

70,
2ej

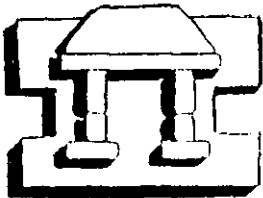


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

"EFECTOS TERATOGENICOS PRODUCIDOS POR
LA DIABETES INDUCIDA DURANTE LA
GESTACION EN LA RATA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
NORBERTO VAZQUEZ GOMEZ



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA. EDO. DE MEXICO.

1990
9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

270211



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCION	1
1. DIABETES MELLITUS Y GESTACION	6
2. TERATOGÉNESIS	7
3. TERATOGÉNESIS POR DIABETES MELLITUS	8
4. FACTORES CAUSALES DE LA TERATOGÉNESIS POR DIABETES MELLITUS	10
4.1 Hiperglucemia	
4.2 D-glucosa y otras hexosas	
4.3 Metabolismo del ácido araquidónico	
4.4 Vía del poliol	
4.5 Inhibidores de aldosa reductasa	
4.6 Prostaglandinas	
4.7 Radicales libres de oxígeno	
4.8 Cetosis	
4.9 Inhibidores de somatomedina	
4.10 Glucosilación de proteínas	
4.11 Efecto de la dieta	
4.12 Contenido de proteína y fibra	
4.13 Hipoglucemia	
5. INDUCCION DE DIABETES MELLITUS CON ALOXANA Y ALTERACIONES REPRODUCTIVAS	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
III. OBJETIVOS	22
IV. METODOLOGIA	24
1. Material biológico	
2. Apareamiento	
3. Determinación del peso materno	
4. Inducción química de la diabetes	
5. Determinaciones bioquímicas	
6. Determinación de los efectos teratogénicos	
7. Análisis estadísticos	
V. RESULTADOS	26
VI. DISCUSION	47
VII. CONCLUSIONES	56
VIII. REFERENCIAS	57

DEDICATORIAS

A mis padres: Antonio Vázquez García (†) y Arcelia Gómez Ayala (†) por todo lo que me dieronespecialmente la vida.

A mis hermanos por todo su apoyo, comprensión y por todos esos momentos que pasamos juntos en familia.

A mi hermana Lulú, por haber sido como mi segunda madre, por toda su ayuda, apoyo y comprensión.

A mis familiares y amigos

A mis sobrinos: Cuauhtémoc, Moisés, Xochitl, Fabio, Toño, Cuitláhuac (†), Gustavo, Laura, Alma, Adair, Miguel y Omar.

A mi amiga Dra. Magally Pineda y Téllez por su constante apoyo moral.

A mi querida amiga Mónica Chávez.

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi profundo agradecimiento a la Dra. Juana Alba Luis Díaz por su excelente calidad humana, por su invaluable amistad y por sus oportunos consejos que me han sido muy útiles.

Igualmente mi más sincero respeto y agradecimiento al M.V.Z. Agustín Carmona Castro por todas sus atenciones, valiosísima ayuda y por su amistad.

Deseo agradecer las finas atenciones del Biólogo Jorge Gersenowies quien realizó el tratamiento estadístico de este estudio.

Agradezco especialmente a los sinodales y director de tesis por sus indicaciones y sugerencias que enriquecieron e hicieron posible el presente trabajo.

Quiero agradecer de manera muy especial a la M. en C. Leticia Verdín Terán por todo su apoyo y por su desinteresada amistad.

A la familia Hernández Gordillo por toda la ayuda recibida y por la oportunidad que me dieron de ser su amigo.

RESUMEN

Con la finalidad de precisar una dosis adecuada de aloxana para la obtención de un modelo de diabetes tipo I complicada con gestación se probaron diferentes dosis de aloxana en el día cero de la gestación, por vía intraperitoneal en la rata Sprague-Dowley para fines de investigación. La dosis diabetógena mínima es de 120 mg/Kg de peso, sin embargo produce mortalidad embrionaria (reabsorción) en todos los casos, al día 10 de la gestación. Dosis de 90 a 110 mg/Kg producen diabetes en algunos individuos cuando se evalúa, sin llegar al 80% de los sujetos. Por otra parte, aunque la frecuencia de malformaciones no fue la esperada, se pudieron observar malformaciones clásicas y representativas debidas a la diabetes mellitus tales como exencefalia, defectos del plegamiento, también se encontraron reabsorciones y/o deciduomas con embriones normales en ambos cuernos uterinos, mortalidad materna aumentada, alteraciones en los niveles séricos de glucosa, triacilglicéridos y lípidos totales, aumento o disminución de la ganancia de peso corporal materno, disminución del tamaño de camada, peso fetal aumentado, etc., en comparación con los controles.

La dosis de 100 mg de aloxana/Kg de peso fue, en esta investigación, la que produjo mejores resultados en relación a la problemática y objetivos planteados. Sin embargo, aunque esos resultados están de acuerdo con Angervall (1959) y Solomon (1959), quienes usan la misma cepa de rata y dosis similares de aloxana, quedan aún muchos inconvenientes por resolver, además de realizar más investigación al respecto, antes de poder decir que se ha tenido éxito en el desarrollo del modelo buscado.

I. INTRODUCCION

La diabetes mellitus es una enfermedad muy conocida desde la antigüedad, y actualmente es parte importante de la problemática de salud pública en el mundo, la que se aprecia en las altas tasas de morbilidad y mortalidad de las últimas décadas. La diabetes destaca como causa directa o indirecta de la mortalidad debidas a ellas en el ser humano. En Estados Unidos afecta a 6 millones de personas y posiblemente la padecen otros 4 o 5 sin ser detectada (Mahan y Arlin, 1995). En nuestro país, la incidencia de morbilidad y mortalidad es igualmente importante, ya que las limitaciones acerca de su diagnóstico y control son semejantes como en casi todo el mundo. Se estima que casi un 7% de la población adulta es diabética, pero en la mitad de ellos no se ha diagnosticado. Es la causa más común de ceguera en los Estados Unidos, y ocasiona el 25% de todas las enfermedades renales en etapa final cada año en pacientes diabéticos. El índice de cardiopatías es de 2 a 3 veces más alto que en pacientes no diabéticos y la esperanza de vida es de solo 2/3 partes respecto a la de la población general. La diabetes mellitus representa por sí misma un problema muy serio para el hombre, independientemente de sus múltiples repercusiones. Su importancia siempre ha sido reconocida y se han realizado muchas investigaciones en torno a su etiología, con el propósito de reducir las altas tasas de morbimortalidad en todas las etapas de la vida del hombre, lo que ha proporcionado elementos de gran utilidad para su mejor comprensión y manejo.

La diabetes mellitus o sacarina es una alteración crónica del metabolismo, ocasionada por una carencia absoluta o relativa de insulina. Recientemente se le ha caracterizado como un grupo de enfermedades metabólicas cuyo carácter más distintivo es la presencia de hiperglucemia. El síndrome clínico de la diabetes se caracteriza por un deterioro de la capacidad para metabolizar carbohidratos y grasas, lo cual conlleva a un aumento de la concentración de glucosa (hiperglucemia) y lípidos (hiperlipidemia) en la sangre circulante, que finalmente causa degeneración vascular prematura. Esta anormalidad metabólica se debe a la secreción inadecuada de insulina y/o a la ineficiencia de la disponible. El transporte de glucosa al interior de casi todas las células depende de la unión de la insulina a sitios receptores, localizados en las membranas celulares. Cuando la insulina no está en cantidades suficientes, o su eficacia está reducida, la glucosa no puede cruzar la membrana celular y se acumula en la sangre, originando hiperglucemia y glucosuria.

El diagnóstico de la diabetes mellitus o sacarina se lleva al cabo mediante la medición de la glucosa plasmática en ayuno, combinada en ocasiones con la determinación de glucosa plasmática postprandrial, o con la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT).

Recientemente han sido revisados y modificados los criterios de diagnóstico para la diabetes mellitus (Comité de Expertos para el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus, 1997). Actualmente el diagnóstico de la diabetes mellitus puede ser efectuado si se concurren las siguientes tres condiciones:

1. Si se presentan síntomas clásicos de diabetes (poliuria, polidipsia y pérdida inexplicable de peso principalmente), además de una concentración casual (cualquier momento del día sin considerar el tiempo desde la última comida) de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL.

2. Si la glucosa plasmática en ayuno (FPG, por sus siglas en inglés) ≥ 126 mg/dL. El ayuno se define como ingestión no calórica por al menos 8 horas.

3. Si la glucosa plasmática a las dos horas durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) es ≥ 200 mg/dL. Esta prueba debe ser realizada como lo señala la Organización Mundial de la Salud (WHO), usando una carga de 75 g de glucosa.

Se ha identificado un grupo intermedio de individuos caracterizado por tener niveles de glucosa plasmática en ayuno entre 110 y 126 mg/dL y es conocido como intolerancia a la glucosa plasmática (IFP). La FPG por debajo de 110 mg/dL es considerada normal y por arriba de 126 mg/dL se da un diagnóstico provisional de diabetes, que debe ser confirmado como se indicó. La OGTT también puede ser usada para identificar a estos individuos. Si la concentración postcarga de glucosa a las 2h (2hPG) es < 140 mg/dL, se dice que hay tolerancia normal a la glucosa. Si está entre 140 y 200 mg/dL, se está en el rango de intolerancia a la glucosa, y si es ≥ 200 mg/dL, se da un diagnóstico provisional de diabetes. Ambas pruebas, FPG y OGTT dan información muy valiosa en relación al riesgo de ciertas complicaciones de la diabetes tales como las enfermedades micro y macrovascular y la retinopatía.

La sintomatología de la diabetes no controlada es muy extensa, y es consecuencia de la incapacidad de la glucosa para entrar a la mayoría de las células (supresión celular de la glucosa) y de su alta concentración en la sangre, además de los esfuerzos del riñón para reducir los valores elevados de la glucemia. Entre estos síntomas están el aumento del apetito (polifagia), de la micción (poliuria) y de la sed (polidipsia), pérdida de peso y falta de fuerza. La incapacidad para

equilibrar la diuresis excesiva aumentando la ingestión de líquido origina deshidratación desequilibrio electrolítico e incluso cetoacidosis. En la diabetes descompensada, por lo general hay altos niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, triacilglicéridos y colesterol (Felig *et al.* 1989). La alta concentración de ácidos grasos libres se debe a un marcado aumento de su liberación a partir de los depósitos de grasa, puesto que en la diabetes mellitus, la lipogénesis esta inhibida, y por lo tanto, no hay una formación de novo de estos compuestos. El incremento de la lipólisis se debe a la pérdida del efecto inhibitor normal que la insulina ejerce sobre una lipasa sensible a hormonas del tejido adiposo. Además la utilización disminuida de glucosa resulta en una menor disponibilidad de glicerol-3-fosfato para reesterificar los ácidos grasos dentro del adipocito (Felig *et al.* 1989).

En la diabetes, la hipertriacilgliceridemia se debe a un mecanismo más complejo. En condiciones normales, las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos entran en el plasma como quilomicrones procedentes de la grasa contenida en la dieta o como lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL) producidas en el hígado e intestino. Los ácidos grasos son extraídos de estas fuentes de triacilglicéridos gracias a la lipasa de lipoproteína presente en el endotelio capilar, dicha enzima es activada por efecto de la insulina. En la diabetes no tratada o mal controlada, la disminución de la actividad de la lipasa produce una elevación de los triacilglicéridos plasmáticos. El incremento del aporte de los ácidos grasos hacia el hígado contribuye también a la síntesis aumentada de triacilglicéridos, ya que en el hígado del diabético no se altera la esterificación de los ácidos grasos con glicerol. Por lo anterior, el hígado del diabético mal regulado o no tratado es adiposo y agrandado, además de que presenta hipertriacilgliceridemia, aún cuando la síntesis de ácidos grasos es prácticamente nula (Felig *et al.* 1989).

Cuando la insulina es extremadamente baja, las alteraciones del metabolismo de las grasas en el tejido adiposo, el hígado y el músculo producen la acumulación de cuerpos cetónicos. Además, la hiperketonemia se debe a la disminución del uso de cetonas por el músculo. El efecto limitante normal de la insulina sobre la cetonemia se debe a su capacidad para inhibir la lipólisis, disminuir la oxidación de ácidos grasos a cetonas en el hígado y estimular la utilización de estos por el músculo. La deficiencia muy marcada de insulina, lleva a estimular simultáneamente la entrada de ácidos grasos al hígado y la enzima limitante de su oxidación (acilcarnitin transferasa) (Felig *et al.* 1989). El tratamiento de la diabetes incluye el control de la dieta y la administración de hipoglucemiantes orales o insulina, según el caso, y esta dirigido a conservar la glucemia tan

cerca de su valor normal como sea posible sin causar hipoglucemia. Se han asociado efectos muy diversos y severos debidos a la hiperglucemia crónica, entre los cuales destacan el daño a largo plazo, la disfunción y la falla de diversos órganos, etc. Estas afecciones son principalmente retinopatía con pérdida potencial de la visión; nefropatía con la consecuente falla renal; neuropatías periférica y autónoma. La neuropatía periférica puede poner en riesgo al paciente de úlceras del pie, amputación y uniones de Charcot, mientras que la neuropatía autónoma conduce a complicaciones gastrointestinales, genitourinarias, cardiovasculares e incluso a disfunción sexual. También se presentan altos índices de cardiopatías tales como aterosclerosis, enfermedad vascular periférica, cerebrovascular e hipertensión, además de otros trastornos metabólicos. El tratamiento de la diabetes incluye el control de la dieta y la administración de hipoglucemiantes orales o insulina, según el caso, y está dirigido a conservar la glucemia tan cerca de su valor normal como sea posible sin causar hipoglucemia.

Actualmente, la clasificación de la diabetes mellitus o sacarina está fundamentada en base a la atención de criterios acerca de su etiología y/o patogénesis (Comité de Expertos sobre el Diagnostico y Clasificación de la Diabetes Mellitus, 1997); ya que la anterior clasificación (National Diabetes Data Group, 1979) se basaba en criterios no uniformes, tales como la edad de inicio de la enfermedad y la dependencia de la insulina exógena. La nueva clasificación está más de acuerdo con el conocimiento actual que sobre la diabetes se tiene. Esto último es muy importante, ya que se contempla que una actualización acerca de los criterios de diagnóstico y sobre todo una clasificación más real resultan indispensables para realizar estudios epidemiológicos y clínicos. En la Tabla 1 se da un resumen de la nueva clasificación.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE LA DIABETES MELLITUS

I. Diabetes tipo 1 (destrucción de las células β , usualmente llevando a la deficiencia absoluta de insulina).

A. Mediada por un mecanismo inmune. Anteriormente conocida como diabetes insulino dependiente, diabetes tipo I o diabetes de comienzo juvenil. Resulta de una destrucción de las células β del páncreas mediada por un mecanismo celular autoinmune

con múltiples predisposiciones genéticas, donde también se involucran factores medioambientales.

- B. Diabetes idiopática. No tiene etiología conocida, algunos pacientes presentan insulopenia permanente con propensión a cetoacidosis, pero sin manifestaciones de actividad de algún mecanismo autoinmune.

II. Diabetes tipo 2 (comprende desde la resistencia a la insulina con deficiencia relativa de la insulina predominantemente, a un defecto secretorio de insulina con resistencia a la insulina predominantemente). Anteriormente conocida como diabetes no insulino dependiente, diabetes tipo II o diabetes de comienzo en el adulto. Se caracteriza por la manifestación de resistencia a la insulina y relativa deficiencia de insulina. La insulina exógena no es necesaria para sobrevivir.

III. Otros tipos específicos.

- A. Defectos genéticos de la función de las células β . Se caracterizan por comienzo de hiperglucemia leve a una etapa temprana (generalmente antes de los 25 años de edad) Anteriormente se conocía como diabetes del joven de comienzo en la madurez (MODY).
- B. Defectos genéticos en la acción de la insulina. Anormalidades metabólicas genéticamente determinadas asociadas con mutaciones del receptor de la insulina que afectan su acción (hiperinsulinismo e hiperglucemia moderada a diabetes severa).
- C. Enfermedades del páncreas exócrino. La diabetes se debe a cualquier proceso que difusamente dañe al páncreas.
- D. Endocrinopatías.
- E. Inducida por drogas –o sustancias químicas-.
- F. Infecciones. Se han asociado ciertos virus con la destrucción de las células β .
- G. Formas no comunes de diabetes mediada por un mecanismo autoinmune.
- H. Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con diabetes.

IV. Diabetes mellitus gestacional

1. DIABETES MELLITUS Y GESTACION

Además de otras complicaciones muy comunes de la diabetes mellitus, existen aspectos muy poco conocidos o que se les ha restado importancia, pero que están vinculados a tasas altas de morbimortalidad. Uno de esos aspectos es el del embarazo de mujeres diabéticas y sus consecuencias sobre la descendencia; estas pueden incluir malformaciones congénitas, abortos y nacidos muertos. Por otra parte, implican también otras anomalías caracterizadas como patologías, que afectan postnatalmente a la descendencia.

Antes de la introducción de la insulina en 1921, la diabetes durante el embarazo tenía consecuencias letales tanto para la madre como para el feto. Williams indica en 1909 una tasa de mortalidad materna del 30% y de pérdida fetal del 65%. No obstante, aunque ha habido avances significativos en el conocimiento de la etiología de la diabetes, así como en su tratamiento y control, el carácter genético de esta enfermedad representa todavía un inconveniente por resolver. Por lo tanto, a pesar de haber conseguido una considerable reducción en la incidencia de malformaciones y muertes, aún estas son altas, ya que del 6 al 12% de los hijos de madres diabéticas sufren malformaciones congénitas de importancia (Miller *et al.*, 1947), lo que equivale a una frecuencia de 3 a 4 veces mayor que en la población general.

Existe controversia en cuanto a las cifras de malformaciones y de otras consecuencias del desarrollo embrionario alterado debido a la diabetes mellitus, puesto que, aunque se han descrito cifras diferentes (Moreno *et al.*, 1988), se ha señalado una incidencia aumentada de malformaciones congénitas, nacidos muertos y abortos en la descendencia de las madres diabéticas (Hunter *et al.*, 1993). Esta incidencia representa altas tasas de morbilidad y mortalidad neonatal (Rivera *et al.*, 1993). Las lesiones congénitas afectan al 3% de los recién nacidos en Estados Unidos, lo que representa el 21% de la mortalidad infantil (Freinkel, 1984). No obstante, la mortalidad perinatal ha disminuido bruscamente, y en los hijos de madres diabéticas tratadas con insulina en Estados Unidos, esta era de 33.3% en los años 20s, de 6.5% durante el periodo de 1976 hasta 79. En Editorial (1978) se señalan malformaciones congénitas severas en el 6.8% de los hijos de madres diabéticas. Entre 1950 y 1980, la incidencia de defectos al nacimiento de la descendencia de madres diabéticas no se ha reducido. La frecuencia de malformaciones en infantes de madres diabéticas es entre 2 a 4 veces más alta que en la población general, esto es,

del 2 al 3%, y actualmente es la causa más común de muerte perinatal en los infantes de madres diabéticas. Casi la mitad de los hijos de madres diabéticas mal controladas mueren durante el periodo perinatal a causa de estas lesiones congénitas (Pinter y Reece, 1988). Las malformaciones congénitas representan ahora la causa más grande de mortalidad en el infante de la madre diabética (Goldman *et al.*, 1985).

También se ha señalado que ciertas alteraciones metabólicas durante el embarazo (fenilcetonuria, diabetes mellitus tipo 1) están relacionadas con una mayor incidencia de abortos al inicio de la preñez, malformaciones congénitas y retraso mental. El riesgo relativo de alteraciones metabólicas y/o morfológicas neonatales es difícil de evaluar debido a la carencia de grupos control y a que se tiende a comparar con las tasas de morbilidad de la población general de recién nacidos. Así, de esta forma se señala que el 25% de los hijos de mujeres diabéticas nacen antes de las 37 semanas de gestación, y que el 11% presenta malformaciones congénitas en mujeres que se embarazan antes de los 20 años de edad (Sadler *et al.*, 1993).

2. TERATOGENESIS

La consideración de que muchas sustancias y factores pueden causar malformaciones congénitas en infantes de madres diabéticas y no diabéticas hace más compleja esta problemática; debido a esto la Teratología puede ser enfocada a varios niveles de estudio: en el caso del embarazo humano complicado por diabetes, los energéticos ambientales alterados en la etapa temprana del primer trimestre influyen sobre la organogénesis continua (teratogénesis de órganos mediada por energéticos); la formación de las células cerebrales durante el segundo trimestre puede ser afectada por mezclas de energéticos anormales y consecuentemente manifestarse en patrones psicológicos o intelectuales (cognoscitivos) alterados (teratogénesis conductual) o durante el tercer trimestre, cuando los adipocitos fetales, las células musculares, las células pancreáticas y los ejes neuroendócrinos están en máxima diferenciación y proliferación, pueden ser afectados por la hiperglucemia o hiperaminoacidemia maternas, aumentando la propensión a la obesidad tardía o a la diabetes tipo 2 (teratogénesis antropométrica o metabólica), Freinkel *et al.*, 1986. Lo anterior no significa una división de la teratogénesis en especialidades, es más bien una descripción muy general de ciertos efectos teratogénicos en función de etapas bien definidas del embarazo.

La investigación en Teratología es interdisciplinaria e interdependiente de la que se realiza en ciencias recíprocamente auxiliares como la Embriología, la Genética, la Fisiología, la Bioquímica, la Medicina, etc.; debido a esto, resulta claro que las limitaciones en estas últimas influyeron necesariamente en el desarrollo de la Teratología hasta su estado actual. Aunque se han logrado avances considerables, no obstante aún faltan muchos mecanismos y aspectos por conocer, para poder dar soluciones realmente efectivas y definitivas con respecto a la problemática de la teratogénesis debida a la diabetes. El marco de investigación de la Teratología no ha sido fácil, ya que muchos hechos relacionados a los mecanismos naturales de la fisiología del embarazo eran desconocidos, tales como las adaptaciones metabólicas al embarazo, la misma etiología de la diabetes humana, la fisiología de muchos intermediarios metabólicos, así como sus efectos en situaciones patológicas, etc.

3. TERATOGENESIS POR DIABETES MELLITUS

Las anomalías producidas durante el embarazo complicado por diabetes, han suscitado en atención a la gran importancia que implican, un número muy considerable de estudios acerca de las alteraciones en el metabolismo de los energéticos maternos. La necesidad de reducir los altos índices de morbimortalidad debidos a la teratogénesis por diabetes, han permitido que las investigaciones realizadas tengan buenas perspectivas para la solución parcial o absoluta de este problema en un futuro. En los últimos 20 años, se han logrado algunos avances derivados principalmente de estudios en modelos animales, tanto *in vivo* como *in vitro*, además de estudios en humanos, que ya se están aplicando en clínica y que están dirigidos a, mediante diversas técnicas modernas (monitoreo de niveles de glucosa, tratamientos de insulina con perfusión continua, etc.), reducir esos altos índices de morbimortalidad.

La hiperglucemia puede ser inducida experimentalmente en animales de laboratorio mediante la administración de aloxana o estreptozotocina, entre otros fármacos, así como la extirpación del páncreas. Aplicando ciertas dosis se pueden obtener grados diferentes de hiperglucemia. Se define la dosis efectiva como aquella que causa diabetes en al menos un 80% de los animales tratados (Méndez y Ramos, 1993). Estas sustancias inductoras de diabetes actúan a nivel de los islotes pancreáticos; no obstante, se ha señalado que no se debe descartar un posible efecto directo de estos agentes químicos en la producción de anomalías (Cockroft y

Coppola, 1977). Los estudios *in vitro* han proporcionado mucho conocimiento acerca de la teratogénesis durante el embarazo complicado por diabetes. A finales de los 60s y principios de los 70s, la introducción de las técnicas de cultivo de embriones postimplantacionales de mamífero o técnica de cultivo embrionario total desarrollada en Inglaterra por New (1971) ha dado excelentes resultados en los estudios mencionados. El uso de esta técnica ofrece muchas ventajas al investigador, ya que, por una parte, permite un mayor control de variables ambientales, por lo cual resulta ideal para eliminar las posibles interferencias con el metabolismo materno *in vivo*. De esta forma, se pueden probar diversas condiciones experimentales, tales como número y cantidad de sustancias para probar sus efectos teratogénicos o protectores, etc. Por otra parte, el método de New (1971) permite seguir la evolución de situaciones sinérgicas e imita la condición *in vivo* en cuanto al ambiente embrionario, especialmente con respecto a la glucosa, la cual cruza fácilmente la placenta. La técnica de cultivo embrionario total de New (1971) se ha utilizado con diversas modificaciones, realizadas por el mismo y por otros, para adaptarla a los diversos diseños experimentales.

Se han propuesto causas muy diversas de las anomalías inherentes a la teratogénesis de la diabetes, y a medida que se investiga surgen nuevas implicaciones y posibilidades que eventualmente están permitiendo comprender mejor los mecanismos de la embriopatía y fetopatía diabéticas. De esta manera se ha logrado relacionar y comprobar la participación de factores antes no considerados y a la vez se reafirma la noción de que la teratogénesis durante el embarazo complicado por diabetes es de origen multifactorial. Entre las causas propuestas se tiene: hiperglucemia (Cockroft y Coppola, 1977), hipoglucemia (Smoak y Sadler, 1990), hipercetonemia (Sadler *et al*, 1993), hiperaminoacidemia (Reece *et al*, 1994), hiperinsulinismo (Eriksson *et al*, 1987), hiperémesis, glucosilación aumentada no enzimática de proteínas embrionarias, actividad disminuida de la vía de los monofosfato de hexosa debida a la atenuación del aumento en la concentración de ácido ascórbico, alteración o inhibición de la glucólisis (Freinkel, 1984), deficiencia del ácido araquidónico y de la síntesis de prostaglandinas (Goldman *et al*, 1985), alteraciones en la vía del poliol tales como depleción de *mio*-inositol y aumento de sorbitol; es decir, de la vía aldosa reductasa (Hod *et al*, 1989), así como la participación de inhibidores de somatomedina (Freinkel *et al*, 1986), metales traza (Uriu Hare *et al*, 1989), contenido de proteína y fibra dietarias (Giavini *et al*, 1993) radicales de oxígeno (Eriksson y Borg, 1991 y 1993), y poliaminas (Méndez y Arreola, 1992); además de la predisposición genética.

4. FACTORES CAUSALES IMPLICADOS EN LA TERATOGENESIS POR DIABETES MELLITUS

4.1. Hiperglucemia:

4.2. D-Glucosa y otras hexosas

Inicialmente, como es lógico suponer, el primer compuesto bajo sospecha de ser causante de las malformaciones congénitas, nacidos muertos y abortos fue, por supuesto, el energético natural por excelencia utilizado por los organismos animales: la glucosa. Así, los estudios *in vivo* o *in vitro* fueron diseñados para investigar los efectos dismorfogénicos de esta sustancia.

Estudios *in vivo* con roedores (Watanabe e Ingalls, 1963), conejos (Miller *et al.*, 1947) y pollos, permitieron hacer el señalamiento de que la hiperglucemia puede ser teratogénica, lo cual fue demostrado por Cockroft y Coppola (1977) en cultivo embrionario de rata en etapa de pliegue cefálico temprano. Ellos aplicaron 6, 9, 12 ó 15 mg/mL de glucosa para evaluar su efecto teratogénico en la rata. Estas concentraciones representan 4, 6, 8 y 10 veces la concentración normal de glucosa en los roedores (de 1.3 a 1.5 mg/mL) (Sadler, 1993) y fueron utilizadas con o sin corrección de la osmolaridad. Las concentraciones más altas de glucosa tuvieron efectos teratogénicos severos, afectando una alta proporción de embriones; mientras que las concentraciones más bajas no mostraron efecto teratogénico. Los mayores efectos, sin embargo, ocurrieron sin corrección de la osmolaridad a la concentración de 15 mg/mL, esta falta de corrección de la osmolaridad parece aumentar el efecto de la glucosa, es decir, aumentan la frecuencia y severidad de las malformaciones. Estudios *in vitro* realizados por Sadler (1980) acerca de los efectos del suero de ratas diabéticas sobre la embriogénesis temprana del ratón demostraron efectos relacionados a la edad y la dosis, encontrando que la anomalía más común fue la exencefalia o inhibición del cierre de tubo neural, además de microftalmia, hipoplasia mandibular y maxilar. A nivel celular se encontró necrosis celular, variación en el número y espesor de las capas neuroepiteliales y de la cresta neural y variación en el índice mitótico.

Mediante la comparación de los efectos embriotóxicos *in vitro* de diferentes hexosas tales como D-fructuosa, D-sorbitol, *mio*-inositol, D-galactosa, D-glucosa y D-manosa; sobre la organogénesis en la rata (Freinkel *et al.*, 1984), se encontró que esta última exhibió una embriotoxicidad mucho más grande con respecto a las demás, incluso a dosis muy bajas, sugiriendo

que esto se debe al deterioro o inhibición de la glucólisis, ya que los organismos son altamente dependientes de esta vía durante la embriogénesis temprana. Con este estudio, Freinkel sugiere nuevas vías de investigación en la que muchos agentes y factores aún no relacionados o identificados se podrían considerar por su posible papel en la teratogénesis debida a la diabetes mellitus.

4.3. Metabolismo del ácido araquidónico

Se ha relacionado la deficiencia en el metabolismo del ácido araquidónico con la teratogénesis por diabetes (Goldman *et al.*, 1985; Pinter *et al.*, 1986). Se ha señalado una deficiencia funcional del ácido araquidónico en rata diabética gestante y en cultivo embrionario de ratón. El mecanismo mediador de la teratogenicidad de la hiperglucemia puede involucrar una deficiencia funcional de ácido araquidónico en una fase crítica de la organogénesis. La administración de ácido araquidónico a ratas diabéticas gestantes *in vivo*, o su adición al cultivo de embriones *in vitro*, mejora significativamente los efectos dismorfogénicos causados por niveles altos de glucosa (Goldman *et al.*, 1985). También se ha establecido que el ácido araquidónico puede prevenir el daño y la embriopatía del saco vitelino debido a hiperglucemia (Pinter *et al.*, 1986). El ácido araquidónico *per se* no es teratogénico, ya que se observa un mejor desarrollo embrionario cuando esta presente. La adición del ácido araquidónico evitó la presencia de malformaciones en conjunto, así como las anomalías microscópicas del saco vitelino y el neuroepitelio (Pinter *et al.*, 1986). Esto es de suma importancia, ya que estudios de cultivo de embriones de rata demostraron que se requiere una capa intacta del saco vitelino visceral endodérmico para un desarrollo embrionario normal. La aplicación de los resultados de estos estudios son de gran interés, ya que se ha indicado que los pacientes diabéticos con complicaciones vasculares tienen concentraciones séricas bajas de ácido araquidónico y linoleico, y que la deficiencia de ácido araquidónico provoca que la hiperglucemia afecte más a la vascularización.

4.4. Vía del poliol

De igual manera, la vía del poliol se ha considerado como importante en la dismorfogénesis causada por la hiperglucemia (Hod *et al.*, 1986; Hashimoto *et al.*, 1990). La hiperglucemia causa depleción del *mio*-inositol libre, y una acumulación muy considerable de sorbitol intracelular, además de una disminución en el contenido de proteína y DNA embrionarios totales (Goldman *et*

al., 1985; Pinter *et al.*, 1986; 1986; Hod *et al.*, 1986; Hashimoto *et al.*, 1990).

Por otra parte, estudios bioquímicos *in vitro* en la rata han confirmado una alza de *mio*-inositol en la etapa de somita temprana, la cual es afectada por la hiperglucemia llevando a la dismorfogénesis (Weigensberg *et al.*, 1990).

4.5. Inhibidores de aldosa reductasa

Los inhibidores de la aldosa reductasa han permitido prevenir algunos efectos embriopáticos; ya que la depleción de *mio*-inositol y el aumento de sorbitol debidos a la hiperglucemia han sido descritos en muchos tejidos, así como la reversión efectuada por dichos inhibidores, encontrando que el sorbinil y el estatil atenuaron significativamente el aumento en sorbitol en los embriones *in vitro* de 2 veces a 6 veces, sin modificar la disminución de proteína, DNA y *mio*-inositol. (Eriksson *et al.*, 1987).

Se ha encontrado también que la suplementación de *mio*-inositol, en la dieta a ratas diabéticas gestantes, o adicionándolo al medio con glucosa donde crecen embriones en cultivo, compensa la depleción del mismo y evita los defectos del tubo neural producidos por la hiperglucemia. Este efecto protector fue revertido por la indometacina, un inhibidor del metabolismo del ácido araquidónico que lleva a la biosíntesis de prostaglandinas. Igualmente, la depleción de *mio*-inositol se puede evitar por el tratamiento con insulina, la suplementación de *mio*-inositol proporciona una protección parcial contra la dismorfogénesis inducida por la diabetes, mientras que la insulina protege completamente (Baker *et al.*, 1986, 1990; Hashimoto, 1990).

La falla de la fusión del tubo neural observada en la teratogénesis por diabetes es mediada a través de un mecanismo que involucra anomalías del metabolismo del *mio*-inositol y del ácido araquidónico, resultando en una deficiencia de las prostaglandinas en un momento crítico de la fusión de este. No se sabe cómo la hiperglucemia lleva a una deficiencia del ácido araquidónico, pero se ha establecido la deficiencia del *mio*-inositol como un defecto primario del mecanismo (Baker *et al.*, 1990; Goldman y Goto, 1990).

4.6. Prostaglandinas

Las consecuencias inmediatas de los estudios acerca del ácido araquidónico fueron el considerar a las prostaglandinas como un factor igualmente importante de una etiología multifactorial de la embriopatía y fetopatía diabéticas, puesto que el ácido araquidónico es necesario

para la síntesis de estas biomoléculas (Ericksson *et al.*, 1987; Backer *et al.*, 1990 y Goto *et al.*, 1992).

La observación de que las prostaglandinas son sintetizadas en células embrionarias de rata y ratón, ha sugerido que pueden ser importantes en la fusión del tubo neural y en la embriopatía diabética en general (Baker *et al.*, 1990). Se ha señalado que las prostaglandinas resultan ser teratógenas a concentraciones mayores a 2800 nmol/L, y su administración por diversas vías durante el embarazo puede causar malformaciones congénitas en ratones. La adición de PGE₂ (142 nmol/L) al medio de cultivo provocó un efecto protector completo contra defectos de tubo neural inducidos por glucosa, no obstante, esto no ocurrió así con otras prostaglandinas (PGF₂α, PGI₂), las que protegen parcialmente (Baker *et al.*, 1990). Estos resultados fueron confirmados por Goto *et al.*, (1992) cuando adicionaron PGE₂ a cultivos de embriones totales de ratón, en un rango de 0.028 a 28.4 nmol. Sin embargo, la protección completa sólo ocurrió con 28.4 nmol de PGE₂ adicionada al medio con glucosa, siendo también significativa en embriones cultivados en suero de ratas diabéticas:

4.7. Radicales libres de oxígeno

El aumento en la presencia y actividad de radicales libres de oxígeno se ha vinculado con la producción de manifestaciones embriopáticas. En apoyo a esta noción, se ha observado que las enzimas depuradoras de radicales libres de oxígeno tienen acción protectora contra las malformaciones congénitas observadas por efecto de la diabetes en estudios *in vitro*. La adición de enzimas depuradoras de radicales libres de oxígeno como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX); o la citiolona, inductor de éstas, mejoró el desarrollo embrionario en estudios *in vitro*. La mayor protección se observó con la SOD en medios con 10 y 50 veces la concentración normal de glucosa (Ericksson y Borg, 1991). Las actividades de estas enzimas fueron de 10 a 100 veces más altas en membranas que en embriones.

La producción aumentada de radicales libres de oxígeno contribuye a ciertas complicaciones de la diabetes mellitus, tales como angiopatía, retinopatía, neuropatía y nefropatía. En general, la participación de radicales libres se ha implicado en procesos tales como diversos estados patológicos, degradación de medicamentos, envejecimiento, etc. (Huberman, 1988). También se ha descrito un mecanismo en el que proteínas glucosiladas enzimáticamente pueden inducir la generación de radicales libres de oxígeno (Hunter *et al.*, 1988).

Se cree que las mitocondrias de los *concepti*, son el lugar donde los radicales libres de

oxígeno son generados, en vista de que una sobrecarga de glucosa causaría un flujo aumentado a través de la cadena de transporte de electrones. Los radicales libres de oxígeno son generados en presencia de una alta presión de oxígeno, esto lleva a un aumento en el número de crestas mitocondriales, lo que implica una actividad funcional mayor. Los lípidos son afectados por los radicales libres de oxígeno, los que ocasionan la peroxidación aumentada de los mismos; esta peroxidación produce hidroperóxidos, los que estimulan la biosíntesis de prostaglandinas, inhibiendo a la vez la producción de prostaciclina.

En otro estudio *in vitro* por Eriksson y Borg (1993), en el que investigaron la actividad de los radicales libres de oxígeno inducidos por sustrato: piruvato (PYR), D-glucosa, hidroxibutirato (HBT) y (α -cetoisocaproato (KIC)), en cultivo de embriones de rata; los efectos teratogénicos producidos por radicales libres inducidos por estos sustratos fueron también atenuados por SOD adicionada al medio. La suplementación de ácido cianohidroxycinnámico (CHC), un inhibidor reversible específico no competitivo del transporte de piruvato mitocondrial, al medio de cultivo, suprimió los efectos teratogénicos inducidos por glucosa y piruvato, pero no fue así con los producidos por HBT y KIC. Cada uno de estos sustratos oxidativos, que en exceso entran al metabolismo mitocondrial, puede inducir malformaciones embrionarias (Eriksson y Borg, 1993).

Con base en esto, se hace necesario que el control metabólico de la embarazada diabética sea casi perfecto para normalizar las concentraciones séricas maternas de todos los sustratos oxidativos posibles, y así reducir el riesgo de malformaciones (Eriksson y Borg, 1993). Diferentes metabolitos intermediarios como el lactato, el piruvato, los cuerpos cetónicos y los aminoácidos de cadena ramificada muestran concentraciones séricas aumentadas en la diabetes. Aunque los niveles de glucosa sean normalizados, otros sustratos metabólicos pueden permanecer anormales (elevados), incluso en pacientes diabéticos bien controlados.

4.8. Cetosis

La cetosis o producción de cuerpos cetónicos es una característica clásica de la diabetes mellitus y ha sido estudiada en cultivos de embriones de la rata (Sheehan *et al.*, 1983; Lewis *et al.*, 1985 y Freinkel *et al.*, 1986) y el ratón (Buchanan *et al.*, 1994) para investigar si está relacionada con la producción de anomalías embrionario-fetales y si sus efectos son sinérgicos con la hiperglucemia. Los datos de estos estudios confirman ambas suposiciones, siendo esto una base firme para asegurar que la teratogénesis en el embarazo complicado por diabetes es de origen

multifactorial (Freinkel *et al.*, 1986; Buchanan *et al.*, 1994) y reafirmando a la vez la noción de teratogénesis mediada por energéticos (Freinkel *et al.*, 1986).

Los estudios con cuerpos cetónicos llevaron a la conclusión de que otros factores, además de la glucosa y del 3-hidroxiacetil-CoA (3OHB) explican gran parte del potencial teratogéno del suero diabético para producir malformaciones, además de que la glucosa *per se* no es una causa principal de la teratogenicidad del suero diabético. Algunos de los efectos son explicados por el 3OHB. La administración de insulina causa la disminución rápida y significativa de la teratogenicidad del suero diabético *in vivo*, normalizando las concentraciones de glucosa y 3OHB (Buchanan *et al.*, 1994).

4.9. Inhibidores de somatomedina

Se ha observado también un efecto del suero de ratas diabéticas, debido a la bioactividad de inhibidores de somatomedina, los cuales pueden estar presentes en la circulación durante la utilización deteriorada de la glucosa. Usando suero normal de ratas del mismo sexo, suero normal suplementado con glucosa y cetonas, y suero de ratas diabéticas con inhibidores de somatomedina, se logró evidenciar la severidad del daño causado por estos últimos en cuanto al número de somitas, longitud cefalocaudal y el contenido de proteínas, produciendo además un 66% de malformaciones mayores, es decir del sistema nervioso central y otras muy severas, etc.(Freinkel *et al.*, 1986).

4.10. Glucosilación de proteínas

Se ha señalado que niveles sanguíneos aumentados de glucohemoglobina están relacionados con incidencias importantes de malformaciones y abortos espontáneos (Greene *et al.*, 1989).

La glucosilación no enzimática de muchas proteínas, incluyendo la fibronectina y la osteocalcina, resulta en funciones alteradas de éstas, y a la vez, ésto se manifiesta en alteraciones metabólicas y del crecimiento del hueso. También se han encontrado otras malformaciones en fetos de ratas diabéticas, tales como, costillas supernumerarias, onduladas, esternón dividido, hemivértebra, micrognacia, cola ausente, paladar hendido, nariz malformada, disgénesis caudal, etc.

4.11. Efecto de la dieta

Se ha descrito que las deficiencias nutricionales, tales como la ingestión dietaria inadecuada de zinc en el embarazo humano y animal producen malformaciones. Algunos estudios acerca de la

gestación en ratas diabéticas han revelado alteraciones en los niveles de metales traza, sobre todo del zinc, tanto en la madre como en la descendencia (Uriu Hare, 1989).

Igualmente, se ha señalado que la deficiencia de zinc por una dieta baja en metales traza, en ratas gestantes no diabéticas, con predisposición genética a malformaciones, produjo alteraciones fetales similares a las que se presentan en la descendencia de ratas diabéticas de esta cepa. Se ha postulado que una baja concentración embrionaria de zinc durante la gestación puede ser causa, junto con otros factores, de anomalías en el desarrollo embrionario en el estado diabético (Eriksson *et al.*, 1987). Se cree que esta deficiencia de zinc produce efectos como la reducción de la biosíntesis del DNA, y de la capacidad para evitar el daño producido por radicales libres de oxígeno.

La gestación de ratas diabéticas se caracteriza por un metabolismo de zinc materno y fetal alterados, y por una frecuencia más alta de malformaciones congénitas. Aplicando 3 dietas diferentes: baja, (4.5 mg); adecuada, (24.5 mg) y alta, (500 mg) en zinc durante la gestación de ratas diabéticas se ha observado que la dieta baja en zinc tuvo fuertes efectos teratogénicos, mientras que las dietas adecuada y alta en zinc no tuvieron efecto negativo sobre el desarrollo fetal (longitud y peso fetal). Sin embargo, la suplementación de zinc en la dieta durante la gestación complicada con diabetes no revierte la frecuencia de malformaciones. Las concentraciones hepáticas de zinc, cobre y metalotionina en fetos de madres diabéticas fueron más bajas que en los de madres control. En estos estudios se observa un incremento de los efectos dismorfogénicos durante el embarazo complicado por diabetes, debido a una deficiencia materna de zinc y también a una alteración del transporte de zinc y cobre a través de la placenta, así como su retención por el feto, lo cual lleva a anomalías del desarrollo del hueso (los mismos efectos son observados con la deficiencia de cobre) (Uriu Hare *et al.*, 1989).

El metabolismo anormal de zinc, particularmente hiperzincuria, ocurre en la diabetes humana, y se ha propuesto que una excreción excesiva de zinc puede ocasionar deficiencias marginales de este metal traza.

El metabolismo de zinc, cobre y manganeso es severamente afectado por la diabetes mellitus no controlada, además de que se supone que períodos frecuentes de hipoglucemia e hiperglucemia también podrían alterar el metabolismo de minerales. En un estudio acerca de la influencia de las dietas con diferente contenido de proteína y fibra sobre la teratogénesis por diabetes en ratas, se encontraron diferencias importantes en la ingestión diaria de proteínas en los grupos diabéticos; sin

embargo, los efectos embriopáticos (peso fetal reducido y aumento en las tasas de malformación y reabsorción) no difieren estadísticamente en estos grupos. Esto puede significar que la composición de la dieta influye en gran medida sobre la ingestión de alimentos y calorías en ratas diabéticas gestantes, lo cual puede implicar una función importante en cuanto a la manifestación teratológica de la diabetes. El aumento en el contenido de proteína de una dieta resulta en una disminución de los efectos dismorfogénicos. Un alto contenido de proteína en la dieta produce el mismo efecto que las fibras vegetales en el intestino, es decir, reduce la absorción intestinal de carbohidratos disminuyendo los efectos embriopáticos (Giavini *et al.*, 1993).

4.12. Contenido de proteína y fibra

Se ha demostrado que la ingestión de alimentos ricos en proteína y fibra ayudan en gran medida a los pacientes diabéticos mejorando sus condiciones metabólicas. Un buen control metabólico de los energéticos maternos desde la etapa de preconcepción hasta la primera parte del embarazo es la única forma de evitar, en cierto grado, las consecuencias letales de la teratogénesis por diabetes. A pesar de que existen avances importantes en la investigación acerca del embarazo complicado por diabetes, en la práctica resultan relativas e insuficientes, pues es difícil alcanzar un excelente control metabólico de la paciente diabética embarazada, lo cual se debe con frecuencia a que falta mucha información que la paciente diabética o genéticamente predispuesta debe conocer para tener amplia conciencia de la importancia de este problema y de sus múltiples riesgos; debido a esto la paciente diabética debe tener responsabilidad en la planeación de su embarazo y someterse a control metabólico para tener mejores pronósticos. Además, frecuentemente se presentan situaciones inesperadas o contradictorias, como los episodios hipoglucémicos, especialmente cuando el control metabólico es muy estricto. Por otra parte, la influencia de otros mecanismos que no son conocidos totalmente pueden manifestarse durante el control metabólico y jugar un papel importante en la producción de malformaciones.

4.13. Hipoglucemia

Las consecuencias de niveles alterados de glucosa e insulina sobre el feto son notablemente contradictorias, debido a que es difícil evaluar cada uno de ellos conjuntamente (Sadler, 1980). El control metabólico estricto con insulina disminuye las tasas de malformaciones fetales y morbilidad perinatal en humanos (Hori *et al.*, 1966). La administración de insulina a

ratas gestantes y otras especies de mamíferos disminuye marcadamente los niveles de glucosa tanto en la madre como en el feto, lo cual dificulta la evaluación de los efectos directos de la insulina y su distinción de los efectos del metabolismo de la glucosa sobre el desarrollo fetal. Se ha propuesto que la insulina es una hormona promotora del crecimiento fetal; no obstante, no se puede considerar que la insulina fetal sea un teratógeno, ya que las células β -pancreáticas que la producen, no se encuentran en el embrión durante la embriogénesis temprana (organogénesis), Eriksson *et al.*, 1987. Grandes cantidades de insulina *in vitro* no producen malformaciones congénitas (Sadler y Horton, 1983) y la administración de insulina a animales diabéticos disminuye las frecuencias de malformación (Horii *et al.*, 1966). Probablemente en estos casos, el agente teratogénico en animales hiperinsulinémicos sea la hipoglucemia inducida por insulina (Eriksson *et al.*, 1987 y Sadler *et al.*, 1993).

Un control muy estricto de la hiperglucemia (Buchanan y Kitzmiller, 1994) ocasiona que las concentraciones sanguíneas de glucosa varíen ampliamente, lo cual representa un mayor riesgo de malformaciones congénitas. Estas fluctuaciones debidas a un control muy estricto causan hipoglucemia. Episodios relativamente breves de hipoglucemia en una etapa crítica de la embriogénesis pueden ser suficientes para producir malformaciones en fetos de madres diabéticas (Cockroft y Coppola, 1977).

Buchanan *et al* (1986) investigaron el efecto de la hipoglucemia ligera debida a la infusión breve de insulina a la madre durante la organogénesis de rata, observando que hay una interrupción del desarrollo embrionario normal y efectos teratogénicos debidos a la hipoglucemia *per se*, limitando así la disponibilidad de glucosa para la glucólisis obligada en puntos críticos en la embriogénesis (Freinkel *et al.*, 1986), y sin ninguna relación con posibles efectos directos de la insulina, se encontraron anomalías del sistema nervioso central, sobre todo del tubo neural, retraso del crecimiento y cambios conductuales.

Los defectos del desarrollo embrionario observados en la rata, ratón y conejo después de la administración de insulina durante el embarazo temprano ocurrieron en asociación con ataques e hipoglucemia prolongada. Estos estudios no evaluaron los efectos directos de la insulina sobre los *concepti*, lo cual puede ser importante, ya que se han señalado acciones embriotóxicas de la insulina en el pollo. Sin embargo, como se mencionó antes, la hormona no parece ser teratógena en mamíferos.

Concentraciones de glucosa de 40 y 60 mg/dL (0.4 y 0.6 mg/mL) produjeron 100% y 90%

de malformaciones respectivamente, aunque también se observaron efectos sobre el crecimiento (número de somitas); solo con 40 mg/dL de glucosa se encontró una reducción significativa en el contenido de proteína. Adicionando glucosa para alcanzar concentraciones de 120 a 300 mg/dL, el crecimiento normal fue restaurado (Sadler y Hunter, 1987).

Hunter y Sadler (1989) evaluaron los aspectos bioquímicos de la hipoglucemia en cultivo embrionario de ratón en la etapa de neurulación, mediante la medición de las tasas metabólicas de la vía glucolítica, del ciclo del ácido cítrico, de la vía oxidativa de las pentosas monofosfato y la utilización anabólica.

Una reducción de la glucosa del 50% en un período de 2 horas produce efectos teratogénicos en el embrión durante la neurulación. La exposición a un período corto de hipoglucemia fue investigada por Smoak y Sadler (1990), en cultivos embrionarios de ratón durante la gastrulación y la neurulación, mediante variaciones sistémicas en las concentraciones de glucosa y duraciones de la exposición hipoglucémica, lo cual permitió evaluar la susceptibilidad dependiente de la etapa a hipoglucemia y definir específicamente los parámetros de exposición, en los cuales se manifiestan dismorfogénesis, retardo del crecimiento o ambas en el modelo de cultivo embrionario de ratón. De esta forma, se encontró que los embriones en gastrulación son más susceptibles a períodos cortos de hipoglucemia con respecto a embriones en neurulación (Smoak y Sadler, 1990).

5. INDUCCION DE DIABETES MELLITUS CON ALOXANA Y ALTERACIONES REPRODUCTIVAS

La inducción de diabetes mellitus, que simule la del tipo 1, a través de agentes químicos, se lleva al cabo utilizando sobre todo los fármacos aloxana y estreptozotocina. Mientras que sus mecanismos de acción diabética no están del todo comprendidos, se sabe desde hace algunas décadas que actúan destruyendo la integridad de las células β -pancreáticas. Sin embargo, existen evidencias de que pueden tener efectos colaterales no relacionados con su acción citotóxica. Adicionalmente, se ha utilizado el modelo de pancreatomectomía subtotal.

La mayoría de los estudios acerca de la acción de la diabetes mellitus descritos arriba, en los cuales se estudian las alteraciones metabólicas y la prevención de malformaciones, están realizados mediante la inducción con estreptozotocina, fármaco que causa un estado diabético más estable que la aloxana, pero que tiene el inconveniente de ser cerca de cien veces más caro.

La administración de aloxana previa al apareamiento, a dosis de 40 mg/Kg de peso a ratas normales con ciclos estrales definidos, causa que al momento del parto se obtengan solamente placentas (Davis *et al.*, 1947), mientras que Kim *et al.*, (1960) mencionan alteraciones en la fecundación e interrupción de la preñez. Dosis de 55 mg/Kg causan una elevada incidencia de neonatos muertos (Sinden y Longwell, 1949). Cuando se tratan hembras inmaduras o que inician la pubertad (30 ó 60 días de edad, respectivamente) con 50 mg/Kg del fármaco, se interrumpe el ciclo estral, y en el caso de aparearse exitosamente, los fetos de 21 días de gestación son cerca de un gramo de peso menores que los de las madres control (Lawrence y Contopoulos, 1960). Dosis de 25-30 mg causan, según los autores, un estado de "subdiabetes", sin afectar los parámetros reproductivos de la hembra, pero ocasionan la pérdida de la viabilidad de los neonatos, y que éstos sean más pesados que los normales (Lazarow *et al.*, 1960). Probablemente este esquema cause un estado similar al de la diabetes mellitus gestacional en humanos, mientras que los señalados por Davis *et al.*, (1947), Kim *et al.*, (1960) y Lawrence y Contopoulos (1960) induzcan en realidad una "subdiabetes" o diabetes ligera, y no una diabetes severa, debido a que cuando se causa diabetes severa por pancreatomectomía subtotal (corte de cerca del 95% del páncreas), se pierde la capacidad de aceptación del macho (Foglia *et al.*, 1963). También se encontró que la inducción con aloxana a dosis de 140 a 175 mg/Kg causa la pérdida de la capacidad de apareamiento o la interrupción de la preñez (Levi y Weinberg, 1949). Recientemente, se señaló

que una dosis de 300 mg/Kg causa la falla de la ruptura de la vesícula germinal, y que para que las ratas sean capaces de aparearse, se requiere después de la inducción, la aplicación de insulina exógena y la estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas con gonadotropina de suero de yegua gestante (Diamond *et al.*, 1989).

La inducción diabética previa a la implantación en la rata causa efectos diversos, principalmente la pérdida de la habilidad reproductiva (Davis *et al.*, 1947); y en la diabetes inducida por la administración de 100 mg de aloxana/Kg de peso corporal en el día uno de la gestación, se obtiene un alto porcentaje de abortos y malformaciones (Angerwall, 1959). Con dosis de 80 mg/Kg en el día cuatro de la gestación en ratones se observan anomalías en el sistema nervioso central en el 28% de los embriones (Horii *et al.*, 1966); mientras que una dosis de 40 mg/Kg en el día cinco en la rata provoca reabsorciones y aborto. No hay hasta nuestro conocimiento, otro informe de inducción previa a la implantación (Davis *et al.*, 1947).

La inducción de diabetes química antes o cerca de la neurulación en la rata o ratón ocasiona diversos efectos: La administración de 200 mg/Kg en el día seis, causa retraso de la osificación, sin afectar al sistema nervioso o cardíaco (Wilson *et al.*, 1985). La inducción en el día siete con 160 mg/Kg, provoca una alta frecuencia de malformaciones del sistema nervioso central (Takano y Nishimura, 1966). Una dosis única de 100 mg/Kg entre los días 8.5 a 13.5 provoca una alta mortalidad y paladar hendido, siendo menor el efecto cuando el desarrollo embrionario está más avanzado (Watanabe e Ingalls, 1963), mientras que la administración entre los días 10 al 12, provoca un alto porcentaje de aborto (Angerwall, 1959). Si se aplica la misma dosis en el día nueve de la gestación, se encuentra una elevada proporción de reabsorciones fetales (Ellison y Maren, 1972); mientras que 60 mg/Kg al mismo día, provocan una elevada proporción de malformaciones de los sistemas nervioso central y cardíaco (Deuchar, 1977). Dosis de 67 a 125 mg/Kg entre los días 11 a 14 de gestación provoca crías mayores que las normales (Solomon, 1959), lo que indica que quizá este autor provocó una diabetes gestacional.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Obtener un modelo apropiado de diabetes mellitus tipo 1 que permita estudiar las malformaciones congénitas, no es una tarea fácil, debido a que no hay un consenso entre los autores acerca del día en que se debe administrar la aloxana ni de la dosis a emplear. Es posible que las aparentes contradicciones entre los autores se deban al uso de diferentes cepas, distinta presentación, marca y estado de conservación de la aloxana, e incluso a la susceptibilidad de los animales de experimentación. En experiencias previas, dosis de aloxana mayores a 150 mg/Kg de peso, administradas a ratas machos y hembras, causan un estado diabético tan severo, que los animales que la presentan mueren muy rápido, y dosis menores a 80 mg/Kg no causan diabetes en la rata macho o hembra no gestante (datos no mostrados).

Actualmente existe mucho interés en contar con un modelo de diabetes mellitus tipo 1, durante el proceso de gestación, que nos permita estudiar las alteraciones que la acompañan, además de que sea económico y rápido de producir. La pancreatectomía es muy agresiva, y realizarla previo a la gestación causa la pérdida de la fertilidad (Foglia *et al.*, 1963). Por otra parte, las cepas de ratas genéticamente diabéticas (Zucker, ob/ob, etc) constituyen un modelo de diabetes mellitus tipo 2, además de que la frecuencia de teratogénesis en estas ratas es muy baja y el costo de obtención y mantenimiento es elevado.

Por lo anterior, las únicas opciones para la inducción de la diabetes son la estreptozotocina y la aloxana; y como se indicó anteriormente, aquella es cien veces más costosa y no se encuentra en disposición en nuestro laboratorio. Por esto, se eligió la utilización de la aloxana.

III. OBJETIVOS

Principal

Obtener un modelo de diabetes mellitus tipo 1 complicado con gestación, mediante la inducción con aloxana en la rata de la cepa Sprague-Dowley, para estudiar las diversas alteraciones que dicha enfermedad produce en el desarrollo embrionario; y, además, ofrecer alternativas que puedan ser aplicadas clínicamente en la misma problemática humana.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Obtener un modelo apropiado de diabetes mellitus tipo 1 que permita estudiar las malformaciones congénitas, no es una tarea fácil, debido a que no hay un consenso entre los autores acerca del día en que se debe administrar la aloxana ni de la dosis a emplear. Es posible que las aparentes contradicciones entre los autores se deban al uso de diferentes cepas, distinta presentación, marca y estado de conservación de la aloxana, e incluso a la susceptibilidad de los animales de experimentación. En experiencias previas, dosis de aloxana mayores a 150 mg/Kg de peso, administradas a ratas machos y hembras, causan un estado diabético tan severo, que los animales que la presentan mueren muy rápido, y dosis menores a 80 mg/Kg no causan diabetes en la rata macho o hembra no gestante (datos no mostrados).

Actualmente existe mucho interés en contar con un modelo de diabetes mellitus tipo 1, durante el proceso de gestación, que nos permita estudiar las alteraciones que la acompañan, además de que sea económico y rápido de producir. La pancreatectomía es muy agresiva, y realizarla previo a la gestación causa la pérdida de la fertilidad (Foglia *et al.*, 1963). Por otra parte, las cepas de ratas genéticamente diabéticas (Zucker, ob/ob, etc) constituyen un modelo de diabetes mellitus tipo 2, además de que la frecuencia de teratogénesis en estas ratas es muy baja y el costo de obtención y mantenimiento es elevado.

Por lo anterior, las únicas opciones para la inducción de la diabetes son la estreptozotocina y la aloxana, y como se indicó anteriormente, aquella es cien veces más costosa y no se encuentra en disposición en nuestro laboratorio. Por esto, se eligió la utilización de la aloxana.

III. OBJETIVOS

Principal

Obtener un modelo de diabetes mellitus tipo 1 complicado con gestación, mediante la inducción con aloxana en la rata de la cepa Sprague-Dowley, para estudiar las diversas alteraciones que dicha enfermedad produce en el desarrollo embrionario; y, además, ofrecer alternativas que puedan ser aplicadas clínicamente en la misma problemática humana.

Particulares

1. Encontrar la dosis diabética de la aloxana en las ratas de la cepa Sprague-Dowley, en el día cero de la gestación.
2. Evaluar los efectos teratogénicos de diferentes dosis de aloxana en ratas Sprague-Dowley.

IV. METODOLOGIA

1. Material biológico. Se utilizaron 107 ratas hembras vírgenes de la cepa Sprague-Dowley, con una edad de dos a dos meses y medio (para estudios teratológicos no es recomendable emplear ratas de mayor edad o con más peso, Beaudin, 1980) y un peso aproximado de 250 g, en las cuales se estableció previamente que presentaban ciclos estrales definidos. Estos animales fueron proporcionados por el Bioterio Central del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se mantuvieron en condiciones de luz, humedad y temperatura controladas, con agua y alimentación (Purina rat chow) *ad libitum*.

2. Apareamiento. Las ratas se aparearon utilizando el sistema poligámico; dos hembras y un macho fértil, permaneciendo juntos toda la noche. Se asignó como tiempo cero (día cero) de la gestación la medianoche anterior al día en que se detectaron espermatozoides en el lavado vaginal.

3. Inducción de diabetes. El presente estudio se dividió en dos fases, la primera enfocada a la búsqueda de la dosis mínima teratogénica, utilizando aloxana a dosis de 80, 90, 100, 110, 120, 140 y 150 mg/Kg de peso, el día cero de la gestación; y la evaluación de su efecto los días 8 ó 10 de desarrollo embrionario, con el fin de detectar malformaciones en los procesos de cierre de tubo neural. Para esta parte se utilizaron 60 ratas, asignadas al azar a grupos de número variable, debido a la alta mortalidad encontrada. En los resultados se detalla para cada experimento, tanto el número inicial de organismos, como el porcentaje de mortalidad y el efecto encontrado. Se tuvieron 17 animales como control, a los que se administró solución salina (NaCl 0.9%) por vía intraperitoneal, de manera simultánea a los sujetos experimentales.

En la segunda fase, enfocada a la búsqueda de malformaciones gruesas o mayores evidentes, se utilizaron 47 ratas, tratadas con dosis de aloxana de 80, 90, 100 y 110 mg/Kg de peso o solución salina al 0.9%, administradas el día cero de la gestación. Estos grupos también fueron de tamaño variable, debido a la mortalidad provocada por distintas dosis del fármaco. En ellos, se determinó adicionalmente la glucemia diaria mediante la obtención de una gota de sangre venosa, por la vena caudal, y su aplicación a una tira reactiva HaemoGlukotest 20-800R, que fue medida en un Glucometro Reflolux S, de acuerdo a los instructivos del aparato y de las tiras.

4. Determinación del peso materno. Después de la administración de la aloxana, las hembras diabéticas y las controles fueron pesadas diariamente, con la finalidad de observar posibles fluctuaciones en el peso durante la gestación, que pudieran provocar las diferentes dosis administradas.

5. Determinaciones bioquímicas. Previamente al sacrificio de las hembras en las que se indujo la diabetes y en las controles, se obtuvieron muestras sanguíneas a través de punción cardiaca bajo anestesia total de los animales con 0.3-0.4 de Anestosal (pentobarbital sódico), i.m. La sangre colectada se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, y el suero obtenido (sobrenadante) se llevó a reaccionar con glucosa oxidasa/peroxidasa en presencia de O_2 , H_2O y aminofenozona, de acuerdo a la técnica Merckotest 740 393 (Glucosa Trinder).

6. Determinación de los efectos teratogénicos. En la segunda fase del estudio, las ratas se sacrificaron mediante dislocación cervical en el día 19 de la gestación. En seguida se disecaron los úteros y se contó el número de fetos viables, muertos y reabsorbidos. Los fetos obtenidos se analizaron macroscópicamente, y posteriormente se analizaron mediante la técnica de Wilson modificada por Barrow y Taylor (1969), que es un método para determinar malformaciones internas. Además, se utilizó la técnica histológica de rutina (H-E) para la determinación de daños a nivel tisular, sobre todo del tejido nervioso y hepático.

7. Análisis estadísticos. Mediante la prueba de ancova (Análisis de Covarianza), se compararon los valores medios del cambio o ganancia de peso corporal y de la glucemia de las ratas gestantes tratadas con 80, 90, 100 y 110 mg de aloxana/Kg de peso, además de los controles. Esta prueba estadística fue elegida con el objeto de ver que efectos hay entre los diferentes tratamientos aplicados y otras variables, y por otra parte, eliminar la posible influencia de otros factores no considerados. Los valores medios del peso fetal de los hijos de ratas tratadas con 100 mg de aloxana/Kg de peso y de sus controles, así como los parámetros bioquímicos (glucosa sérica, triacilglicéridos y lípidos totales), al día 19, día del sacrificio, para ratas tratadas con esta misma dosis de aloxana, se analizaron mediante la prueba de t de Student. Estos parámetros bioquímicos fueron determinados también para la dosis de 110 mg de aloxana/Kg de peso mediante la prueba de t de Student. El tamaño de camada de las ratas tratadas con 100 mg de aloxana/Kg de peso y sus controles se procesaron utilizando las pruebas estadísticas de t de Student y de la mediana. El nivel de significancia estadística elegido fue de 0.05 (95% de confianza).

V. RESULTADOS

La administración de aloxana a ratas gestantes produjo los siguientes efectos:

En la Tabla 2 se muestran los efectos que sobre el desarrollo embrionario de la rata Sprague Dowley produce la aplicación de 120, 140 y 150 mg de aloxana/Kg de peso administradas por vía intraperitoneal (v.i.p.) en el día cero de la gestación y evaluados el día 8.

120 mg de aloxana/Kg de peso (n=10) resultaron en una mortalidad del 20%. El 75% de las ratas sobrevivientes presentaron sitios de implantación que se caracterizan en este caso, por la presencia de neoplasias o decíduomas. El tamaño de camada fue de 12.8 ± 1.6 fetos. Cuando se administró 140 mg de aloxana/Kg de peso (n=15), se encontró un tamaño de camada similar, el cual fue de 13.0 ± 2.4 fetos; la mortalidad fue del 27% y solo el 36.4% de las ratas sobrevivientes presentaron sitios de implantación. Y con 150 mg de aloxana/Kg de peso (n=4) se da el número más bajo de camada (10.0 fetos), produciendo una mortalidad del 25%. El grupo control (n=4), tratado con solución salina al 0.9% no presentó mortalidad, y el 75% de ellas tuvieron sitios de implantación, presentando un tamaño de camada de 12.6 ± 1.5 fetos.

El efecto de las mismas dosis de aloxana fue evaluado al día 10 de la gestación (Tabla 3). La dosis de 120 mg de aloxana/Kg de peso (n=4) produjo una mortalidad de 25%, las ratas sobrevivientes (75%) presentaron sitios de implantación que específicamente fueron identificados y registrados como reabsorciones, con un tamaño de camada de 12.3 ± 0.6 . Con 140 mg de aloxana/Kg de peso (n=6), se dio una mortalidad del 33%, todas las ratas sobrevivientes (66%) presentaron sitios de implantación, igualmente como reabsorciones, el tamaño de camada fue de 9.0 ± 2.0 . La dosis de 150 mg de aloxana/Kg de peso (n=4) resultó letal para todo el lote de ratas a las que se les administró. El grupo control (n=4) para esta serie experimental no fue afectado por muertes, el 75% de las ratas presentaron sitios de implantación con decíduomas, y el tamaño de camada fue de 10.0 ± 5.2 . El efecto de dosis de aloxana inferiores a las anteriormente descritas (80 y 100 mg/Kg de peso) sobre el desarrollo embrionario de la rata al día 10 de la gestación, se muestra en la Tabla 4. La administración de 80 mg de aloxana/Kg de peso (n=4) produjo niveles sanguíneos de glucosa de 128.3 ± 44.4 mg/dL. El tamaño de camada fue de 12.0 ± 2.2 , y los embriones tuvieron de 22 a 24 somitas. En este grupo experimental se dio la mayor severidad de daños, tales como exencefalia, mal plegamiento, decíduomas pequeños y vacíos, etc. (figs. 1 y 2).

La dosis de 100 mg de aloxana/Kg de peso (n=4) resultó en niveles sanguíneos maternos de glucosa de 342.5 ± 246.7 mg/dL. Estas ratas tuvieron un tamaño de camada de 14.3 ± 1.0 , muy similar a los controles. Los embriones tuvieron de 22 a 23 somitas, otros tenían talla pequeña y, al obtenerlos estaban muertos, probablemente debido a la acción embriotóxica de la aloxana o al efecto del metabolismo alterado del embarazo. Las ratas control (n=2), tuvieron niveles de glucosa sanguínea de 101.5 ± 6.36 mg/dL; y el tamaño de camada fue de 14.0 ± 2.7 . Los embriones tuvieron 23-24 somitas, presentando características morfológicas normales. Los deciduomas, en todas las series experimentales donde se evaluaron para obtener el tamaño de camada fueron apreciados a simple vista.

En un experimento posterior, se evaluó el cambio o ganancia de peso materno diario desde el día cero hasta el día 19 de la gestación, y la glucemia desde el día cero hasta el día 18, por efecto de varias dosis de aloxana (ver Metodología). La Figura 1A muestra el peso en gramos (del día cero al día 19 de la gestación) de ratas gestantes control (n=4) y de las que se les administró 80 y 90 mg de aloxana/Kg de peso (n=6 en ambos casos). Se puede apreciar que no hay una variación notable entre los pesos de las ratas tratadas con aloxana respecto al grupo control. Las tres curvas muestran tendencias muy parecidas, incluso en sus variaciones ascendentes y descendentes, y probablemente indicarían que no tienen diferencias significativas.

La Figura 1B muestra los niveles de glucosa sanguínea en las ratas gestantes control (n=4) y de aquellas tratadas con 80 y 90 mg de aloxana/Kg de peso (n=6). El grupo al que se le administró 80 mg de aloxana/Kg de peso mostró una mayor variación en cuanto a los niveles sanguíneos de glucosa con respecto al grupo control. El grupo tratado con 90 mg de aloxana/Kg de peso, muestra la más grande variación de los niveles sanguíneos de glucosa de los tres grupos considerados.

La Figura 2A muestra el cambio de peso en gramos de ratas gestantes control (n=7) e inducidas a diabetes con 100 mg de aloxana/Kg de peso (n=9). El peso del grupo experimental muestra una curva muy parecida en forma a la del grupo control, aunque no se aprecia mucha variación entre ambas curvas, la curva del grupo experimental se mantiene siempre por abajo de la curva del grupo control, lo que significa que hay una importante reducción de la ganancia de peso en el grupo diabético. La Figura 2B muestra los niveles sanguíneos de glucosa de ratas gestantes control y de ratas gestantes diabéticas inducidas con 100 mg de aloxana/Kg de peso administrada por vía intraperitoneal. En el grupo control no se aprecian grandes variaciones en los niveles sanguíneos de glucosa, sin embargo, en conjunto hay una tendencia a disminuir.

La Figura 3A muestra el peso en gramos de las ratas gestantes control y del grupo experimental a quienes se les administró 110 mg de aloxana/Kg de peso. Se aprecia claramente que el peso de las ratas de este grupo experimental, (que incluye a las ratas en su totalidad, es decir, independientemente de ser madres o no “todos los datos”, $n=11$; y aquellas que fueron madres “solo las madres”, $n=8$) queda por abajo del peso de las ratas del grupo control, excepto los días cero, uno, dos, seis y 19, en “solo las madres” y al día cero en “todos los datos”, días en que el peso de éstas se encuentran por arriba del peso de las madres control. El 21.4% de las ratas murieron de hiperglucemia. Igualmente el 21.4% de las ratas no lograron embarazarse, o perdieron los fetos, de manera que no se pudieron observar ni reabsorciones. La Figura 3B muestra los niveles sanguíneos de glucosa en mg/dL, de ratas gestantes control y del grupo experimental inducido a diabetes con 110 mg de aloxana/Kg de peso. En general las curvas de los niveles sanguíneos de glucosa de “todos los datos” y de “solo las madres” tienen la misma forma, aunque cuantitativamente son diferentes, siendo de valores más altos los de “todos los datos”. No obstante, en ambos casos los niveles sanguíneos de glucosa son superiores a los del grupo control. La glucemia en el grupo control no varía de manera considerable, manteniéndose durante la gestación en un rango de 60.6 a 86.7 mg/dL. Los valores límite de este rango son los del día cero (86.7 mg/dL) y los del día 18 (60.6 mg/dL). Los valores de la glucosa sanguínea de “solo las madres” son los que se acercan más a los valores de la glucosa sanguínea del grupo control.

Estadísticamente, la comparación recíproca, mediante el análisis de covarianza, entre los días de la gestación en función del cambio o ganancia de peso materno por efecto de todos los tratamientos (C, a80, a90, C2, a100, a110 y a110m) nos indica, según la prueba de Tukey, que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir del día 10 de la gestación hasta el día 19, día del sacrificio, y que estas diferencias van disminuyendo a medida que nos acercamos al día de dicho sacrificio; igualmente hay diferencias significativas del día cero al día 14 de la gestación con respecto a los días 10 a 19. El resumen de todos los efectos sobre el cambio o ganancia de peso materno, se relaciona con los tratamientos aplicados y con los días de la gestación: entre los tratamientos, sí hay diferencias significativas, e igualmente entre los días de la gestación ($p < 0.05$); pero al comparar los tratamientos con los días de la gestación no hay significancia estadística entre ambas variables.

La figura 4A muestra los valores medios del cambio o ganancia de peso materno y de la glucemia en función de los diversos tratamientos. El efecto principal se debe a estos últimos ($p <$

0.05). El cambio o ganancia de peso materno varía dentro de un rango no muy amplio, pero es muy evidente en los tratamientos de aloxana de 100 mg/Kg y 110 mg/Kg “todos los datos”, donde se da una disminución del cambio o ganancia de peso materno con respecto a los dos tratamientos control. Igualmente se da una variación notable, aunque en menor grado, en los tratamientos de aloxana de 80 y 90 mg/Kg, sin embargo dicha variación implica un aumento en el cambio o ganancia de peso materno con respecto a los dos tratamientos control y al de aloxana 110 mg/Kg “solo las madres”.

La figura 4B muestra los valores medios del cambio o ganancia de peso materno y de la glucemia en función de los días de la gestación, los cuales constituyen el efecto principal ($p < 0.05$). El cambio o ganancia de peso materno se manifiesta en un aumento constante a través de todo el período de la gestación. La glucemia muestra una tendencia ascendente del día cero al día cuatro de la gestación, y posteriormente desciende gradualmente hasta volver a los niveles iniciales.

La prueba de Tukey, que proporciona las probabilidades de la relación entre el cambio o la ganancia de peso materno y los tratamientos, indica que los tratamientos de aloxana 100 mg/Kg y 110 mg/Kg “todos los datos” resultaron con más diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos. De igual manera, los tratamientos de aloxana 100 mg/Kg y 110 mg/Kg “todos los datos” tienen más diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos cuando se consideró la glucemia. Los tratamientos constituyen el efecto principal sobre el cambio o ganancia de peso materno y la glucemia.

La prueba de Tukey, que compara entre sí los días de la gestación en función de la glucemia, no muestra diferencias significativas.

La figura 4C muestra los valores medios del cambio o ganancia de peso materno por efecto de cada uno de los tratamientos en función de los días de la gestación. Se puede observar que en los tratamientos de aloxana de 80 y 90 mg/Kg se dan cambios de peso materno muy bruscos después del día 11 de la gestación, mientras que los demás tratamientos siguen un patrón regular y semejante entre sí durante todo el período de la gestación, aunque no cuantitativamente.

El resumen de todos los efectos sobre el cambio o ganancia de peso materno, implica la comparación de todos los tratamientos por una parte, y de los días de la gestación por otra. En este caso, se dan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, entre los días de la gestación y también cuando se comparan tratamientos con los días de la gestación.

La Tabla 5 muestra el efecto de la aloxana sobre algunos parámetros bioquímicos, índice de

mortalidad, peso fetal y el tamaño de la camada o número de fetos al día del sacrificio (día 19) de ratas gestantes. La administración de 80 mg de aloxana/Kg de peso (n=6) resultó en 95.0 ± 14.34 mg de glucosa sérica/dL, ellas produjeron 12.8 ± 1.3 fetos; pesando 2.1138 ± 0.2228 g (n =77). No se presentó mortalidad en este grupo. Los triacilglicéridos fueron de 339.16 ± 304.36 mg/dL.

El tratamiento con 90 mg de aloxana/Kg de peso (n=6) ocasionó una mortalidad del 33%. Las ratas sobrevivientes registraron niveles séricos de glucosa de 106.0 ± 20.15 mg/dL; además de un tamaño de camada de 12.0 ± 3.6 fetos, y un peso fetal de 2.100 ± 0.5229 g (n = 43). Los niveles séricos de triacilglicéridos fueron de 325.75 ± 183.99 mg/dL.

La dosis de 100 mg de aloxana/Kg de peso (n=14) ocasionó una mortalidad del 36%, sobreviviendo 9 ratas (64%), las cuales tuvieron un nivel sérico de glucosa de 207.0 ± 134.56 mg/dL (no significativo, $p > 0.05$ con respecto al control). Los niveles séricos de triacilglicéridos fueron de 243.11 ± 119.88 mg/dL, lo que representa una disminución del 54% (significativos, $p < 0.015$). El contenido de lípidos totales fue de 616.89 ± 144.27 mg/dL, es decir fueron aumentados en un 35% (no significativo, $p = 0.247$). El tamaño de camada fue de 9.0 ± 3.9 (significativo, $p = 0.023$). El peso fetal fue de 2.1488 ± 0.2031 g (n = 80; significativo, $p < 0.05$).

El tratamiento de 110 mg de aloxana/Kg de peso (n = 14) resultó en una mortalidad de 21.43%, sobreviviendo el 78.6 % de las ratas. Estas tuvieron un nivel medio de glucosa sérica de 188.0 ± 177.0 mg/dL (no significativo, $p = 0.202$). Los niveles séricos de triacilglicéridos fueron de 740.82 ± 311.82 mg/dL, aumentados en un 64% (significativos, $p < 0.05$), y los de lípidos totales de 356.73 ± 289.39 mg/dL, disminuidos en un 22% (no significativos). Los niveles de glucosa sérica están en un rango de 79 a 547 mg/dL. Los triacilglicéridos (rango de 415 a 1428 mg/dL) son muy variables y, en general, mucho más altos que en los controles. Los niveles de lípidos están entre 40 y 958 mg/dL (media = 356.7 mg/dL) y son menores que los del grupo control. Llama la atención que los valores mas altos de lípidos, 958 mg/dL (rata 4) y 785 mg/dL (rata 12), corresponden a niveles relativamente bajos de glucosa sanguínea 89 mg/dL (rata 4) y 129 mg/dL (rata 12). El 21.4 % de las ratas no mostraron fetos, teniendo esto una relación directa con el grado de glucemia exhibido por estas ratas diabéticas, lo que coincide con los valores más altos de la glucemia. Se observaron 10.5 ± 2.1 fetos en la camada. El peso fetal fue de 2.1196 ± 0.4201 g (n = 82). El 35.7% de las ratas murieron antes del día 19 debido a la hiperglucemia, pero no se pudo constatar si estaban o no gestantes. El grupo control no fue afectado por muertes, ya que el número inicial de animales (n = 7) al día cero de la gestación, ratas preñadas, fue igual al número final al día

19, día del sacrificio. Los niveles séricos de glucosa fueron 97.71 ± 6.39 mg/dL (rango de 87 a 104 mg/dL), mientras que los de triacilglicéridos de 451.71 ± 180.87 mg/dL (rango de 255 a 739 mg/dL) y los de lípidos totales de 458.43 ± 360.53 mg/dL (rango de 104 a 1125 mg/dL). No hay una relación coherente al respecto, ya que la rata con la más baja concentración sanguínea de glucosa (87 mg/dL) posee además el más alto nivel de lípidos (1125 mg/dL), mientras que sus niveles de triacilglicéridos (462 mg/dL) son apenas un poco más grandes que el promedio. No se presentaron malformaciones morfológicas evidentes. El tamaño de camada fue de 12.6 ± 1.3 fetos y el peso fetal 2.0365 ± 0.1229 gr.

Algunos órganos y tejidos provenientes de fetos con alteraciones morfológicas evidentes o aparentes fueron procesados con la técnica histológica de rutina; sin embargo, aunque estas muestras siempre tuvieron su correspondiente control, no resultaron positivamente tan distintivas como se esperaba. Adicionalmente, se efectuaron cortes histológicos, igualmente con la técnica de Harris, de útero y de reabsorciones de madres afectadas (sin controles), observándose en general, el endometrio engrosado, el epitelio con células cilíndricas simples junto con células secretoras y ciliadas. Hay destrucción parcial del endometrio y esfacelamiento del mismo, sobre todo de la capa funcional, que es la más superficial. También se observan evidencias de hemorragias moderadas debido a la ruptura de los vasos de la mucosa. El estroma es edematoso y las venas superficiales dilatadas. La capa basal permanece íntegra en la mayoría, y presenta glándulas desarrolladas. Las arterias y los capilares aparecen moderadamente desarrollados. El miometrio es hipertrófico y es notable la formación de nuevas fibras musculares y la división de las ya existentes; algunas células musculares están degeneradas y se halla presente una gran cantidad de tejido conectivo; se observa un engrosamiento de la capa muscular (figs. 5 y 6)

En las zonas de reabsorción, se observa la presencia de abundantes mononucleares mezclados con restos celulares derivados principalmente por células necróticas del endometrio y fibrina sobre las vellosidades endometriales. En la zona embrionaria, también se observan macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, además de células plasmáticas en gran número. La luz es más grande y hay un adelgazamiento de la zona estromal, además de una abundante vascularización. El epitelio está muy ramificado y en las mucosas se observan abundantes secreciones y glándulas muy desarrolladas. La presencia de numerosas células plasmáticas alrededor del endometrio profundo indica una importante reacción inmunológica.

Aunque la descripción anterior puede ser aún más detallada, no revela aspectos que

confirman alguna malformación congénita debida a la diabetes aloxana (o mellitus); por lo contrario, esta descripción confirma o la falta de malformaciones en la mayoría de los productos o la presencia de reabsorciones.

**TABLA 2 EFECTO DE LA ALOXANA EN EL DESARROLLO
EMBRIONARIO DE LA RATA SPRAGUE-DOWLEY AL
OCTAVO DIA DE LA GESTACION**

	Número inicial	Número final	Sitios de implantación (%)	Mortalidad (%)	Tamaño de camada *
CONTROL (Salina)	4	4	75.0	0.00	12.6 ± 1.5
ALOXANA (mg/kg de peso, i.p.)					
120	10	8	75.0	20.00	12.8 ± 1.6
140	15	11	36.4	27.00	13.0 ± 2.4
150	4	3	33.3	25.00	10.0 ± 0.0

*Se obtuvieron deciduomas con embriones normales en todos los casos.

* Se presentan la media ± desviación estándar.

**TABLA 3 EFECTO DE LA DIABETES ALOXANA EN EL DESARROLLO
EMBRIONARIO DE LA RATA SPRAGUE-DOWLEY AL
DECIMO DIA DE LA GESTACION**

	Número inicial	Número final	Sitios de implantación (%)	Mortalidad (%)	Tamaño de camada *
CONTROL (Salina)	4	4	75.0	0.00	10.0 ± 5.2
ALOXANA (mg/kg de peso, i.p.)					
120	4	3	100.0	25.00	12.3 ± 0.6
140	5	4	100.0	33.00	9.0 ± 2.0
150	4	0	0.0	100.00	0.0 ± 0.0

• Solo en el grupo control se obtuvieron deciduomas con embriones normales.

• Se presentan la media ± desviación estándar.

• Los grupos experimentales tratados con 120 y 140 mg de aloxana/kg presentaron reabsorciones.

TABLA 4 EFECTOS DE LA DIABETES ALOXANA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RATA SPRAGUE-DAWLEY AL DECIMO DIA DE LA GESTACION

	Número de ratas gestantes (N)	Glucosa sanguínea (mg/dl) *	Número de somitas	Características morfológicas	Tamaño de camada *
CONTROL (Salina)	2	101.5 ± 6.36	23 - 24	Normales	14.0 ± 2.7
ALOXANA (mg/kg de peso, i.p.)					
80	4	128.25 ± 44.35	22 - 24	Exencefalia (n = 2), defecto del plegamiento (n = 2), deciduomas pequeños y vacíos (n = 2)	12.0 ± 2.2
100	4	342.5 ± 246.7	22 - 23	Reabsorciones (n = 2), talla pequeña, muertos	14.3 ± 1.0

* Se presentan la media ± desviación estándar.

TABLA 5 EFECTOS DE LA DIABETES ALOXANA EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RATA SPRAGUE-DOWLEY AL DIA 19 DE LA GESTACION

	Número inicial	Número final	Mortalidad (%)	Glucosa sérica (mg/dl) *	Triacilglicéridos (mg/dl) *	Lípidos totales (mg/dl) *	Tamaño de camada **	Peso fetal (gr) *
Control (Salina)	7	7	0.00	97.71 ± 6.39	451.71 ± 180.87	458.42 ± 360.53	12.6 ± 1.3	2.0365 ± 0.1229
Aloxana (mg/kg, i.p.)								
80	6	6	0.00	95.00 ± 14.34	339.16 ± 344.36	549.5 ± 185.3	12.8 ± 1.3	2.1138 ± 0.2228
90	6	4	33.33	106.00 ± 20.15	325.75 ± 183.99	702.2 ± 41.8	12.0 ± 3.6	2.100 ± 0.5229
100	14	9	35.71	207.00 ± 134.56 •	243.11 ± 119.88 •	616.89 ± 144.27 •	9.0 ± 3.9 • ♦	2.1488 ± 0.2031 •
110	14	11	21.43	188.00 ± 177.00 •	740.82 ± 311.82 •	356.73 ± 289.39 •	10.5 ± 2.1	2.1196 ± 0.4201

* Se presentan la media ± desviación estándar.

** El tamaño de camada incluye reabsorciones, deciduomas y fetos.

• Se aplicaron análisis estadísticos de t de Students siendo significativos ($p < 0.05$) sólo para triacilglicéridos, tamaño de camada y peso fetal.

♦♦ Se aplicó la prueba de la mediana, siendo significativo ($p < 0.05$)

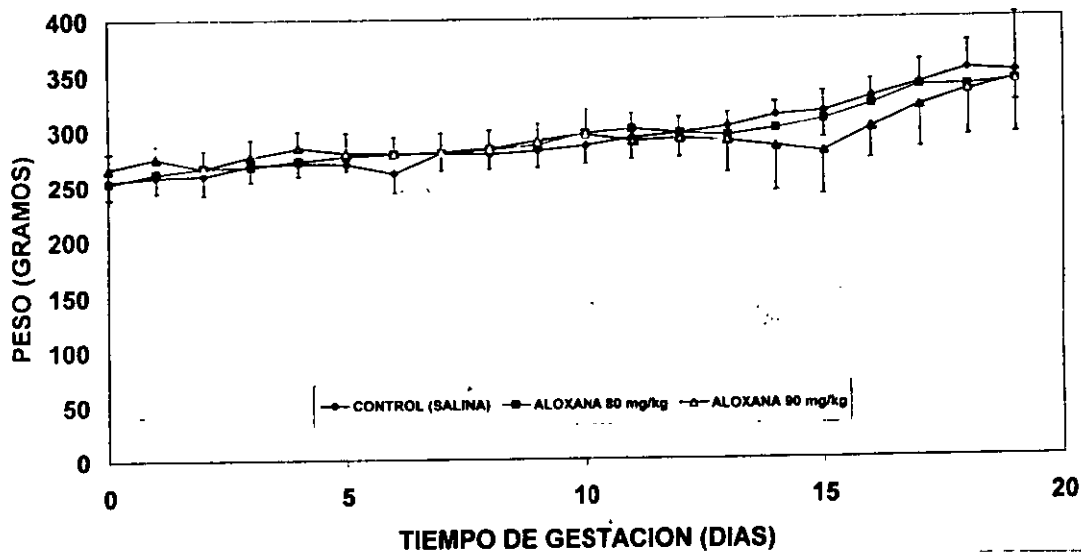


Figura 1A. Peso materno de ratas control y ratas tratadas con dosis de aloxana de 80 y 90 mg/Kg durante la gestación.

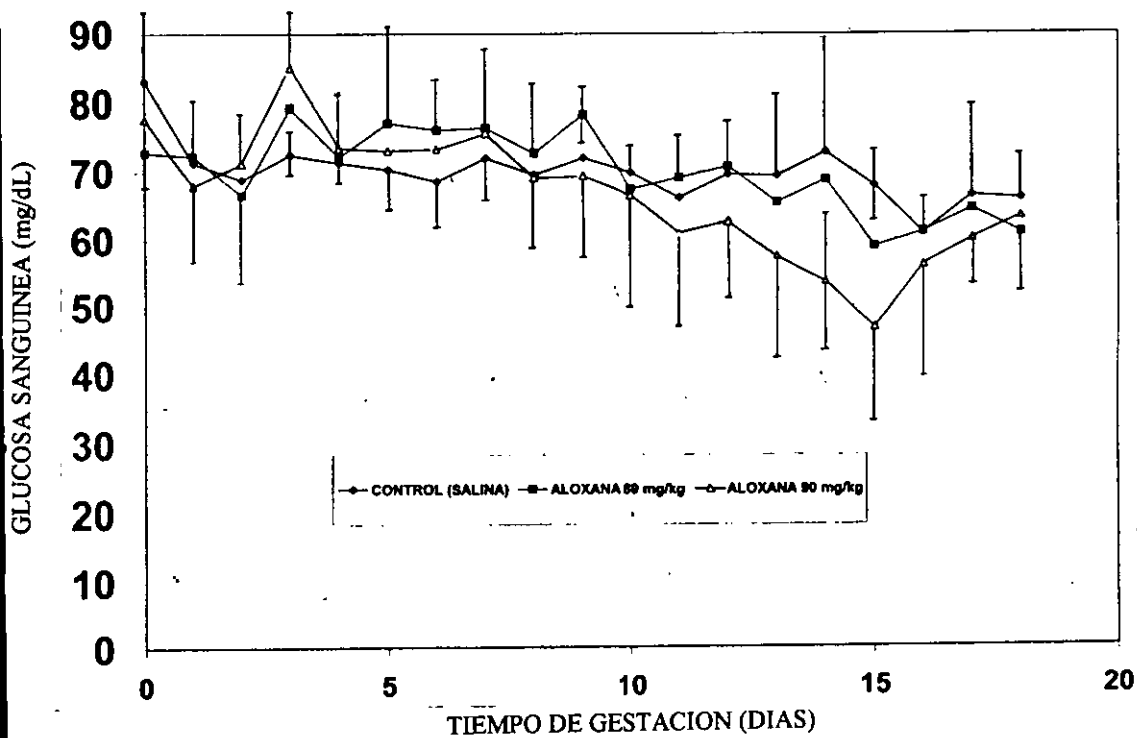


Figura 1B. Glucemia de ratas control y ratas tratadas con dosis de aloxana de 80 y 90 mg/Kg durante la gestación.

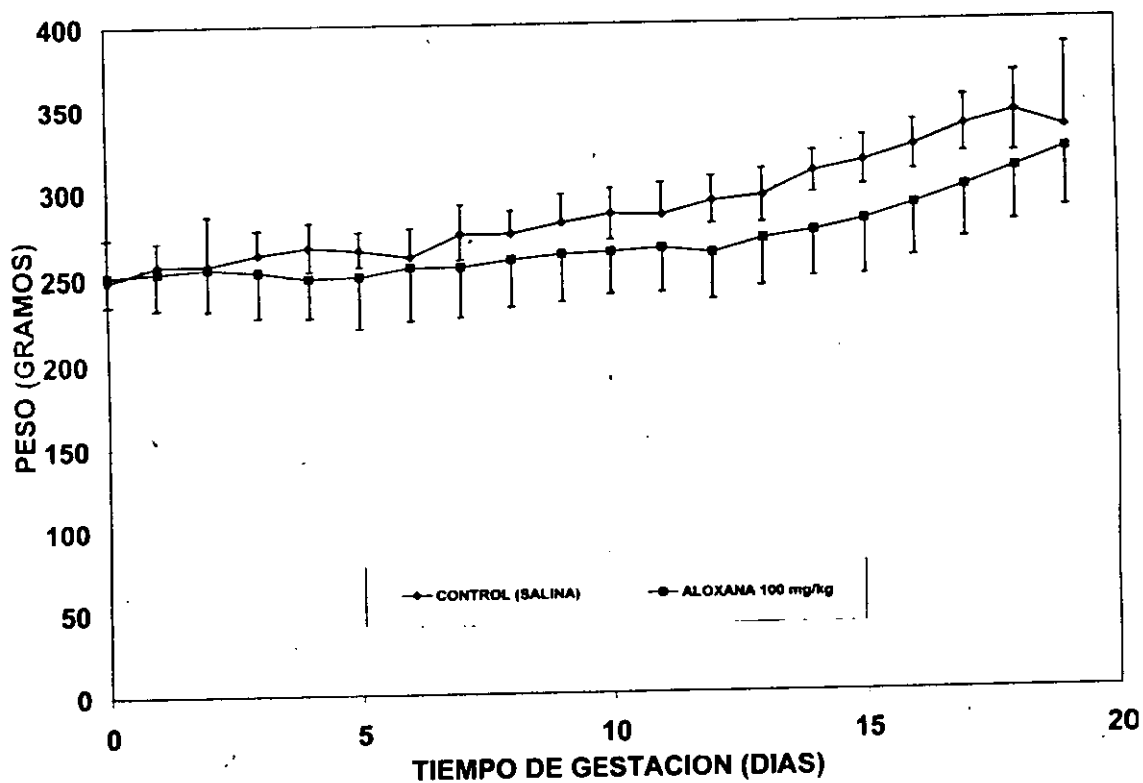


Figura 2A. Peso materno de ratas control y de ratas tratadas con aloxana 100 mg/Kg durante la gestación.

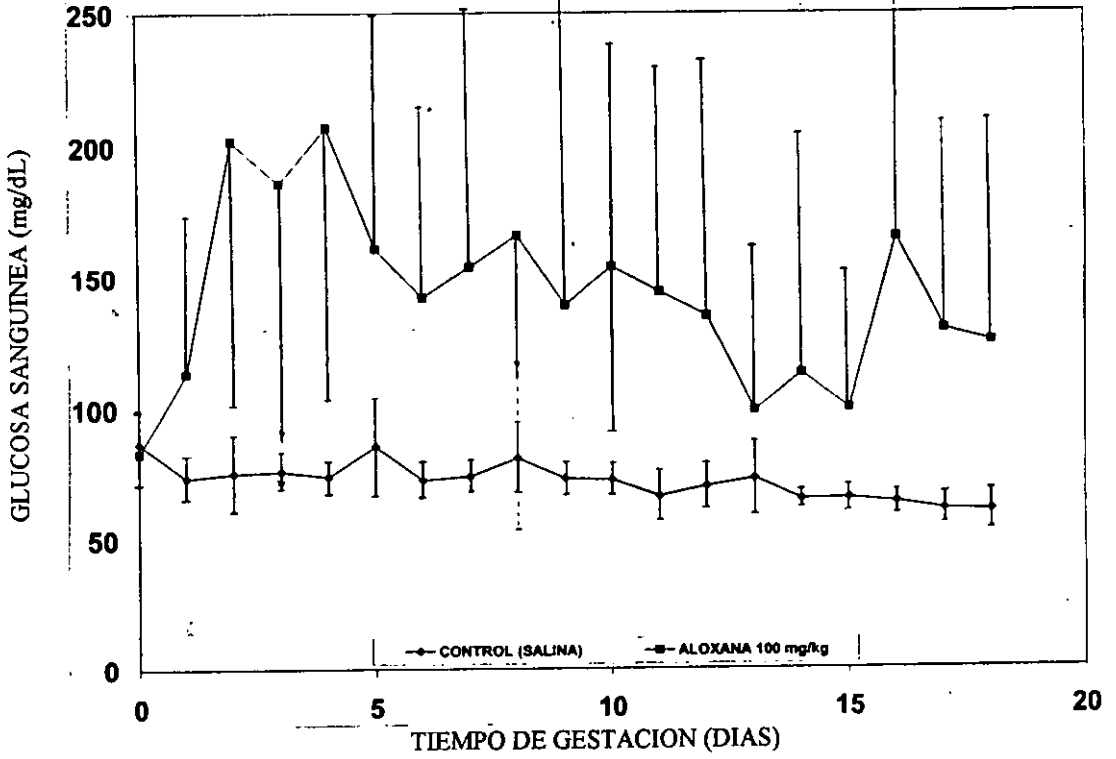


Figura 2B. Glucemia de ratas control y ratas tratadas con aloxana 100 mg/Kg durante la gestación.

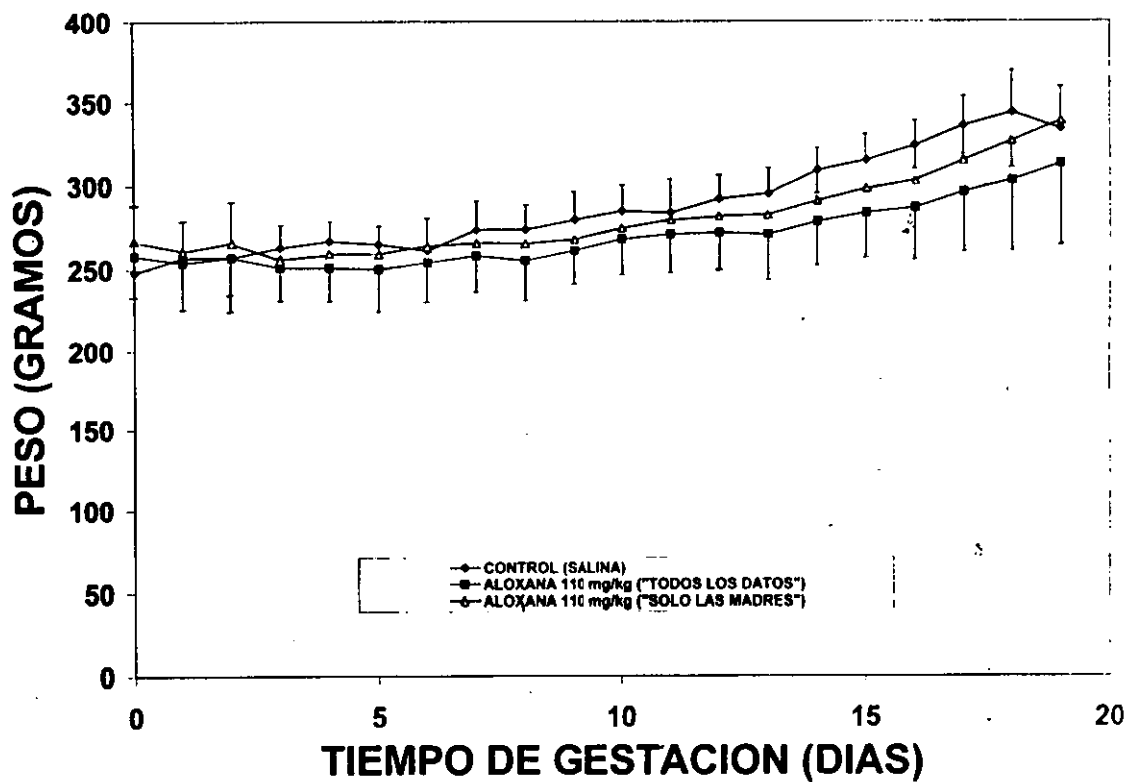


Figura 3A. Peso materno de ratas control y ratas tratadas con aloxana 110 mg/Kg durante la gestación.

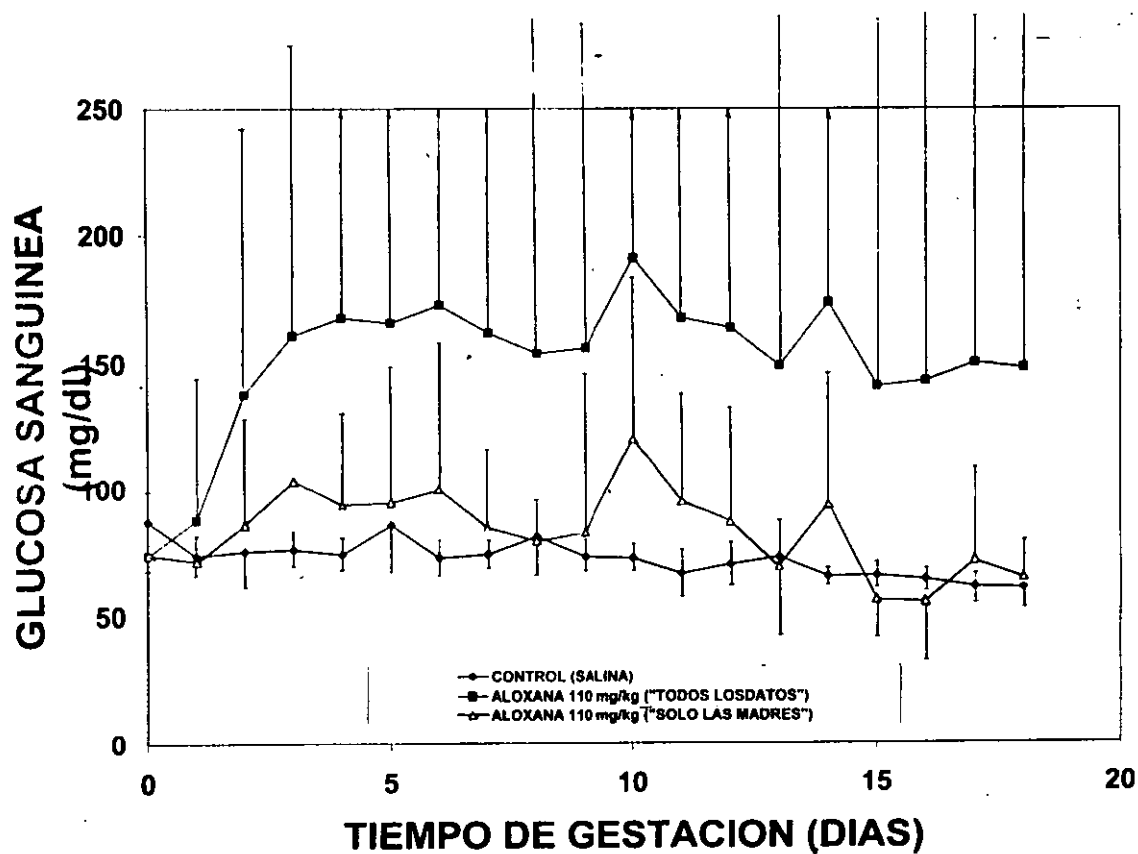


Figura 3B. Glucemia de ratas control y ratas tratadas con aloxana 110 mg/Kg durante la gestación.

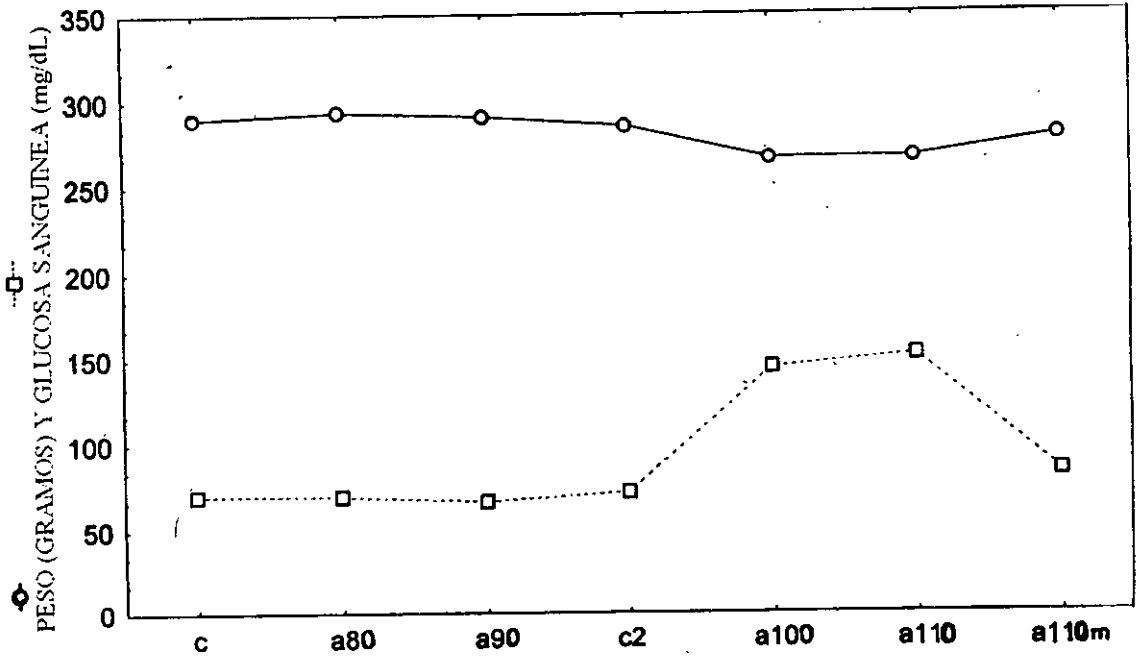


Figura 4A. Peso materno y glucemia en función de todos los tratamientos durante la gestación.

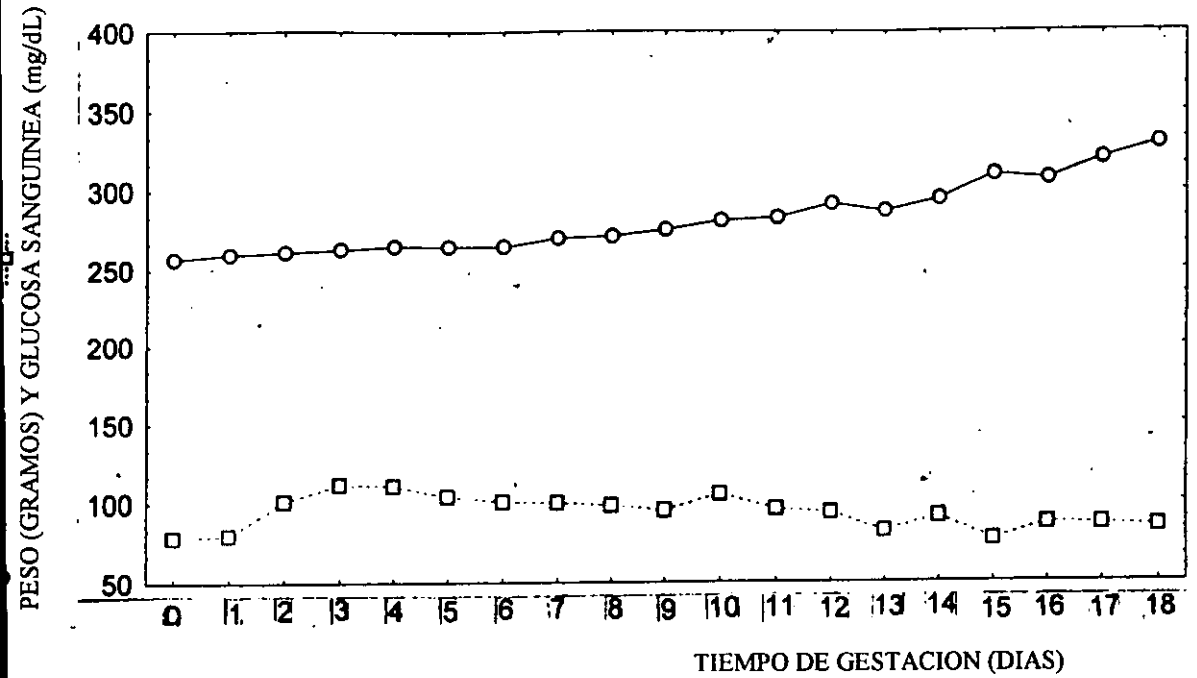


Figura 4B. Peso materno y glucemia de ratas control y tratadas con diversas dosis de aloxana en función de los días de la gestación.

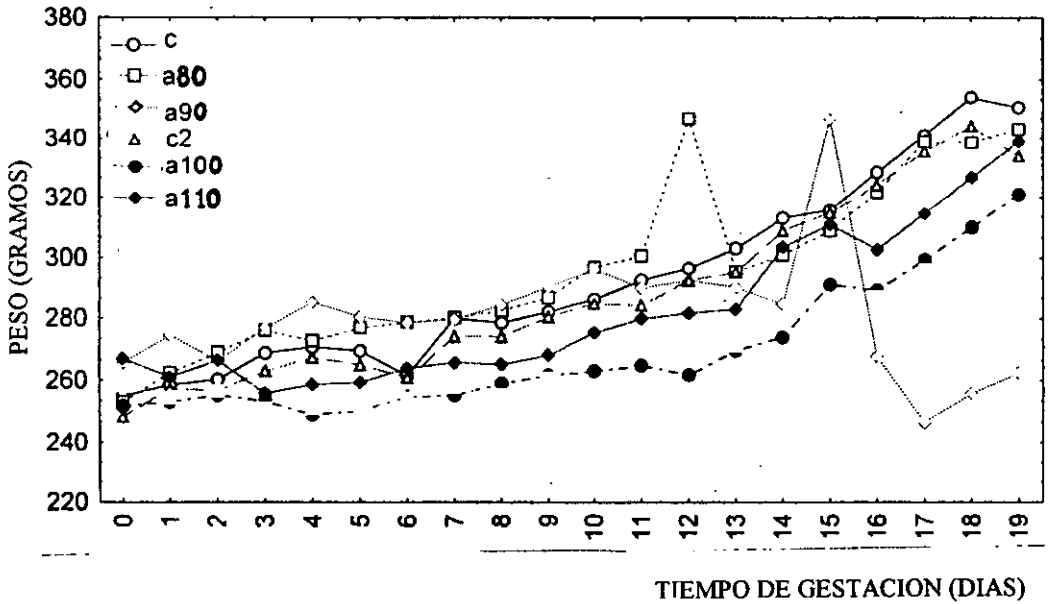


Figura 4C. Peso materno por efecto de todos los tratamientos en función de los días de la gestación.



Figura 5. Corte histológico (H-E, 200X) de útero de rata Sprague-Dowley tratada con aloxana, que presenta reabsorción embrionaria: a) Glándulas b) Vasos dilatados c) Epitelio cúbico.

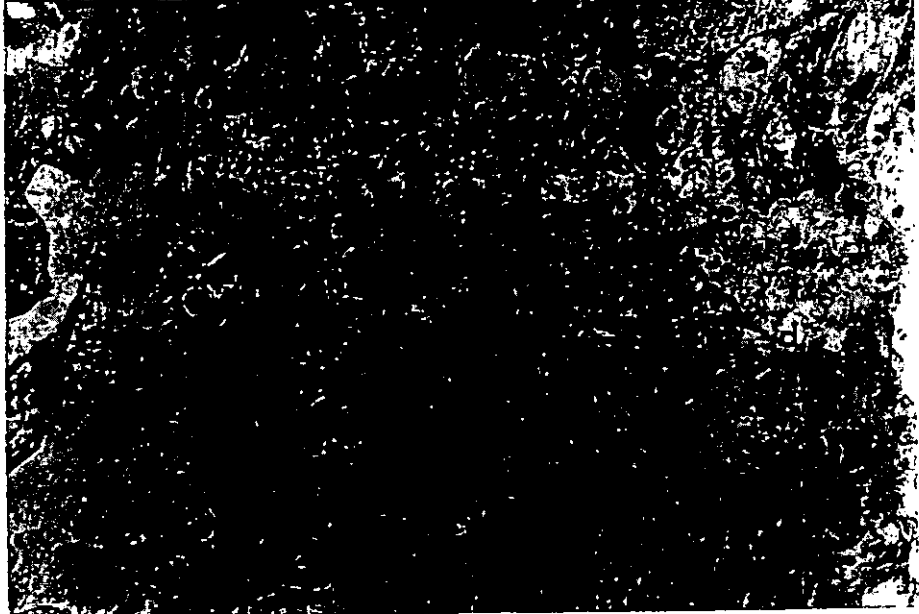


Figura 6. Corte histológico (H-E, 200X) de útero de rata Sprague-Dowley tratada con aloxana, de la zona embrionaria en reabsorción: a) Lagunas hemorrágicas b) Necrosis c) Neutrófilos d) Macrófagos.



Figura 7. Efecto de la administración de 80 mg/kg. de aloxana (40X):
 a) Embrión con malformaciones a nivel de tubo neural (flecha) a los 8 días de gestación. Note la curvatura anormal de la espina dorsal y la deficiencia del crecimiento.
 b) Embrión normal del mismo día

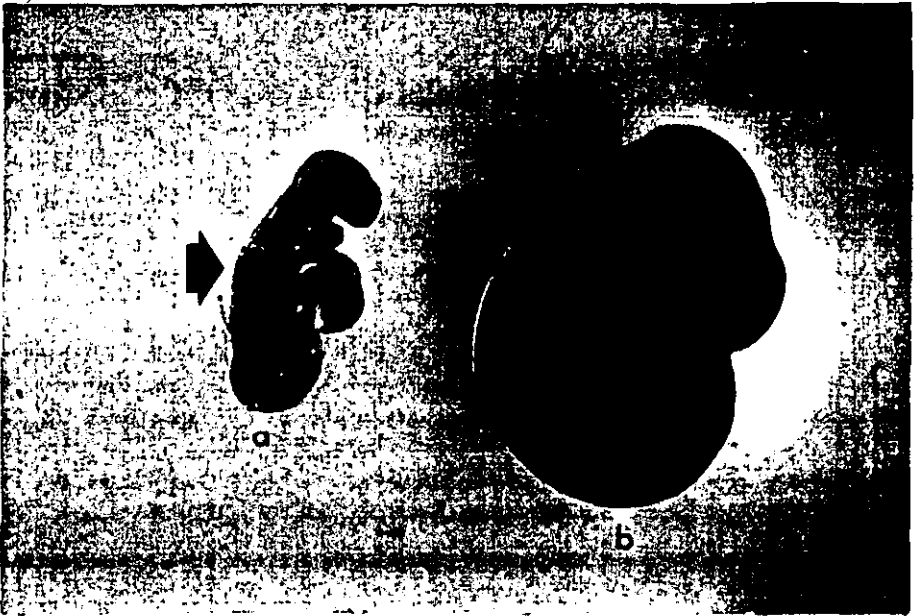


Figura 8. Efecto de la administración de 80 mg/kg. de aloxana (40X)
 a) Embrión con malformaciones evidentes, tales como retraso del crecimiento, peso disminuido y estructura corporal alterada a los 10 días de gestación.
 b) Embrión normal de la misma edad.

VI. DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta investigación están de acuerdo con los efectos de la aloxana en el desarrollo embrionario de la rata descritos por diversos autores. La literatura hace alusión a una gran variedad de dosis de aloxana administradas previo o durante la gestación por diferentes vías en roedores y otros animales, además de que los efectos señalados son muy diversos y contradictorios. Los autores consultados indican que incluso dosis bajas de aloxana como 25-30 mg/Kg de peso (Lazarow *et al.* 1960), 40 mg/Kg (Davis *et al.* 1947; Kim *et al.* 1960), 50 mg/Kg (Sinden y Longwell, 1949) o 55 mg/Kg (Lawrence y Contopoulos, 1960) producen efectos que van desde la aparición de subdiabetes, pasando por diabetes transitoria, hasta una diabetes bien establecida y permanente; y que, por lo contrario, dosis muy altas de aloxana como 160 mg/Kg (Takano y Nishimura, 1966), 140-175 mg/Kg (Levi y Weinberg, 1949), 200 mg/Kg (Wilson *et al.* 1985) y 300 mg/Kg (Diamond *et al.* 1989) inducen diabetes bien establecidas y en algunos casos tan severas que sus efectos dismorfogénicos son frecuentemente muy drásticos. Entre los principales inconvenientes que impiden la estandarización de la técnica de inducción de la diabetes mellitus tipo 1 están, por un lado, la falta de uniformidad de criterios en la literatura y, por otro, la existencia de resultados contradictorios; debido a esto, una de las cuestiones más interesantes por discutir se relaciona con este problema; e implica, que es muy importante determinar si las dosis de aloxana usadas aquí produjeron en realidad un estado diabético, y si así fue, de que grado. Por otra parte, no es suficiente dar por sentado que el efecto inmediato de la administración de aloxana es siempre la manifestación de hiperglucemia y otros síntomas clásicos de la diabetes mellitus, ya que esta puede ser transitoria. Los estudios de teratogénesis relacionados con diabetes mellitus requieren forzosamente del establecimiento de una condición de hiperglucemia permanente, como señalan la mayoría de los autores; y, sobre todo, que el control de dicha variable permitirá tener mayores posibilidades de establecer exitosamente el modelo animal de diabetes mellitus tipo 1.

Los valores normales de la glucemia en roedores, no obstante, pueden ser muy variables y dependen en muchos casos de factores que casi nunca consideramos, tales como las condiciones de crianza en los bioterios, principalmente luz, temperatura, humedad, alimentación, espacio, etc., Por otra parte, los errores de apreciación en la administración de sustancias, toma de muestras, interpretación de observaciones, tanto conductuales como de aparatos de medición y en la manipulación de animales, etc.; pueden afectar los resultados, ya que un mal manejo de ellos o errores en la aplicación de

sustancias pueden provocar estrés en los animales.

Al revisar los valores de referencia de análisis químicos clínicos para animales de laboratorio (Loeb y Quimby, 1989), se puede observar que los parámetros bioquímicos suelen ser muy variables y están en función de ciertos factores tales como el tipo de cepa utilizada, del sexo, de la edad, del origen de la muestra (o método de colección de sangre), del método de análisis utilizado, etc. Loeb y Quimby, (1989), reportan que la cepa de ratas Sprague-Dawley hembras, de 6 a 8 semanas de edad (1.5 a 2 meses), no embarazadas, tienen un nivel medio de glucosa sanguínea de 226 ± 89 mU/mL, siendo la muestra obtenida por punción cardiaca, determinada por el método de la glucosa oxidasa ($n=20$); mientras que la rata Sprague-Dawley hembra de 30 a 91 días de edad (1 a 3 meses) tiene una glucemia media de 143.10 ± 15.30 mg/dL resultante de una muestra obtenida de la órbita ocular, determinada por el método MCA ($n=30$). La rata Sprague-Dawley hembra de 30 a 91 días de edad (1 a 3 meses), de una muestra obtenida por punción cardiaca, tuvo una glucemia media de 237.89 ± 77.74 mg/dL, determinada por el método MCA ($n=69$).

Como se puede apreciar, el origen de la muestra es uno de los más importantes factores determinantes en la interpretación de los niveles de glucosa. La muestra tomada por punción cardiaca tiene un valor más elevado, siempre que sea tomada de la sangre arterial que se encuentra en la aurícula y ventrículo izquierdos; si la muestra es tomada de la vena caudal, la sangre venosa, no oxigenada, puede tener valores de glucosa un poco más bajos debido a que, aún en presencia de un estado diabético, la glucosa es muy permeable para ciertos órganos como el hígado y el cerebro, y por lo tanto es utilizada sin mediar receptores especializados como en las demás células, disminuyendo de este modo su concentración sanguínea. En este sentido, es muy importante tomar en cuenta que el mismo estado de gestación disminuye los niveles de glucosa, como se puede apreciar en los grupos control usados en esta investigación, y que, una situación de embarazo complicada con la manifestación de un cuadro patológico de diabetes no controlada puede alterar en un grado muy elevado el metabolismo y producir niveles muy bajos (hipoglucémicos) y/o altos (hiperglucémicos) de glucosa. Angervall (1959) utiliza ratas control de la cepa Sprague-Dawley cuyo nivel medio de glucosa es de 88 ± 6 mg/dL. Las ratas normales de la cepa Long Evans tienen una concentración media de glucosa de 102 mg/dL (Lawrence y Contopoulos, 1960). El nivel medio de glucosa de ratas control de la cepa Sprague-Dawley, se ha indicado estar en un rango de 80 a 100 mg/dL (media = 94 mg/dL) (Lazarow *et al.* 1960). Un valor

similar (media = 100 mg/dL) también fue señalado por Foglia *et al.* 1963. Las ratas control de Ellison y Maren (1972) mostraron un valor de 69 ± 4 mg/dL, que un día después de la administración de aloxana subió a 89 ± 4 mg/dL. Las ratas normales de la cepa Wistar tienen una glucemia de 90 a 130 mg/dL (Deuchar, 1977; Wilson, 1985). Finalmente Abdel Raman *et al.* (1992), hace el señalamiento de que las ratas control Sprague- Dowley tienen niveles medios de glucosa de 114.9 mg/dL antes del periodo de la gestación, y de 78.5 mg/dL durante éste.

Se ha indicado que los niveles normales de glucosa sérica en roedores son de 1.2 - 1.3 a 1.5 mg/mL (120 - 130 a 150 mg/dL) (Sadler, 1993); no obstante, casi todos los animales control utilizados en esta investigación (a excepción de 1 rata que tuvo 121 mg de glucosa /dL), tuvieron niveles de glucosa por abajo de estos valores, lo cual inicialmente los incluiría como hipoglucémicos. En la serie experimental en la que se administraron 80 y 100 mg de aloxana/Kg de peso (n=4, en ambos casos), cuyos efectos fueron evaluados al día 10 de la gestación, y que puede ser considerada como una serie preliminar (Tabla 4), se inducen hiperglucemias en 2 individuos en cada caso. La administración de 120, 140 y 150 mg de aloxana/Kg de peso y la correspondiente evaluación de sus efectos sobre el desarrollo embrionario al día 8 y 10 de la gestación (Tablas 2 y 3) resulta en un aumento en el número de decíduomas y/o reabsorciones en el cuerno uterino izquierdo y disminuciones de los mismos en el cuerno uterino derecho con respecto a los controles, excepto para la dosis de 120 mg de aloxana/Kg de peso al día 10 de la gestación, donde también hay un aumento en relación con los controles. Aunque no se determinaron los niveles de glucosa, las tasas de mortalidad o supervivencia producidas con esas dosis podrían estar relacionadas con glucemias muy altas. Además de que la literatura señala, que a estas dosis de aloxana se inducen diabetes muy severas cuyos efectos son también severos, tales como malformaciones del SNC, alteraciones del proceso de osificación, incapacidad para aparearse debido a patrones conductuales alterados (Levi y Weinberg, 1949; Takano y Nishimura, 1966; Wilson *et al.* 1985), e incluso falla de la ruptura de la vesícula germinal (Diamond *et al.* 1989). En este sentido, también concuerdan los señalamientos de los autores que hablan acerca de los índices elevados de mortalidad materna debidos a hiperglucemias elevadas.

Los decíduomas probablemente están relacionados con los altos niveles hiperglucémicos que impiden la continuidad de la preñez (Miller, 1947).

Al considerar los niveles promedio de glucosa sanguínea desde el día cero al día 18 de la gestación, previo al día del sacrificio, de las ratas madres tratadas con 80 y 90 mg de aloxana/Kg de

peso (Figura 1B) y del grupo control, nos permite apreciar una considerable variabilidad de los valores en las glucemias, y que, con respecto a Sadler (1993) no alcanzan nunca niveles hiperglucémicos. Con el tratamiento de 80 mg de aloxana/Kg de peso los niveles de glucosa comprenden un rango de 58.8 a 79.2 mg de glucosa/dL de sangre total. La mayor variabilidad de los niveles de glucosa se da con el tratamiento de 90 mg de aloxana/Kg de peso, en este caso, los niveles de glucosa caen en un rango de 46.5 a 85.0 mg/dL de sangre total. El rango de los niveles promedio de glucosa sanguínea en los controles fue de 60.8 a 83.0 mg/dL de sangre total. Sin embargo, no es posible comparar con los valores reportados por Sadler (1983), ya que el valor de 1.2 - 1.3 a 1.5 mg/dL reportado por este autor se refiere a glucosa sérica, mientras que el glucómetro utilizado en este estudio determina glucosa sanguínea. Por tal razón, el análisis es contra el grupo control, encontrando que no hay diferencia entre alguno de los dos tratamientos y éste último.

Al analizar los valores promedio de glucosa del día cero al día 18 de la gestación en ratas madres inducidas con 100 mg de aloxana/Kg de peso (Figura 2B), se observa que estos valores caen en un rango que va de 82.9 (día cero) a 207 mg de glucosa/dL (día cuatro), y al observar la gráfica de la figura, se aprecia una tendencia de estos valores a mantenerse en niveles hiperglucémicos, además de que, con respecto a la curva de los controles, la diferencia entre ambas es notable.

El análisis de los valores promedio de glucosa durante todos los días de la gestación (excepto el día 19, día del sacrificio), de las ratas tratadas con 110 mg de aloxana/Kg de peso (Figura 3B), tuvieron un rango de glucemia para "todos los datos" de 73.5 (día cero) a 191 mg de glucosa/dL (día 10); y el de "solo las madres", comprendió de 55.4 (día 16) a 120 mg de glucosa/dL (día 10). Llama la atención que en ambos casos al día 10 se alcanza el máximo valor de la glucemia. Esto se debe a que el 21.4% de las ratas desarrollaron hiperglucemia severa durante todo el embarazo y no se encontraron fetos en ellas, de tal manera que, al considerar "todos los datos" el máximo valor de 191 mg de glucosa/dL representa el promedio más alto; y en "solo las madres", también en ese día, se alcanza el máximo valor promedio de glucemia debido a que otro 21.4% de ratas registraron valores hiperglucémicos con respecto al grupo control. El grupo control mantuvo sus niveles de glucosa dentro de un rango de 60.6 (día 18) a 86.7 (día cero) mg/dL; es notable que el límite superior de este intervalo corresponde al inicio del período de gestación, y el límite inferior al día previo al sacrificio, además que en la gráfica se observa esa tendencia de manera muy clara con respecto al eje de las abscisas. Sin embargo, la disminución de la glucemia en los grupos control, sin duda se debe al embarazo y a las exigencias metabólicas del mismo (Buchanan y Kitzmiller,

1994). La descripción anterior acerca de los 2 grupos tratados con aloxana también puede ser apreciado en la Figura 3B, donde las curvas respectivas ocupan una posición diferente con respecto al eje de las ordenadas. Es notable que, la curva de "solo las madres" tiene la misma forma que la de "todos los datos", sobre todo, del día 3 al día 18, sin embargo, se encuentra muy por abajo de la curva anterior con respecto al eje de las ordenadas. Cabe resaltar que en "solo las madres", el valor promedio más alto de glucosa, 120 mg/dL (día 10) está en el límite de hipoglucemia y normoglucemia, por lo tanto, se puede decir que 110 mg de aloxana/Kg de peso inducen, por un lado, niveles hiperglucémicos muy severos, pero estos impiden que el embarazo llegue a término (Levi y Weinberg, 1949); y por otro lado, más frecuentemente, se inducen también niveles hipoglucémicos con respecto a los valores normoglucémicos indicados por Sadler (1993).

El efecto sobre la ganancia de peso corporal medio de las ratas madres como resultado de la administración intraperitoneal de 80, 90, 100 y 110 mg de aloxana/Kg de peso durante todo el período de gestación hasta el día 19, día del sacrificio, no es uniforme, y según los datos, parece estar en relación con estas dosis. Se observa un aumento del cambio o ganancia de peso corporal medio de las ratas madres con respecto a los controles, cuando aquellas son tratadas con 80 y 90 mg de aloxana/Kg de peso, principalmente desde el día cero hasta el día 11 de la gestación. Posteriormente hay una reducción del cambio o ganancia de peso corporal medio de estas ratas madres hasta el día 19 (Figura 1A). Por lo contrario, el tratamiento con 100 (Figura 2A) y 110 mg de aloxana/Kg de peso (Figura 3A) resulta en una reducción del cambio o ganancia de peso corporal medio de las ratas madres en comparación con los controles durante todo el período de la gestación. Lo anterior encuentra una confirmación en las experiencias de Solomon (1959), quién utiliza dosis de aloxana en un rango de 67 a 125 mg/Kg de peso en ratas Sprague-Dowley y señala que hay poca ganancia, y en ocasiones, pérdida de esta ganancia de peso corporal de las ratas madres cuando son comparadas con los controles.

La disminución del cambio o ganancia de peso corporal medio es evidente en las madres tratadas con 100 mg de aloxana/Kg de peso: en la Figura 2A se observa que el trazo de la curva queda situada por abajo de la curva de los controles; mientras que, con el tratamiento de 110 mg de aloxana/Kg de peso, la disminución de la ganancia de peso corporal medio de las ratas es similar a la anterior cuando consideramos "todos los datos" y menos pronunciada en "solo las madres"; es decir, que cualitativamente, esto puede ser interpretado en la gráfica por el hecho de que el trazo de

la curva tanto de "todos los datos" como de "solo las madres" queda por abajo de la curva de los controles, pero la curva de "solo las madres" está situada en una posición intermedia entre la curva de los controles y la de "todos los datos" (Figura 3A). Parece ser que a ciertas dosis de aloxana hay diferentes cambios en la ganancia de peso corporal de las ratas madres durante el periodo de gestación (Angervall, 1959). Se ha indicado también una ganancia de peso materno significativamente menor con respecto a controles en grupos diabéticos de ratas Wistar inducidas en el día 6 de la gestación con 200 mg de aloxana/Kg de peso (Wilson *et al.* 1985).

El aumento de la ganancia de peso corporal medio de las ratas madres tratadas con 80 y 90 mg de aloxana/Kg de peso puede deberse a los efectos de las exigencias metabólicas propias del embarazo y a las alteraciones hormonales que conlleva, y es menos probable que la diabetes pudiera haber participado, ya que al parecer, no pudo ser inducida con estas dosis; sin embargo, en otra serie experimental, donde las ratas fueron tratadas con 80 mg de aloxana/Kg de peso, se presentaron ciertas malformaciones de importancia debidas a unos pocos individuos diabéticos que si pudieron ser inducidos, aunque la hipoglucemia también pudo ser responsable (Smoak y Sadler, 1990).

La disminución de la ganancia de peso corporal medio de las ratas tratadas con 100 y 110 mg de aloxana/Kg de peso estaría en relación con la hiperglucemia inducida con estas dosis; es decir, que este efecto se debería principalmente a la diabetes no controlada, que aunada con otros factores, podrían provocar condiciones conductuales de apatía que llevarían a una reducción de la ingestión de alimentos. Además, también podrían estar implicadas ciertas alteraciones metabólicas y/o patológicas, debidas también a la diabetes, caracterizadas por deshidratación e hiperosmolaridad (Wilson *et al.* 1985).

Los fetos de las ratas tratadas con dosis de 80, 90, 100 y 110 mg de aloxana/Kg de peso tuvieron pesos fetales, al día del sacrificio (día 19), un poco mayores con respecto a los controles, pero en el tratamiento de 100 mg de aloxana/Kg de peso, la prueba t de Student, reveló una diferencia significativa entre el peso fetal del grupo diabético y los controles, ya que la probabilidad para el valor de $t = 4.43$ fue < 0.05 . El número de fetos, que esta en relación con el peso fetal medio al nacimiento, en el día del sacrificio, fue mayor en el cuerno uterino izquierdo de las ratas tratadas con 80 y 90 mg de aloxana/Kg de peso, cuando fue comparado con los controles; y menor en ese mismo cuerno cuando el tratamiento es de 100 y 110 mg de aloxana/Kg de peso. En cambio, el número de fetos es menor en el cuerno uterino derecho en todos los tratamientos de aloxana con respecto a los controles. Solo en los controles ($n=7$) y en el tratamiento

con 80 mg de aloxana/Kg de peso (n=6) no hay mortalidad materna, pero en el tratamiento de 90 mg de aloxana/Kg de peso (n=6) murieron el 33% de las ratas; y en los de 100 (n=14) y 110 (n=14) mg de aloxana/Kg de peso murieron el 36% de las ratas en cada caso por efectos de la hiperglucemia y/o hipoglucemia. No obstante, en el tratamiento de 90 mg de aloxana/Kg los fetos pudieron ser recuperados y analizados, no siendo así en los tratamientos de 100 y 110 mg de aloxana/Kg. La prueba de t de Student y de la mediana, aplicada al tamaño de camada de madres control y tratadas con 100 mg de aloxana/Kg de peso, y con un valor de $t = 2,55$ indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos grupos, lo que está de acuerdo con la mayor parte de los autores que se refieren a este efecto de la diabetes (Sinden y Longwell, 1949; Solomon, 1959; Angervall, 1959; Kim *et al.* 1960; Wilson *et al.* 1985 y Abdel Raman *et al.* 1992). Solomon (1959) señala que el peso al nacimiento de neonatos de ratas diabéticas es por lo general más grande que el de ratas normales. Igualmente, Angervall (1959) señala que Hultquist (1950) encontró que el peso neonatal medio fue significativamente más alto en hijos de ratas diabéticas que en el grupo control. El mismo Angervall (1959) indica que el peso fetal medio al nacimiento difirió significativamente entre los hijos de los grupos diabético y control ($p < 0.001$). El mismo aumento significativo en el peso fetal medio al nacimiento de grupos diabéticos comparados con controles fue encontrado por otros autores (Lazarow *et al.* 1960; Kim *et al.* 1960; Foglia *et al.* 1963; etc.). También se ha encontrado una disminución de peso fetal medio al nacimiento en animales diabéticos (Ellison y Maren, 1971; Wilson *et al.* 1985), mientras que otros no han encontrado diferencias en este sentido (Miller, 1947; Abdel Raman *et al.*, 1992).

Angervall (1959) analizó la relación entre el peso de los recién nacidos y el peso corporal materno a la concepción y al parto, de grupos diabéticos y control, en camadas completas, mediante la prueba estadística de la regresión. Encontró que los pesos maternos a la concepción y al parto en el grupo diabético tuvieron una diferencia significativa con el peso al nacimiento, no sucediendo así con el grupo control. También analizó la relación entre el peso medio de la camada y el peso corporal materno en grupos diabético y control. Dicho autor encontró una regresión positiva del peso medio al nacimiento sobre el peso medio al parto en el grupo diabético. Además, también reportó una relación entre el peso medio al nacimiento por camada y el número de crías por camada, siendo significativa ($p < 0.02$) en controles y sin correlación evidente en el grupo diabético. Esto implica que hay una regresión positiva entre el peso al nacimiento y el peso materno a la concepción y una regresión negativa entre el peso al nacimiento y el tamaño de camada. Angervall

(1959) también hace énfasis en que el embarazo prolongado en las ratas diabéticas por aloxana parece contribuir al peso aumentado al nacimiento.

En cuanto a los parámetros bioquímicos para ratas preñadas, tratadas con 100 y 110 mg de aloxana/Kg de peso medidos en el día del sacrificio, existen notables diferencias con respecto a los controles y, por otra parte, también entre los grupos tratados con aloxana. El tratamiento de 110 mg de aloxana/Kg de peso influye más irregular y drásticamente en los niveles de glucosa al día del sacrificio, pues a excepción del 21.4 % de las ratas, que desarrollan niveles hiperglucémicos muy altos, las demás parecen no estar afectadas, pues sus niveles de glucosa permanecen por abajo de los niveles normales.

Los valores de referencia para análisis clínicos de triacilglicéridos de ratas hembras no embarazadas de la cepa Sprague-Dawley de 30 a 91 días de edad son 99.48 ± 40.13 mg/dL, y las muestras fueron tomadas por punción cardíaca (n=5) (Loeb y Quimby, 1989). En esta investigación, los niveles de triacilglicéridos de los animales control fueron de 452 ± 181 mg/dL, los que, comparados con los valores de referencia de Loeb y Quimby (1989) son 4.5 veces más grandes; esto se debe sin duda a los efectos metabólicos de la gestación. En comparación con los controles, los niveles de triacilglicéridos de los grupos experimentales son más bajos, pero comparativamente más altos que los valores de referencia de Loeb y Quimby (1989) lo que también parece ser una consecuencia normal de la gravidez. Resulta notable que los valores más altos de glucemia de madres tratadas con 110 mg de aloxana/Kg de peso, corresponden a valores bajos y/o moderados de triacilglicéridos, además de que no tuvieron fetos; aunque este grupo, evidentemente fue inducido a diabetes, ésta, en la mayoría de los casos, fue transitoria y no muy severa; no obstante, al parecer, la diabetes inducida justifica esos altos valores de triacilglicéridos.

Los efectos de la aloxana sobre las ratas gestantes dependen de la dosis usada y de las condiciones experimentales al administrarse (previo o durante el embarazo), y en teoría podemos esperar que exista una relación directa entre estas dosis y el grado de diabetes inducida. Sin embargo, los resultados de esta investigación no comprueban totalmente esa relación, ya que los datos obtenidos se presentan frecuentemente contradictorios con las referencias consultadas. El desarrollo de un modelo animal *in vivo* de diabetes mellitus tipo 1 está en función de múltiples factores que, en la medida en que sean bien conocidos, considerados y controlados en su totalidad, podrán asegurar la viabilidad de dicho modelo. El carácter más difícil de satisfacer es la inducción de una hiperglucemia permanente que, por un lado es una condición imprescindible

para los estudios teratogénicos y, por otro, el resultado puede ser contraproducente, debido a que puede resultar muy severa. Por lo tanto la hiperglucemia inducida debe ser moderada pero no transitoria.

También es necesario prestar una atención primordial a las técnicas de evaluación de efectos dismorfogénicos, ya que la técnica de Barrow y Taylor (1964) requiere de mucha destreza manual y amplios conocimientos de Anatomía e Histopatología para ser aplicada con efectividad. La técnica histológica normal (H-E) o de rutina podría ser completada con técnicas de microscopía electrónica para efectuar una evaluación más óptima a nivel celular. Ante la dificultad de desarrollar un modelo animal *in vivo* de diabetes mellitus tipo 1 es necesario tomar en cuenta los muchos factores que se relacionan con la problemática de la diabetes mellitus durante el desarrollo embrionario y sus consecuencias sobre la descendencia. Es muy importante elegir la cepa adecuada de la especie de roedor por utilizar, prestar especial atención a las condiciones de crianza para no alterar sus ciclos biológicos (sexuales y circadianos). También es necesario llevar al cabo mediciones cuidadosas de todos los parámetros posibles.

VII. CONCLUSIONES

1. Los efectos teratogénicos observados en la gestación de la rata Sprague-Dowley son similares a los señalados en otros estudios.

2. Las dosis de 80, 90 y 100 mg de aloxana/Kg de peso pueden inducir alteraciones en la ganancia de peso corporal y otros parámetros, pero no producen la frecuencia de malformaciones esperada, y tampoco provocan cambios bioquímicos de importancia.

3. Se puede decir que las concentraciones de 110 y 120 mg de aloxana/Kg de peso se relacionan más con un efecto embriotóxico de la diabetes que con resultados dismorfogénicos o teratogénicos de la misma.

4. Dosis superiores a 120 mg de aloxana/Kg de peso no son indicados para desarrollar el modelo buscado ya que sus efectos son muy severos y provocan una alta incidencia de mortalidad materna.

VIII. REFERENCIAS

- Abdel-Rahman MS, Elrakhawy FI, Iskander, FA (1992) Endocrine pancreas in the postnatal offspring of alloxan diabetic rats. *Toxicol Lett* 62: 263-274.
- Angerwall L (1959). Alloxan diabetes and pregnancy in the rat. *Acta Endocrinol* 39(Suppl 44): 1-86.
- Baker L, Piddington R, Goldman A, Eagler J, Moehring J (1990). Myo inositol and prostaglandins reverse the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos. *Diabetologia* 33: 593-596.
- Barrow MV, Taylor WJ (1964). A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J Morphol* 127: 291-306.
- Buchanan TA, Kitzmiller JL (1994). Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annu Rev Med.* 45: 245-260.
- Buchanan TA, Denno KM, Sipos GF, Sadler TW (1994). Diabetic teratogenesis: *In vitro* evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose *per se*. *Diabetes* 43: 656-660.
- Buchanan TA, Schemmer, JK, Freinkel N (1986).. Embryotoxic effects of brief maternal insulin hypoglycemia during organogenesis in the rat. *J Clin Invest* 78: 643-649.
- Cockroft DL, Coppola PT (1977). Teratogenic effects of excess glucose on head fold rat embryos in culture. *Teratology* 16: 141-146.
- Davis ME, Fugo NW, Lawrence KG (1947) Effect of alloxan diabetes on reproduction in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 66: 638-641.
- Deuchar EM (1977). Embryonic malformations in rats, resulting from maternal diabetes: preliminary observations. *J Embryol Exp Morph* 41: 93-99.
- Editorial (1980). Abnormal infants of diabetic mothers. *Lancet* I: 633-634.
- Ellison AC, Maren TH (1972) The effects of metabolic alterations on teratogenesis. *John's Hopkins Med J* 130: 87-94
- Eriksson UJ, Borg LAH (1991). Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose induced embryonic malformations *in vitro*. *Diabetologia* 34: 325-331.

- Eriksson UJ, Borg LAH (1993). Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate induced free oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* 42: 411-419.
- Eriksson UJ, Karlsson MG, Styruð J (1987).. Mechanisms of congenital malformations in diabetic pregnancy. *Biol Neonate* 51: 113-118.
- Felig P, The endocrine pancreas: Diabetes mellitus. En Felig. P., Baxter. J., Broadus. A., y Frohman. L. (Eds). *Endocrinology and Metabolism*. New York. McGraw Hill. 1981. p 761.
- Felig P, Coustan D (1989). Diabetes sacarina, En *Complicaciones médicas durante el embarazo*. GN Burrow, TF Ferris (Eds). Panamericana. 2a. Buenos Aires, Argentina.
- Foglia VG, Borghelli RF, Chieri RA, Fernandez -Collazo EL, Spindler I, Wesely O (1963). Sexual disturbances in the diabetic rat. *Diabetes* 12: 231-237.
- Freinkel N, Cocckcroft DL, Lewis NJ, Gorman L, Akazawa S, Phillips LS, Shambaugh GE (1986). The 1986 McCollum award lecture. Fuel mediated teratogenesis during early organogenesis: The effects of increased concentrations of glucose, ketones, or somatomedin inhibitor during rat embryo culture. *Am J Clin Nutr* 44: 986-995.
- Freinkel N, Lewis NJ, Akazawa S, Roth SI, Gorman L (1984). The honeybee syndrome: Implications of teratogenicity of mannose in rat embryo culture. *N Eng J Med* 310: 223-230.
- Giavini F, Airoidi L, Broccis ML, Roversi GD Prati M (1993). Effects of diets with different content in protein and fiber on embryotoxicity induced by experimental diabetes in rats. *Biol Neonate* 63: 353-359.
- Goldman AS, Baker L, Piddington R, Marx B, Herold R, Egler J (1985). Hyperglycemia induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8227-8231.
- Goto MP, Goldman AS, Uhing, MR (1992). PGE2 prevents anomalies induced by hyperglycemia or diabetic serum in mouse embryos. *Diabetes* 41: 1644-1650.
- Hashimoto M, Akazawa S, Akazawa M, Akashi M, Yamamoto H, Maeda Y, Yamaguchi Y, Yamasaki H, Tahara D, Nakanishi T, Nagataki S (1990). Effect of hyperglycemia on sorbitol and

myo-inositol content of cultured embryos: treatment with aldose reductase inhibitor and myo inositol supplementation. *Diabetologia* 33: 597-602.

Hod M, Star S, Passonneau JV, Unterman TG, 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.

Horii K-I, Watanabe G-I, Ingalls TH (1966). Experimental diabetes in pregnant mice. Prevention of congenital malformations in offspring by insulin. *Diabetes* 15: 194-204.

Huberman A (1988). Biología de los radicales libres de oxígeno. En: Hicks JJ y Díaz-Zagoya JC (Eds). *Bioquímica e Inmunología*. Facultad de Medicina, UNAM, México. pp. 353-365.

Hunter ES, Sadler TW (1987). Fuel mediated teratogenesis: Biochemical effects of hypoglycemia during neurulation in mouse embryos *in vitro*. *Am J Physiol* 257 (Endocrinol Metabol 20): E269-E276

Hunter DJS, Burrows RF, Mohide PT, Whyte RK (1993). Influence of maternal insulin dependent diabetes mellitus on neonatal morbidity. *Can Med Assoc J* 149: 47-52.

Kim JN, Runge W, Wells LJ, Lazarow A (1960). Effects of experimental diabetes on the offspring of the rat: Fetal growth, birth weight, gestation period and fetal mortality. *Diabetes* 9: 396-404.

Lawrence AM, Contopoulos AN (1960). Reproductive performance in the alloxan diabetic female rat. *Acta Endocrinol* 33: 175-184.

Lazarow A, Kim JN, Wells LJ (1960). Birth weight and fetal mortality in pregnant subdiabetic rats. *Diabetes* 9: 114-117.

Levi JE, Weinberg T (1949). Pregnancy in alloxan diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 72: 658-662.

Lewis NJ, Akazawa S, Freinkel N (1983). Teratogenesis from β -hydroxybutyrate during organogenesis in rat embryo organ culture and enhancement by subteratogenic glucose. *Diabetes* 32(Suppl): 11A (Abstract).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Loeb WF, Quimby FW (1989). The clinical chemistry of laboratory animals. Pergamon Press, Inc. Maxwell House, Fairview Park Elmsford, New York 10523, USA. 519 p.

Mahan LK, Arlin MT (1995). Nutricion y dietoterapia. Interamericana Mc Graw-Hill. México. pp. 535-564.

Méndez JD y Arreola MA (1992). Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem Int* 28: 569-575

Méndez JD y Ramos HG (1993). Modelos experimentales. En: Islas AS y Lifshitz A (Eds). Diabetes mellitus. Interamericana. México. pp. 303-333.

Miller HG (1947). The effect of pregnancy complicated by alloxan diabetes on the fetuses of dogs, rabbits and rats. *Endocrinology* 40: 251-258.

Moreno Ruiz ME, Palacio Vasco F, Espinosa de los Monteros A (1988). Malformaciones congénitas en los hijos de madres con alteración en el metabolismo de la glucosa. *Bol Med Hosp Inf Méx* 45: 666-670.

New DAT (1971). Methods for the culture of post-implantatio embryos of rodents. En: Daniel JC (ed), Methods in mammalian embryology. Freeman, San Francisco, California, pp. 305-319.

Pinter E, Reece EA, Leranath CZ, García Segura M, Hobbins JC, Mahoney MJ, Naftolin F (1986). Arachidonic acid prevents hyperglycemia associated yolk sac damage and embryopathy. *Am J Obstet Gynecol* 155: 691-702.

Reece EA, Homko C, Wiznitzer A (1994). Metabolic changes in diabetic and nondiabetic subjects during pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 49: 64-71.

Rivera Rueda MA, Barranco Jaubert A, Mas Muñoz L, Cardona Pérez A, Udaeta Mora E (1993). Hijo de madre diabética insulino dependiente: repercusiones neonatales. *Bol Med Hosp Infant Méx* 50: 321-327.

Sadler TW, Hunter ES (1987). Hypoglycemia: How little is too much for the embryo? *Am J Obstet Gynecol* 157: 190-193.

Sadler TW (1980a). Effects of maternal diabetes on early embryogenesis: I. The teratogenic potential of diabetic serum. *Teratology* 21: 339-347.

- Sadler TW (1980b). Effects of maternal diabetes on early embryogenesis. II. Hyperglycemia induced exencephaly. *Teratology* 21: 349-356.
- Sadler TW, Denno KM, Hunter ES (1993). Effects of altered maternal metabolism during gastrulation and neurulation stages of embryogenesis. *Ann NY Acad Sci* 678: 48-61.
- Sheehan E A, Beck F, Clarke CA, Stanisstreet M (1985). Effects of β - hydroxybutirate on rat embryos grown in culture. *Experientia* 41: 273-275.
- Sinden JA, Longwell BB (1949). Effect of alloxan diabetes on fertility and gestation in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 70: 607-610.
- Smoak IW, Sadler TW (1990). Embryopathic effects of short term exposure to hypoglycemia in mouse embryos *in vitro*. *Am J Obstet Gynecol* 163: 619-624.
- Solomon F (1959). Embryomegaly and increased fetal mortality in pregnant rats with mild alloxan diabetes. *Diabetes* 8: 45-50.
- Takano K, Nishimura H (1966). Congenital malformations induced by alloxan diabetes in mice and rats. *Anat Rec* 158: 303-312.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197.
- Uriu Hare JY, Stern J, Kleen CL (1989). Influence of maternal dietary Zn intake on expression of diabetes induced teratogenicity in rats. *Diabetes* 38: 1282-1290.
- Watanabe G-I, Ingalls TH (1963) Congenital malformations in the offspring of alloxan-diabetic mice. *Diabetes* 12: 66-72.
- Weigensberg MJ, García Palmer FJ, Freinkel N (1990). Uptake of *myo* inositol by early somite rat conceptus: Transport kinetics and effects of hyperglycemia. *Diabetes* 39: 575-582.
- Wilson GN, Howe M, Stover JM (1985). Delayed developmental sequences in rodent diabetic embryopathy. *Pediatric Res* 19: 1337-1340.