Cederberg y Eriksson, 1997; Cederberg y cols., 2000; Forsberg y cols., 1996; Ornoy y cols., 1999; Sivan y cols., 1997; Zaken y cols., 2001;). Sin embargo otros estudios reportan que la DM *in vivo* o la hiperglicemia *in vitro* aumentan la producción de ERO's en embriones, sin cambiar la actividad o expresión de enzimas antioxidantes (Sivan y cols., 1997; Trocino y cols., 1995; Yang y cols., 1997).

Nuestro grupo de trabajo recientemente trató de determinar si durante la embriopatía diabética y la embrioprotección por poliaminas se afectaba la actividad de Cat, sin embargo, ésta no pudo ser detectada por ninguno de los tres métodos utilizados (Aebi, 1983; Thurman et al., 1972; y estuche comercial CAT100, de Sigma Chemical Co)., en 10 embriones de rata cultivados en medio normal, hiperglucémico o en medio hiperglucémico suplementado con espermidina o espermina por 24 h (Chirino-Galindo y cols., enviado). Aunque otros autores han encontrado actividad similar a la de catalasa, y una disminución de la misma en embriones de 10.5 de edad de rata o ratón cultivados por 28 h en medio hiperglicémico-hipercetonémico (Cederberg y cols., 2000; El-Bassiouni y cols., 2005; Sivan y cols., 1997; Ornoy y cols., 1999; Zaken y cols, 2001).

Una posible explicación para la discrepancia en resultados entre estos autores puede ser la diferencia en la presión de oxígeno en el medio; ya que los trabajos en los que se encuentra actividad de catalasa y un cambio en la misma (Ornoy y cols., 1999; Zaken y cols, 2001) cultivaron a los embriones en un medio con una atmósfera hiperbárica (20% O₂/5% CO₂/75% N₂ por 24 h y 40% O₂/5% CO₂/55% N₂ por 4 h) mientras que en este estudio se usó un medio, que en comparación con los usados por los otros autores, tiene una presión de oxígeno muy baja (se usó una mezcla de gases de 5% O₂/5% CO₂/90% N₂ por 24 h) (Chirino-Galindo y cols., enviado). Además, debe tenerse en cuenta que existen diferencias profundas entre ratas y ratones, así como diferencias entre cepas o razas de la misma especie (Zangen et al, 2006)

Debido a que no se encontró actividad de Cat en embriones de 10 días de edad cultivados bajo las condiciones usadas en este estudio y a que se ha encontrado inmunorreactividad a esta proteína, únicamente en la región cefálica *in vivo* en embriones de 10.5 días de edad gestacional, pero no se ha encontrado en otros tejidos en desarrollo (Nardacci y cols., 2004) se buscó Cat en embriones de rata *in vitro* por métodos inmunohistoquímicos; encontrando una tendencia a disminuir la cantidad de catalasa en embriones cultivados en medio glucosado, sin embargo no hubo diferencia significativa entre estos y los cultivados en medio control. Esto puede deberse a que cuando un órgano se encuentra bajo estrés oxidativo, la actividad de las enzimas

antioxidantes aumenta. Sin embargo, al continuar el estrés oxidativo, se va reduciendo la actividad enzimática (Ornoy, 2007). Por lo que podemos asumir que la cantidad de Cat en los embriones cultivados en medio glucosado está en descenso y que el tiempo de exposición al estrés oxidativo causado por la elevada concentración de glucosa fue suficiente para que los embriones presentaran malformaciones, más no para que la cantidad de Cat fuera menor que en los embriones cultivados en medio control. Esto es apoyado por estudios recientes que demuestran que los niveles relativamente bajos de catalasa endógena que se encuentran en embriones y fetos de ratones (5% de los niveles que se encuentran en adultos, 800 U/mg de proteína en adultos), protegen de manera importante contra el estrés oxidativo fisiológico y el causado por sustancias exógenas, sin embargo pueden ser insuficientes para proteger de algunos efectos en el desarrollo causados por ERO's, particularmente a dosis elevadas (Abramov y Wells, 2011a, 2011b; Miller y Wells, 2011).

Los embriones cultivados en medio glucosado y suplementado con espermidina o espermina tampoco presentaron diferencia en la cantidad de catalasa, con respecto al control, sin embargo se observa un efecto embrioprotector del daño que causa la glucosa en concentraciones elevadas (500 mg/dL); tal como lo señalan Chirino-Galindo y cols., (2009) y Méndez y Palomar-Morales (1999) el orden de este efecto es espermina > espermidina; es decir, a mayor longitud de la poliamina o a mayor número de grupos amino cargados positivamente, el efecto es mayor.

Lo anterior sugiere que la vía de acción de las poliaminas no está relacionada con la cantidad de catalasa, lo que nos podría indicar que los efectos embrioprotectores de las poliaminas, se deben a sus propiedades antioxidantes (Das y Misra, 2004; Ha y cols., 1998), esto se apoya por el orden de acción: mayor para espermina que para espermidina: a más número de grupos amino, mayor capacidad depuradora de radicales libres (Chirino-Galindo y cols., 2009).

Las poliaminas son depuradores endógenos de ERO's, por lo cual pueden proteger al DNA, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo. Existe evidencia experimental de que las poliaminas se unen y estabilizan macromoléculas, tales como ácidos nucleicos

y proteínas. La interacción de las poliaminas con los ácidos nucleicos, mediada por interacciones electrostáticas entre los grupos amino cargados positivamente de las poliaminas y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos es importante para estabilizar las estructuras de la cromatina, el tRNA, el rRNA, y procurar una buena función celular. Se sabe que el efecto de la espermina sobre la estabilización molecular es mayor que el de la espermidina y la espermidina puede reemplazar el rol protector de la espermina, sólo cuando se presenta a una concentración molar mayor (Bachrach, 2005; Das y Misra, 2004; Ha y cols., 1998; Rider y cols., 2007).

En roedores, el metabolismo de poliaminas es importante para el desarrollo embrionario. La enzima L-ornitina descarboxilasa (ODC) es esencial para el crecimiento y desarrollo de tejido embrionario, debido a su rol en el metabolismo de poliaminas (O'toole y cols., 1989). La actividad de la ODC aumenta dramáticamente en embriones de rata el día 10.5 de desarrollo embrionario intrauterino (Huber y Brown, 1982), en el cual no existe crecimiento tisular rápido o proliferación celular elevada, pero que corresponde con la neurulación. En embriones de rata *in vivo*, durante la etapa de neurulación/organogénesis, las actividades de ODC y la S-adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC) muestran un importante incremento, al igual que las concentraciones de las poliaminas; las cuales se reducen al comenzar la etapa de crecimiento fetal (Russell y McVicker, 1972). Asimismo se ha reportado que la inhibición de la ODC placentaria en roedores, produce retraso del desarrollo (Ishida y cols., 2002) y la inhibición de la actividad de ODC durante la organogénesis causa una disminución del mismo (O'Toole y cols., 1989).

Por otra parte, durante la organogénesis y la neurulación, en embriones de ratas diabéticas gestantes, se reportó que la actividad de ODC y las concentraciones de poliaminas disminuyen drásticamente en comparación con las encontradas en embriones de gestación no diabética. Estos hallazgos apoyan la idea de que las poliaminas son importantes durante las fases de organogénesis y neurulación en mamíferos y sugieren que el metabolismo de poliaminas está involucrado en la

dismorfogénesis provocada por una concentración elevada de glucosa, debido a que la degradación de poliaminas genera ERO's (Bengtsson y cols., 1994)

Por último, uno de los mecanismos propuestos para explicar la elevada frecuencia de malformaciones y pérdida de gestación provocadas por la DM, pudiera ser la inducción de apoptosis o muerte celular programada en los embriones de embarazo diabético por la hiperglucemia (Moley, 2001).

Recientemente, se encontró que en embriones de ratas diabéticas existe disminución de la expresión de los factores antiapoptóticos *Pax3* y *Akt*, y activación de la expresión del factor proapoptótico *Bax* y de la enzima caspasa-3 (Reece y cols., 2005). Otros autores encontraron disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica *Bcl-2* y aumento de la expresión de las proteínas proapoptóticas *Bax* y caspasa-3, además de un incremento de p53 en embriones de ratas diabéticas *in vivo* y en embriones cultivados en presencia de glucosa elevada (Gäreskog y cols., 2007). El factor antiapoptótico *Pax3* se expresa en el tubo neural, en la cresta neural y el mesodermo y se ha sugerido que la inhibición de su expresión en embriones de ratas diabéticas está mediado por la producción de ERO's (Chappel y cols., 2009). La alteración de la mitocondria por la hiperglucemia conlleva a una fuga de proteínas involucradas en la apoptosis, como *Bcl-2*, *Bax* y Citocromo C, este último está relacionado con la activación de la caspasa 3 (Gäreskog y cols., 2007). Se ha postulado que las poliaminas pudieran inhibir o reducir la apoptosis en diversos sistemas, por unión a macromoléculas por enlaces iónicos, formación de enlaces covalentes por acción enzimática, o por depuración de ERO's (Seiler y Raul, 2005).

CONCLUSIONES:

1. Las poliaminas espermidina y espermina revierten los daños morfológicos causados por una concentración elevada de glucosa en embriones de rata de diez días de edad en cultivo.
2. La catalasa se presenta en el tejido nervioso, cardíaco y tejidos extraembrionarios principalmente.
3. La catalasa tiende a disminuir de manera no cuantitativa con una concentración elevada de glucosa, y la adición de las poliaminas espermidina y espermina, aparentemente revierte este efecto.

REFERENCIAS

Abramov, J.P.; Wells, P.G. (2011a). Embryonic catalase protects against endogenous and phenytoin-enhanced DNA oxidation and embryopathies in acatalasemic and human-catalase expressing mice. *FASEB J.* 25: 2188-2200.

Abramov, J.P.; Wells, P.G. (2011b). Embryoprotective role of endogenous catalase in acatalasemic and human catalase-expressing mouse embryos exposed in culture to developmental and phenytoin-enhanced oxidative stress. *Toxicol. Sci.* 120: 428-438.

Aebi HE. 1983. Oxidoreductases acting on groups other than CHOH. 3.9 Catalase: hydrogen-peroxidase: hydrogen-peroxidase oxidoreductase E. C. 1. 11. 1. 6. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim: Verlag Chemie. Vol. III: 273-286.

Algranati, I.D.; Serra, M.P.; Carrillo, C.; González, N.S. (2006). Biología molecular de metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina descarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*. *Revista Química Viva* 5(2): <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/algranati.html>.

Allen, D.A.; Yaqoob, M.M.; Harwood, S.M. (2005). Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr. Biochem.* 6:705-713.

American Diabetes Association. (2004). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 27 (Suppl 1): S5-S10.

Bachrach, U.; Wang, Y.C.; Tabib, A. (2001). Polyamines: New cues in cellular signal transduction. *News Physiol. Sci.* 16: 106-109.

Bachrach, U. (2005). Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 6: 559-566.

Baynes, J.W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412.

Bengtsson, K.-O.; Wiberg, K.; Eriksson, U.J. (1994). Ornithine decarboxylase activity and concentrations of polyamines in embryos of diabetic rats. *Biol. Neonate* 66: 230-237.

Boveris, A.; Repetto, M.G.; Boveris, A.D.; Valdéz, L.B. (2008). Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas: radicales libres y estrés oxidativo aplicaciones medicas. Editor: Konigsberg, F.M. Ed. *El Manual Moderno*. Mexico. pp. 319-328.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820.

Buchanan, T.A.; Kitzmiller, J.L. (1994). Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annu. Rev. Med.* 45: 245-260.

Cascales, A. M. (1999). *Estres oxidativo envejecimiento y enfermedad*. Ed. Instituto de España. Madrid, España. pp. 10, 15, 23, 52, 53.

Cederberg, J.; Eriksson, J.U. (1997). Decreased catalase activity in malformation-prone embryos of diabetic rats. *Teratology* 56: 350-357.

Cederberg, J.; Galli, J.; Holger, L.; Eriksson, U. (2000). Increased mRNA levels of Mn-SOD and catalase in embryos of diabetic rats from a malformation-resistant strain. *Diabetes* 49: 101-107.

Cederberg, J.; Simán, C.M.; Eriksson, U.J. (2001). Combined treatment with Vitamin E and Vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Ped. Res.* 49: 755-762.

Cederberg, J.; Eriksson, J.U. (2005). Antioxidative treatment of pregnant diabetic rats diminishes embryonic dysmorphogenesis. *Birth Def. Res. (Part A)* 73: 498-505.

Ceriello, A.; Morocutti, A.; Mercuri, F.; Quagliaro, L.; Moro, M.; Damante, G.; Viberte, G.C. (2000). Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 49: 2170-2177.

Chappel, J.H.; Wang, X.D.; Loeken, M.R. (2009). Diabetes and apoptosis: neural crest cells and neural tube. *Apoptosis* 14: 1472-1483

Chirino, G.G. (2007). Efecto de las poliaminas sobre el crecimiento de embriones de rata cultivados in Vitro, en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. Tesis de Licenciatura en biología. FES Iztacala, UNAM. 70 p.

Chirino-Galindo, G.; Baiza-Gutman, L. A.; Barrera-Escorcía, E.; Palomar-Morales, M. (2009). Polyamines protect rat embryo in vitro from high glucose-induced developmental delay and dysmorphogenesis. *Birth Def. Res. (Part B)* 86: 58-64.

Chirino-Galindo, G.; Hurtado-Monzón, A.M.; Mejía-Zepeda, R.; Palomar-Morales, M. (2012). Change in lipoperoxidation and scavenging enzymes presence but not activity during polyamine embryoprotection in rat embryo cultured in hyperglycemic media. *Birth Def. Res (Part B)*: (enviado).

Danglot-Banck, C.; Gómez-Gómez, M. (2004). Los hijos de madres diabéticas. *Rev. Mex. Ped.* 71: 248-257.

Das, K.C; Misra, H.P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Mol. Cell. Biochem.* 262: 127-133.

El-Bassiouni, E.A.; Helmy, M.H.; Rawash, N.A.; El-Zoghby, S.M.; Kamel, M.A.E.; Rayah, A.N.A. (2005). Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of oxidative stress and antioxidant defense. *Br. J. Biomed. Sci.* 62: 71-76.

Ellington, S. K. L. (1997). Effects of excess glucose on mammalian post-implantation embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 299-306.

Eriksson, U.J. (1991). Diabetes in pregnancy: effects on post implantation embryos. *Isr. J. Med. Sci.* 27: 478-486.

Eriksson, U.J.; Borg, L. (1993). Diabetes and embryonic malformations. role of sustrare-induce free oxigen radical production for dymorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* 42: 422-419.

Eriksson U.J.; Naeser P.; Brolin E. (1996). Increased accumulation of sorbitol in offspring of manifest diabetic rats. *Diabetes* 35: 1356-1363.

Eriksson, U.J.; Cederberg, J.; Wentzel, P. (2003). Congenital malformations in offspring of diabetic mothers: animal and human studies. *Rev. Endocr. Metab. Dis.* 4: 79-93.

Ferris, A.M.; Reece, E.A. (1994). Nutritional consequences of chronic maternal conditions during pregnancy and lactation: lupus and diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 59 (Suppl): 465S-473S.

Forsberg, H. Borg, L.A.;Eriksson, U.J. (1996). Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. *Free Radic. Res.* 24 (6): 451-459.

Freinkel, N. (1980). The Banting lecture: of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29: 1023-1035.

Freinkel, N.; Cockroft, D.L.; Lewis, N.J.; Gorman, L.; Akazawa, S.; Phillips, L.S.; Shambaugh, G.E. III. (1986). The 1986 McCollum award lecture. Fuel-mediated teratogenesis during early organogenesis: The effects of increased concentrations of glucose, ketones, or somatomedin inhibitor during rat embryo culture. *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 986-995.

Gabbe, S.G. (1985). Management of diabetes mellitus in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 153: 824-828.

Gäreskog, M.; Eriksson, U.J.; Wentzel, P. (2005). Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats. *Birth Def. Res. (Part A)* 76: 486-490.

Gäreskog, M.; Cederberg, J.; Eriksson, U.J.; Wentzel, P. (2007). Maternal diabetes *in vivo* and high glucose concentration *in vitro* increases apoptosis in rat embryos. *Reprod. Toxicol.* 23: 63-74.

Ha, H., Sirisoma, N., Kuppusamy, P., Zweier, J., Woster, P.; Jr., R. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11140-11145.

Hagay Z. J.; Weiss Y.; Zusman I.; Peled-Kamar M.; Reece E. A.; Eriksson U. J.; Grouer Y. (1995). Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. *Am. J. Obstet Gynecol* 173: 1036-1041.

Hansberg, T. W. (2008). El dioxígeno y sus especies reactivas. En: radicales libres y estrés oxidativo aplicaciones medicas. Editor: Konigsberg, F.M. Ed. El Manual Moderno. Mexico. pp. 25-36.

Huber, B.E.; Brown, N.A. (1982). Developmental patterns of ornithine decarboxylase activity in organogenesis phase rat embryos in culture and in utero. *In Vitro* 18: 599-605.

Igarashi, K.;Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: Mysterious of modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559-564.

Ishida, M.; Hiramatsu, Y.; Masuyama, H.; Mizutani, Y.; Kudo, T. (2002). Inhibition of placental ornithine decarboxylase by DL- α -difluoromethyl ornithine causes fetal growth restriction in rats. *Life Sci.* 70: 1395-1405.

Kwon, H.; Wu, G.; Bazer, F.W.; Spencer, T.E. (2003). Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biol. Reprod.* 69: 1626-1634.

Lesser, K.B.; Carpenter, M.W. (1994). Metabolic changes associated with normal pregnancy and pregnancy complicated by diabetes mellitus. *Semin. Perinatol.* 18: 399-406.

Mayer, B. (1998). Diabetes Mellitus, W.B. Saunders, 4a. ed., USA. P. 442.

Méndez, J.D.; Palomar-Morales, M. (1999). Embryotoxicity for diabetes induced in rat: prevention for L-arginine and polyamines. *Reprod. Toxicol.* 13: 501-509.

Metzger, B.E. (1991). Biphasic effects of maternal metabolism on fetal growth. Quintaessential expression of fuel-mediated teratogenesis. *Diabetes* 40 (Suppl 2): 99-105.

Miller, L; Wells, P.G. (2011). Altered methanol embryopathies in embryo culture with mutant catalase-deficient mice and transgenic mice expressing human catalase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 252: 55-61.

Moley, K. (2001). Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *Trends Endocrinol. Metab.*12: 78-82.

- Morgan, D.M.L. (1999). Polyamines: an overview. *Mol. Biotechnol.* 11: 229-250.
- Nardacci, R.; Falciatori, I.; Moreno, S.; Stefanini, S. (2004). Immunohistochemical localization of peroxisomal enzymes during rat embryonic development. *J. Histochem. Cytochem.* 52: 423-436.
- New, D.A.T. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.* 53: 81-122.
- Ochoa, R.; Leal, G.; Méndez, J. (2002). Papel de las poliaminas en inmunosupresión. *Rev. Med. IMMS* 40: 77-83.
- Organización Mundial de la Salud. (2009). Diabetes. Nota Descriptiva N° 312: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html.
- Ornoy, A.; Zaken, V.; Kohen, R. (1999). Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology* 60: 376-386.
- Ornoy, A. (2007). Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod. Toxicol.* 24: 31-41.
- O'Toole, B.; Huffman, K.W.; Gibson, J.P. (1989). Effects of eflornithinehydrochloride (DFMO) on fetal development in rats and rabbits. *Teratology* 39: 103-113.
- Palomar-Morales, M.; Morimoto, S.; Mendoza-Rodriguez, C.; Cerbon, M. (2010). The protective effect of testosterone on streptozotocin-induced apoptosis in β cells is sex specific. *Pancreas* 39: 193-200.
- Peraza, R.L. (2008). Catalasa. En: radicales libres y estrés oxidativo aplicaciones medicas. Editor: Konigsberg, F.M. Ed. El Manual Moderno. Mexico. Pp. 183-200.
- Reece, E.A.; Homko, C.; Wiznitzer, A. (1994). Metabolic changes in diabetic and nondiabetic subjects during pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* 49: 64-71.
- Reece, E.A.; Ma, X.-D.; Zhao, Z.; Wu, Y.-K.; Dhanasekaran, D. (2005). Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy in rats: II. Apoptotic pathways. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192: 967-972.
- Rider, J.E.; Hacker, A.; Mackintosh, C.A.; Pegg, A.E.; Woster, P.M.; Casero Jr, R.A. (2007). Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino acids* 333: 231-240.
- Russell, D.H.; McVicker, T.A. (1972). Polyamines in the developing rat and in supportive tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 259: 247-258.

Schipper, R.G.; Penning, L.C.; Verhofstad, A.J. (2000). Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin. Cancer Biol.* 10: 55-68.

Seiler, N.; Raul, F. (2005). Polyamines and apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* 9: 625-642.

Shubert, P. J., Gordon, M.C., Landon, M.B., Gabbe, S.G.; Kniss, DA. (1996). Ketoacids attenuate glucose uptake in human trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 56-62.

Sivan, E. Lee, Y., Wu, Y.;Reece, A. (1997). Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology* 56: 343-349

Tabor, C.W.; Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: 3160-3167.

Thurman RG, Ley HG, Scholz R. 1972. Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur. J. Biochem.* 25: 420-430.

Trocino, R.A; Akazawa, S.; Ishibashi, M.; Matsumoto, K.; Matsuo, H.; Yamamoto, H.; Goto, S.; Urata, Y.; Kondo, T.; Nagataki, S. (1995). Significance of glutathione depletion and oxidative stress in early embryogenesis in glucose-induced rat embryo culture. *Diabetes* 44: 992-998.

Wentzel, P.; Eriksson, U.J. (2005). A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E₂ in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Def. Res. (Part A)*. 73:506-511.

Yang, X.; Borg, L.A.; Eriksson, U.J. (1997). Altered metabolism and superoxide generation in neural tissue of rat embryos exposed to high glucose. *Am. J. Physiol.* 272 (1 pt 1): E173-180.

Zaken, V.; Kohen, R.; Ornoy, A. (2001). Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 64: 33-44.

Zangen, S. W.; Yaffe, P.; Shechtman, S.; Zangen, D.H.; Ornoy, A. (2002). The role of reactive oxygen species in diabetes-induced anomalies in embryos of Cohen diabetic rats. *Int. J. Exp. Diab. Res.* 3: 247-255.

Zangen, S.W.; Ryu, S.; Ornoy, A. (2006). Alterations in the expression of antioxidant genes and the levels of transcription factor NF-Kappa B in relation to diabetic embryopathy in the Cohen diabetic rat model. *Birth Def. Res. (Part A)* 76: 107-114.