



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**Expresión del gen Pax3 en un modelo *in vitro* de embriopatía diabética y su  
prevención por poliaminas**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. NINNA LESLIE TREJO GONZALEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Martin Palomar Morales**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**

**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM**

**MEXICO, CD. MX., MAYO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.


Lic. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de octubre de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **TREJO GONZALEZ NINNA-LESLIE**, con número de cuenta 304304873, con la tesis titulada "Expresión del gen PAX3 en un modelo *in vitro* de embriopatía diabética y su prevención por poliaminas", realizada bajo la dirección del **DR. MARTIN PALOMAR MORALES**:

Presidente: DRA. ALEJANDRA CONTRERAS RAMOS  
Vocal: DRA. GUADALUPE DÍAZ ROSAS  
Secretario: DR. LLIS ARTURO SAIZA GUTMAN  
Suplente: DRA. MARGARITA DÍAZ JIMÉNEZ  
Suplente: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Méx. a 22 de marzo de 2018

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (a) interesado (a)

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de superarme en el ámbito académico, por poner a mí alcance las herramientas necesarias para convertirme en una profesionista mejor preparada para afrontar el gremio laboral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca de estudios (CVU 482874). Así mismo al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, de la Dirección de Asuntos de Personal Académico de la UNAM con el proyecto IN215414. De la misma forma se agradece al Hospital Infantil de México por su aporte al proyecto HIM/2016/036. Todos estos apoyos contribuyeron de manera importante a la conclusión de este proyecto.

## ***AGRADECIMIENTOS PERSONALES***

*Primeramente a Dios, sé que sin su guía y presencia en mi vida esto no habría sido posible.*

*A mi tutor principal, Dr. Martín Palomar Morales, de una manera muy especial agradezco que siempre haya tenido la voluntad de compartir sus conocimientos, de tenerme paciencia, gracias por escucharme y darme consejo cuando lo necesite, gracias por nombrarse y comportarse como un padre académico.*

*A la Lic. Gladys Chirino, por tantas horas de plática, por sus consejos, por su ayuda infinita siempre, por hacerme sentir que tengo una amiga en usted.*

*A la Dra. Alejandra Contreras Ramos y a la Dra. Guadalupe Díaz Rosas, por todo su apoyo en la realización de este proyecto, por enseñarme tanto de todo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por hacerme sentir parte de otra familia.*

*A mis tutores Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y la Dra. Sandra Díaz Barriga, siempre pendiente de mi avance, gracias por su sinceridad y todos sus consejos dirigidos a mi trabajo.*

## **DEDICADO...**

*A mis padres, Nina y Jorge, dos pilares que siempre me han sostenido, que me han alentado a seguir adelante, a nunca desfallecer. Siempre involucrados en todos los pasos que he dado. Los amo.*

*A mi hermana Lorena, porque siempre me preocupé por ser un buen ejemplo para tí, y ahora me haces sentir tan orgullosa de la persona que eres, te amo.*

*Al hombre que me ha enseñado que la vida es bella, que día a día desde hace 14 años toma mi mano para hacerme sentir fuerte y capaz de superar todos los obstáculos que se presenten, mi esposo Gerardo. A tí por siempre acompañarme y cruzar conmigo las aguas impetuosas de la vida. Te amo infinitamente. STXS.*

*Al gran amor de mi vida, mi hija Natalia, mi pequeño pedazo de cielo, a tí por inyectarme tanta energía, por ser el motor más grande que ha movido mi vida, porque me has dado tantos deseos de ser la mejor persona que mereces como madre. A tí simplemente por existir y hacerme la mujer más feliz del mundo. Te amo incondicionalmente con todo mi ser.*

*A mí misma, porque simultaneo a este proceso, enfrente pruebas que jamás en la vida creí conocer, y aunque flaqueé e imagine que no podría concluir, hoy estoy aquí más fuerte y deseosa de seguir creciendo.*

# ÍNDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	3
Clasificación de la DM	3
La DM durante el embarazo	4
ANTECEDENTES	6
Embriopatía diabética	6
<i>Modelos experimentales para estudiar la embriopatía diabética</i>	7
<i>Desarrollo embrionario de la rata durante los días 10 y 11 de gestación</i>	8
<i>Expresión genética durante la embriopatía diabética</i>	11
<i>Implicación de la familia de Pax en la embriopatía diabética</i>	12
<i>Generalidades de Pax3</i>	14
Poliaminas	15
JUSTIFICACIÓN	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
General	22
Particulares	22
METODOLOGÍA	23
Sujetos experimentales	23
Preparación del medio de cultivo	23
Cultivo de embriones	24
Análisis morfológico	24
Inmunofluorescencia y ensayo TUNEL	26
Extracción de RNA	26
Síntesis del cDNA	27
PCR tiempo real	27
Análisis estadístico	28
RESULTADOS	29
Análisis e índice morfológico	29
Análisis de la expresión de Pax 3 y apoptosis en embriones de rata cultivados <i>in vitro</i>	33

<b>Análisis de la expresión del mensajero de Pax3 en embriones de rata cultivados <i>in vitro</i></b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>46</b>



## RESUMEN

La diabetes mellitus es una patología que afecta a millones de personas a nivel mundial. Durante el embarazo de mujeres con diabetes franca existe una elevada posibilidad de que se presenten malformaciones congénitas, estas anomalías se encuentran principalmente asociadas al sistema nervioso y corazón. La hiperglucemia es el principal promotor de la embriopatía diabética, debido en parte a que ocasiona, entre otras cosas, un desbalance en el sistema redox de las células, aumentando el estrés oxidativo a raíz de un incremento en la formación de productos de glicación avanzada, lo que afecta diversas vías de señalización durante el periodo de organogénesis, fase en que el embrión es más vulnerable a cualquier tipo de teratógeno.

Por otro lado, la familia de genes Pax codifica para factores de transcripción que están altamente relacionados con el desarrollo temprano y la especificación de tejidos. Pax3 es uno de los genes más estudiados en la embriopatía diabética; debido a sus implicaciones en el desarrollo cardíaco y del sistema nervioso, así como en la especificación y migración de las células de la cresta neural. Muchos trabajos muestran que agentes antioxidantes como las vitaminas E y C, el ácido fólico, el resveratrol, y otras moléculas como las poliaminas pueden mejorar las condiciones de desarrollo de un embrión expuesto a altas concentraciones de glucosa. Las poliaminas son moléculas de naturaleza policatiónica presentes en plantas, animales y microorganismos, que se han visto involucradas en procesos como desarrollo, crecimiento, senescencia y respuesta a estrés. Las poliaminas espermina y espermidina han sido propuestas como moléculas candidatas para combatir los efectos adversos de un ambiente hiperglucémico durante el desarrollo.

Estadísticamente la incidencia de malformaciones congénitas aumenta cuatro veces entre los niños de madres con diabetes pregestacional, en comparación con embarazos normoglucémicos, por esta razón es de suma importancia encontrar solución a este problema.

El propósito de este trabajo fue evaluar la capacidad embrioprotectora de la espermina y espermidina contra a los daños morfológicos en embriones de rata en cultivo en presencia de concentraciones altas de glucosa, y dilucidar si el efecto de la glucosa y estas moléculas es mediado por cambios en la expresión del gen Pax3.

Para cumplir nuestro propósito, se cultivaron embriones post-implantacionales de rata (día 10 de edad gestacional) en medio control (Ctl), medio suplementado con glucosa 500 mg/dL

(Glc), medio suplementado con glucosa más espermidina 25  $\mu\text{M}$  (Spd) y medio suplementado con glucosa más espermina 25  $\mu\text{M}$  (Spm) por 24 h a 37° C. Se evaluaron los cambios morfológicos, se determinó la expresión de la proteína y mensajero de Pax3 por inmunohistoquímica y qPCR tiempo real, y la muerte celular (apoptosis) se evaluó por TUNEL.

Por medio del análisis morfológico hallamos que las concentraciones elevadas de glucosa afectan significativamente el desarrollo del embrión, alterando principalmente: el diámetro del saco vitelino, la longitud del embrión, la longitud céfalo-caudal y el número de somitas presentes. En contraste, los embriones tratados con las poliaminas espermina y espermidina presentaron similitud con el grupo control en los parámetros antes mencionados.

Por lo que respecta a Pax3, la expresión tanto de la proteína como del mensajero decayó significativamente en el grupo tratado con alta glucosa en relación al control. En contraste en los embriones tratados con poliaminas, espermidina y espermina, pese a que la expresión de Pax3 fue mayor a la del grupo glucosa, nunca se alcanzaron los niveles de expresión del grupo control.

Por otro lado, la apoptosis fue determinada en todos los grupos excepto en el control, cabe destacar que el mayor daño se observó en el grupo con alta concentración de glucosa.

Todos estos resultados nos permiten suponer que Pax3 es un miembro importante en la inducción del proceso teratógeno en la embriopatía diabética, y que las poliaminas espermina y espermidina podrían ser utilizadas como moléculas protectoras, ante los efectos de la glucosa en individuos en proceso de desarrollo.

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus is a pathology that affects millions of people worldwide. During pregnancy, women with diabetes mellitus have a high risk of congenital deformities or malformations in the fetus. Statistics shown that this situation increases four times more for children when the mother has diabetes mellitus in the stage of pregnancy than children of healthy women. The malformations are more frequently found in the nervous system and the heart. Hyperglycemia is one of the principal factors in diabetic embryopathy. It may be a factor because it causes, between other manifestations, an imbalance in redox system in the cells, increase of oxidative stress and in the formation of advanced glycation end-products, this is because hyperglycemia affects different routes of signaling during the stage of organogenesis, the developmental stage in which the embryo is more vulnerable to any kind of teratogen.

In the other hand the family of Pax genes encodes for transcription factors that are highly related to early development and tissue specification. Pax3 is one of the most studied genes in diabetic embryopathy; due to its implications in cardiac and nervous system development, as well as in the specification and migration of neural crest cells. Many studies show that antioxidant agents such as vitamins E and C, folic acid, resveratrol, and other molecules such as polyamines can improve the development conditions of an embryo exposed to high concentrations of glucose. Polyamines are molecules of polycationic nature present in plants, animals and microorganisms, which have been involved in processes such as development, growth, senescence and stress response. The spermine and spermidine polyamines have been proposed as candidate molecules to ameliorate the adverse effects of a hyperglycemic environment during development.

Statistically, the incidence of congenital malformations increases four times among children of mothers with pregestational diabetes, in comparison with normoglycemic pregnancies, for this reason it is very important to find a solution to this problem.

The purpose of the present work was to evaluate the embryoprotective capacity of spermine and spermidine against morphological damage in rat embryos in culture in the presence of high glucose concentrations, and to elucidate whether the effects of glucose and these molecules are mediated by changes in the expression of the Pax3 gene. To fulfill our purpose, rat post-implantation embryos (day 10 of gestational age) were cultured in control medium (Ctl), medium supplemented with glucose 500 mg/dL (Glc), medium supplemented

with high glucose plus spermidine 25  $\mu$ M (Spd) and medium supplemented with glucose plus spermine 25  $\mu$ M (Spm) for 24 h at 37° C. Morphological changes were evaluated, the expression of the Pax3 protein and messenger were determined respectively by immunohistochemistry and real time qPCR, and cell death (apoptosis) was evaluated by TUNEL. Through morphological analysis we found that high glucose concentrations significantly affect the development of the embryo, mainly altering yolk sac diameter, embryo length, crown-rump length and somite number. In contrast, the embryos treated with the spermine and spermidine polyamines showed similarity with the control group in the aforementioned parameters.

With regard Pax3, the expression of both the protein and the messenger decreased significantly in the group treated with high glucose in relation to the control group. In contrast, in the embryos treated with polyamines, spermidine and spermine, although the expression of Pax3 was greater than that of the glucose group, the parameter never reached the levels of expression found in the control group.

On the other hand, apoptosis was determined in all groups except the control, it should be noted that the greatest damage was observed in the group with high glucose concentration.

All these results allow us to suppose that Pax3 is an important member in the induction of the teratogenic process in diabetic embryopathy, and that the polyamines spermine and spermidine could be used as protective molecules against the effects of glucose in developing individuals.

## **INTRODUCCIÓN**

La diabetes es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, con grados variables de predisposición hereditaria, ya que en su desarrollo participan diferentes combinaciones de genes junto con factores ambientales. Es una alteración del metabolismo caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), causada por deficiencia relativa o absoluta de la secreción o acción, de la insulina (Secretaría de Salud, 2001), una hormona peptídica secretada por el páncreas. Este padecimiento se caracteriza por hiperglucemia crónica, y en general defectos del metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. Los principales síntomas de la DM son la poliuria, la polidipsia, la pérdida de peso, algunas veces polifagia y visión borrosa (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003) Además, la hiperglucemia crónica se asocia con daño a largo plazo de varios órganos, especialmente riñones (nefropatía), ojos (retinopatía), nervios (neuropatía), corazón (cardiopatía) y vasos sanguíneos (Restrepo, 2000).

### **Clasificación de la DM**

La clasificación actual de la DM, aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), está basada en la propuesta por el National Diabetes Data Group (NDDG) en 1979. En ésta se utilizan números arábigos, de forma que la DM de tipo 1 es la que antes se conocía como dependiente de insulina, juvenil o tipo I, y la DM tipo 2 sustituye a la nombrada previamente como no dependiente de insulina, del adulto o tipo II. Además de introducir por separado a la diabetes gestacional, la intolerancia a la glucosa y un grupo heterogéneo denominado "otros tipos de diabetes". Ya en 1997, una comisión formada por expertos de la OMS y de la American Diabetes Association (ADA), dio a conocer los nuevos criterios de clasificación (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of diabetes mellitus, 1997), que quedaron reducidos a cuatro grupos resumidos en la tabla 1.

Tabla 1 Clasificación de la Diabetes mellitus (Tébar y Escobar, 2009).

Tipo	Características generales
DM tipo I	Existen dos tipos: autoinmune (DM tipo 1a), e idiopática (DM tipo 1b). Se caracteriza por la destrucción de las células $\beta$ pancreáticas, lo que conduce a una deficiencia absoluta de insulina. Abarca entre el 5 y el 10% de los casos.
DM tipo II	Caracterizada por la deficiencia en la producción de insulina y resistencia a ésta, por lo general ambos fenómenos están presentes. Es la más común, representa más del 90% de los casos.
Tipos específicos de DM	Los signos y síntomas característicos de estos padecimientos se presentan de manera secundaria a enfermedades principales (defectos genéticos de la función de la célula $\beta$ o en la acción de la insulina, endocrinopatías, inducidas por fármacos o sustancias químicas, infecciones, enfermedades del páncreas exocrino, formas infrecuentes de diabetes autoinmunes).
DM gestacional (DMG)	Se define como una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, de severidad variable, que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Este término se aplica independientemente de si se requiere o no insulina, o si la alteración persiste después del embarazo y no excluye la posibilidad de que la alteración metabólica este presente después de la gestación. Para algunos autores, se debe a casos de DM tipo 2 que se disparan por la gestación. Se presenta en aproximadamente 5% de los embarazos de las mujeres consideradas sanas hasta ese momento.

### La DM durante el embarazo

La DM es considerada como la entidad metabólica más común durante la gestación, se presenta aproximadamente en el 5% de los embarazos. El 90% de estas pacientes presentan diabetes mellitus gestacional (DMG), es decir son mujeres con predisposición genética o metabólica a la diabetes, incapaces de compensar adecuadamente los efectos diabetogénicos del embarazo; el restante 10% está conformado por mujeres con diabetes ya diagnosticadas antes del embarazo (DM1, DM2 y otros tipos) y se denomina diabetes franca pregestacional, o diabetes pregestacional (Restrepo, 1992).

La incidencia de malformaciones congénitas aumenta cuatro veces entre los niños de madres con diabetes pregestacional, debido al ambiente metabólico alterado durante las primeras semanas del embarazo, tiempo en el cual ocurre la organogénesis (Carpenter, 2007).

Se sabe que las hormonas que son secretadas durante el embarazo tienen efecto diabetogénico porque producen alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos. Los estrógenos, la progesterona, el lactógeno placentario y el cortisol son antagonistas de la insulina; por lo tanto, la captación periférica y la utilización de la glucosa disminuyen. Además de lo anterior, la placenta atrapa y destruye la insulina, lo que agrava el problema; sin embargo, el páncreas tiende a producir mayor cantidad de insulina para mantener una buena tolerancia a la glucosa (Malacara *et al.*, 1977).

El embarazo diabetogénico es una condición metabólica de tipo oxidativa en que la unidad feto-placentaria se forma a expensas de la madre (Acevedo *et al.*, 2007). El ambiente hiperglucémico e hiperlipémico que rodea al embrión genera sustancias con alta capacidad para dañar la estructura de las biomoléculas y alterar las funciones en que ellas participan. Dichas sustancias pueden provocar cambios en eventos de señalización cruciales durante determinados períodos del desarrollo, afectar la expresión de genes relacionados con la morfogénesis y producir daño estructural del material genético, mecanismos que han sido implicados en la embriopatía diabética (Loeken, 2006).

La etiología del efecto teratogénico del estado diabético no se conoce. Sin embargo, tanto los factores ambientales (estado diabético materno y condiciones intrauterinas) como la predisposición genética parecen tener importancia en la embriopatía diabética, es decir, se trata de un caso de interacción entre el ambiente y el trasfondo genético del individuo.

## ANTECEDENTES

### Embriopatía diabética

Además de los factores hormonales inherentes al embarazo normal y en condiciones patógenas, se ha reportado que la hiperglicemia materna es el principal factor en la producción de malformaciones congénitas (Allen *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2006; Gâreskog *et al.*, 2006; Gâreskog y Wentzel, 2007; Guleria *et al.*, 2006), aunque existen otros factores metabólicos adversos producidos en la DM, tales como cuerpos cetónicos, productos finales de glicación avanzada, aminoácidos de cadena ramificada y deficiencia de inositol (Hod *et al.*, 1986; Strieleman *et al.*, 1992; Weigensberg *et al.*, 1990) los cuales pueden tener efectos sinérgicos con la glucosa en la interrupción del desarrollo embrionario normal (Eriksson *et al.*, 2000; Horton y Sadler, 1983; Hunter *et al.*, 1987; Hunter y Sadler, 1987; Moore *et al.*, 1989).

Antes de la organogénesis el embrión avascular es fisiológicamente hipóxico (2%-5% O<sub>2</sub>) comparado con la circulación materna (20% O<sub>2</sub>). El incremento de la masa celular causa un estado fisiológico de hipoxia que lleva a la activación de genes que inducen la formación del sistema circulatorio fetal (García y García, 2009), cuando hay un aporte mayor de glucosa desde la madre hacia el producto; antes de este suceso se obliga a los tejidos embrionarios a consumir más O<sub>2</sub> y como consecuencia hay un aumento en el metabolismo oxidativo. Finalmente se tiene una alta producción mitocondrial del radical superóxido, lo que genera así estrés oxidativo (Li *et al.*, 2007; Wentzel *et al.*, 2003).

En la cadena de transporte de electrones, las altas concentraciones de glucosa provocan una interrupción en el complejo III, como consecuencia hay una oxidación aumentada del oxígeno molecular por la coenzima Q (Brownlee, 2001) conduciendo a la exagerada generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Aunado a un aumento en los niveles de ROS, también se ha encontrado que las defensas antioxidantes del embrión se ven disminuidas a causa de los altos niveles de glucosa (Sivan *et al.*, 1997; Weksler-Zangen *et al.*, 2003; Zaken *et al.*, 2001). Estas investigaciones llevaron a la utilización de diferentes agentes antioxidantes para intentar frenar los defectos congénitos a causa de la embriopatía diabética, con los que se han obtenido respuestas favorables. Por mencionar algunas de estas moléculas se encuentra la N-acetilcisteína (Roest *et al.*, 2007), el resveratrol (Singh *et al.*, 2011) el ácido  $\alpha$ -lipoico (Ghaffli *et al.*, 2004; Sugimura *et al.*, 2009), la vitamina E (Cederberg *et al.*, 2001; Gareskog *et al.*, 2006; Wentzel



*et al.*, 2005; Zaken *et al.*, 2001) el ácido fólico (Gârescog *et al.*, 2006; Wentzel y Eriksson *et al.*, 2005; Zabihi *et al.*, 2007) la vitamina C (Cederberg *et al.*, 2001; Zaken *et al.*, 2001) el ácido alfa-linolénico (Chirino-Galindo *et al.*, 2017) y las poliaminas espermina y espermidina (Méndez y Palomar-Morales, 1999; Chirino-Galindo *et al.*, 2009, 2012).

La descompensación provocada por la DM alrededor del período de organogénesis ha sido relacionada con un espectro de alteraciones del desarrollo que incluye: anomalías del sistema nervioso, cardiovascular, renal, sistema esquelético, retardo en el crecimiento y aborto (García y García, 2009), siendo los dos primeros los más frecuentes y devastadores.

Los defectos congénitos más comunes incluyen espina bífida, anencefalia y microcefalia en el sistema nervioso central (SNC) y defectos del septo ventricular, defectos del tabique interauricular, transposición de las grandes arterias y tetralogía de Fallot en el caso del sistema circulatorio (Mills, 1982; Reece y Homko, 1994).

### ***Modelos experimentales para estudiar la embriopatía diabética***

En humanos no se pueden realizar estudios para conocer la etiología de la teratogénesis producida por la DM, por razones tanto éticas como técnicas; por esta razón es necesario recurrir a modelos experimentales.

Hay dos tipos de modelo que pueden utilizarse en la investigación:

- *In vivo*, significa que se trabaja con el organismo vivo y en condiciones naturales exceptuando las variables independientes a las que se someta al individuo. En este caso, podemos hablar de la inducción de diabetes por exposición a algún agente viral (Salazar, 2008) o químico (aloxana y estreptozotocina). También existen cepas o líneas de animales que pueden desarrollar esta enfermedad espontáneamente, sin embargo, son caras y en su mayoría son modelos de la DM2 y no siempre los resultados obtenidos cuando son utilizadas pueden extrapolarse a la especie humana.
- *In vitro*, se refiere a que se trabaja en un ambiente controlado fuera del organismo vivo, con esto se pretende observar los efectos de cierto agente teratógeno directamente en el individuo sin que pase por el metabolismo materno (New, 1978). El tiempo en el que debe hacerse el cultivo debe corresponder a las semanas 3 a 6

de embarazo en la especie humana, ya que un altísimo porcentaje de malformaciones sucede durante el proceso de organogénesis (Mills, 1979).

### ***Desarrollo embrionario de la rata durante los días 10 y 11 de gestación***

En esta etapa de desarrollo se puede observar que la primera bolsa faríngea está en contacto con el ectodermo, y el segundo arco faríngeo ha comenzado a evaginar. Las vesículas óticas ya están presentes, aunque aún no es muy fácil distinguirlas, mientras que las vesículas ópticas son fácilmente identificables.

Durante el día 10 de gestación en la rata se inicia un proceso conocido como neurulación o tubulación, el cual da lugar a la formación del sistema nervioso (SN) y durante su desarrollo se desenvuelve a través de un programa codificado genéticamente, con el cual se dan de manera secuencial en el tiempo una serie concatenada de procesos embriológicos fundamentales que se inician con la inducción primaria y eventos asociados, seguido por la neurulación primaria; neurulación secundaria; proliferación celular; migración celular; agregaciones celulares; diferenciación celular (neuronal, glial); establecimiento de conexiones; muerte celular programada (apoptosis) y desarrollo progresivo de patrones integrados (Carlson, 2005). Cualquier falla en el desarrollo de este programa puede alterar la formación de un sistema nervioso normal.

El SN es originado a partir del ectodermo, una porción de esta capa germinal que se encuentra en la zona dorsal está destinada a convertirse en ectodermo neural y estas células llegan a ser reconocibles por su aspecto columnar. Esta región del embrión es denominada placa neural. El proceso por el cual este tejido forma un tubo neural (NT) (que es el rudimento del sistema nervioso central), como ya se mencionó, es denominado neurulación y un embrión que experimenta tales cambios es denominado una neurula. El tubo neural formará el cerebro en la parte anterior y la médula espinal en la posterior (Gilbert, 2005).

El NT se extiende por toda la longitud del embrión. En la región craneal forma más tarde el cerebro en desarrollo, y en la región espinal forma la médula espinal (Palmer, 2015).

La formación del tubo neural en la rata comienza en el día 9.5 después de la cópula, el borde más dorsal de los pliegues neurales se enrolla gradualmente hacia adentro para

formar una estructura con forma de tubo, razón por la cual algunos autores prefieren el término tubulación.

Se da lugar a los neuroporos dorsal y neural a partir de la fusión dorsal de los márgenes laterales. Así es como la placa neural comienza a formar el NT (Alvarez-Bolado y Swanson, 1996; Uylings, 1990). Los neuroporos son regiones abiertas del NT entre puntos de cierre.

El cierre del NT comienza en tres puntos de cierre diferentes. El cierre 1 se inicia en el límite lumbo-cervical, el cierre 2 se inicia en el límite mesencéfalo-prosencéfalo y el cierre 3 se inicia en el límite rostral del prosencéfalo. Estos cierres se extienden rostral y caudalmente a lo largo de la línea media (Palmer, 2015) (figura 1).

Conforme se cierra el neuroporo rostral se pueden observar las vesículas cerebrales primarias que son el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo (Kandel y Schwartz, 1991) existen controversias a cerca de este estadio, hay autores que localizan esta visualización hasta el día 12 (Uylings *et al.*, 1990).

Durante el día 10 de desarrollo el corazón se encuentra en forma de “bucle S inmaduro” (Manner y Merkel, 2007). Los cuernos de los senos izquierdo y derecho, que eran simétricos bilateralmente y que están conectados a las aurículas primitivas, se han desplazado parcialmente hacia la región cefálica y comienzan a adquirir una posición ventral (Salazar *et al.*, 2012).

Durante este periodo la cresta neural se hace visible como una población transitoria de células, que se originan entre la placa neural y el ectodermo superficial. Las células de la cresta neural pierden su carácter epitelial y adquieren características mesenquimatosas, transformándose en células migratorias (Basch *et al.*, 2004).

Las células de la cresta neural migran distancias considerables para generar diversos tipos celulares como son: el esqueleto craneofacial, células neuronales y gliales del sistema nervioso sensorial simpático y parasimpático, células medulares de la glándula suprarrenal, las leptomeninges y todos los melanocitos del cuerpo (Hall, 2008).

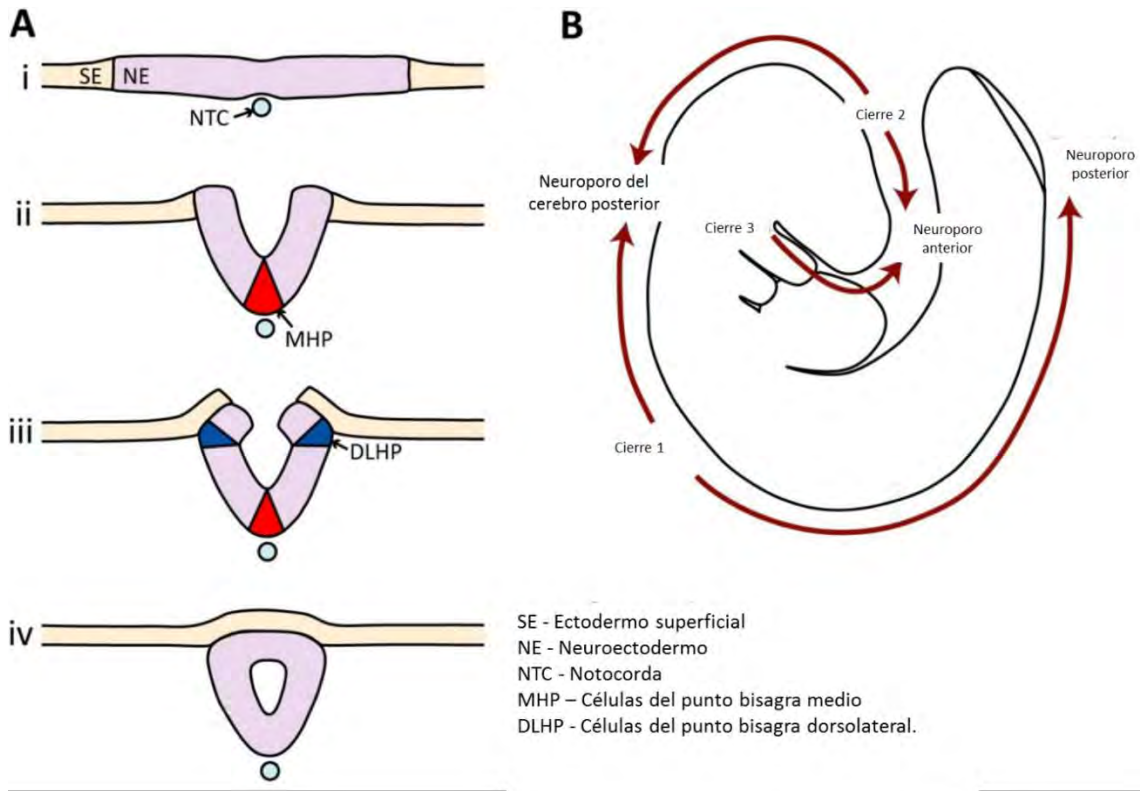


Figura 1. Formación y cierre del tubo neural durante la neurulación (Tomado de Blake y Ziman, 2014).

Algunas de estas células son denominadas cresta neural cardíaca, ya que originan el endotelio de las arterias del arco aórtico. Las células de la cresta neural cardíaca migran hacia los arcos faríngeos y entran al tronco arterioso para formar el tabique troncoconal, que separa el tronco arterioso en arteria pulmonar y aorta (Waldo *et al.*, 1998).

Durante el día 11 de gestación el extremo anterior del suelo neural continúa creciendo rápidamente en dirección rostral. La notocorda internalizada ha reemplazado al suelo notocordal, esta región se denomina suelo precordial, se expande considerablemente y contiene una mezcla de células asociadas con el suelo notocordal rostral y la membrana orofaríngea (Alvarez-Bolado y Swanson, 1996).

El tubo neural está polarizado a lo largo de un eje dorso-ventral. En la médula espinal la región dorsal es donde las neuronas sensoriales reciben los estímulos, mientras que en la región ventral es donde residen las neuronas motoras y en medio residen muchas interneuronas que actúan como estaciones de relevo entre ellas. La polaridad del tubo neural es inducida por señales que provienen de su entorno más inmediato: el patrón dorsal

es impuesto por la epidermis y el patrón ventral es inducido por la notocorda (López-Juez, 2009).

### ***Expresión genética durante la embriopatía diabética***

Diversas investigaciones han puesto de manifiesto que la exposición de un embrión en desarrollo a la hiperglucemia presente en un embarazo diabético induce alteraciones en la expresión génica, lo que resulta en una señalización celular aberrante y dismorfogénesis (Reece *et al.*, 2006). Esta anomalía en la expresión génica trae consigo modificaciones en los perfiles transcripcionales del embrión, afectando así programas específicos del desarrollo (Pavlinkova *et al.*, 2009).

Se sabe que incluso los genes expresados en el saco vitelino tienen un nivel de expresión diferente, hay más de 100 genes desregulados cuando hubo alguna exposición a una alta concentración de glucosa. Entre estos genes se encuentran algunos involucrados con las vías de señalización de la insulina, calcio y de la proteína cinasa C (PKC) así como de la respuesta al estrés y crecimiento celular (Reece *et al.*, 2006).

También en este proceso se involucran genes relacionados con la apoptosis y la proliferación celular, por ejemplo, el gen proapoptótico BAX está sobreexpresado, mientras que el gen del factor de supervivencia celular, la cinasa Akt, está disminuido (Reece *et al.*, 2005).

Ya directamente en el embrión, se ha visto que su exposición a un ambiente similar al de la diabetes materna, puede afectar la señalización vía Wnt y esto resulta en dismorfogénesis caudal (Pavlinkova *et al.*, 2008).

Las anomalías en la expresión del gen TGF $\beta$  están relacionadas con defectos cardíacos originados antes de la septación; este mismo gen se ha encontrado desregulado frente a un medio similar al que hay durante la embriopatía diabética (Zhao, 2010). Otros genes relacionados con el desarrollo de la cresta neural cardíaca se han encontrado con baja expresión en un modelo de embriopatía diabética, tales como PGP 9.5, NCAM, Bmp 4, Msx 1 y Pax 3, esta mala expresión derivó en defectos congénitos cardíacos (Kumar *et al.*, 2007).

La baja expresión del gen Pax3 también ha sido vinculada con un aumento en la frecuencia de malformaciones del tubo neural en modelos de embriopatía diabética (Phelan *et al.*,

1997; Fine *et al.*, 1999) y las diferentes malformaciones que resultan de la alteración en la expresión de este gen son cierres anormales del tubo neural, por ejemplo, exencefalia, cierre cefálico incompleto y espina bífida (Salbaum y Kappen, 2010) También es indispensable para la migración de las células de la cresta neural cardiaca y para la separación de la vía de salida cardiaca primitiva única en la aorta y las arterias pulmonares (Morgan *et al.*, 2008).

### ***Implicación de la familia de Pax en la embriopatía diabética***

Al igual que otros genes del control del desarrollo, las proteínas Pax actúan como factores de transcripción, ya que muestran actividad de unión al ADN en una secuencia específica y pueden activar la transcripción (Mansouri *et al.*, 1994).

*Hasta el día de hoy se han descrito nueve componentes de la familia Pax: que van desde el Pax1 hasta el Pax9, los cuales están divididos en cuatro grupos. La subclasificación de los genes Pax está dada por la estructura de sus productos de traducción. Todos constan de un dominio de transactivación y el “dominio pareado” que es un sitio de unión al ADN, está compuesto por los subdominios PAI y RED, cada uno tiene tres hélices en un motivo hélice-giro-hélice (Chi y Epstein, 2002) (figura 2). Algunos miembros de la familia Pax contienen adicionalmente un homeodominio de unión al ADN y/o un octapéptido. Los miembros de la familia Pax se expresan en varios tejidos durante la ontogénesis. Hay evidencia de su papel crucial en la morfogénesis, organogénesis, diferenciación celular y oncogénesis; estos datos se saben a partir de roedores mutantes y enfermedades humanas (Monsouri *et al.*, 1996). Sus principales funciones están relacionadas con la especificación y el establecimiento del eje rostro-caudal así como en el desarrollo del SNC (Bandín, 2016).*

De manera general la mayoría de los genes Pax se encuentran manteniendo a las células en un estado progenitor no apoptótico hasta que las señales ambientales son capaces de inducir la proliferación o la plena diferenciación y maduración de la población (Blake y Ziman, 2014).

Durante la embriogénesis, Pax 1 y Pax 9 han sido encontrados con un patrón similar de expresión en los arcos faríngeos, y en las extremidades (Neubûser *et al.*, 1995) en la región ventromedial de los somitas, es decir, en los esclerotomas, siendo notorio que primero se da la expresión de Pax 1 y en seguida de Pax 9 y a lo largo de la diferenciación de estas estructuras Pax 1 se expresa en la zona posterior y Pax 9 predomina en la zona

ventrolateral (Deutsch *et al.*, 1988; Ebensperger *et al.*, 1995; Neubûser *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1995). Pax 9 también se ha encontrado en el desarrollo del paladar secundario y de los dientes (Peters *et al.*, 1998).

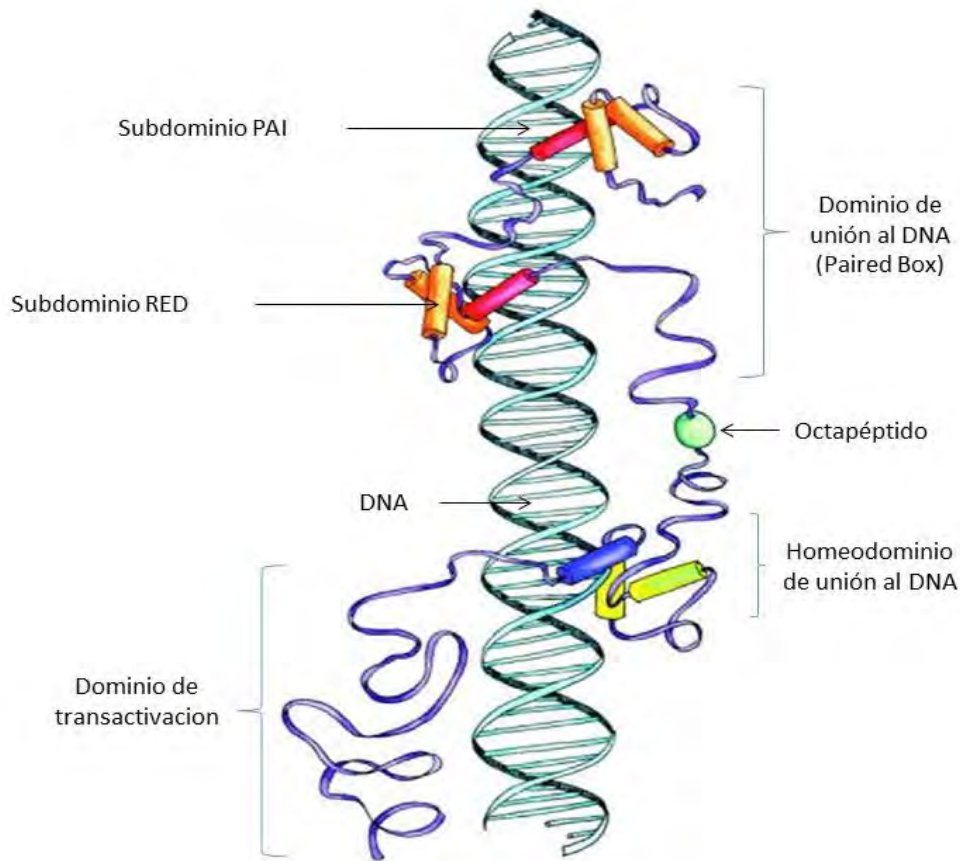


Figura 1. Estructura de los factores de transcripción Pax (Tomado de Blake y Ziman, 2014).

*Pax2, Pax5 y Pax8, son importantes en la región ístmica y en la especificación neuronal rombencefálica y espinal. Pax 2 está involucrado en el desarrollo del riñón, del SNC y en del sistema auditivo junto con Pax 8; este último también está relacionado con la tiroides. Pax 5 se ha encontrado también en linfocitos B (Eccles y Schimmenti, 1996; Macchia, 1998; Nutt y Busslinger, 1999).*

*La expresión de Pax4 y Pax6 es fundamental en la formación y el mantenimiento de diversas estructuras como los ojos, el páncreas y el telencéfalo (Balczarek et al., 1997; Kang y Krauss, 2010; Stuart et al., 1994). Se sabe también qu Pax6 se expresa*

tempranamente a lo largo de la región intermedioventral del tubo neural, genera motoneuronas e interneuronas (Goulding *et al.*, 1993).

Los genes *Pax3* y *Pax7* se expresan principalmente en células madre del músculo y en regiones medias y caudales del SNC, así también en la especificación, migración y diferenciación de las células de la cresta neural, y de manera más aislada se han encontrado participando en procesos de desarrollo de músculo esquelético, de la vasculatura del corazón, del sistema nervioso entérico, los melanocitos y las células de Schwann (Barr *et al.*, 1996; Epstein, 1996; Hoth *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 2000; Tassabehji *et al.*, 1992).

### Generalidades de Pax3

*Pax3* es uno de los genes más estudiados para entender la embriopatía diabética, codifica para un factor de transcripción de unión al ADN que se expresa a partir del día 8.5 en el desarrollo embrionario de la rata. El gen codifica una proteína de 479 aminoácidos con un Mr de 56 kDa y contiene tanto el dominio pareado y un homeodominio (Goulding *et al.*, 1991). Su localización genómica en humanos es 2q36.1 y en ratas es 9q33 y consiste en 9 exones (figura 3).

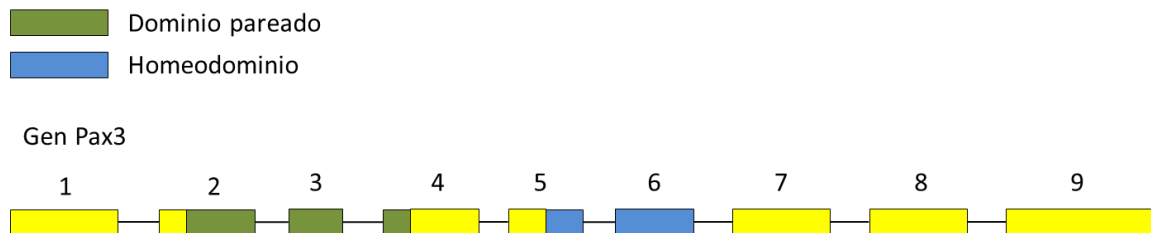


Figura 3. Estructura del gen Pax3.

Este gen es expresado en somitas, tubo neural y células de la cresta neural (Goulding *et al.*, 1991). En los somitas, regula la migración, diferenciación y sobrevivencia de los precursores miogénicos de tipo esquelético que darán lugar al diafragma y los músculos de las extremidades y la lengua (Buckingham y Relaix, 2007).



En la cresta neural es un factor de transcripción crítico para el desarrollo temprano y el mantenimiento de las células troncales derivadas de ella; además se ha sugerido también un papel crucial de este gen en la especificación de los progenitores de linaje de la cresta neural cardiaca (Nelms *et al.*, 2011; Olaopa *et al.*, 2011).

Con respecto al tubo neural se sabe que desregulación en la expresión de Pax3, en embriones en cultivo en un medio hiperglucémico, puede favorecer la ausencia de cierre (Phelan *et al.*, 1997). Existen varias teorías que pueden explicar este suceso, una de ellas es la estimulación de la degradación de p53 a causa de una expresión normal de Pax3, por lo que cuando este último está desregulado a la baja, la proteína de p53 se incrementa ocasionando apoptosis en la región neuroepitelial, dando lugar a la formación de diferentes defectos de tubo neural (Sanders *et al.*, 2014).

Existen evidencias de que el estrés oxidativo presente durante un embarazo complicado con diabetes es capaz de inhibir la expresión del gen Pax3 y propiciar así defectos del tubo neural (Chang *et al.*, 2003) y de migración de las células de la cresta neural cardiaca (Morgan *et al.*, 2008) lo que causa defectos del tracto de salida.

## **Poliaminas**

Las poliaminas son pequeñas moléculas orgánicas nitrogenadas, cargadas positivamente, que se encuentran en las células de todos los organismos y son consideradas moduladoras del crecimiento y el metabolismo celular (Sabater, 2008). Son un grupo de aminas alifáticas de bajo peso molecular, con grupos amino distribuidos de forma regular a lo largo de su estructura y que a pH fisiológico se encuentran en estado policatiónico (Ruiz-Cano *et al.*, 2012).

Estos compuestos nitrogenados presentan un sistema de cargas positivas a distancias definidas y grupos alquílicos entre ellas, lo que les confiere la capacidad de establecer interacciones más fuertes y más específicas que los cationes inorgánicos (Thomas y Thomas, 2001).

Las principales y más abundantes poliaminas en organismos superiores son llamadas putrescina, espermidina y espermina, conocidas por esto como “poliaminas fisiológicas”. Tienen un tamaño sucesivamente mayor, poseen 2, 3 y 4 grupos aminos, respectivamente. La putrescina (1,4-diaminobutano) es el precursor de las poliaminas mayores, espermidina

(1,8-diamino-4 azaoctano) y espermina (1,12-diamino-4,9-diazaoctano) (figura 4). Sin embargo, también se han encontrado otras poliaminas minoritarias como diaminopropano, cadaverina o agmatina tanto en procariotas como en eucariotas (López-Contreras, 2008), aunque al parecer son metabolitos intermedios durante los procesos de interconversión de las poliaminas naturales.

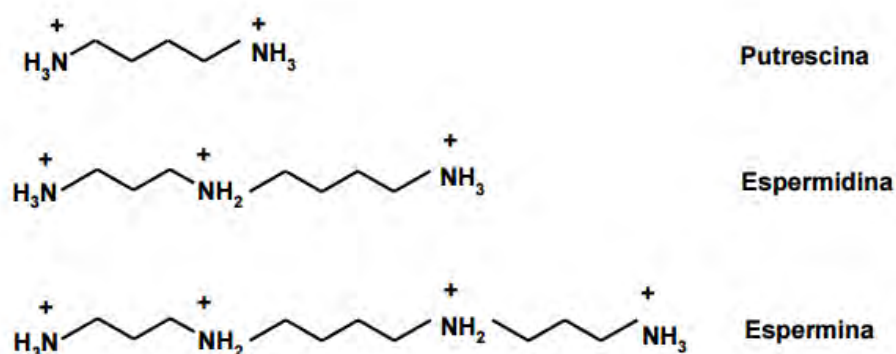


Figura 4. Estructura de las poliaminas.

La síntesis de poliaminas en células eucarióticas se inicia con la descarboxilación de ornitina para producir putrescina en una reacción catalizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). A la putrescina a su vez se le puede añadir enzimáticamente uno o dos grupos aminopropilos para formar espermidina o espermina, respectivamente (figura 5). En estos casos el dador de grupos aminopropilos es la S-adenosil metionina descarboxilada que se forma a partir de S-adenosil metionina. La degradación intracelular de poliaminas se inicia por un proceso de reconversión que consiste en dos etapas: acetilación y posterior oxidación, o una reacción directa de oxidación (Algranati *et al.*, 2006).

Diversas investigaciones han demostrado que las poliaminas presentan numerosas y diferentes funciones con efectos potencialmente benéficos para el organismo, por mencionar algunos: procesos como crecimiento, proliferación y apoptosis celular, maduración del tracto intestinal, papel antioxidante, carcinogénesis y crecimiento de tumores, alteraciones del estado cognitivo, entre otras (Ruiz-Cano *et al.*, 2012).

Los niveles intracelulares de poliaminas son factores importantes en la protección de las células de los efectos tóxicos de oxígeno (Chattopadhyay *et al.*, 2003) proponiendo así un efecto antioxidante. Estas moléculas también fungen como protectoras contra la apoptosis

(Igarashi y Kashiwagi, 2010) así como reguladoras de la expresión génica por medio de diferentes mecanismos (Childs *et al.*, 2003).

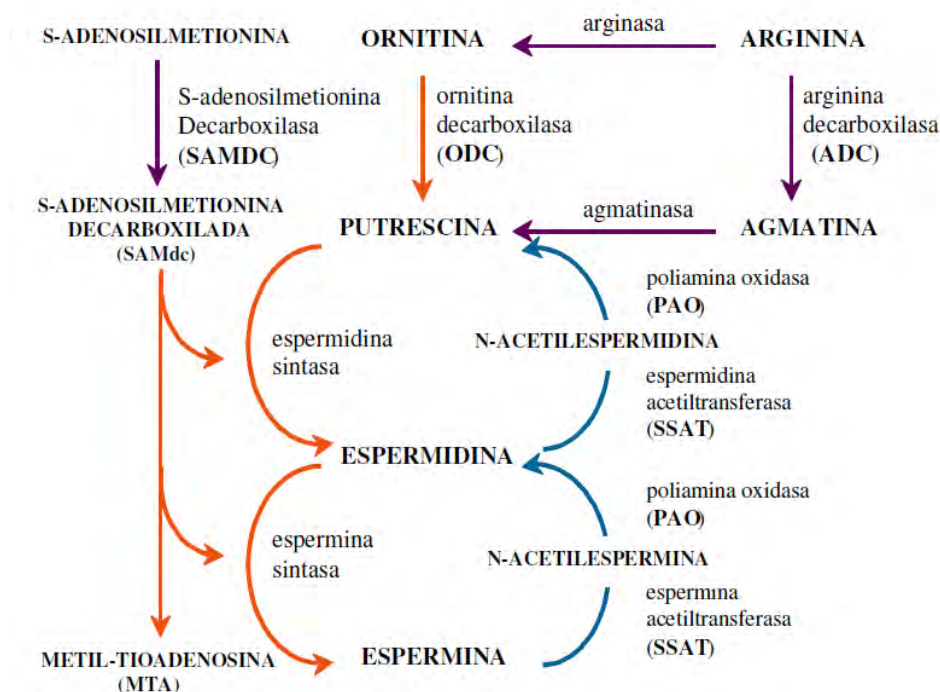


Figura 5. Metabolismo de las poliaminas (Tomado de Algranati *et al.*, 2006).

Ha sido reportado que las poliaminas espermina, espermidina y putrescina pueden prevenir las reabsorciones y los efectos embriotóxicos causados por una DM inducida por aloxana en un modelo *in vivo* de rata (Méndez y Palomar-Morales *et al.*, 1999), su efecto embrioprotector también ha sido demostrado en modelos *in vitro* en los que el medio de crecimiento del embrión ha sido enriquecido con glucosa (Chirino-Galindo *et al.*, 2009). Esta glucosa en exceso a la que es expuesto el embrión causa un aumento en la lipoperoxidación y al ser administradas las poliaminas, la cuantificación de las moléculas finales de la peroxidación resulta en valores similares a los normales ocasionando una reducción en el estrés oxidativo y manteniendo así un medio conveniente para el desarrollo normal de los embriones (Chirino-Galindo *et al.*, 2012).

## JUSTIFICACIÓN

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que, a nivel mundial, de 1995 al 2003, casi se triplicó el número de personas que vivieron con diabetes, mientras que, en 2014, según el informe mundial de la Federación Internacional de Diabetes (2015), esta enfermedad afectó a más de 422 millones de adultos en todo el mundo. La mayoría de los casos se presenta en países en vías de desarrollo.

La Federación Mexicana de Diabetes (2014) reportó que en nuestro país la DM ocupa uno de los primeros lugares de causa de defunciones por año. En 2014, cuatro millones de personas estaban diagnosticadas con DM. Tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente, con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales.

Debido a que es uno de los padecimientos más frecuentes a nivel global, el número de mujeres embarazadas con DM franca (previa) también se ha incrementado y cerca de 60 millones de mujeres en edad reproductiva tienen DM en todo el mundo, se estima que para el año 2030, éste número se duplicará (Dong *et al.*, 2015).

En México, La Guía de Práctica Clínica de la SSa (Secretaría de Salud, 2001) reconoció que la DM pregestacional es un factor que incrementa la frecuencia de malformaciones neonatales, y se propone como una de las metas reducir la aparición de ellas. El porcentaje de malformaciones por DM franca pregestacional permanece cercano al 3.0 %, en comparación con el 1.5 % en la población abierta, mientras que la mortalidad perinatal es todavía dos veces mayor (Vitoratos *et al.*, 2010).

Con todos estos antecedentes, surge la necesidad de controlar además de la glucosa, otros factores bioquímicos, metabólicos y hormonales durante el embarazo diabético, con el fin de tratar de prevenir o por lo menos reducir la elevada frecuencia y severidad de malformaciones y muerte perinatal en este tipo de embarazos. Para conseguir este objetivo, se deben abordar varias estrategias: mejorar el diagnóstico de las anomalías fetales o neonatales; desarrollar tecnologías para reconocer las malformaciones tan pronto como se presenten; así como implementar programas de monitoreo y control metabólico gestacional. Sin embargo, el desarrollo de intervenciones terapéuticas no puede llevarse a cabo de la manera adecuada si se desconocen los mecanismos celulares y moleculares que causan la embriopatía diabética. La investigación básica usando modelos animales ha aportado

una cantidad considerable de información acerca de las manifestaciones de las anomalías del desarrollo, pero todavía se requiere de mucha investigación en el tema, puesto que hay muchos factores participantes que permanecen sin dilucidar (Zhao y Reece, 2013).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM es considerada como la alteración metabólica más común durante la gestación (Restrepo, 1992). En el ambiente hiperglucémico al que se somete la unidad feto-placentaria durante el embarazo que cursa con DM, el desarrollo embrionario es más propenso a derivar en malformaciones congénitas que son consecuencia de daños en la señalización y la expresión de genes involucrados en la organogénesis (Loeken, 2006), así como en la activación de vías de apoptosis (Forsberg *et al.*, 1998).

Existen evidencias de que el estrés oxidativo presente durante un embarazo complicado con diabetes es capaz de inhibir la expresión del gen Pax3 y propiciar así defectos del tubo neural (Chang *et al.*, 2003) y de migración de las células de la cresta neural cardiaca (Morgan *et al.*, 2008) generando defectos del tracto de salida.

La etiología del efecto teratógeno de la diabetes no está completamente dilucidada aun, pero lo más común es encontrar investigaciones en donde las malformaciones congénitas producidas por diabetes experimental son prevenidas en animales por administración de diferentes sustancias con capacidades antioxidantes como vitamina C y E (Cederberg *et al.*, 2001; Gareskog *et al.*, 2006; Wentzel y Eriksson, 2005, Zaken *et al.*, 2001), la N-acetilcisteína (Roest *et al.*, 2007), el resveratrol (Singh *et al.*, 2011) el ácido  $\alpha$ -lipoico (Ghaffi *et al.*, 2004; Sugimura *et al.*, 2009), el ácido fólico (Gâreskog *et al.*, 2006; Wentzel y Eriksson, 2005; Zabihi *et al.*, 2007), el ácido alfa-linolénico (Chirino-Galindo *et al.*, 2017) y las poliaminas espermina y espermidina (Chirino-Galindo *et al.*, 2009, 2012; Méndez y Palomar-Morales *et al.*, 1999).

Las poliaminas espermina y espermidina poseen un efecto embrioprotector en modelos *in vivo* (Méndez y Palomar-Morales *et al.*, 1999), e *in vitro* (Chirino-Galindo *et al.*, 2009, 2012) y aunque se ha propuesto que es a través de sus propiedades antioxidantes (Chirino-Galindo *et al.*, 2009) no se ha encontrado efecto de las poliaminas sobre la actividad o expresión de las enzimas antioxidantes (Chirino-Galindo *et al.*, 2012) por lo que no se puede discriminar la idea de que su función protectora sea a causa de alguna de sus muchas otras características, ya que son moléculas sumamente versátiles.

## **HIPÓTESIS**

Está plenamente demostrado que el embarazo diabético aumentan las posibilidades de tener un hijo con malformaciones congénitas, siendo las más comunes las que están relacionadas con el sistema nervioso y cardiaco. La teoría más aceptada en cuanto al elemento que induce la embriopatía diabética es el estrés oxidativo generado a partir de un aumento de glucosa en el ambiente de desarrollo del embrión.

Por lo anterior se espera que la incubación de embriones de rata en medio con elevada concentración de glucosa provocará un incremento en la frecuencia de malformaciones y aumento de la apoptosis en las regiones de tubo neural y cardiaca, debido a una desregulación del gen Pax3. La adición de espermina y espermidina contribuirá a reducir la severidad y la frecuencia de malformaciones, así como al mantenimiento de los niveles de la expresión del gen Pax3, por ende se reducirá la apoptosis.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar *in vitro* el desarrollo normal de embriones de rata y su correlación con la expresión de Pax3, en presencia de poliaminas (espermina y espermidina) y altas concentración de glucosa

### **Particulares**

- Describir las malformaciones de los embriones de 10 dpc cultivados en medio con elevadas concentraciones de glucosa y poliaminas.
- Determinar los cambios de expresión de la proteína y mensajero de Pax3 en embriones de 10 dpc cultivados en medio con poliaminas en presencia de una elevada concentración de glucosa.
- Evaluar *in situ*, la presencia de muerte celular (apoptosis) en embriones de 10 dpc cultivados en medio con poliaminas y elevadas concentraciones de glucosa.



## **METODOLOGÍA**

### **Sujetos experimentales**

Para la obtención de los embriones se utilizaron ratas hembra y macho de la cepa *Wistar* en edad reproductiva, de entre 250 y 300 gramos. Posterior a la copula de 24 h, se realizaron frotis vaginales a las hembras, la presencia de espermatozoides fue considerado como tiempo cero de la gestación. Las ratas gestantes fueron separadas del resto, y se mantuvieron en condiciones normales de temperatura y humedad, con alimento y agua *ad libitum* hasta el día 10 u 11 de gestación, como lo indicó la NOM-062-ZOO-1999. Las hembras se sacrificaron de acuerdo al diseño experimental.

### **Preparación del medio de cultivo**

A partir de sangre periférica obtenida sin anticoagulante de ratas Wistar adultas, machos y hembras pie de cría retirados, se obtuvo el suero inmediatamente sin permitir la coagulación, mediante centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos, y se congeló a -20°C hasta el momento de ser utilizado.

Para la preparación de los medios, el suero se descongeló y se inactivó por calentamiento a 56°C durante 30-45 minutos, con la finalidad de inactivar el sistema del complemento, y potenciales inhibidores de crecimiento celular desconocidos. El medio control se preparó a partir de suero inactivado al 80% en solución salina, y suplementado con 1000 UI/mL de penicilina (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) y 100 µg/mL de estreptomina (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA). La concentración de glucosa en este medio es cercana a 100 mg/dL (Chirino, 2007) Para el medio suplementado, se adiciono glucosa (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) a partir de una solución concentrada para dar una concentración final cercana a 500 mg/dL. Los medios con poliaminas se suplementaron con espermidina o espermina (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) hasta obtener una concentración final de 25 µM.

Todos los medios preparados se filtraron empleando una membrana de 0.22 µm de poro (Millipore, Darmstadt, Alemania) en condiciones de esterilidad, y se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

## **Cultivo de embriones**

Las ratas de 10.5 de gestación, fueron anestesiadas con éter etílico y sometidas a laparotomía para la obtención del útero, posteriormente fueron sacrificadas por dislocación cervical. Inmediatamente los embriones fueron obtenidos en condiciones estériles y colocados individualmente en microtubos de plástico con capacidad de 2.0 mL, con 1.0 mL del medio correspondiente (previamente gasificado durante 3-5 minutos con una mezcla de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> 20%:5% en balance de nitrógeno). Los embriones se incubaron por rotación a 30 rpm, a 37°C, durante 24h, empleando un Rotocell®.

## **Análisis morfológico**

Al finalizar la incubación, los embriones fueron examinados, empleando un microscopio estereoscópico. El análisis morfológico consistió en la cuantificación de somitas, la longitud céfalo-caudal, el diámetro del saco vitelino, el diámetro de cabeza, y la presencia o ausencia de latido del corazón. Se midió el índice o *score* morfológico (Klug et al., 1985) modificado por Chirino (2007), basado en diferentes parámetros que se muestran en la tabla 2. Se tomaron fotografías (aprox. 3) de todos los embriones, mientras conservaban el latido cardiaco.

Con el fin tener parámetros de comparación se obtuvieron embriones de 11.5 dpc como control externo (Ctr 11).

Tabla 2. Registro morfológico de los embriones. (Klug *et al.*, 1985 modificada por Chirino, 2007).

Parámetros	Puntos	Significado
Forma del embrión	5	Flexión completa, embrión en forma de "G"
	4	Flexión casi completa, embrión en forma de "C"
	3	Flexión incompleta, embrión en forma de "I"
Desarrollo de tubo neural	5	Completamente cerrado
	4	Neuroporo caudal abierto
	3	Neuroporos craneal y caudal abiertos
	2	Neuroporo craneal abierto
Forma de la cabeza	3	Telencéfalo separado del diencéfalo por una fisura
	2	No hay separación entre telencéfalo y diencéfalo
Desarrollo del ojo	6	Párpado superior presente
	5	Bolsa del cristalino presente
	4	Vesícula óptica presente
	3	<i>Sulcus</i> óptico presente
	2	Primordio ocular ausente
Desarrollo del oído	6	Saco endolímfático presente
	5	Receso dorsal presente
	4	Vesícula ótica presente
	3	Fosas óticas presentes
	2	Fosas óticas ausentes
Desarrollo de miembros anteriores	6	Completo
	5	Primordio de extremidad (longitud más del doble que la base)
	4	Primordio de extremidad (longitud igual o mayor, pero menor que el doble de la base)
	3	Rudimento de extremidad (longitud menor que la de la base)
	2	Ausencia de primordio
Desarrollo de miembros posteriores		Ver "desarrollo de miembros anteriores"
Desarrollo de la cola	5	Cola alargada y se pueden reconocer los somitas de la cola
	4	Cola alargada, pero no se reconocen los somitas
	3	Primordio de la cola
	2	Ausencia de primordio de la cola
Presencia de sangre	4	Circulación sanguínea reconocible
	3	Islotes sanguíneos reconocibles
	2	No hay indicación de la formación de sangre
<b>REGISTRO EMBRIONARIO TOTAL</b>		<b>SUMA DE LOS DIGITOS ASIGNADOS (MAXIMO 50 PUNTOS)</b>

## **Inmunofluorescencia y ensayo TUNEL**

Para este fin, algunos de los embriones postcultivo se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS frío durante 24 h. Posteriormente el material fue deshidratado con alcoholes ascendentes. Para el proceso de aclaramiento se empleó aceite de cedro y cloroformo. Los embriones fueron incluidos en Paraplast Plus (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania). Los bloques fueron cortados a 8  $\mu\text{m}$  empleando un micrótomo de rotación RM2125RTS (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania), los cortes se colocaron en portaobjetos tratados previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA). Las laminillas se desparafinaron a 60°C por 60 min y fueron rehidratadas con alcoholes ascendentes. La técnica de apoptosis fue realizada siguiendo las especificaciones del fabricante, empleando el kit de TUNEL (ApopTag, Merck, Darmstadt, Alemania), consecutivamente el anticuerpo primario de Pax3 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) fue adicionado y las laminillas se incubaron toda la noche en una cámara humedad a 4°C, el reconocimiento de Pax se realizó a través de la incubación de anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 595 durante 4 h. Los núcleos se contrastaron con DRAQ7 (Biostatus Limited, UK) por 20 minutos. Las laminillas fueron observadas en microscopio confocal modelo Axiovert 100M (Zeiss, Oberkochen, Alemania), empleando PBS-glicerol como medio de montaje.

## **Extracción de RNA**

Posterior al cultivo, los embriones fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C en un ultracongelador REVCO, hasta su uso, que por lo general fue dentro de las dos semanas después de la obtención de los mismos. La extracción del ARN se llevó a cabo mediante el método de tiocianato de guanidina, utilizando el reactivo Trizol (Ambion, Thermofisher, USA), de acuerdo al instructivo. De manera individual, los embriones fueron homogeneizados en frío y lisados con 1 mL de Trizol. Para la extracción del ácido nucleico, a cada una de las muestras se les agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo grado biología molecular y se mezclaron en vórtex por 30 segundos, se dejaron reposar por 3 min y se centrifugaron a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue trasferida a un microtubo eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se dejaron reposar a -20°C toda la noche para favorecer la precipitación de ARN. Al siguiente día, las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Para el lavado

del botón de ARN, se les agregó, 1 mL de etanol al 75% a cada una de las muestras, se mezclaron en vórtex, se centrifugaron a 7500 g por 5 min a 4°C, y se decantó completamente el sobrenadante. El lavado del botón de ARN se repitió dos veces más. Finalmente, el ácido nucleico se dejó secar al aire por no más de 10 minutos a temperatura ambiente. El botón se rehidrato con agua libre de RNAsas, incubando las muestras por 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se dejó secar en un bloque térmico por 15 min a 55°C (Chomczynski, 1993). La concentración del ARN se midió mediante absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta. El cociente A260/A280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.8 y 2.2.

### **Síntesis del cDNA**

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 20 µL, utilizando como iniciadores hexanucleótidos al azar y taq polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Un microgramo de ARN disuelto en agua se incubó durante 10 min a 70°C para su desnaturalización. Posteriormente se añadió la mezcla de la reacción, la cual contenía: amortiguador (MgCl<sub>2</sub> 4 mM), hexanucleótidos al azar (25 µg/µl), inhibidor de RNAsas (20 U), dNTPs (1 mM), y transcriptasa inversa (100 U). Todos los reactivos de esta técnica correspondieron a un kit de la marca Promega (Madison, Wisconsin, Estados Unidos). La reacción se mantuvo durante 5 min a temperatura ambiente y después se incubó durante 1 hora a 42°C, seguido de 15 minutos a 70°C. Por último, se agregó a cada tubo 30 µL de agua y se guardó a -20°C hasta el momento de su uso.

### **PCR tiempo real**

Con la finalidad de medir la expresión del gen Pax3, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) en un sistema Mx30005Tm QPCR y se analizó con un programa MxPro QPCR versión 3.00. Se utilizó Syber Green (Applied Biosystem, Foster City, California, Estados Unidos) como fluorocromo. Las secuencias de todos los iniciadores se diseñaron mediante el programa *Primer3*. Se utilizaron las secuencias FW: ACCAGG CAT GGA TTT TCA AG y RV: ACC GTG GTT GGT CAG AAG TC. También se analizó la expresión del gen constitutivo GAPDH con las secuencias FW: ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC y RV: GAA GGC AGC CCT GGT AAC C. La reacción

de amplificación se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ l, la cual contenía: Syber Green (concentración final), iniciador FW (0.8  $\mu$ L) (IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos), iniciador RV (0.8  $\mu$ L) (IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos) y 100 ng de ADN complementario. Las condiciones de amplificación más adecuadas se consiguieron realizando un primer ciclo de incubación 10 min a 95°C; seguido de 40 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 30s; las temperaturas de la curva de disociación fueron 95°, 55°, 95°. La cuantificación relativa se realizó comparando el nivel de expresión de Pax3 y la expresión del gen constitutivo GAPDH. El análisis de los datos se realizó mediante el método  $\Delta\Delta$ Ct. Este método utiliza el valor del ciclo umbral (CT) generado del sistema de QPCR (Livak y Schmittgen, 2001).

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa MINITAB versión 17. Los datos morfológicos con escala cuantitativa fueron presentados en gráficas de barras representando el promedio  $\pm$  desviación estándar con un valor  $p < 0.05$ . Las diferencias estadísticas se establecieron por ANOVA para las mediciones cuantitativas y para los datos semicualitativos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

En el caso de la presencia de Pax3 y de apoptosis los datos presentados se obtuvieron de manera observacional, tomando en cuenta las áreas más representativas de aproximadamente 5 fotos por corte histológico.

La expresión relativa de Pax3 se determinó por el método de  $\Delta\Delta$ Ct, las diferencias significativas se establecieron por ANOVA paramétrica a partir de las medias estadísticas de los datos obtenidos con un valor  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Análisis e índice morfológico

Por medio de la observación directa a los embriones después de ser cultivados durante 24 horas en diferentes medios, se determinó que los individuos expuestos a altas concentraciones de glucosa presentaron como rasgos principales retraso en el crecimiento y una torsión antinatural, además de fallas en el cierre del tubo neural, y en el desarrollo cardíaco, en comparación con los embriones cultivados en presencia de las poliaminas, quienes mostraron un nivel de desarrollo mucho más similar al observado en los especímenes del grupo control, exhibiendo una torsión normal, así como un desarrollo de tubo neural y cardíaco correspondiente a la edad gestacional (figura 6).

Para poder comprender el daño que generó el exceso de glucosa en el desarrollo del embrión y visualizar efecto protector de las poliaminas espermina y espermidina, se realizó un minucioso análisis morfológico semicuantitativo, que incluyó el diámetro del saco vitelino (figura 7A), la longitud céfalo-caudal (figura 7B), la longitud de la cabeza (figura 7C) y conteo de los somitas (figura 8A), además del índice morfológico (Klug *et al.* 1985) (figura 8B). De esta manera encontramos diferencias significativas en el grupo tratado con glucosa respecto al grupo control ( $p < 0.001$ ) y los grupos de espermina y espermidina ( $p < 0.001$ ).

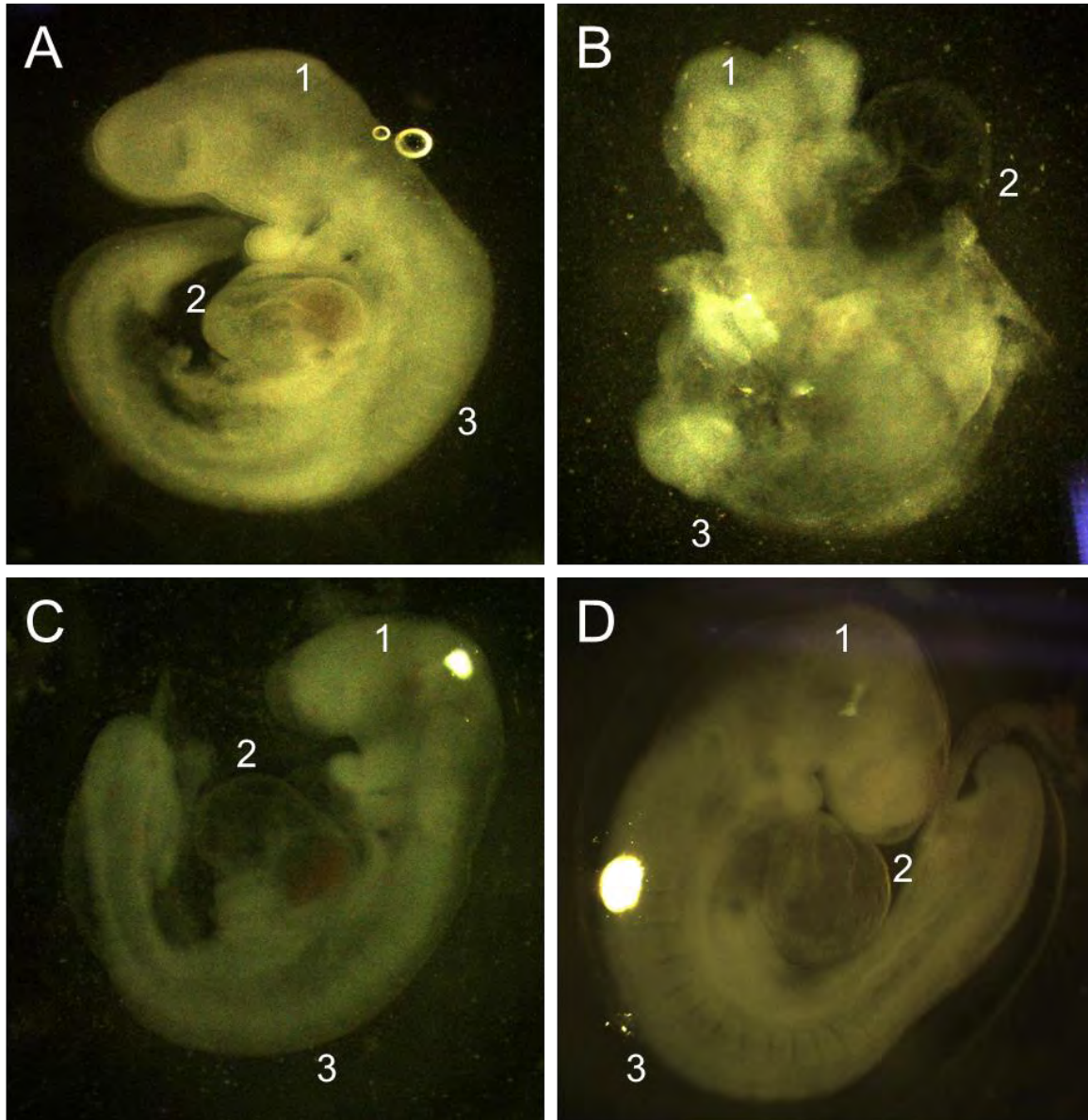


Figura 6. A. Control. B. Glucosa. C. Glucosa + espermina. D. Glucosa + espermidina. Embriones de 10 días de gestación cultivados 24 horas in vitro. Los embriones fueron observados en un microscopio estereoscópico con un aumento de 4x. 1. Tubo neural. 2. Corazón. 3. Somitas.



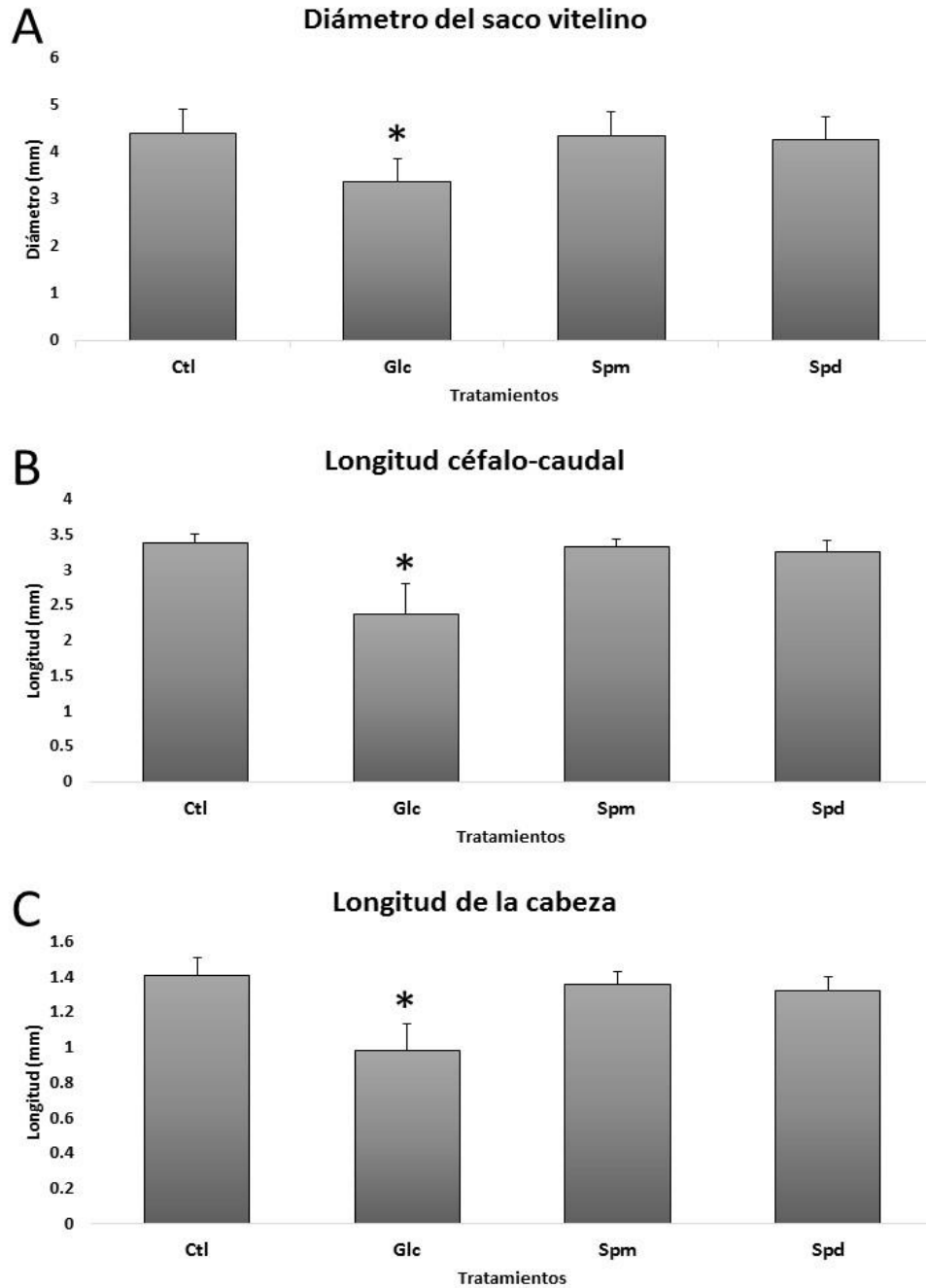


Figura 7. A. Diámetro del saco vitelino. B. Longitud cefalo-caudal. C. Longitud de la cabeza. Los embriones fueron cultivados por 24 h, posteriormente se observaron en un microscopio estereoscópico con un aumento de 4x. Promedio  $\pm$  error estándar de 20 determinaciones. El grupo "Glc" es estadísticamente diferente del control,  $p < 0.05$ . Los grupos con poliaminas son estadísticamente diferentes del de glucosa. Ctl: control; Glc: glucosa; Spm: glucosa + espermina; Spd: glucosa + espermidina.

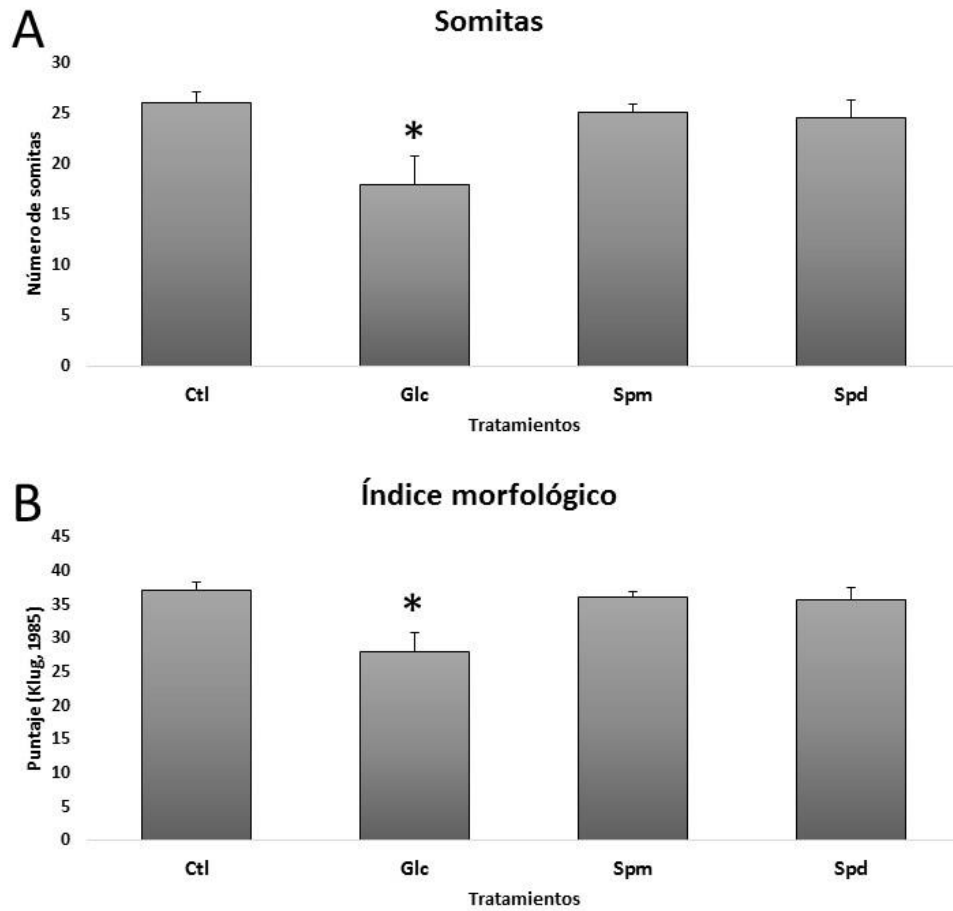


Figura 8. A. Número de somitas. B. Índice morfológico. Los embriones fueron cultivados por 24 h, posteriormente se observaron en un microscopio estereoscópico con un aumento de 4x. Promedio  $\pm$  error estándar de 20 determinaciones. El grupo "Glc" es estadísticamente diferente del control,  $p < 0.05$ . Los grupos con poliaminas son estadísticamente diferentes del de glucosa. Ctl: control; Glc: glucosa; Spm: glucosa + espermina; Spd: glucosa + espermidina.

## **Analisis de la expresion de Pax 3 y apoptosis en embriones de rata cultivados *in vitro***

En la figura 9, puede observarse un corte longitudinal de embrión de grupo control con la finalidad de tener una idea de que zonas fueron las estudiadas.

Con respecto a las características del tejido puede apreciarse que en ambos controles los núcleos se encuentran mejor organizados y uniformes, mientras que en los grupos expuestos a glucosa se observan núcleos poco regulares en tamaño y forma, así como una segregación poco habitual, indicando que en estos casos los tratamientos con poliaminas no fueron suficientemente efectivas para evitar el daño.

Las observaciones realizadas en la región del tubo neural (figura 10) mostraron que la proteína de Pax 3 en los grupos controles se encuentra de manera citoplasmática, mientras que en los cortes de los individuos expuestos a altas concentraciones de glucosa, con o sin poliaminas, se observan en regiones nucleares. La apoptosis se visualizó principalmente en los grupos expuestos a altas concentraciones de glucosa, con o sin poliaminas, y fue notoria una reducción en la frecuencia de aparición de está en el grupo adicionado con glucosa + espermina.

En cuanto a la zona cardiaca (figura 11) la localización de la proteína de Pax 3 se observó de manera citoplasmática en los grupos controles, y al igual que en la región de tubo neural, en los individuos cultivados con altas concentraciones de glucosa, Pax3 se observó en los núcleos. La apoptosis se encontró con el mismo comportamiento que en la zona de tubo neural y se vió disminuida en el grupo tratado con espermina.

También pudimos observar que contrario a lo esperado, existe una co-localización de Pax3 y señal de TUNEL en los casos de los grupos tratados con glucosa, incluso en los adicionados con poliaminas, lo que indica que aun cuando hay expresión de Pax3 estas células son propensas a sufrir apoptosis. Todo lo anterior se observó tanto en cortes cardiacos como de tubo neural.

Es importante resaltar que si bien el grupo tratado con espermina y el tratado con espermidina se presentan de manera anormal, existe una gran diferencia en cuanto a la cantidad de células apoptóticas, siendo el grupo adicionado con espermina el menormente afectado por este proceso.

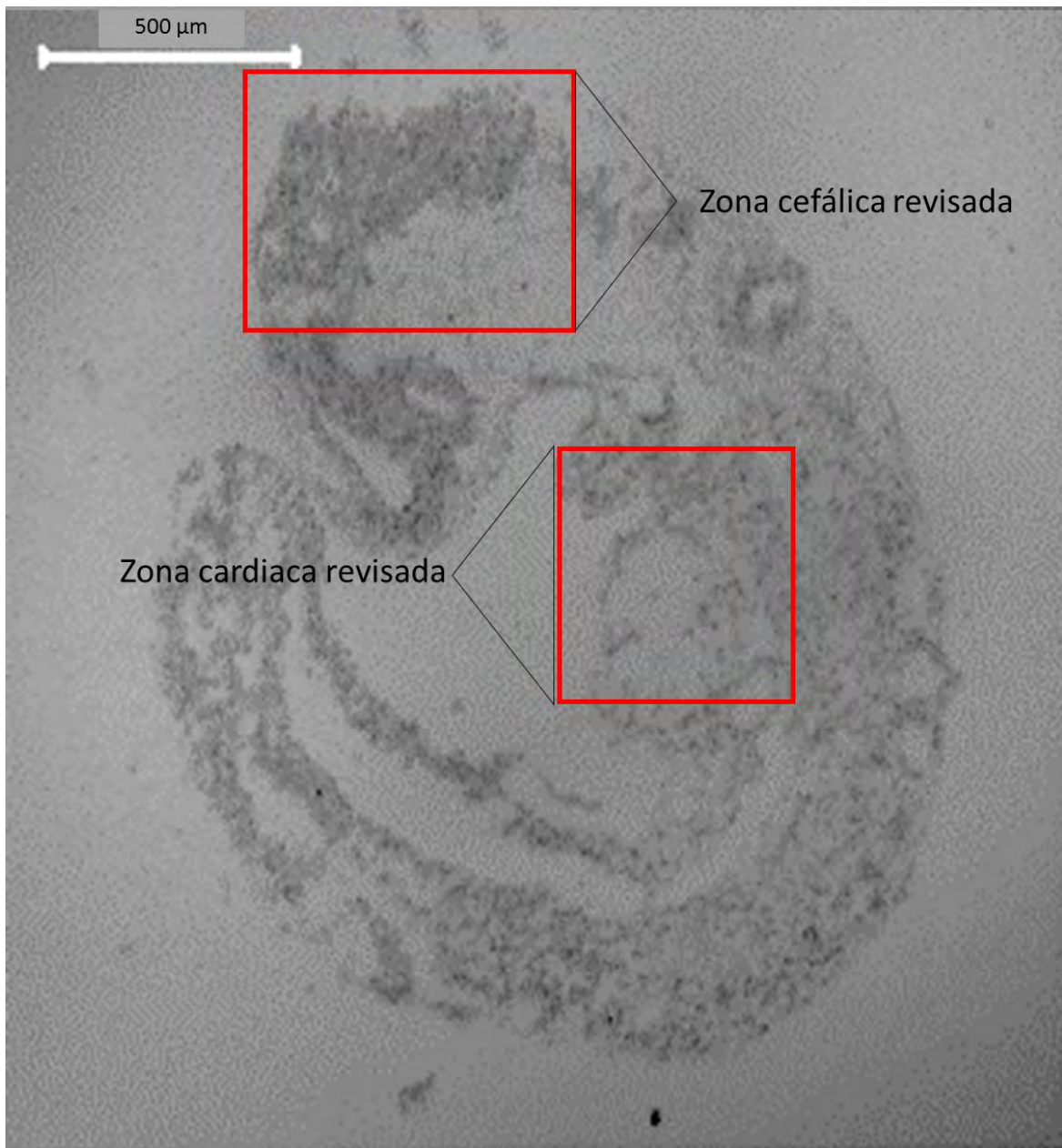


Figura 9. Esquema panorámico de las regiones analizadas para Pax3 y apoptosis.

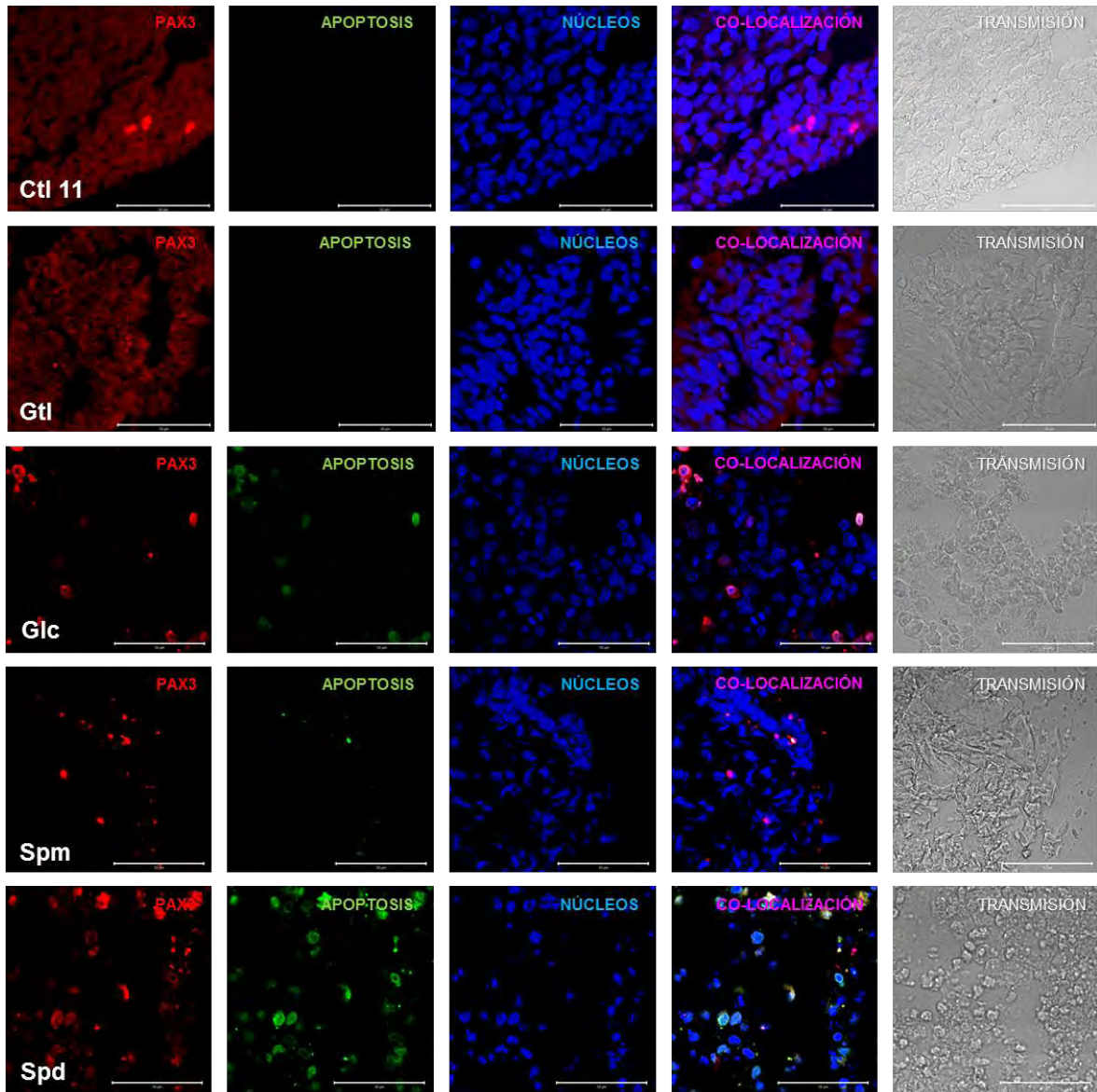


Figura 10. Inmunofluorescencia para Pax3 y TUNEL para observar apoptosis. Región cefálica en plano frontal. Aumento 40X, la escala representa 50 µm.



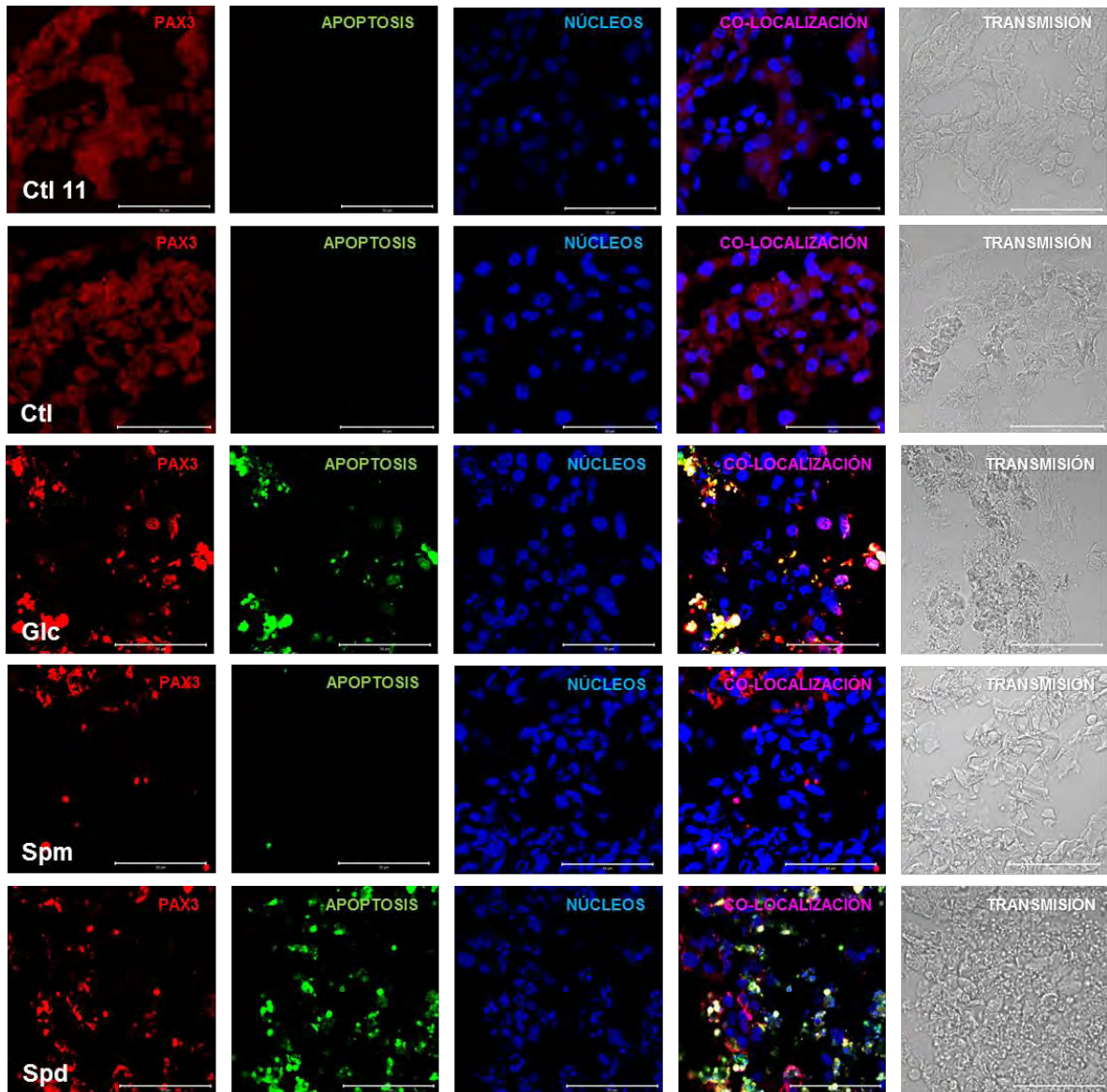


Figura 11. Figura 10. Inmunofluorescencia para Pax3 y TUNEL para observar apoptosis. Región cardiaca en plano frontal. Aumento 40X, la escala representa 50 µm.

### **Análisis de la expresión del mensajero de Pax3 en embriones de rata cultivados *in vitro***

La expresión del mensajero de Pax3 se evaluó en todos los grupos. Los CTs de todos los grupos cultivados, al ser normalizados con la expresión obtenida en el grupo Ctl 11 evidenció que, aunque el cultivo *in vitro* es óptimo para el crecimiento de embriones destinados a la investigación, no es capaz de igualar al 100% la expresión genética del individuo en desarrollo en un medio *in vivo*, al menos esto se observó con respecto a la expresión del gen Pax3 (Figura 12A).

En cuanto a la expresión de Pax 3 en los grupos cultivados en altas concentraciones de glucosa con o sin poliaminas, normalizados con los datos obtenidos en el grupo control cultivado, reveló una reducción en la expresión del mensajero en el grupo de alta glucosa, comparada con el resto de los grupos. Los grupos suplementados con las poliaminas mostraron una recuperación en la expresión de Pax 3, y aunque no se encontraron diferencias estadísticas, se observa que este efecto es más notorio en el grupo adicionado con espermina (Figura 12B).

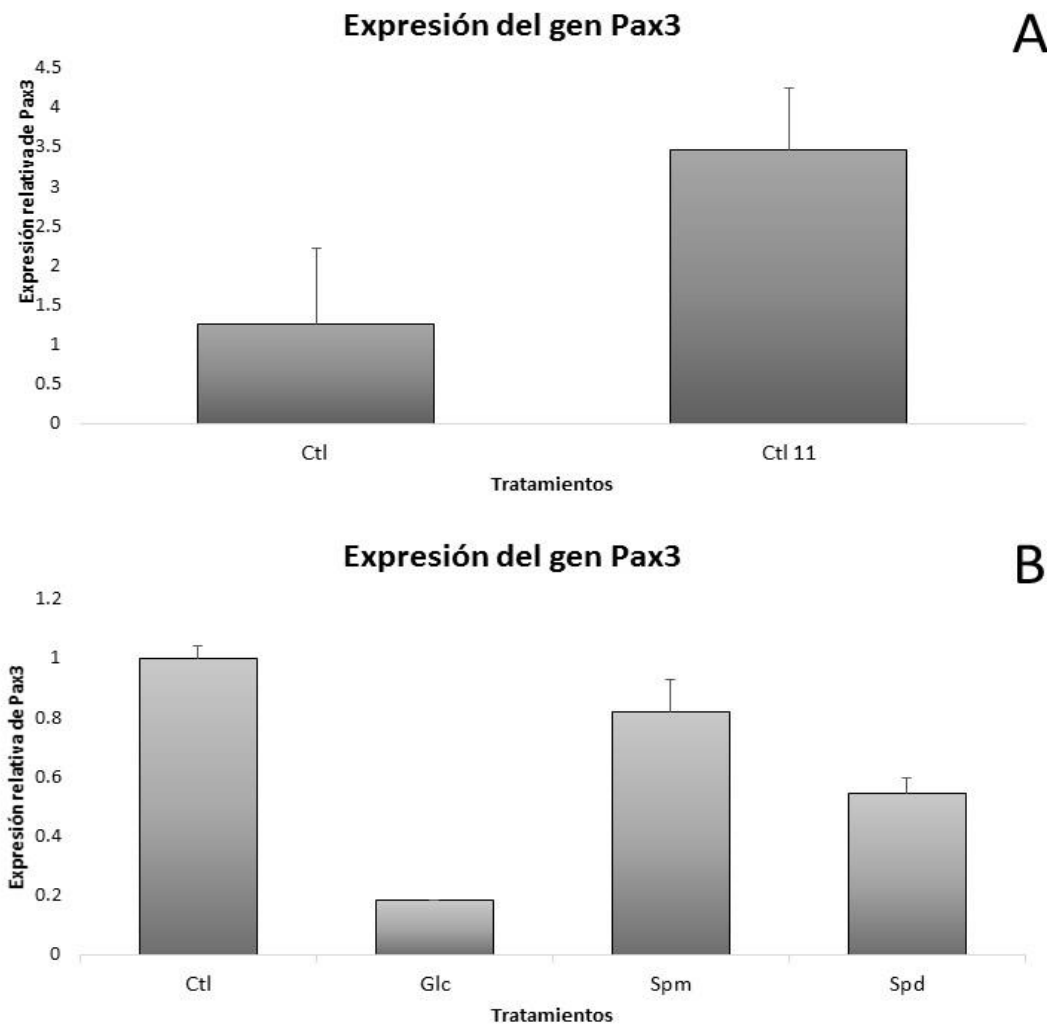


Figura 11. A. Expresión del gen Pax3 en los dos grupos controles, el cultivado (Ctl) y el in vivo obtenido el día 11 de gestación (Ctl 11). Promedio  $\pm$  error estándar de 3 determinaciones. B. Expresión del Pax3 en embriones cultivados en diferentes medios por 24h. Promedio  $\pm$  error estándar de 3 determinaciones. Si bien el grupo Glc no es estadísticamente diferente del control, se puede decir que la tendencia a una menor expresión es muy fuerte. Ctl: control; Glc: glucosa; Spm: glucosa + espermina; Spd: glucosa + espermidina.



## DISCUSIÓN

El síndrome denominado “embriopatía diabética” es el resultado de la exposición del embrión en sus primeras etapas de formación a un ambiente de diabetes materna (Chappell *et al.*, 2009). Aunque existen varias investigaciones en torno a la etiología de la teratogénesis asociada a la diabetes materna, aún no se conocen todos los procesos vinculados a esta, no obstante, la mayoría de los autores coinciden en que la hiperglucemia daña severamente el desarrollo (Goldman *et al.*, 1985; Mattos *et al.*, 2007; Wentzel *et al.*, 2003), además de causar un retraso general en el desarrollo físico, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro* (Chirino-Galindo *et al.*, 2009; Méndez y Palomar-Morales, 1999; Wentzel y Eriksson, 2005). Al respecto, en este trabajo se encontró que en general el desarrollo y crecimiento de los embriones cultivados en presencia de elevada glucosa sin adiciones, está muy por debajo de las características normales. De forma interesante los embriones incubados en medio suplementado con poliaminas espermina y espermidina se comportaron similar a los incubados en condiciones control. Lo anterior puede atribuirse a dos razones claramente distinguibles, una es el hecho de que el exceso de glucosa ocasiona ese comportamiento del individuo en desarrollo y otra es debido al aporte de las poliaminas al medio.

Diversos estudios han puesto de manifiesto el papel fundamental de las poliaminas en procesos de crecimiento desde organismos como las bacterias (Herbst y Snell, 1948; Mager *et al.*, 1954; Martin *et al.*, 1952), *D. melanogaster* (Dion y Herbst, 1970) mientras que en eucariotas, su función está demostrada en hígado (Raina *et al.*, 1970), sistema nervioso (Kremzner *et al.*, 1970) y en general en embriones de pollo (Caldarera y Moruzzi, 1970). Al respecto, estudios de cultivo *in vitro* demostraron que la adición de concentraciones micromolares de las poliaminas espermina y espermidina al medio de crecimiento de embriones de rata frena los efectos adversos en la morfología de embriones expuestos a un medio “hiperglucémico (Chirino-Galindo *et al.*, 2009, 2012).

Una de las malformaciones más frecuentes observadas, en los embriones cultivados con glucosa en el presente estudio fue la ausencia del cierre del tubo neural, estos hechos son congruentes con reportes de diversos grupos de trabajo, tanto en humanos como en modelos animales (Becerra *et al.*, 1990; Freinkel, 1988; Kucera, 1971; Martínez-Frías, 1994; Miodovnik *et al.*, 1988).

El estudio de la patogénesis de los defectos congénitos a causa de la embriopatía diabética, realizado en animales de experimentación, reveló un complejo proceso en el estado diabético, que induce alteraciones en una serie de vías metabólicas interrelacionadas que conducen a la teratogenicidad al interferir la expresión de importantes genes del desarrollo embrionario (García y García, 2009).

Cabe mencionar, que algunos estudios sugieren que el aumento de defectos del tubo neural durante la embriopatía diabética está asociado a la reducción de la expresión de Pax3, ya que es un factor de transcripción que se requiere para el desarrollo del tubo neural (Chang *et al.*, 2003; Fine *et al.*, 1999). Al respecto Phelan *et al.* (1997) encontraron una reducción en la expresión del mensajero de Pax3 en las zonas del mesencéfalo y el rombencéfalo en embriones de 10.5 días de desarrollo, de ratonas diabéticas. Por su parte Fine *et al.* (1999) concluyeron que la glucosa puede ser el estímulo necesario para inhibir la expresión de Pax3, sin necesidad de otras alteraciones metabólicas. Estos antecedentes son consistentes con nuestros resultados, al analizar la expresión del mensajero de Pax3 en el grupo con alta glucosa, pese a que no fue posible determinar diferencias significativas con respecto al control, si notamos baja expresión del Pax3 en comparación con el resto de los grupos.

Hasta este momento, Pax3 es uno de los genes más estudiado para poder comprender por qué es que la hiperglucemia ocasiona fallos en el cierre del tubo neural y como consecuencia malformaciones a nivel del sistema nervioso central en los hijos de madres diabéticas (Conway *et al.*, 2000; Epstein *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2008).

Por otro lado, Chang *et al.* (2003), mediante la inducción de estrés oxidativo con antimicina A (AA) en un modelo *in vivo* de ratón diabético, encontraron que no se inhibió la actividad de Pax3 ni se generaron rupturas en la cadena de ADN, por lo tanto, la expresión del Pax3 está dada por un estado redox que altera las moléculas de señalización que regulan la inducción de la expresión de dicho gen. Es común el uso de moléculas con propiedades antioxidantes para intentar reducir o vedar los efectos de la embriopatía diabética. Así mismos, existen reportes de que las vitaminas C y E, la N-acetilcisteína, el ácido fólico, etc., ayudan contrarrestar los daños ocasionados por un medio de desarrollo hiperglucémico. Por su parte Gaboriau *et al.* (2005) observaron que células con nulas reservas de poliaminas son altamente sensibles al ataque oxidativo, también observaron que las células responden al estrés oxidativo incrementando la biosíntesis de poliaminas y su captación. Se sabe que las poliaminas son importantes antioxidantes fisiológicos, por lo cual pueden

proteger el DNA, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo (Chattopadhyay et al., 2003). Aunque en este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de las poliaminas, resultados previos de nuestro grupo de investigación señalaron que su adición al medio de cultivo “hiperglucémico” revierte la lipoperoxidación a niveles normales, lo que se correlaciona con su poder embrioprotector (Chirino-Galindo et al., 2012).

Por otro lado, determinamos por análisis de expresión del mensajero de Pax3 diferencias significativas entre el grupo control cultivado y el control externo de 11.5 días, dejando ver que, aunque el control cultivado no estuvo expuesto a un tratamiento adicional, las condiciones *in vitro* no lograron ser idénticas a las condiciones de desarrollo *in vivo*. Al respecto, Ellington (1997) al realizar una minuciosa comparación entre trabajos de cultivo *in vitro* vs *in vivo* de embriones murinos, llegó a la conclusión de que, el cultivo *in vitro* constituye una herramienta fundamental para la investigación de los efectos de factores únicos asociados con la diabetes en etapas precisas del desarrollo, pero los resultados obtenidos de ellos deben ser extrapolados a condiciones *in vivo* con extrema precaución.

Como se mencionó anteriormente, debido a sus propiedades antioxidantes las poliaminas espermina y espermidina se utilizaron para neutralizar los efectos provocados por la embriopatía diabética (Chirino-Galindo et al. 2009). Chirino-Galindo et al. (2012) demostraron en embriones de rata *in vitro*, que la suplementación con espermina o espermidina, reduce los niveles de lipoperoxidación ocasionada por la exposición al medio alto en glucosa. Pese a que en el presente estudio, no evaluamos el estrés oxidativo, es necesario destacar que la expresión del mensajero de Pax3 en los embriones tratados con espermidina o espermina en el medio de cultivo fue similar a la determinada en los embriones control.

Además de una protección antioxidante por parte de las poliaminas; el efecto antiteratogénico podría deberse a su propiedad antiglicosilante. La glicación no enzimática es la base de las complicaciones de la diabetes debida a la hiperglucemia (Singh et al., 2001). En un primer momento se da lugar a la formación de productos de Amadori o fructosaminas y después se forman los productos de glicación avanzada (AGEs) (Ulrich y Cerami, 2001). Gugliucci y Menini (2003) en cultivos *in vitro* de timo fetal y eritrocitos de origen bovino, comprobaron que la espermina inhibe el avance de la glicación en histonas y en la ubiquitina, y que inhibe la glicación inducida experimentalmente por el metilglioxal; además, que la espermina y la espermidina actúan como inhibidores de los AGEs. Esto último, puede ser una de las razones por las cuales los embriones cultivados en medio con

una elevada concentración de glucosa y suplementado con poliaminas presentaron una menor incidencia en malformaciones congénitas y un mejor nivel de desarrollo.

Ciertas evidencias proponen que las poliaminas pueden actuar en procesos epigenéticos, debido a que afectan la conformación del ADN, así como la condensación de la cromatina, cuando se encuentran en alta concentración, ya que las poliaminas son capaces de resolubilizar la cromatina, exponiendo el ADN y posiblemente permitiendo el acceso a la maquinaria de transcripción y replicación (Sharma *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que las poliaminas naturales, tienen mecanismos de acción diferentes; así, la putrescina podría efectuar su función biológica por participación en la regulación de la presión osmótica; la espermidina activaría la síntesis de proteínas por su conversión a hipusina dentro del factor de transcripción eIF5A; y la espermina participaría más activamente en las reacciones dependientes de ATP debido a que estabiliza a esta molécula mejor que los cationes metálicos y las otras dos poliaminas (revisado por Igarashi y Kashiwagi, 2010). De esta manera, los niveles de expresión de Pax3 determinados en los grupos tratados con poliaminas, es probable que sea debido a la participación de la espermina en la modificación post-traducciona que realiza al factor de iniciación de la traducción eucariótica 5A-1, una proteína que en humanos esta codificada por el gen eIF5A y aparentemente este factor puede influir en la disponibilidad de la maquinaria de traducción del ARN (Park *et al.*, 1981). Todos estos hechos nos permiten suponer que la espermina actuó como un componente importante para la síntesis del ARN de Pax3, requerido para el desarrollo del embrión. Por tanto las poliaminas podrían minimizar los efectos del medio alto en glucosa pero no pueden proteger al embrión en su totalidad.

Por otra parte, se describió que la apoptosis de diversos tejidos durante la embriopatía diabética está ligada al estrés oxidativo (Sanders *et al.*, 2014), no obstante, si el estrés oxidativo fuera el mecanismo directo que induce apoptosis en la embriopatía diabética, todas las células del embrión serian sensibles, pero no es así, ya que los daños inducidos están limitados al periodo de organogénesis. Así, lo que se ha teorizado es que el estrés oxidativo inhibe la expresión de Pax3 y es a través de esto que se genera una red de desregulación de vías que conducen a la apoptosis (Horal *et al.*, 2004) y de este modo el estrés oxidativo inducido en un embarazo diabético produce fallos en la expresión de genes que regulan la viabilidad de la célula de una manera selectiva (Morgan *et al.*, 2008).

La embriopatía diabética, además de los defectos del tubo neural, genera defectos cardíacos como transposición de las grandes arterias y los defectos del tabique auricular o ventricular (Loffredo *et al.*, 2001; Miodovnik *et al.*, 1988). Al respecto Chappel *et al.* (2009) revelaron que la falta de células de la cresta neural cardíaca (CNC) genera doble tracto de salida del ventrículo derecho; por lo que los embriones mueren a los 14.5 días (Amand *et al.*, 2006; Epstein, y otros, 2000). Además Pax3 se ha observado expresado en células de la cresta neural, principalmente (Conway *et al.*, 1997). Al respecto, Conway *et al.* (2000) demostraron que todos los defectos cardíacos observados en ratones *Spotch* (cepa de ratones deficientes en la expresión del gen Pax3, ya sea homocigotos o heterocigotos) se deben a la disminución en el número de células de la CNC pre-migratoria debido a la deficiencia de Pax3.

Por otra parte, Chappell *et al.* (2009) revelaron que la ausencia de Pax 3 en la CNC y las células neuroepiteliales induce apoptosis regulada por la proteína supresora de tumores p53 (Chappell *et al.*, 2009). En relación a estos hechos, observamos que la expresión del mensajero de Pax3 se redujo, mientras que la apoptosis se incrementó en corazón tubo neural de los embriones con alta glucosa y suplementados con espermidina. En contraste Forsberg *et al.* (1998) observaron pocas células apoptóticas dispersas en alantoides, epitelio del intestino anterior, neuroepitelio craneal y mesénquima craneal en embriones de ratón expuestos a altas dosis de glucosa, por lo que llegaron a la conclusión de que la capacidad inherente de las células embrionarias en crecimiento *in vitro* para entrar en apoptosis es baja y que la apoptosis de amplio espectro no es probable que desempeñe un papel importante en la dismorfogénesis inducida por diabetes.

Cuando no hay cierre del tubo neural, además de un exceso de apoptosis, puede presentarse también bajos niveles de proliferación celular (Wlodarczyk *et al.*, 1996). Palmer (2015) propone que Pax3 influye en una serie de vías de señalización y procesos celulares, incluyendo mecanismos generales tales como apoptosis y proliferación, y mecanismos específicos de tejidos, como la diferenciación de ciertos tipos de células y la migración celular.

No hay estudios que asocien directamente las malformaciones congénitas observadas en la embriopatía diabética con una disminución de la expresión de genes involucrados en la proliferación celular, así que este campo constituiría una nueva área de estudio para comprender mejor la patología.

Todo lo anterior lleva a inferir que si puede haber una contribución positiva por parte de las poliaminas a un desarrollo normal en individuos en riesgo de exposición a altas concentraciones de glucosa.

## CONCLUSIONES

- Un ambiente similar al embarazo diabético, induce malformaciones congénitas y retraso en el crecimiento de embriones de rata cultivados *in vitro*.
- La adición de las poliaminas espermina o espermidina a un medio de cultivo “hiperglucémico” favorece el desarrollo de los embriones expuestos, reduciendo la aparición de malformaciones congénitas causadas por la glucosa en exceso.
- La expresión del gen Pax3 al parecer es afectado directamente por el estrés oxidativo provocado por la embriopatía diabética.
- La presencia de las poliaminas espermina o espermidina en un ambiente “hiperglucémico” podría incrementar la expresión del gen Pax3.

## REFERENCIAS

- Acevedo L, C., López A, F., Sepúlveda B, S., y Espinoza F, V. (2007). Actividad de la glutatión reductasa en el embarazo diabético. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 72(2), 82-88.
- Algranati I, D., Serra M, P., Carrillo C, y González N, S. (2006). Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina decarboxilasa en *Trypanosoma cruzi*. *Rev Química Viva*, 5(2), 78-94.
- Allen D, A., Yagoob M, M., y Harwood S, M. (2005). Mechanisms of high glucose- induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem*, 16(12), 705-713.
- Alvarez-Bolado, G., y Swanson L, W. (1996). *Developmental brain maps: Structure of the embryonic rat brain*. Amsterdam: Elsevier Science .
- Amand T, R. S., Lu J, T., Zamora M, Gu Y, Stricker J, Hoshijima M, y Chien K, R. (2006). Distinct roles of HF-1b/Sp4 in ventricular and neural crest cells lineages affect cardiac conduction system development. *Develop Biol*, 291(2), 208-217.
- Balczarek K, A., Lai Z, C., y Kumar S. (1997). Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol*, 14, 829-842.
- Bandín C, S. (2016). *Expresión de los genes Pax en el SNC y análisis de la geoarquitectura embrionaria de la región talámica en "Xenopus laevis"*. Tesis doctoral: Universidad Complutense de Madrid.
- Barr F, G., Nauta L, E., Davis R, J., Schäfer B, W., Nycum L, M., y Biegel J, A. (1996). In vivo amplification of the PAX3-FKHR and PAX7-FKHR fusion genes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Hum Mol Genet*, 5, 15-21.
- Basch L, M., García-Castro, M. I., y Bronner-Fraser, M. (2004). Molecular Mechanisms of neural crest induction. *Birth Def Res*, 72, 109-123.
- Becerra J, E., Khoury M, J., Cordero J, F., y Erickson J, D. (1990). Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediatrics*, 85(1), 1-9.
- Blake J, A., y Ziman M, R. (2014). Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development*, 141(4), 737-751.
- Borycki A, G., Li J, Jin F, Emerson C, P., y Epstein J, A. (1999). Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development*, 126(8), 1665-1674.
- Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820.
- Buckingham M, y Relaix F. (2007). The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 645-673.



- Caldarera C, M., y Moruzzi G. (1970). Polyamines and nucleic acid metabolism in the chick embryo. *Ann. NY Acad. Sci*, 171(1), 709-722.
- Cao Y, Zhao Z, Eckert R, L., y Reece E, A. (2011). Protein kinase C $\beta$ 2 inhibition reduces hyperglycemia-induced neural tube defects through suppression of a caspase 8-triggered apoptotic pathway. *Am J Obstet Gynecol*, 204(3), 226- e1.
- Carlson B, M. (2005). *Embriología Humana y Biología del Desarrollo* (3a ed.). Madrid: Elsevier.
- Carpenter, M. (2007). Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. *Diabetes Care*, 30 S, 246-250.
- Cederberg J, Simán C, M., y Eriksson U, J. (2001). Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr. Res*, 49(6), 755-762.
- Chang T, I., Horal M, Jain S, K., Wang F, Patel R, y Loeken M, R. (2003). Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia*, 46(4), 538-545.
- Chappell J, H., Dan W, y Loeken M, R. (2009). Diabetes and apoptosis: neural crest cells and neural tube. *Apoptosis*, 14, 1472-1483.
- Chattopadhyay M, K., Tabor C, W., y Tabor H. (2003). Polyamines protect Escherichia coli cells from the toxic effect of oxygen. *Proc Natl Acad Sci*, 100(5), 2261-2265.
- Chi N, y Epstein J, A. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet*, 18, 41-47.
- Childs A, C., Mehta D, J., y Gerner E, W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci*, 60(7), 1394-1406.
- Chirino-Galindo, G., Baiza-Gutman, L. A., Barrera-Escorcía, E, y Palomar-Morales, M. (2009). Polyamines protect rat embryo in vitro from high glucose-induced developmental delay and dysmorphogenesis. *Birth Def Res Part B: Develop Reprod Toxicol*, 86(1), 58-64.
- Chirino-Galindo, G., Mejía-Zepeda, R., y Palomar-Morales, M. (2012). Change in lipoperoxidation but not in scavenging enzymes activity during polyamine embryoprotection in rat embryo cultured in hyperglycemic media. *In Vitro Cell Dev Biol An*, 48(9), 570-576.
- Chirino-Galindo, 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: UNAM.
- Chirino-Galindo, G., Barrera-Argüelles, J. I., Trejo-González, N. L., Mejía-Zepeda, R., y Palomar-Morales, M. (2017). Biphasic effect of alpha-linolenic acid on glucose-induced dysmorphogenesis and lipoperoxidation in whole rat embryo in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 484(4), 879-883.
- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15, 532-537.

- Conway S, J., Bundy J, Chen J, Dickman E, Rogers R , y Will B, M. (2000). Decreased neural crest stem cell expansion is responsible for the conotruncal heart defects within the Splotch (Sp2H)/Pax3 mouse mutant. *Cardiovasc Res*, 47(2), 314-328.
- Deutsch U, Dressler G, R., y Gruss P. (1988). Pax-1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell*, 53, 617-625.
- Diabetes, F. I. (2015). *Atlas de la diabetes*. España: España.
- Diabetes, F. M. (2014). *Diabetes en México*. Obtenido de <http://fmdiabetes.org/diabetes-en-mexico/>
- Dion A, S., y Herbst E, J. (1970). Polyamine changes during development of Drosophila melanogaster. *Ann NY Acad Sci*, 171(1), 723-734.
- Dong D, Yu J, Wu Y, Fu N, Villela N, A., y Yang P. (2015). Maternal diabetes triggers DNA damage and DNA damage response in neurulation stage embryos through oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 467, 407-412.
- Ebensperger C, Wilting J, Brand-Saberi, B., Mizutani Y, Christ B, Balling R, y Koseki H. (1995). Pax-1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos. *Anat Embryol*, 191, 297-310.
- Eccles M, R., y Schimmenti L, A. (1996). Pax3, neural crest and cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*, 6, 255-260.
- Ellington S, K. (1997). Effects of excess glucose on mammalian post-implantation embryos. *Int J Dev Bio*, 41, 299-306.
- Epstein J, A., Li J, Lang D, Chen F, Brown C, B., Jin F, y Lo C, W. (2000). Migration of cardiac neural crest cells in Splotch embryos. *Development*, 127(9), 1869-1878.
- Epstein S, K. (1996). Pax3, neural crest and cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*, 6, 255-260.
- Eriksson U, J., Borg L, A., Cederberg J, Nordstrand H, Simán C, M., Wentzel C, y Wentzel P. (2000). Pathogenesis of diabetes-induced congenital malformations. *Ups J Med Sci*, 105, 53-84.
- Fine E, Horal M, Chang T, Fortin G, y Loeken M. (1999). Hyperglycemia is responsible for altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects associated with diabetic pregnancy. *Diabetes*, 48, 2454-2462.
- Forsberg H, Eriksson U, J., y Welsh N. (1998). Apoptosis in embryos of diabetic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 83(3), 104-111.
- Freinkel N. (1988). Diabetic embryopathy and fuel-mediated organ teratogenesis: lessons from animal models. *Horm Metab Res*, 20(8), 463-475.
- Fu J, Tay S, S. W., Ling E, A., y Dheen S, T. (2006). High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia*, 49(5), 1027-1038.

- Gaboriau F, Vaultier M, Moulinoux J, P., y Delcros J, G. (2005). Antioxidative properties of natural polyamines and dimethylsilane analogues. *Redox Report*, 10(1), 9-18.
- García G, D., & García D, R. (2009). Avances en la patogénesis de la embriopatía diabética. *Rev Méd Chile*, 137, 1627-1635.
- Gâreskog M, Eriksson U, J., y Wentzel P. (2006). Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats. *Birth Def Res Part A: Clin Molec Teratol*, 76(6), 483-490.
- Gâreskog M, y Wentzel P. (2007). N-Acetylcysteine and  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid alter protein kinase C (PKC)- $\delta$  and PKC- $\zeta$  and diminish dysmorphogenesis in rat embryos cultured with high glucose in vitro. *J Endocrinol*, 192(1), 207-214.
- Gareskog M, Eriksson U, J., y Wentzel P. (2006). Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats. *Birth Def Res Part A: Clin Molec Teratol*, 76(6), 483-490.
- Ghafli M, H. M., Padmanabhan R, Kataya H, H., y Berg B. (2004). Effects of  $\alpha$ -lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. *Mol Cell Biochem*, 261(1), 123-135.
- Gilbert S, F. (2005). *Biología del desarrollo*. Buenos Aires: Panamericana.
- Goldman A, S., Baker L, Piddington R, Marx B, Herold R, y Egler J. (1985). Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 8227-8231.
- Goulding M, D., Chalepakis G, Deutsch U, Erselius J, R., y Gruss P. (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J*, 10(5), 1135.
- Goulding M, D., Lumsden A, y Gruss P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development*, 117, 1001-1016.
- Gugliucci A, y Menini T. (2003). The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci*, 72(23), 2603-2616.
- Guleria R, S., Pan J, Di Pette, D., y Singh U, S. (2006). Hyperglycemia inhibits retinoic acid-induced activation of Rac1, prevents differentiation of cortical neurons, and causes oxidative stress in a rat model of diabetic pregnancy. *Diabetes*, 28(2), 3326-3334.
- Guzmán-Juárez, N., y Madrigal-Bujaidar, E. (2003). Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 28(2), 14-23.
- Hall B. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci*, 33, 781-793.
- Herbst E, J., y Snell E, E. (1948). Putrescine as a growth factor for *Hemophilus parainfluenzae*. *J Biol Chem*, 176(2), 989-990.

- Hod M, Star S, Passonneau J, V., Unterman T, G., y Freinkel N. (1986). Effect of hyperglycemia on sorbitol and myo-inositol content of cultured rat conceptus: failure of aldose reductase inhibitors to modify myo-inositol depletion and dysmorphogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 140, 974-980.
- Horal M, Zhang Z, Stanton R, Virkamäki A, y Loeken M, R. (2004). Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: involvement in diabetic teratogenesis. *Birth Def Res Part A: Clin Molec Teratol*, 70(8), 519-527.
- Horton W, E., y Sadler T, W. (1983). Effects of maternal diabetes on early embryogenesis. Alterations in morphogenesis produced by the ketone body, B-hydroxybutyrate. *Diabetes*, 32, 610-618.
- Hoth C, F., Milunsky A, Lipsky N, Sheffer R, Clarren S, K., y Baldwin C, T. (1993). Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein- Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). *Am J Hum Genet*, 52, 455-462.
- Hunter E, S., y Sadler T, W. (1987). D-(–)-beta-hydroxybutyrate-induced effects on mouse embryos in vitro. *Teratology*, 36(2), 259-564.
- Hunter E, S., Sadler T, W., y Wynn R, E. (1987). A potential mechanism of DL-beta-hydroxybutyrate-induced malformations in mouse embryos. *Am J Physiol (Endocrinol Metabol)*, 253(1), E72-E80.
- Igarashi K, y Kashiwagi K. (2010). Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13, 243-248.
- Kandel E, R., y Schwartz J, H. (1991). *Principles of neural science*. New York: Elsevier.
- Kang J, S., y Krauss R, S. (2010). Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13, 243-248.
- Klug S, Lewandowski C, y Neubert D. (1985). Modification and standardization of the culture of early postimplantation embryos for toxicological studies. *Arch Toxicol*, 58, 84-88.
- Kremzner L, T., Barrett R, E., y Terrano M, J. (1970). Polyamine metabolism in the central and peripheral nervous system. *Ann NY Acad Sci*, 171(1), 735-748.
- Kucera J. (1971). Rate and type of congenital anomalies among offspring of diabetic women. *J Reprod Med*, 7, 61-70.
- Kumar S, D., Dheen S, T., y Tay S, S. (2007). Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development. *Cardiovasc Diabetol*, 6, 34.
- Lang D, Chen F, Milewski R, Li J, Lu M, M., y Epstein J, A. (2000). Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest*, 106, 963-971.

- Li-R, Thorens B, y Loeken Mr. (2007). Expression of the gene encoding the high-K (m) glucose transporter 2 by the early postimplantation mouse embryo is essential for neural tube defects associated with diabetic embryopathy. *Diabetologia*, 50, 682-689.
- Livak K, J., y Schmittgen T, D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Loeken M, R. (2006). Advances in Understanding the Molecular Causes of Diabetes- Induced Birth Defects. *J Soc Gynecol Investig*, 13(1), 1-10.
- Loffredo C, A., Wilson P, D., y Ferencz C. (2001). Maternal diabetes: an independent risk factor for major cardiovascular malformations with increased mortality of affected infants. *Teratology*, 64(2), 98-106.
- López-Contreras, A. J. (2008). *Caracterización de ODCp como una nueva proteína inhibidora de antizimias (AZIN2). Aspectos estructurales y funcionales*. Tesis de licenciatura: Universidad de Murcia.
- López-Juez, M. J. (2009). *Evolución ontogenética de un sistema de neurotransmisión en encéfalo y médula de rata*. Tesis doctoral: Universidad Complutense de Madrid.
- Macchia P, E., Lapi P, Krude H, Pirro M, T., Missero C, Chiovato L, Di Lauro R. (1998). PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet*, 19, 83-86.
- Mager J, Traub A, y Grossowicz N. (1954). . Cultivation of Pasteurella tularensis in chemically defined media: effect of buffers and spermine. *Nature*, 174, 747-748.
- Malacara J, M., García-Viveros, M., y Valverde-Rodríguez, C. (1977). *Fundamentos de endocrinología clínica*. México DF: Biblioteca Medica Mexicana.
- Manner J, y Merkel N. (2007). Early morphogenesis of the sinuatrial region of the chick heart: a contribution to the understanding of the pathogenesis of direct pulmonary venous connections to the right atrium and atrial septal defects in hearts with right isomerism of the atrial sep. *Anat Rec*, 290, 168-180.
- Mansouri A, Stoykova A, y Gruss P. (1994). Pax genes in development. *J Cell Sci*, 18, 35-42.
- Martin Jr W, H., Pelcza Jr M, J., y Hansen P, A. (1952). Putrescine as a growth requirement for Neisseria. *Science*, 116(3018), 483.
- Martínez-Frías, M. L. (1994). Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in diabetic mothers: identification of the most characteristic and most frequent congenital anomalies. *Am J Med Gen*, 51(2), 108-113.
- Mattos I, Rodrigues L, T., Damasceno D, C., y Vieira M. (2007). Diabetes and pregnancy: an update of the problem. *ARBS Annu Rev Biomed Sci*, 9, 1-11.
- Méndez J, D., y Palomar-Morales, M. (1999). Embryotoxicity for diabetes induced in rat: prevention for L-arginine and polyamines. *Reprod Toxicol*, 13(6), 501-509.

- Mills J, L. (1979). Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implication for treatment. *Diabetes*, 28, 292-293.
- Mills J, L. (1982). Malformations in infants of diabetic mothers. *Teratology*, 25, 385-394.
- Miodovnik M, Mimouni F, Dignan P, S. J., Berk M, A., Ballard J, L., Siddiqi T, A., Tsang R, C. (1988). Major malformations in infants of IDDM women: vasculopathy and early first-trimester poor glycemic control. *Diabetes Care*, 11(9), 713-718.
- Monsouri A, Hallonet M, y Gruss P. (1996). Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol*, 8(6), 851-857.
- Moore D, C., Stanisstreet M, y Clarke C, A. (1989). Morphological and physiological effects of betahydroxybutyrate on rat embryos grown in vitro at different stages. *Teratology*, 40, 237-251.
- Morgan S, C; Lee H, Y; Relaix F; Sandell L, L; Levorse J, M; Loeken M, R;. (2008). Cardiac outflow tract septation failure in Pax3-deficient embryos is due to p53-dependent regulation of migrating cardiac neural crest. *Mech Develop*, 125(9), 757-767.
- Nelms B, L., Pfaltzgraff E, R., y Labosky P, A. (2011). Functional interaction between Foxd3 and Pax3 in cardiac neural crest development. *Genesis*, 49(1), 10-23.
- Neubûser A, Koseki H, y Balling R. (1995). Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev Biol*, 170, 701-716.
- New D, A. T. (1978). Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol Rev*, 53, 81-122.
- Nutt S, L., y Busslinger M. (1999). Monoallelic expression of Pax5: a paradigm for the haploinsufficiency of mammalian Pax genes? *Biol Chem*, 380, 601-611.
- Olaopa M, Zhou H, M., Snider P, Wang J, Schwartz R, J., Moon A, M., y Conway S, J. (2011). Pax3 is essential for normal cardiac neural crest morphogenesis but is not required during migration nor outflow tract septation. *Develop Biol*, 356(2), 308-322.
- Palmer A, J. (2015). *Cellular and molecular mechanisms underlying Pax3-related neural tube defects*. Tesis doctoral: University College London.
- Park M, H., Cooper H, L., y Folk J, E. (1981). . Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proc Natl Acad Sci*, 78(5), 2869-2873.
- Pavlinkova G, Salbaum J, M., y Kappen C. (2008). Wnt signaling in caudal dysgenesis and diabetic embryopathy. *Birth Def Res Part A: Clin Molec Teratol*, 10(1), 710-719.
- Pavlinkova G, Salbaum J, M., y Kappen C. (2009). Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC genomics*, 10(1), 274.
- Peters H, Doll U, y Niessing J. (1995). Differential expression of the chicken Pax -1 and Pax-9 gene: in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Dev Dyn*, 203, 1-16.

- Peters H, Neubüser A, Kratochwil K, y Balling R. (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev*, 12, 2735-2747.
- Phelan S, A., Ito M, y Loeken M, R. (1997). Neural tube defects in embryos of diabetic mice: role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes*, 46(7), 1189-1197.
- Raina A, Jänne J, Hannonen P, y Hölttä E. (1970). Synthesis and Accumulation of Poly Amines in Regenerating Rat Liver. *Ann NY Acad Sci*, 171(1), 697-708.
- Reece E, A., y Homko C, J. (1994). Infant of the diabetic mother. *Semin Perinatol*, 18, 459-469.
- Reece E, A., Ji I, Wu Y, K., y Zhao Z. (2006). Characterization of differential gene expression profiles in diabetic embryopathy using DNA microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 195(4), 1075-1080.
- Reece E, A., Ma X, D., Zhao Z, Wu Y, K., y Dhanasekaran D. (2005). Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy in rats: II, apoptotic pathways. *Am J Obstet Gynecol*, 192(3), 967-972.
- Restrepo O, O. (1992). Enfoque y manejo de la embarazada diabética. *Rev Colomb Obstet Ginecol*, 43(2), 97-108.
- Restrepo, O. O. (2000). Diabetes y embarazo. *Rev Colomb Obstet Ginecol*, 51(1), 1-32.
- Roest P, A., van Iperen L, Vis S, Wisse L, J., Poelmann R, E., Steegers-Theunissen, R. P., Adriana C. (2007). . Exposure of neural crest cells to elevated glucose leads to congenital heart defects, an effect that can be prevented by N-acetylcysteine. *Birth Def Res Part A: Clin Molec Teratol*, 79(3), 231-235.
- Ruiz-Cano, D., Pérez-Llamas, F., y Zamora S. (2012). Implicaciones de las poliaminas en la salud infantil. *Arch Argent Ped*, 110(3), 244-250.
- Sabater M. (2008). *Efectos de las poliaminas y los fructooligosacáridos de la dieta sobre la maduración intestinal en cerdos destetados precozmente*. Tesis doctoral: Universidad de Murcia, España.
- Salazar G, M. (2008). *Evaluación del efecto teratogénico de la diabetes inducida en rata sobre el desarrollo facial y de las extremidades*. Doctorado en Ciencias Biológicas: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- Salazar G, M., Revilla M, M. C., Palomino G, M. A., Arteaga, M. C., Díaz-Cintra, S., De La Rosa-Santander, P., Sánchez G, C. (2012). Chronological and morphological study of heart development in the rat. *Anat Rec*, 295(8), 1267-1290.
- Salbaum J, M., y Kappen C. (2010). Neural tube defect genes and maternal diabetes during pregnancy. *Birth Def Res Part A: Clin Molec Teratol*, 88(8), 601-611.
- Salud, S. d. (2001). *Programa de Acción: Diabetes Mellitus*. Obtenido de [http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/diabetes\\_mellitus.pdf](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/diabetes_mellitus.pdf)

- Sanders K, Jung J, H., y Loeken M, R. (2014). Use of a murine embryonic stem cell line that is sensitive to high glucose environment to model neural tube development in diabetic pregnancy. *Birth Def Res Part A: Clin Molec Teratol*, 100(8), 584-591.
- Singh C, K., Kumar A, Hitchcock D, B., Goodwin R, LaVoie H, A., Nagarkatti P, Singh U, S. (2011). Resveratrol prevents embryonic oxidative stress and apoptosis associated with diabetic embryopathy and improves glucose and lipid profile of diabetic dam. *Mol Nutr Food Res*, 55(8), 1186-1196.
- Singh R, Barden A, Mori T, y Beilin L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129-146.
- Sivan E, Lee Y, Wu Y, y Reece E. (1997). Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology*, 56, 343-349.
- Strielemann P, J., Connors M, A., y Metzger B, E. (1992). Phosphoinositide metabolism in the developing conceptus. Effects of hyperglycemia and scyllo-inositol in rat embryo culture. *Diabetes*, 41, 989-997.
- Stuart E, T., Kioussi C, y Gruss P. (1994). Mammalian Pax genes. *Annu Rev Genet*, 28, 219-236.
- Sugimura Y, Murase T, Kobayashi K, Oyama K, Hayasaka S, Kanou Y, Murata Y. (2009).  $\alpha$ -Lipoic acid reduces congenital malformations in the offspring of diabetic mice. *Diab Metab Res Rev*, 25(3), 287-294.
- Tassabehji M, Read A, P., Newton V, E., Harris R, Ballin R, Gruss P, y Strachan T. (1992). Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature*, 355, 635-636.
- Tébar M, F. J., y Escobar J, F. (2009). *La Diabetes Mellitus en la práctica clínica*. España: Panamericana.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classifi. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 20(7), 1183-1197.
- Thomas T, y Thomas T, J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, 58(2), 244-258.
- Ulrich P, & Cerami A. (2001). Protein glycation, diabetes, and aging. *Rec Progr Horm Res*, 56(1), 1-22.
- Uylings H, C Van Eden, Parnavelas J, y Karlsbeek A. (1990). *The prenatal and postnatal development of the rat cerebral cortex*. In: *The Cerebral Cortex of the Rat*. B. Kolb and R. Tees. Cambridge: MIT Press.
- Vitoratos N, Vrachnis N, Valsamakis G, Panoulis K, y Creatsas G. (2010). Perinatal mortality in diabetic pregnancy. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1205, 94-98.
- Waldo K, Miyagawa-Tomita, S., Kumiski D, y Kirby M, L. (1998). Cardiac neural crest cells provide new insight into septation of the cardiac outflow tract: Aortic sac to ventricular septal closure. *Dev Biol*, 196, 129-144.



- Wang L, Lin S, Yi D, Huang Y, Wang C, Jin L, Ren A. (2017). Apoptosis, expression of Pax3 and P53, and caspase signal in fetuses with neural tube defects. *Birth Defects Res*, 109(19), 1596-1604.
- Weigensberg M, J., García-Palmer, F. J., y Freinkel, N. (1990). Uptake of myo-inositol by early-somite rat conceptus. Transport kinetics and effects of hyperglycemia. *Diabetes*, 39, 575-582.
- Weksler-Zangen, S., Yaffe P, y Ornoy A. (2003). Reduced SOD activity and increased neural tube defects in embryos of the sensitive but not of the resistant Cohen diabetic rats cultured under diabetic conditions. *Birth Def Res Part A: Clin Molec Teratol*, 67(6), 429-437.
- Wentzel P, y 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: Clin Molec Teratol*, 73(7), 506-511.
- Wentzel P, Ejdesjo A, y Eriksson U, J. (2003). Maternal diabetes in vivo and high glucose in vi tro diminish GAPDH activity in rat embryos. *Diabetes*, 52, 1222-1228.
- Wlodarczyk B, C., Craig J, C., Bennett G, D., Calvin J, A., y Finnell R, H. (1996). Valproic acid-induced changes in gene expression during neurulation in a mouse model. *Teratology*, 54, 284-297.
- Zabihi S, Erikson U, J., y Wentzel P. (2007). Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes. *Reprod Tox*, 23, 486-498.
- Zaken V, Kohen R, y Ornoy A. (2001). Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology*, 64(1), 33-44.
- Zhao Z. (2010). Cardiac malformations and alteration of TGF $\beta$  signaling system in diabetic embryopathy. *Birth Def Res Part B: Develop Reprod Toxicol*, 89(2), 97-105.

