



31960
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 2

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Diferenciación de la gónada masculina en crías de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina.

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Biología de la
Reproducción

PRESENTA

MIGUEL ANGEL PALOMINO GARIBAY

DIRECTOR DE TESIS.

Dra. María Cristina Revilla Monsalve



Tlalnepantla, Edo. de Mex.

294292
2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en la:

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN
ENFERMEDADES METABÓLICAS del CMN SXXI
del IMSS.**

Dra. Ma. Cristina Revilla Monsalve:

Gracias por tu amistad, confianza, motivación y apoyo.

Dr. Sergio A. Islas Andrade:

Gracias por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Ana C. Polanco, Araceli Cárdenas, Sylvia Sura:

Gracias por el apoyo técnico, pero sobre todo por el existencial y por su amistad.

A

Francisco Palomino Rosales
María de la Cruz Garibay Gámez

Gracias por todo.

A mis hermanos

Laura, Patricia, Edith y Francisco

Por su apoyo incondicional

A la siguiente generación

Alonso, Alejandro, Paulina y Mónica

Ustedes siguen

A

Dr. Pedro Martín Hernández Quiroz

Por tu amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al jurado que revisó este trabajo:

Dra Ma. Cristina Revilla Monsalve

Dr. Sergio Islas Andrade

M. en C. Mrtha Oropeza B.

M. en C. Judith Téllez

Dra. Guadalupe Rico

A la Dra. Concepción Sánchez Gómez del Departamento de Biología del Desarrollo del Hospital Infantil de México. Por el apoyo técnico y de Infraestructura para las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido. Gracias por su amistad.

A la Dr. María del Carmen Uribe A. Del Laboratorio de Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias, UNAM, Por la toma de las micrografías de microscopía de Luz.

INDICE	PAG.
I. Resumen	4
1. Antecedentes	
1.1. Diabetes.	5
1.1.1 Concepto.	5
1.1.2. Clasificación.	5
1.1.3. Diagnóstico.	9
1.1.4. Complicaciones.	12
1.1.4.1. Agudas	12
1.1.4.2. Crónicas	16
1.1.5. Páncreas y diabetes.	17
1.1.5.1. Insulina	20
1.1.5.1.1. Estructura	21
1.1.5.1.2. Regulación de la biosíntesis	22
1.1.5.1.3. Mecanismo de secreción.	23
1.1.5.1.4. Regulación de la secreción	23
1.1.6. Diabetes experimental.	24
1.1.6.1. Inducción de la diabetes	24
1.1.6.2. Inducción Química.	27
1.1.6.2.1. Aloxana	27
1.1.6.2.2. Estreptozotocina	28
1.1.7. Diabetes inducida y reproducción.	29
1.1.8. Diabetes inducida y desarrollo.	31
1.2. Diferenciación gonadal en roedores	33
1.2.1. Origen de las células germinales primordiales	33
1.2.1.1 Migración de las células germinales primordiales	36
1.2.2. Cresta urogenital	39
1.2.3. Gónada indiferenciada	42
1.2.4. Diferenciación de testículo.	44
1.2.5. Regulación génica de la diferenciación gonadal	46
2. Planteamiento del Problema	51
3. Hipótesis	51
4. Objetivos	51
4.1. Objetivo general	51
4.2. Objetivos particulares	51

5. Material y Métodos.	51
5.1. Microscopía de luz	53
5.2. Microscopía electrónica de barrido.	53
5.3. Parámetros bioquímicos.	53
5.4. Análisis estadístico.	54
5.5. Diagrama de flujo.	55
6. Resultados.	56
6.1. Pesos	57
6.2. Niveles de glucosa	58
6.3. Cetonuria	59
6.4. Glucosuria	60
6.5. Química sanguínea	61
6.6. Fetos	63
6.6.1. Proporción de hembras y machos	64
6.6.2. Placentas	65
6.6.3. Descripciones histológicas	66
6.6.4. Microscopía electrónica de barrido	72
7. Discusión	80
9. Conclusiones.	87
10. Bibliografía.	88
II. Índice de Abreviaturas	97
III. Índice de Cuadros	98
IV. Índice de Figuras	98
V. Índice de Tablas	98
VI. Índice de Gráficas	99
VII. Índice de Micrografías	99

I. RESUMEN

La hiperglucemia materna produce una serie de alteraciones en el desarrollo de las crías, entre las cuales destacan las malformaciones congénitas y el retraso en el crecimiento y desarrollo. Se ha demostrado que el efecto que la diabetes materna ejerce sobre los embriones se produce desde la blastogénesis por lo que afecta la diferenciación de diversos órganos; en el mesodermo intermedio, altera la diferenciación de las gónadas. Se determinó el efecto de la condición diabética materna inducida con estreptozotocina (STZ), sobre la diferenciación de la gónada masculina de fetos de 20 días de gestación. Para esto se utilizaron 85 ratas hembras gestantes de 250 a 350g de la cepa Sprague-Dawley. A 23 se les inyectó ip 60 mg/kg de peso de STZ el día 6 de la gestación (EI); a 51 se les inyectó ip 50 mg/kg de peso de STZ el día 6 de la gestación (EII), a 6 se les inyectó el vehículo de disolución de la STZ (CI) y 5 se puncionaron con aguja del mismo calibre que los otros lotes (CII). Se consideraron diabéticas a las ratas con niveles ≥ 200 mg/dl de glucosa sérica a las 48 horas de la inducción. Se monitorearon la glucosa sérica, cetonuria, glucosuria y el peso corporal cada semana. El día 20 de gestación se sacrificaron las ratas por dislocación cervical, se disecaron y extrajeron los fetos, anotando el número peso y talla. A los fetos machos se les extrajeron los testículos, los izquierdos se procesaron para microscopía de luz y los testículos derechos se procesaron para su observación al microscopio electrónico de barrido. El análisis de la estructura de los testículos de los fetos de ratas diabéticas, reveló una reducción en el número de cordones seminíferos con una distribución irregular, y una escasa región medular de la gónada. La reducción en el número de espermatogonias así como la pérdida de los puentes citoplásmicos fue notoria. Las células pre-Sertoli presentaron una distribución irregular; el tejido intersticial fue abundante con una reducción en el número de células de Leydig. Se llegó a las siguientes conclusiones: La diabetes materna altera el desarrollo de los testículos de sus crías provocando: a) una disminución en el número, y una distribución irregular de los cordones seminíferos b) reducción del número de espermatogonias c) alteración de la distribución de las células pre Sertoli y d) reducción en el número de células de Leydig lo que provocará alteraciones en la gametogénesis, esteroidogénesis y consecuentemente en la eficiencia reproductiva.

1. Antecedentes

1.1. Diabetes.

1.1.1. Concepto.

La Diabetes mellitus (DM) es la expresión clínica de la absoluta o relativa deficiencia de insulina que afecta aproximadamente entre 20 a 30 millones de personas en el mundo⁽¹⁾.

Aunque la deficiencia de insulina puede ser reducida por la dieta, la inyección de insulina, la terapia de agentes hipoglucemiantes orales, y los tratamientos estándares no previenen el desarrollo de complicaciones crónicas que afectan órganos tales como los ojos, el riñón, los nervios y las arterias⁽¹⁾.

En términos más concretos la DM es una enfermedad que produce Alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de pacientes con larga evolución de la enfermedad, se presentan complicaciones microangiopáticas, en especial renales y oculares, así como macroangiopatía con afección de arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía^(1,2).

1.1.2. Clasificación.

La clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías de la intolerancia a la glucosa fueron publicadas en 1979 por el National Diabetes Data Group (NDDG), de los Institutos Nacionales de Salud, en Estados Unidos (Cuadro No. 1)^(2,3).

CUADRO No. 1.

**CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS Y OTRAS CATEGORÍAS
RELACIONADAS**

(Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes, Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos, 1979)

CLASES CLINICAS

DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus dependiente de insulina o tipo I (DMID)
Diabetes mellitus no dependiente de insulina o tipo II (DMNID)
No obeso
Obeso

Diabetes asociada con otras situaciones o síndromes
Enfermedad pancreática
De etiología hormonal
Inducida por sustancias químicas o fármacos
Anormalidades del receptor de insulina
Síndromes genéticos
Misceláneas

Diabetes mellitus gestacional (DMG)

ANORMALIDADES DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA (ATG)

No obeso
Obeso

Asociada con otras situaciones o síndromes (misma subdivisión de la DM asociada con otras situaciones o síndromes)

CLASES CON RIESGO ESTADISTICO*

Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa, DM o ATG previas, sin alteración bioquímica presente

Anormalidad potencial de la tolerancia a la glucosa. Pacientes con historia familiar de DM, macrosomía, problemas obstétricos, miembros de tribus con prevalencia alta de DM, gemelo idéntico a otro con diabetes, anticuerpos a islotes positivos, obesos.

En 1980 el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación, la que fue revisada en 1985 (Cuadro No. 2) ^(2,3).

**Clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías relacionadas
(Comité de Expertos de la OMS, 1985)**

A. CLASES CLÍNICAS

DIABETES MELLITUS

- Diabetes mellitus dependientes de insulina (DMID)
- Diabetes mellitus no dependientes de insulina (DMNID)
 - No obeso
 - Obeso
- Diabetes relacionada con malnutrición (DMRM)
 - Diabetes pancreática fibrocalculosa
 - Diabetes relacionada con desnutrición y con deficiencia proteica.
- Diabetes asociada con otras situaciones o síndromes
 - Enfermedad pancreática
 - Enfermedad de etiología hormonal
 - Inducida por sustancias químicas o fármacos.
 - Anormalidades de la molécula de insulina o sus receptores
 - Ciertos síndromes genéticos
 - Misceláneas
- Diabetes mellitus gestacional (DMG)

ANORMALIDAD DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA

- No Obeso
- Obeso
- Asociada con otras situaciones o síndromes

B. CLASES CON RIESGO ESTADÍSTICO*

- Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa
- Mismo criterio que NDDG
- Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa
- Mismo criterio que NDDG

* Sujetos con tolerancia a la glucosa normal, con riesgo aumentado de desarrollar diabetes

Ambas clasificaciones tienen en común el abandono de terminología previa como diabetes química, limítrofe, subclínica latente y diabetes asintomática^(2,3,4). Además de no considerar el aspecto dinámico de la enfermedad que al evolucionar presenta elevaciones de glucemia en un mismo día, lo que provoca la expresión fenotípica de la misma varíe de individuo a individuo de acuerdo al tiempo de evolución, la existencia de complicaciones y el estilo de vida^(2,3,4).

En el caso de la diabetes tipo II no se considera la interrelación estrecha entre resistencia a la insulina y su secreción^(2,3,4).

Tomando en cuenta los puntos anteriores el comité de Expertos de la Asociación Americana de Diabetes en 1997 propuso una nueva clasificación etiológica de la DM, que se muestra en el cuadro 3^(2,3,4).

Cuadro No. 3.

Clasificación etiológica de la diabetes mellitus*	
I. Diabetes tipo 1** Destrucción de células β que conduce a una deficiencia absoluta de insulina. A. Mediada por mecanismos inmunológicos B. Idiopática.	II. Diabetes tipo 2** Existen variaciones que van desde el predominio de la resistencia a la insulina con relativa deficiencia de ésta, hasta el defecto predominante en la secreción con resistencia a la acción de la hormona.
III. Otros tipos específicos.	
A. Defectos genéticos de la función de la célula β: 1. En cromosoma 12, HNF-1 α (MODY3) 2. EN cromosoma 7, glucocinasa (MODY2) 3. En cromosoma 20, HNF-4 α (MODY1) 4. En ADN mitocondrial 5. Otros B. Defectos genéticos en la acción de la insulina. 1. Resistencia a la insulina tipo A 2. Leprechaunismo 3. Síndrome de Rabson-Mendell 4. Diabetes lipopatrótica 5. Otros C. Enfermedades del páncreas exócrino. 1. Pancreatitis 2. Traumatismo/pancreatectomía 3. Neoplasia 4. Fibrosis quística 5. Hemocromatosis 6. Pancreatopatía fibrocalcálica 7. Otras D. Endocrinopatías 1. Acromegalia 2. Síndrome de Cushing 3. Glucagonoma 4. Feocromocitoma 5. Hipertitoidismo 6. Somatostatina 7. Aldosterona Otras.	E. Sustancias químicas o drogas capaces de inducir diabetes: 1. Pentamidina 2. Ácido nicotínico 3. Glucocorticoides 4. Hormona tiroidea 5. Diazóxido 6. Agonistas β -adrenérgicos 7. Tiazidas 8. Difenhidantoína 9. α -Interferón 10. otras F. Infecciones 1. Rubéola congénita 2. Citomegalovirus 3. Otras. G. Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente: 1. Síndrome del hombre rígido 2. Anticuerpos contra el receptor de insulina 3. Otras. H: Otros síndromes que algunas veces se asocian con diabetes: 1. Síndrome de Down 2. Síndrome de Klinefelter 3. Síndrome de Turner 4. Síndrome de Wolfram 5. Ataxia de Friedreich 6. Corea de Huntington 7. Síndrome de Lawrence Moon Beidel 8. Distrofia miotónica 9. Porfiria 10. Síndrome de Prader Willi 11. Otros
IV. Diabetes mellitus gestacional	

* Traducida del artículo original del Comité de Expertos de American Diabetes Association, 1997.

** Los pacientes pueden requerir tratamiento con insulina en alguna etapa de la enfermedad.

1.1.3. Diagnóstico.

Se reconoce que puede haber pacientes de categorías intermedias que no reúnan las características para el diagnóstico de la diabetes:

- ◆ FPG < 110mg/dL = glucosa de ayuno normal.
- ◆ FPG \geq 110 mg/dL y < 126 mg/dL = FG = intolerancia a la glucosa de ayuno.
- ◆ FPG \geq 126 mg/dL = diagnóstico provisional de diabetes que debe confirmarse^(3,5).

La curva de tolerancia a la glucosa es una de las pruebas clínicas que contribuye de una forma importante al diagnóstico de la diabetes. Es una prueba especialmente útil para el diagnóstico en aquellos pacientes que no manifiesten síntomas y que sus niveles de glucemia en ayuno se encuentren sólo un poco alterados, o bien en aquellos en los que exista alguna duda en el diagnóstico^(2,3,5).

Consiste en la toma de una muestra de sangre en ayuno para determinar los niveles basales de glucemia. Posteriormente se suministran por vía oral 75 g de glucosa disuelta en agua, que se debe ingerir en 2 a 3 minutos. En niños la carga de glucosa debe de ser 175 mg/Kg de peso hasta un máximo de 75 g. Las mujeres embarazadas requieren una carga de 100g. Dos horas después de la ingesta de glucosa se toma una segunda muestra de sangre^(2,3,5).

Para que sea válida la prueba de tolerancia a la glucosa, debe cumplir con los siguientes criterios:

- ❖ Debe realizarse por la mañana, después de un ayuno de un mínimo de 8 horas.
- ❖ El paciente debe llevar una dieta los tres días anteriores al estudio de por lo menos 200 g de carbohidratos diarios.
- ❖ Mantener sentado al paciente durante la prueba, sin fumar ni hacer ningún tipo de ejercicio.
- ❖ Se deben tomar en consideración todos aquellos factores que interfieran con los resultados de la prueba.
- ❖ Hay que tomar en cuenta cualquier respuesta adversa que se presente durante la prueba como náusea, diarrea, etc⁽⁵⁾.

Las categorías correspondientes cuando se utiliza la curva de tolerancia a la glucosa (CTG) son:

❖ A las 2 h poscarga (2hPG) < 140 mg/dL = tolerancia normal a la glucosa.

❖ 2hPG ≥ 200 mg/dL = diagnóstico provisional de diabetes que debe confirmarse.

El ubicar el punto de corte de 140 mg/dL a las 2 h en la curva de tolerancia a la glucosa (2h-CTG) permite identificar a más personas con alteraciones de la homeostasis de glucosa, de las que se detectaban al determinar la glucosa en ayunas con el valor límite de 110 mg/dL^(2,3,5).

Otra de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la diabetes, es la determinación sanguínea de la hemoglobina glucosilada fracción A (HbA)^(5,6,7).

Esta prueba se fundamenta en que durante la vida del eritrocito, debido a la permeabilidad de su membrana a la glucosa, la hemoglobina se incubó con la glucosa de la sangre y como ésta es una sustancia reactiva, el resultado es la glucosilación de los sitios receptivos de los aminoácidos de la hemoglobina^(5,6,7).

Tomando en cuenta el promedio de vida del eritrocito, aquellos que estén entre 30 y 90 días de vida son los que van a predominar y como la glucosilación depende de la concentración integrada de la glucosa en el tiempo, la información que proporciona la medición de la hemoglobina glucosilada es el valor integrado de las ocho semanas precedentes a la toma de la muestra^(5,6,7).

La HbA se forma por glucosilación no enzimática de la porción N-terminal de la cadena β de la hemoglobina A₀⁽⁸⁾.

La cuantificación de hemoglobina glucosilada se basa en la proporción o porcentaje total de hemoglobina que ha sido glucosilada por lo que es una medida relativa que requiere utilizar una metodología reproducible y llevar a cabo todas las determinaciones en un aparato confiable y preciso⁽⁵⁾.

La fracción 1c de la HbA (HbA_{1c}) ha sido aceptada como indicador de la concentración media diaria de la glucemia en los dos meses precedentes^(10,11).

Los niveles obtenidos mediante la determinación regular de HbA_{1c} conducen a cambios en el tratamiento de la diabetes, mejorando el control metabólico lo que se traduce en una disminución de los niveles de HbA_{1c}. Por lo que la medición cada dos o tres meses de HbA_{1c} se ha recomendado para monitorear el tratamiento prolongado de los pacientes con diabetes^(6,7,10,11).

Se ha establecido que el valor normal de hemoglobina glucosilada fracción A_{1c} (HbA_{1c}) es de 3 a 6% y 5 a 8% el de la hemoglobina glucosilada fracción A₁ (HbA₁) en términos absolutos, los valores de HbA₁ son 1-2 % superiores a los de HbA_{1c} y un 1% de cambio de los niveles de la HbA_{1c} o de la HbA₁ corresponde a un cambio en el promedio de la glucosa sanguínea de 35 mg/dL (1.9 mM). Si se considera que los niveles de glucosa sanguínea tienden a aumentar con la edad aun en los individuos no diabéticos, en los pacientes de edad avanzada valores de HbA_{1c} de 8-9% pueden relacionarse con un nivel aceptable de control en pacientes diabéticos⁽⁵⁾.

Pacientes con diabetes tipo 1 tienen valores promedio de HbA_{1c} de 8 a 9% y de hemoglobina glucosilada (HbA) de 10-11% que corresponden a valores promedio de glucosa de 200 mg/dL (11.1 mM/L). Los adolescentes presentan valores 0.5-1.0% mayores, con una glucosa sanguínea de 20-40 mg/dL por arriba de los valores de los adultos. El 95% de los pacientes tienen HbA_{1c} de 5-13% y HbA de 6-15%. Los pacientes de reciente diagnóstico o los mal controlados la presentan de 20-25%⁽⁵⁾.

1.1.4. Complicaciones.

Las complicaciones de la diabetes pueden ser agudas y crónicas:

1.1.4.1. Complicaciones Agudas.

Dentro de las complicaciones agudas se encuentran principalmente la cetoacidosis diabética (CAD) y el síndrome hiperosmolar no cetótico, menos frecuentemente se presentan la hipoglucemia y la acidosis láctica⁽¹²⁾.

La CAD provoca hiperglucemia debido a la ausencia casi absoluta de insulina así como el incremento de la producción de glucosa por el hígado vía la gluconeogénesis y la glucogenólisis⁽¹²⁻¹⁴⁾. Durante la CAD también se producen hipercetonemia, acidosis metabólica y alteraciones hidroelectrolíticas⁽¹²⁾. Por lo general se presenta en los pacientes con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico o sin control adecuado. Cuando se presenta en pacientes con diabetes tipo 2, se requieren factores que lo desencadenen como infecciones, infartos, traumatismos, estrés, hipertiroidismo, feocromocitoma o la ingestión de medicamentos como esteroides, agonistas adrenérgicos, etc⁽¹²⁻¹⁴⁾.

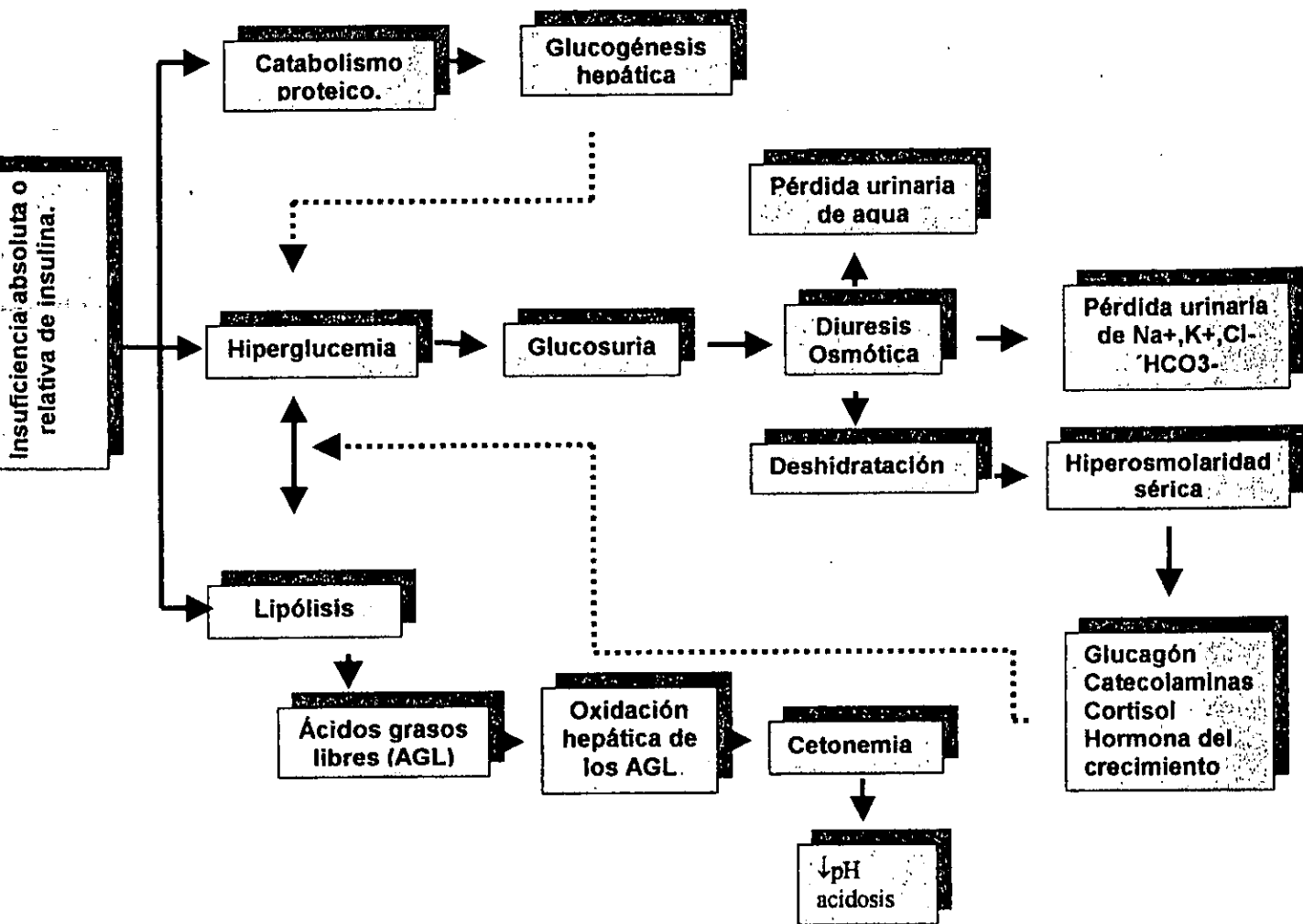
Durante la cetoacidosis se producen cuerpos cetónicos de una manera similar a los que se forman durante el ayuno prolongado en pacientes sanos. La cetogénesis se puede atribuir a la deficiencia de insulina, que tiene un efecto anticatabólico para la inhibición de la cetogénesis, glucogenólisis, lipólisis y gluconeogénesis; este efecto se consigue con bajas concentraciones de insulina, por lo que debido a que la deficiencia de insulina en diabéticos es más pronunciada, la hipercetonemia es mucho más severa⁽¹⁴⁾.

Durante la CAD se presenta una secreción contra-reguladora de hormonas que tienen acciones catabólicas. Este efecto inicia con un aumento en la secreción de glucagon, seguido de la secreción de cortisol y catecolaminas, las que actúan aumentando las fuentes de energía para elevar la producción y liberación de glucosa y estimular la lipólisis actuando sobre los triglicéridos; esto promueve la cetogénesis^(14,15) (figura 1).

La cetoacidosis diabética debe considerarse como un estado en el que el organismo utiliza todas sus defensas para proteger al cerebro del daño que puede resultar de la hipoglucemia^(14,15).

La CAD se puede presentar también durante la gestación en mujeres diabéticas; afecta principalmente a mujeres gestantes que cursan con diabetes tipo 1, pero también puede presentarse en embarazadas diabéticas tipo 2 y en diabetes gestacional^(12,13,14).

FIGURA 1.- Fisiopatología de la cetoacidosis diabética



En mujeres gestantes se presenta una mayor predisposición a la CAD. Las náuseas y el vómito que son síntomas comunes durante el primer trimestre del embarazo favorecen la cetogénesis debido a una mayor deshidratación y al aumento en la producción de hormonas antagonistas de la insulina como el glucagón y las catecolaminas^(13,14,15).

Otro factor desencadenante de la CAD en las mujeres diabéticas embarazadas son las infecciones en el tracto urinario⁽¹⁵⁾.

La CAD, puede poner en peligro la vida de la madre y del producto⁽¹²⁾. La tasa de mortalidad fetal durante un episodio de CAD varía entre el 30 y 70% por lo que se considera que entre más severa

sea la alteración metabólica materna mayor puede ser el daño para el feto^(12,13,14).

La sintomatología de la CAD no es inmediata sino progresiva; inicia con poliuria y polidipsia que son consecuencia de la hiperglucemia (generalmente mayor a los 250 mg/dL de glucosa plasmática) y además son causa de diuresis osmótica y deshidratación⁽¹⁵⁾. Se presenta astenia, pérdida de peso debido al proceso catabólico acelerado, náusea, vómito y dolor abdominal causado por la hipercetonemia y el desequilibrio hidro-electrolítico. Los pacientes cursan además con hipotensión, taquicardia, hipotermia, respiración de Kussmaul (respiración acelerada y superficial) y depresión del estado de alerta^(13,14).

El síndrome hiperosmolar no cetogénico o hiperglucemia no cetogénica o hipertonicidad no cetogénica es otra de las complicaciones agudas que se presenta con mayor frecuencia en diabéticos⁽¹²⁾.

Los factores desencadenantes de esta afección pueden ser entre otros, la supresión inadecuada de hipoglucemiantes orales, infecciones concomitantes, enfermedades concurrentes como infarto al miocardio, accidente cerebral vascular, cirugías, etc⁽¹²⁾. Independientemente del factor desencadenante, la causa directa de este síndrome, es la hiperosmolaridad extracelular, que se produce por la deshidratación causada por la diuresis osmótica debida al aumento importante y constante de los niveles de glucosa⁽¹²⁾.

El cuadro clínico inicia con descontrol de la diabetes, hiperglucemia e hiperosmolaridad sin cetogénesis; se presenta polidipsia, poliuria y vómito con lo que se produce una mayor deshidratación sin respiración de Kussmaul. Frecuentemente se presentan alteraciones neurológicas que varían desde afasia, convulsiones, hemiparesia y signo de Babinsky hasta coma⁽¹²⁾.

1.1.4.2. Complicaciones crónicas

Los tratamientos para el control de la DM no impiden la manifestación de complicaciones crónicas que afectan entre otros a ojos, riñones, nervios y arterias^(1,16).

En los pacientes diabéticos, complicaciones tales como la ceguera son 25 veces más comunes que en los no diabéticos; esta afección se produce por daño capilar de la retina que desencadena edema, neo-formación de vasos y hemorragias. Los pacientes con diabetes también presentan catarata con más frecuencia que los no diabéticos^(1,16).

Alteraciones crónicas a nivel capilar producen adelgazamiento de la membrana basal glomerular, lo que se refleja en un daño renal crónico con proteinuria que es 17 veces más común en los pacientes diabéticos. En el sistema nervioso periférico de los pacientes diabéticos se puede producir la desmielinización por segmentos, lo que se asocia con una alta incidencia de disfunciones motoras, sensoriales y autonómicas entre las que se incluyen la impotencia que afecta al 40% de los pacientes masculinos^(1,16).

Dentro de las complicaciones crónicas presentes con mayor incidencia entre los pacientes diabéticos están la enfermedad coronaria arterial, los infartos y la enfermedad arterial periférica. La mortalidad por enfermedad coronaria en los pacientes diabéticos es de 2 a 4 veces más que en los no diabéticos^(1,16). La gangrena que lleva a amputación es por lo menos 5 veces más frecuente en los diabéticos. La expectativa de vida de los diabéticos en promedio, es de tan sólo 2 terceras partes que el de la población general^(1,16). (Cuadro 5)

CUADRO 5. Complicaciones crónicas en pacientes diabéticos⁽¹⁶⁾.

VASCULARES Macrovasculares <ul style="list-style-type: none">• Arteriosclerosis coronaria acelerada• Arteriosclerosis cerebrovascular acelerada• Vasculopatía periférica acelerada Microvasculares <ul style="list-style-type: none">• Retinopatía• Nefropatía
NEUROPÁTICAS
Neuropatía Sensomotora <ul style="list-style-type: none">• Bilateral simétrica en extremidades inferiores (más común)• Bilateral simétrica en extremidades superiores• Mononeuropatía• Úlcera neuropática• Amiotrofia diabética• Caquexia neuropática Neuropatía Autonómica <ul style="list-style-type: none">• Gastroparesia• Diarrea• Vejiga neurogénica• Impotencia• Reflejos cardiovasculares alterados
ENFERMEDADES VASCULARES Y NEUROPÁTICAS COMBINADAS
<ul style="list-style-type: none">• Úlceras de piernas• Úlceras de pies

1.1.5. Páncreas y diabetes.

El nombre páncreas deriva de las raíces griegas "pan" que significa "todo" y "creas" que significa carne.

En humanos el páncreas es un órgano de 70-150g de peso y 15-25 cm de longitud. Está conectado al duodeno por la ampolla de Water, en donde el conducto pancreático principal se une con el conducto biliar común.

Los términos cabeza, cuello, cuerpo y cola son utilizados para designar las regiones del órgano de proximal a distal. En los roedores la forma del páncreas es menos definida que en humanos⁽¹⁷⁾.

El páncreas es un órgano esencialmente importante para la digestión y la homeostasis de la glucosa en organismos superiores. Alteraciones de la función del páncreas provocan diferentes enfermedades debilitantes tales como diabetes, pancreatitis y cáncer de páncreas⁽¹⁸⁾.

El páncreas posee una función tanto endocrina como exocrina. Endocrinamente libera enzimas al tracto digestivo, mientras que exócrinamente se secretan diferentes hormonas al torrente sanguíneo para coordinar y regular el uso de la glucosa^(17,18).

El páncreas exócrino es una glándula acinar lobulada y ramificada en la que las células secretoras están agrupadas dentro de acinos. Son de forma piramidal con núcleos basales; presentan un arreglo regular de retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi prominente y numerosos gránulos que contienen enzimas digestivas en forma zimogénica⁽¹⁹⁾.

La luz de los acinos es pequeña y puede ser terminal o intercalar. En la unión de los acinos y los conductos están las células centroacinares que son cuboidales bajas, ricas en mitocondrias; estas células secretan los componentes no enzimáticos del jugo pancreático, incluyendo bicarbonato⁽¹⁹⁾.

Los conductos están alineados con las células epiteliales columnares; en los conductos se encuentra un pequeño grupo de células globosas con bordes en cepillo similares a los del intestino. La secreción del jugo pancreático es regulada por estimulación hormonal, principalmente por secretina, colecistoquinina y gastrina, también por estimulación neural. Los acinos y conductos pequeños están cubiertos con una delicada capa de tejido conectivo, el cual llegará a ser más extenso alrededor de los grandes conductos⁽¹⁹⁾.

Las células endocrinas están agrupadas dentro de los islotes de Langerhans, que son pequeños grupos celulares esferoidales compactos embebidos en el tejido exocrino. Existen cuatro tipos principales de células endócrinas. Las α que secretan glucagon, las β que secretan insulina y también un antagonista de la insulina denominado amilina, y constituyen la mayoría de células en el islote,

las δ que secretan somatostatina y las PP que secretan el polipéptido pancreático⁽²¹⁾.

Los islotes ricos en células PP se encuentran generalmente en la parte posterior de la cabeza, derivada del botón pancreático ventral del embrión. Las células endocrinas productoras de glucagon, somatostatina, amilina y péptido Y están presentes no sólo en el páncreas, también en el intestino⁽²¹⁾.

Todos los tipos celulares del islote además de sus hormonas específicas expresan un número de productos génicos característicos de células neuroendócrinas tales como enolasa neurona-específica, receptor a la toxina del tétanos, antígeno A2b5 y la proteína de homeodominio LIM islet-1⁽²¹⁾.

Embrionariamente el páncreas se origina a partir de dos brotes que se desarrollan a los lados dorsal y ventral del duodeno^(17,18,20,22).

El botón ventral se forma inmediatamente adyacente a la parte posterior del divertículo hepático, y el dorsal se origina en el lado opuesto del tubo digestivo. Debido a la rotación del estómago y el duodeno, el botón ventral y el orificio hepatopancreático se mueven alrededor hasta que ellos llegan a hacer contacto y se fusiona con el botón dorsal^(17,18,20,22).

El botón ventral forma la región posterior de la cabeza, o proceso uncinado, mientras que la región dorsal forma las regiones restantes del órgano^(17,18,20,22).

El conducto ventral se fusiona con la región distal del conducto dorsal para convertirse en el conducto pancreático principal (conducto de Wirsung), y la región proximal del conducto dorsal se convierte en un pequeño conducto accesorio (conducto de Santorini) que presenta su propia apertura hacia el duodeno^(17,18,20,22). (figura 2)

Figura 2. Desarrollo del páncreas.

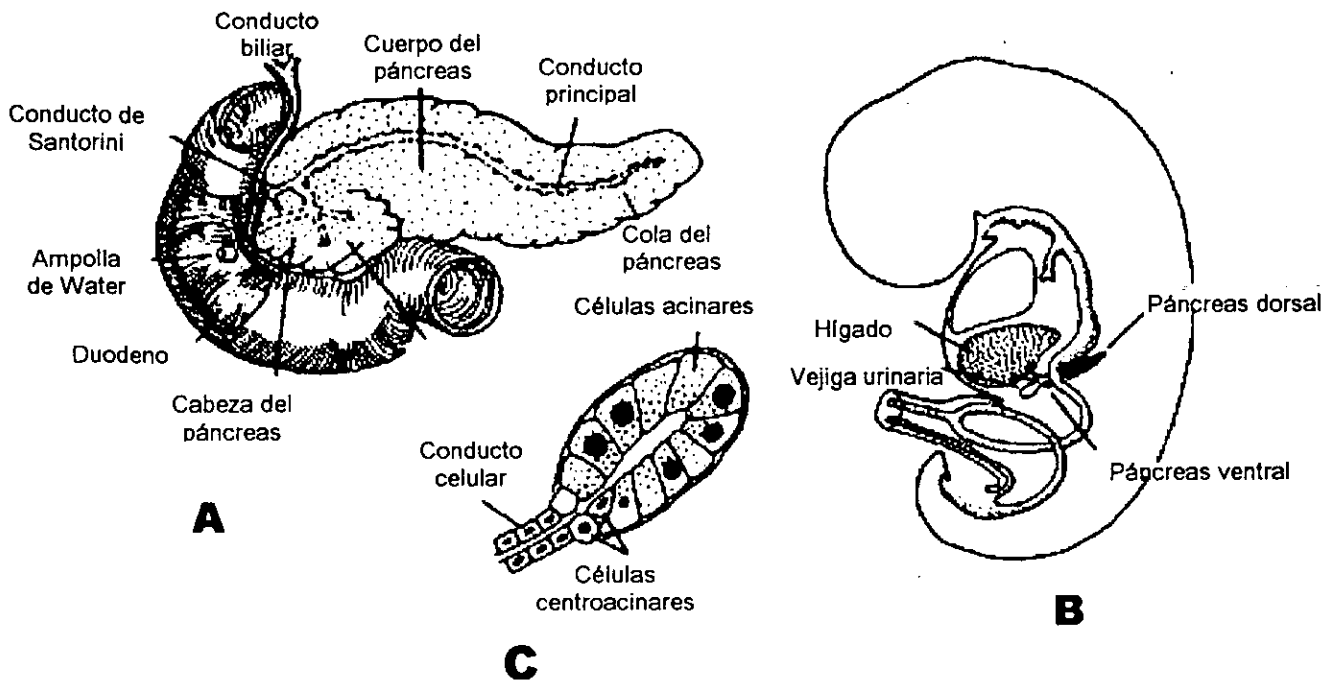


Figura 2 (A) Anatomía del páncreas adulto. (B) Localización de los botones pancreáticos dorsal y ventral en el embrión. (C) Histología de un acino pancreático⁽¹⁷⁾.

1.1.5.1. Insulina

La insulina es una proteína dimérica unida por puentes bisulfuro, es sintetizada como un precursor de cadena simple que primero pierde el péptido señal, y pierde un segmento conocido como péptido C, antes de llegar a ser la molécula hormonal madura. La insulina madura es almacenada en gránulos secretores cuya liberación es controlada por el nivel de glucosa en sangre.

Los efectos de la insulina sobre sus tejidos blanco, son metabólicos, promueven la captación de glucosa e inducen la mitosis⁽²³⁾. Esta actúa vía un receptor tipo tirosin cinasa que tiene un mayor blanco intracelular, una proteína denominada sustrato1 del receptor de insulina. Este puede ser un intermediario en la estimulación de Ip3 cinasa y la ruta de las MAP-cinasas⁽²³⁾.

1.1.5.1.1. Estructura

La estructura de la insulina y sus genes se han conservado a través de la evolución, reflejando su importancia en la regulación del metabolismo. En humanos, el gene que codifica la pre-pro-insulina, el último precursor de la insulina, está localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (en estrecha relación al IGF-2), tiene una longitud de 1355 pares de bases y su región codificante consiste de tres exones; el primero codifica el péptido señal en el N-terminal de la pre-pro-insulina, el segundo la cadena B y parte del péptido C y el tercero el resto del péptido C y la cadena A^(21,23).

La transcripción y el *splicing* remueven los intrones y producen un mensajero de 600 nucleótidos cuya traducción da lugar a la pre-pro-insulina que es un polipéptido de 11.5 kDa que se descarga al retículo endoplásmico rugoso, donde enzimas proteolíticas inmediatamente segmentan la pre-pro-insulina en pro-insulina, removiendo el péptido señal^(21,23).

La pro-insulina es un péptido de 9kDa que contiene las cadena A y B de la insulina (de 21 y 30 residuos de aminoácidos (aa) respectivamente) unida por el péptido C (30-35 aa). La conformación estructural de la pro-insulina y la insulina son muy similares y la función principal del péptido C es la de alinear los puentes bisulfuro que unen las cadenas A y B; de este modo la molécula es correctamente plegada^(21,23).

La pro-insulina es transportada por microvesículas al aparato de Golgi donde es empaquetada en vesículas limitadas por membranas que contiene una bomba de protones dependiente de ATP^(21,23,24).

La conversión de pro-insulina en insulina es iniciada en Golgi y continúa dentro de los gránulos secretores maduros por la acción secuencial de dos endopeptidasas (pro-hormona convertasas 2 y 3) y la carboxipeptidasa H. Estas enzimas aseguran una rápida segmentación en sitios específicos, previniendo una fragmentación posterior de la insulina; actúan juntas para remover la cadena del péptido C, liberando dos dipéptidos segmentados formando finalmente la insulina^(21,23,24).

La insulina tiene una baja solubilidad y coprecipita con iones zinc para formar microcristales dentro de los gránulos secretores. La precipitación también es facilitada por un bajo pH dentro del gránulo, el

cual es creado por la excisión y pérdida de los aminoácidos básicos durante la conversión proteolítica^(21,23,24).

La insulina y el péptido C son almacenados juntos en los sacos granulares y son finalmente liberados en concentraciones equimolares; bajo condiciones normales, 95% del producto hormonal es secretado como insulina y menos del 5% como pro-insulina no convertida^(21,23,24).

1.1.5.1.2. Regulación de la biosíntesis.

Las células β modulan la producción y la liberación de insulina en respuesta a los cambios en la demanda metabólica. Un incremento agudo (<2 h) en la concentración de glucosa extracelular y ciertos otros azúcares resulta en un rápido y dramático incremento en la síntesis de pro-insulina. Existe una relación sigmoidal entre las concentraciones de glucosa y la actividad biosintética, con un incremento en los niveles de glucosa entre 2-4mmol/l. Esto es más bajo que el incremento para la estimulación de la secreción de insulina, y posiblemente asegura una adecuada reserva de insulina dentro de la célula β . La concentración de glucosa en las células β no actúa sobre la tasa de conversión de pro-insulina a insulina^(21,23,24).

En circunstancias en las que se presenta una sobreproducción de insulina por las células β , los gránulos pueden fusionarse con lisosomas dentro de los que su contenido (principalmente insulina y péptido C) es destruido por acción proteolítica; ésta degradación intracelular de gránulos es denominada crinofagia^(21,23,24).

Los gránulos de insulina tienen una apariencia típica, con un amplio espacio entre un centro electro-denso, están limitados por membrana. La forma del centro cristalino es característico para cada especie y por razones desconocidas ésta varía ampliamente entre las especies. Los gránulos contienen insulina y péptido C en altas concentraciones, junto con zinc, el cual participa en la cristalización de la insulina en el gránulo y probablemente no contribuye a la regulación de las concentraciones de calcio citoplásmico. La membrana de los gránulos contiene las enzimas responsables de completar la conversión de pro-insulina a insulina. El gránulo también contiene un amplio rango de otros polipéptidos, de los que se han caracterizado dos, β -granina, un análogo de la cromogranina A, el cual es un componente de vesículas secretoras neuroendócrinas originalmente

identificadas en la médula adrenal; su abundancia es de 0.1 a 0.3% de la insulina y su función es para facilitar el almacén de la hormona en el gránulo^(21,23,24).

1.1.5.1.3. Mecanismo de secreción.

En células β normales la insulina es liberada por un proceso de exocitosis en el que los gránulos se desplazan hacia la membrana celular; la membrana del gránulo y la membrana celular se fusionan produciéndose la liberación del contenido de los gránulos. La membrana del gránulo que se ha integrado a la membrana plasmática es parcialmente reabsorbida por endocitosis hacia el interior de la célula, y reciclada hacia el aparato de Golgi^(21,23,24).

1.1.5.1.4. Regulación de la secreción.

El mayor determinante físico de la secreción de insulina en mamíferos es la concentración de glucosa sanguínea, aunque muchos otros agentes metabólicos, endócrinos, neuronales y farmacológicos pueden influir sobre las células β ^(21,23,24).

Las células β son extremadamente sensibles a cambios de glucosa extracelular dentro de rangos fisiológicos muy estrechos. Concentraciones de glucosa menores a 5 mM/L no afectan la tasa de liberación de insulina, mientras que un incremento en la tasa de secreción se presenta con niveles de glucosa extracelular entre 5.5 y 17 mM/L, con una estimulación media máxima de 8 mM/L. La glucocinasa, es el factor tasa-limitante para la fosforilación de la glucosa en las células β y aparentemente actúa como el "sensor de glucosa", el cual se acopla a la secreción de insulina para regular los niveles de glucosa^(21,23,24).

La glucosa puede ser metabolizada dentro de la célula β con el propósito de estimular la liberación de insulina. Esta es fosforilada por la glucocinasa y entra a la glucólisis para producir adenosin trifosfato (ATP); éste cierra canales de potasio sensibles a ATP en la membrana de la célula β causando su despolarización que dirige un influjo de calcio extracelular a través de canales voltaje dependientes en la membrana de las células β . El incremento en la concentración de calcio citosólico activa la translocación de los gránulos y la exocitosis^(21,23,24).

En general se considera que la secreción de insulina depende no solo de la glucosa, sino del acople de estímulos de secreción que en su conjunto dirigen la activación de distintos caminos de señalización como pueden ser el AMPc, los iones calcio (tal vez actuando a través de proteínas reguladoras calcio-dependientes, como calmodulina y la proteína cinasa C), metabolitos de fosfoinosítoles (IP₃ y DAG) y ácido araquidónico, los que pueden actuar también como mensajeros intracelulares, dirigiendo finalmente la estimulación de la secreción de insulina^(21,23,24). Fig.3

1.1.6. Diabetes Experimental.

1.1.6.1. Inducción de la diabetes

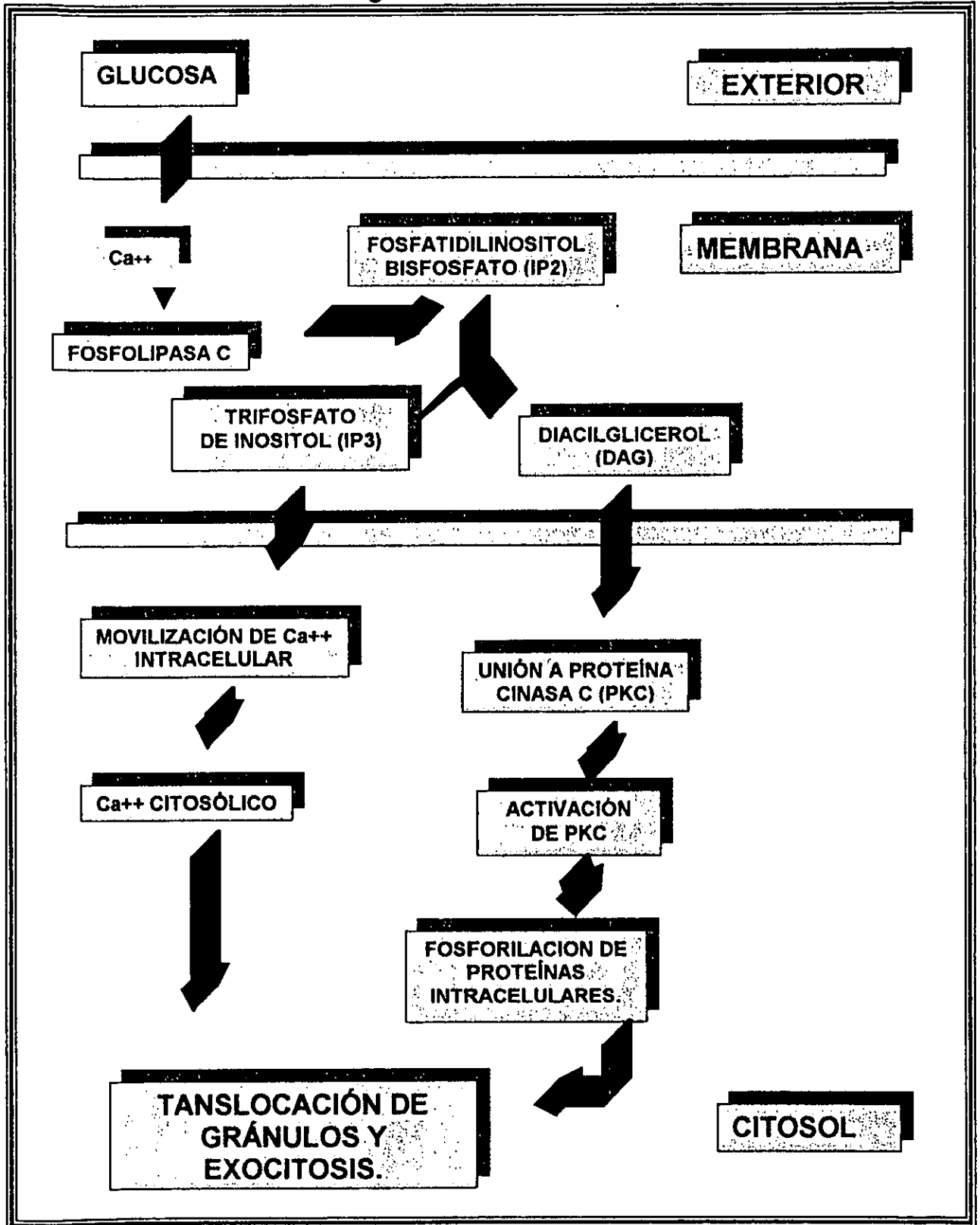
La diabetes puede producirse experimentalmente a través de cirugía, infección viral y la administración de hormonas o de agentes químicos^(25,26).

Los primeros intentos de inducir la diabetes experimental se realizaron por técnicas quirúrgicas en perros por pancreatometomía parcial o total^(25,26).

Posteriormente mediante la lesión selectiva de las células del núcleo ventromedial del hipotálamo de ratas se logró que desarrollaran una diabetes semejante a la tipo 2, caracterizada por obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina⁽²⁵⁾.

Hormonas como la epinefrina, el glucagón, los glucocorticoides y la hormona de crecimiento tienen un efecto antagonista al de la insulina. La epinefrina y el glucagón administrados en altas dosis a los animales, producen hiperglucemia. Incluso se ha reportado que la administración de hidrocortisona o ACTH producen hiperglucemia con hiperplasia de las células beta del páncreas⁽²⁵⁾.

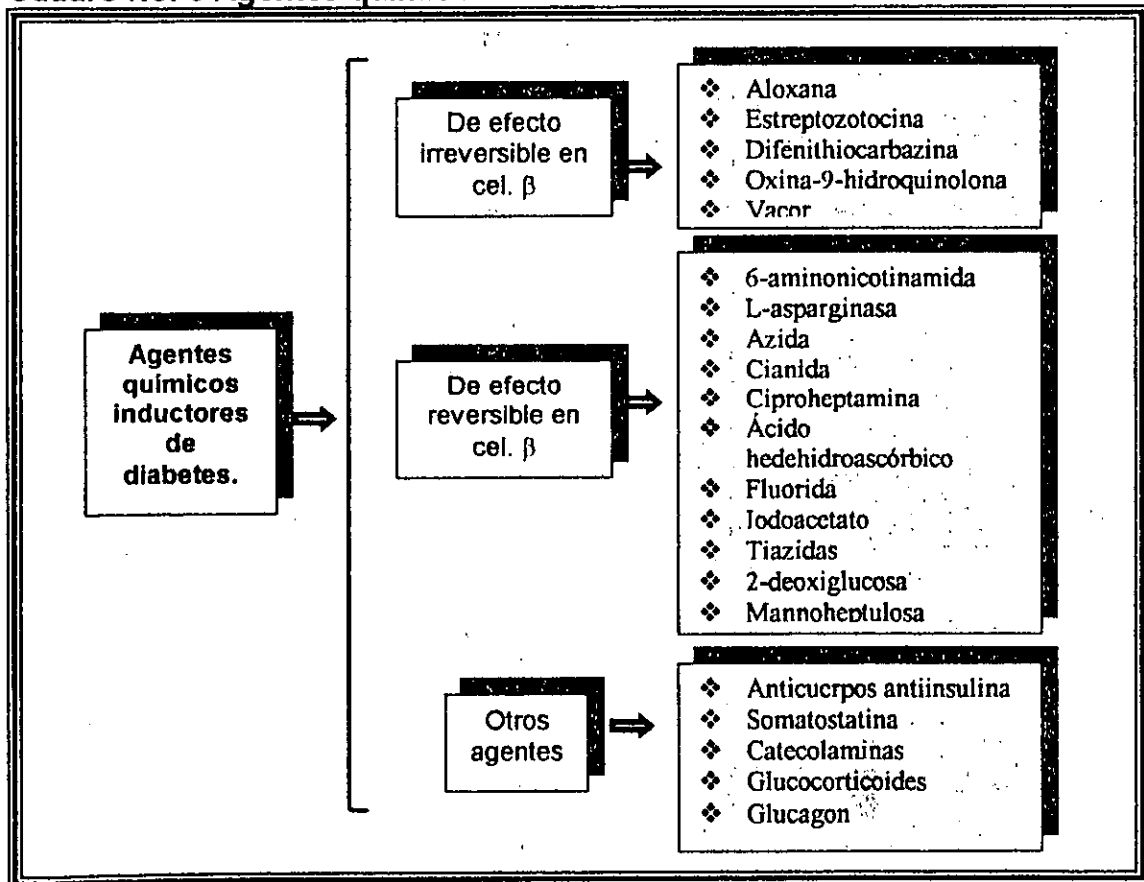
FIGURA 3.-Mecanismo regulador de la liberación de Insulina.



Los virus representan otro mecanismo de inducción de la diabetes, están asociados con el desarrollo de la diabetes tipo 1 en humanos y en animales. Pueden destruir directamente a las células β por efecto citolítico propio del virus o bien actuar indirectamente por una respuesta autoinmune iniciada y aumentada por el virus. La presencia de diabetes en estos casos, se correlaciona con la habilidad de las células beta para mantener la duplicación viral⁽²⁷⁾.

Otro mecanismo para inducir diabetes es vía la administración de diversos agentes químicos que pueden ser de tres tipos: aquellos que destruyen las células beta del páncreas y producen un efecto citotóxico irreversible; los que actúan sobre las células beta del páncreas produciendo un efecto citotóxico reversible; y los que aumentan los requerimientos endógenos de insulina, produciendo un estrés oxidativo al páncreas y secundariamente diabetes^(25,26). (Cuadro 6)

Cuadro No. 6 Agentes químicos inductores de diabetes^(25,26).



En la actualidad el avance de la manipulación genética ha permitido establecer modelos animales que presentan diabetes en forma espontánea⁽²⁸⁻³⁰⁾. Estos modelos y el tipo de diabetes que presentan se resumen en el siguiente cuadro 7:

Cuadro 7. Modelos Animales de diabetes espontánea^(28,29,30).

Mòdelo Biològico	Características	Tipo de diabetes
❖ Ratón NOD	Derivado del ratón albino de la cepa Jcl:ICR.	Tipo 1
❖ Rata Bio-Breeder (BB)	Derivada de la cepa Wistar, presenta diabetes cetogénica sin obesidad.	Tipo 1
❖ Ratón ob/ob	Mutación de obesidad de la cepa C57BL/6J.	Tipo 2
❖ Ratón db/db	Mutación para diabetes del ratón ob/ob.	Tipo 2
❖ Ratón KK	Derivado de la cepa Kasukabe, presenta obesidad moderada.	Tipo 2
❖ Ratón NZO	Ratón obeso de Nueva Zelanda.	Tipo 2
❖ Rata obesa Zucker	No presenta hiperglucemia pero si resistencia a la insulina.	Tipo 2
❖ Fafa/Zucker	Presenta hiperglucemia, obesidad y resistencia a la insulina.	Tipo 2

1.1.6.2. Inducción Química.

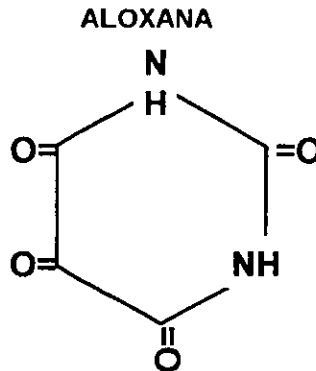
1.1.6.2.1. Aloxana

La Aloxana (AL) fue el primer agente químico diabetogénico descubierto por Dunn y Mc Letchie, en estudios de nefrotoxicidad. Es una potente toxina selectiva para células β del páncreas en ratas y ratones cuando se suministra intravenosamente en una dosis única⁽³²⁾.

La AL es un análogo cíclico de la urea (Figura 4), extremadamente inestable en soluciones acuosas a pH neutro, su tiempo de vida medio es de 2.8 min. en dosis de 50 o 100 mg/Kg de aloxana. Dependiendo de la cepa, y el sexo altas dosis de AL (entre

50 y 80 mg/kg de peso) son generalmente efectivas en producir hiperglicemia crónica^(31,32,33).

Figura 4.



El efecto diabetogénico de la aloxana es rápido, produciendo una hipoglucemia aguda a una hora post-administración, seguido por una hiperglicemia franca a las 48 horas. En el análisis de microscopía electrónica se muestra que las células β sufren necrosis⁽³⁴⁾.

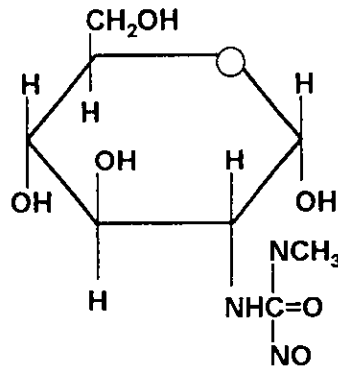
1.1.6.2.2. Estreptozotocina

La Estreptozotocina (STZ) es un antibiótico de amplio espectro producido por *Streptomyces achromogenes*. En su estructura química la STZ (Figura 5) contiene una molécula de glucosa con una alta reactividad de la cadena de nitrosurea que es suficiente para iniciar la acción citotóxica. La movilidad de la glucosa lleva este agente hacia las células β del páncreas, donde se une al receptor de membrana para generar un daño estructural^(31,32,34,35).

A nivel intracelular son tres las vías principales mediante las que la STZ induce la muerte de las células β :

1. Metilación: el efecto deletéreo de la STZ da por resultado la generación de radicales CH_3 ; estos radicales causan la fragmentación del DNA por alquilación de las bases en varias posiciones y esto resulta en la activación de la poli-ADP-ribosa sintetasa como parte del mecanismo de reparación celular^(34,35).

Figura 5. Estreptozotocina



2. Radicales libres: El peróxido de hidrógeno es producido por las células pancreáticas como respuesta a la exposición a STZ tanto *in vivo* como *in vitro*; sin embargo, como la superóxido dismutasa es un detector de radicales libres, puede proteger contra las propiedades diabéticas, estos datos indican que el estrés oxidativo podría participar en la determinación de la toxicidad por STZ⁽³⁴⁾.

3. Oxido nítrico (NO): aunque el proceso metabólico preciso que lleva a la formación de NO no se conoce, puede involucrar a la degeneración de STZ. Se ha observado que los macrófagos activados -producto de la reacción inflamatoria- promueven la producción de NO mediando la destrucción autoinmune de las células β del páncreas sin que se observe insulinitis.

Cualquiera que sea el mecanismo para la generación de NO por STZ, este será implicado significativamente en su citotoxicidad sobre las células β ^(34,36).

1.1.7. Diabetes inducida y reproducción.

La diabetes provoca alteraciones en la función reproductora, se han reportado modificaciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, así como problemas de infertilidad y disfunción reproductora tanto en el sexo femenino como en el masculino,⁽³⁷⁻³⁹⁾.

En ratas macho con diabetes inducida se reportaron diversas alteraciones en el tracto reproductor^(39,40). Ford en 1984 encontró que en las ratas macho la diabetes inducida produce atrofia de las

glándulas sexuales accesorias, pero no altera el peso del testículo ni la cantidad de espermatozoides en el epidídimo⁽³⁹⁾.

Estudios realizados con relación al metabolismo de la glucosa en el túbulo seminífero y epidídimo, encontraron que el testículo no es dependiente de insulina, debido a que la presencia de esta hormona en altas concentraciones no tiene un efecto sobre el metabolismo de la glucosa en el túbulo seminífero o en el espermatozoide. Sin embargo, Hassan informa cambios en el peso de los órganos reproductores, el contenido testicular y epididimario así como en la producción de testosterona en células de Leydig tanto en cultivo como *in vivo*, además de un decremento en los niveles séricos de la hormona luteinizante (LH)⁽⁴⁰⁾.

Se ha demostrado que ratas macho diabéticas presentan deficiencias en la secreción de diferentes hormonas como la folículo-estimulante (FSH), LH, prolactina y testosterona (T), así como un incremento de la sensibilidad en la retroalimentación negativa dada por T^(41,42). Hassan atribuye el decremento en LH a alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, concluyendo que el decremento en los niveles de LH y T no es significativo en las ratas diabéticas y que este decremento es secundario a los desordenes espermatogénicos^(41,42).

En el caso de las hembras diabéticas también se han reportado disfunciones reproductivas, las principales están asociadas con atrofia ovárica, foliculogénesis anormal, insuficiencia en la liberación de progesterona del cuerpo lúteo, involución uterina y problemas asociados con el mantenimiento de la preñez⁽⁴³⁾.

Existen diferentes estudios sobre las alteraciones a nivel del eje hipotálamo hipófisis y del efecto de la diabetes sobre éste^(42,43,44,45,46,47). Valdés *et al* en 1991, reportaron que en ratas hembras con diabetes inducida se produce anovulación, lo que se asocia con una reducción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y demostró que las concentraciones hipotalámicas de GnRH son más bajas en las hembras tratadas con STZ que en hembras normales, indicando que el estado diabético produjo, un daño generalizado en el hipotálamo que se restablece con el suministro de estrógenos. Se demostró que la hipófisis responde más ampliamente en ratas diabéticas tratadas con estrógenos que en ratas sin tratamiento, manifestando, que es el

hipotálamo el sitio primario de disfunción y que la respuesta alterada de la hipófisis a la estimulación con estrógenos, es secundaria a la disfunción hipotalámica. En conclusión, la función hipotalámica alterada puede dar como resultado diferentes anormalidades, especialmente en el sistema porta hipofisiario, o bien puede ser debida a diversos cambios metabólicos asociados con la condición diabética⁽⁴⁴⁾.

Kienast (1993) demostró que los mecanismos de retroalimentación positiva de LH están severamente alterados en la rata diabética. Stegar y Kienast en 1993 establecieron que en ratas hembras diabéticas tratadas con STZ tienen una amplificación en la respuesta a la retroalimentación negativa de los estrógenos, que aparentemente se debe más a un incremento en su capacidad para inhibir el metabolismo de la norepinefrina hipotalámica, que a su acción directa sobre la hipófisis. Se estableció que además de los efectos de la STZ sobre la secreción de LH, también incrementa la liberación de dopamina e inhibe el efecto estimulante de los estrógenos sobre la producción *in vitro* de prolactina^(46,48,49).

1.1.8. Diabetes inducida y desarrollo.

Los experimentos realizados con animales de laboratorio con diabetes inducida por estreptozotocina han demostrado la presencia de malformaciones congénitas, resorciones y retardo en el desarrollo. En ratas gestantes con un control estricto de la diabetes por administración de insulina, se presenta una reducción en la embrioletalidad y en la incidencia de malformaciones congénitas⁽⁵⁰⁻⁵⁵⁾.

La alteración en la relación materno-fetal, resultado de la diabetes durante la gestación ofrece una evidencia importante de la modulación de la glucosa y la insulina sobre el crecimiento-fetal. Aunque un incremento de la glucosa fetal y la disponibilidad de insulina están estrechamente relacionados con el desarrollo de macrosomía fetal, poco se conoce acerca de los mecanismos a través de los cuales la diabetes materna limita el crecimiento fetal en ratas. Se ha demostrado que el exceso de glucosa puede contribuir en un retraso en el crecimiento fetal, sin embargo no se conoce el mecanismo a través del cual ejerce esta influencia⁽⁵⁵⁾.

Estudios en modelos experimentales acerca del efecto de la diabetes materna sobre los productos amplían el conocimiento sobre este tema⁽⁵⁰⁻⁵⁵⁾.

Eriksson (1984)^(37,38,54) utiliza embriones de 11.5 días de gestación de ratas con diabetes inducida y observó un retraso en el crecimiento y desarrollo, con una reducción significativa del eje antero-posterior, en el número de somitas y en el contenido de proteínas totales y DNA del embrión, pero sin un alto índice en la tasa de malformaciones del tubo neural⁽⁵¹⁾. La diabetes materna puede comprometer el crecimiento y desarrollo intrauterino durante el período coincidente con el establecimiento de la circulación de la placenta corioalantoidea^(51,52).

En estudios posteriores en ratones con diabetes inducida por STZ, se encontró que la incidencia de defectos del tubo neural en los embriones de madre diabética es tres veces más alta que en embriones de no diabéticas, las principales alteraciones ocurren en estructuras del cerebro medio y posterior, provocando defectos de cierre del tubo neural⁽⁵⁴⁾.

Phellan *et al.* en 1997 encontraron que la expresión del gen Pax3, un gen que es requerido para el cierre del tubo neural, se reduce considerablemente en los embriones de madres diabéticas, además este gen se relaciona con una alta tasa de células apoptóticas, encontradas en estos defectos neurales⁽⁵⁴⁾. Estos hallazgos sugieren que Pax-3 es un gen muy importante en el control del desarrollo y que las alteraciones de su expresión en embriones de madres diabéticas, producen alteraciones del sistema nervioso así como inducción de apoptosis en éste⁽⁵⁴⁾.

Menegola en 1995, realizó estudios con embriones de rata en cultivo, para lo cual extrajo embriones de 9.5 a 10 días de gestación, de madres con diabetes inducida con STZ y madres normales, cultivándolos en suero de rata normal y en suero de rata diabética; encontró que los embriones de madre normal cultivados en suero de rata normal, no manifestaron embriopatías; sin embargo, los embriones de madres normales cultivados en suero de madres diabéticas presentaron retraso en el crecimiento manifestándose en el diámetro del saco vitelino, la longitud de la cabeza o la longitud total y retraso en el cierre del tubo neural en algunos embriones⁽⁵⁶⁾.

Encontraron que el desarrollo de los embriones obtenidos de madres diabéticas cultivados en suero normal fue semejante al de los embriones normales cultivados en suero diabético, sin embargo, en este estudio una tercera parte de los embriones de este grupo presentaron severas malformaciones. En los embriones de madres diabéticas cultivados en suero de madre diabética se observó un deterioro ligeramente mayor de las condiciones de los embriones en comparación con los otros grupos^(54,56).

1.2. Diferenciación gonadal en roedores.

1.2.1. Origen de las células germinales primordiales.

Durante el desarrollo gonadal, en el embrión se presentan diferentes tipos celulares que al diferenciarse establecen dos líneas celulares características de las gónadas fetales, éstas son la somática y la germinal⁽⁵⁷⁾. La línea germinal tiene su origen en un tipo celular específico que corresponde a las Células Germinales Primordiales (CGPs), que se caracterizan por su origen extra-gonadal, y por su capacidad migratoria desde su sitio de origen hasta su establecimiento en la cresta urogenital⁽⁵⁷⁻⁶²⁾.

Las CGPs se distinguen de las células epiteliales porque histoquímicamente son positivas a fosfatasa alcalina^(57-59, 61-64), y presentan altas concentraciones de glucógeno⁽⁶³⁾. Morfológicamente las CGPs son de gran tamaño, su núcleo es grande y redondo, con inclusiones en su citoplasma dentro de las cuales se ha establecido la presencia de un material electrodensó fibrinogranular denominado "nuage"^(61, 64), que se ha detectado en el citoplasma de células germinales de al menos 80 phyla⁽⁶¹⁾.

El "nuage" es un material citoplásmico que no se encuentra delimitado por membrana, generalmente está asociado a grupos de mitocondrias, y se localiza en el citoplasma perinuclear; este material es característico de muchos estados de desarrollo de las células germinales^(60-62, 64).

En los diferentes grupos animales en los que el nuage esta presente se ha observado en él la presencia de RNA y proteínas, por lo que se considera que esta estructura contiene los determinantes citoplásmicos de la línea germinal^(61,62,64).

En muchos organismos la diferenciación de las células germinales depende de una región especializada de citoplasma en el embrión, denominada plasma germinal, que se asemeja en morfología y ultraestructura al nuage^(60-62,64).

En los mamíferos no se ha reconocido el plasma germinal, pero el nuage se ha caracterizado en muchas especies de mamíferos⁽⁶¹⁾.

El plasma germinal es distinguible en todos los casos por la presencia de organelos especializados denominados gránulos germinales. Al igual que el nuage los gránulos germinales no están rodeados de membrana, pero son distinguibles por microscopía electrónica como partículas fibrosas electrodensas^(60,61,64).

Tanto el plasma germinal como el nuage han sido relacionados con la diferenciación de las células germinales, en ambos casos se ha identificado en su composición a la proteína Vasa, lo que indica una probable relación entre esas estructuras^(61,65).

El gen VASA tiene un papel central en diferentes aspectos de la diferenciación de las células germinales, codifica una proteína que es miembro de la familia de proteínas de caja DEAD que son RNA helicasas. La proteína Vasa es un componente esencial del plasma germinal y es determinante para la diferenciación de la línea germinal⁽⁶¹⁻⁶⁵⁾.

El gen VASA es conservado en especies de invertebrados y vertebrados, incluyendo a *C. elegans*, *Xenopus*, pez cebra, ratón, rata y humanos⁽⁶⁵⁾.

En mamíferos la segregación de la línea germinal inicia cuando el embrión separa sus poblaciones celulares en trofoblasto y macizo celular interno; cuando la masa celular interna se segrega en endodermo primario y ectodermo primario, el endodermo pierde la capacidad de formar células germinales, quedando esta capacidad restringida al ectodermo^(62, 64).

En el ratón se ha demostrado que poco antes de la gastrulación al día 6 del desarrollo embrionario (E 6) y durante la gastrulación temprana (E 6.5), las CGPs se localizan en la región proximal del epiblasto^(61,62).

En esos estadios las células de las que se derivan las CGPs se encuentran constituyendo una franja circular en la región del epiblasto adyacente a la región extraembrionaria; en este estadio no ha tenido lugar la segregación de la línea germinal de la somática, por lo que en esa región se pueden encontrar diferentes tipos celulares tanto de la línea germinal como de la línea somática que dará origen a diferentes tipos celulares del mesodermo extraembrionario^(61,62,64).

La restricción hacia el linaje germinal ocurre durante las primeras 16 horas de la gastrulación (E7), en este momento las CGPs se identifican en el mesodermo extraembrionario posterior a la línea primitiva, en este estado se distinguen por primera vez de otras células por la expresión de fosfatasa alcalina y la población estimada es de 45 a 100 células^(59,61,64).

Cuando ésta región se invagina durante la gastrulación las CGPs son llevadas hacia el interior del embrión localizándose en el epitelio del intestino en desarrollo en el estadio E8^(61,62,64).

Oct-4 es un miembro de la familia de factores de transcripción POU que se expresan durante el desarrollo temprano desde el estado de ocho células en todo el epiblasto; Oct-4 en mamíferos puede ser el responsable de mantener la toti-potencialidad de la línea germinal en ratones^(61,64).

Durante la gastrulación tardía (E8.5) la expresión de Oct-4 es restringida a las CGPs que continúan expresando Oct-4 hasta su diferenciación en gametas, por ello se considera que Oct-4 mantiene la identidad de la línea germinal por supresión de otros caminos de diferenciación^(61,64).

De esta manera Oct-4 es el primer marcador específico de la línea germinal identificado; una down-regulation de él se refleja en una pérdida del potencial para formar células germinales, por lo que ha sido propuesto como el que determina la línea germinal en los mamíferos^(61,64).

1.2.1.1. Migración de las células germinales primordiales.

Durante diferentes días las células germinales de ratón se mueven a través del embrión, siguiendo una compleja ruta a través de diferentes tejidos. Los mecanismos que dirigen el movimiento de las CGPs probablemente cambian durante la fase migratoria, y pueden dividirse al menos en dos fases^(61,64).

Durante la primera fase (7.5 al 9 dpc), las células se mueven del límite posterior de la línea primitiva hacia el intestino medio, incorporándose a la pared intestinal, en este momento las células son llevadas por los movimientos morfogenéticos del intestino en desarrollo, desplazándose de una manera pasiva (Buehr). En este estado las CGPs no presentan características ultraestructurales o fenotipo migratorio^(61,64).

Cuando las CGPs alcanzan el intestino medio (9dpc), desarrollan pseudópodos y otras estructuras características de células capaces de desplazamiento ameboideo^(61,64).

Durante la segunda fase de migración (9.5 a 12.5 dpc.) comienza la migración a través del mesenterio dorsal hacia el primordio de la gónada, que es alcanzado alrededor del día 11.5^(61,64).

Las CGPs para su migración se unen entre sí formando grandes redes, lo que sugiere que la agregación puede ser determinante para la migración^(61,62,64). (figura 6)

Existen diferentes mecanismos por los cuales las células germinales pueden migrar; tales mecanismos pueden ser la quimiotaxis (atracción de las células por una sustancia producida por la gónada en desarrollo); la guía de contacto (movimiento de las células a lo largo de un camino molecular preformado en el sustrato), y la adhesión diferencial (las CGPs responden a contactos célula-célula para maximizar la fuerza de adhesión). Todos estos mecanismos han sido demostrados en otros sistemas, pero no se han demostrado, posiblemente porque otros factores no conocidos pueden intervenir en la migración de las células germinales⁽⁶²⁾.

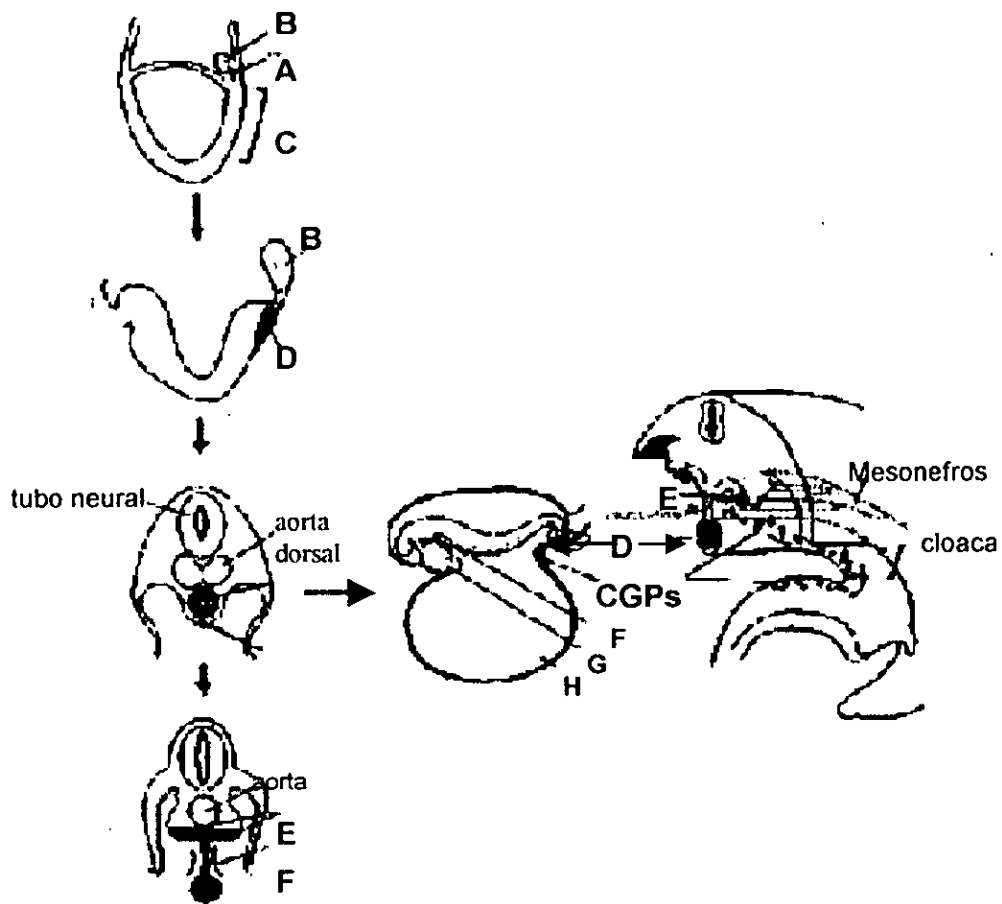


Figura 6. Mecanismo de migración de las células germinales primordiales de la rata. A= CGPs, B= mesodermo extraembrionario, C= línea primitiva, D= intestino primitivo, E= crestas genitales, F= mesenterio dorsal, G= intestino anterior, H= saco vitelino

Durante la etapa migratoria las CGPs expresan diferentes receptores sobre su superficie entre los que se encuentran el antígeno estado específico embrionario (SSEA1), y la integrina $\alpha 6 \beta 1$, necesarios para el reconocimiento de los sustratos de migración celular^(59,62,66).

Dos de los mejor caracterizados genes en el ratón son Dominant White-spotting (W) y Steel (Sl). W codifica el receptor de tirosina cinasa c-kit que se expresa en la superficie de las CGPs. Sl codifica al ligando de c-kit, también conocido como factor Steel (SF) que se expresa a manera de gradiente a lo largo de la ruta de migración de las CGPs y en el primordio de la gónada⁽⁶¹⁾.

Estudios en cultivos de CGPs muestran que la interacción c-kit/Steel es requerida para la supervivencia de las CGPs, a su vez c-kit puede ser requerido por la migración, mediando la adhesión y la quimiotaxis^(61, 62).

La función de la interacción c-kit/Steel en la supervivencia de las CGPs, lleva a la hipótesis de que la liberación local del factor Steel puede controlar la posición de las CGPs (sufren apoptosis si no están en un sustrato de Steel), y que una pérdida de su control es uno de los factores en la formación de tumores de células germinales extra-gonadales en humanos^(61, 62).

Por otra parte se ha observado que las CGPs para su desplazamiento requieren de fibronectina y laminina como sustrato⁽⁶⁷⁾, existen evidencias que sugieren que las crestas genitales secretan una proteína perteneciente a la familia de TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante beta 1) que es capaz de atraer a las CGPs del ratón^(62, 68).

Otro evento importante durante la migración es la proliferación, lo que lleva a que el número CGPs se incremente de una población aproximada de 100 células en el estadio E7-8 a cerca de 25,000 en la cresta urogenital para el E 13^(61, 62).

En el cuadro 8 se presenta un resumen de los eventos y factores que influyen sobre la migración de las células germinales del ratón⁽⁶²⁾:

Cuadro 8

FACTORES DE CRECIMIENTO QUE CONTROLAN LA MIGRACIÓN DE LAS CELULAS GERMINALES EN RATÓN.	
Factor	Efecto sobre CGPs (ref.)
TGFβ1	<ol style="list-style-type: none"> 1) Inhibe la proliferación de PGC 2) efecto quimiotrópico; anticuerpos bloquean el efecto quimiotrópico de la cresta genital en cultivo (Godln y Wylie, 1991).
Interleucina/Familia de citocinas LIF, incluyendo LIF, Oncostatina M, IL6, CNTF	Proliferación y supervivencia de CGPs.
Factor Steel	a) Sobrevivencia de CGPs (Dolci et al, 1991; Godln et al, 1991; Matsui et al, 1991); en combinación con LIF (u otras citocinas de la misma familia) y bFGF, estimula la proliferación (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992). Migración de CGP (Buehr et al., 1993)
Interleucina 4	Sobrevivencia de CGP (Cooke et al., 1996)
EGF	Mitógenos de CGPs (Cooke et al, observaciones no publicadas).

1.2.2. Cresta urogenital

El sistema urogenital se deriva del mesodermo intermedio, que se localiza entre el mesodermo paraxial y el mesodermo lateral. (57,69,70,71)

Este mesodermo realiza una extensiva transformación epitelial para generar los conductos y túbulos que componen a la cresta urogenital. El primer evento de la diferenciación del mesodermo intermedio es la formación del conducto de Wolf, el cual progresa rostrocaudalmente desde el nivel cervical del embrión hasta la cloaca^(57,69).

El conducto de Wolf corre paralelo a un segmento de mesodermo intermedio, que es el cordón nefrogénico a partir del cual se desarrollan tres riñones embrionarios: pronefros, mesonefros y metanefros, con esta secuencia espacial y temporal.

El primer y más anterior tipo de riñón es el pronefros, que se forma de una transformación epitelial del mesénquima del cordón nefrogénico, formando túbulos que presentan un arreglo lineal y se unen al conducto de Wolf ^(57,69). Mientras el pronefros representa un verdadero órgano excretor para los peces y los anfibios, este permanece como una estructura rudimentaria y transitoria en los reptiles las aves y los mamíferos ^(57,69).

Posteriormente aparece el mesonefros, caudalmente al pronefros, y se desarrolla de una forma similar. Sin embargo los túbulos mesonéfricos pueden ser funcionales durante la vida embrionaria de algunos mamíferos ^(57,69).

El metanefros comienza su desarrollo cuando el botón uretérico se forma en la porción caudal del conducto de Wolf y contacta con el mesénquima metanéfrico en la región caudal del cordón nefrogénico ^(57,69). La formación del metanefros requiere señales del botón uretérico que inducen al mesénquima metanéfrico a condensarse y proliferar ^(57,69). En este momento inician señales recíprocas del mesénquima que inducen al botón uretérico a crecer y ramificarse; de esta manera se forma el sistema colector del riñón. A su vez el mesénquima induce que en los extremos de las ramificaciones se formen los glomérulos, y el epitelio tubular proximal y distal ^(57,69).

El factor de transcripción WT-1 se expresa en el mesénquima no inducido y se requiere para la respuesta de inducción. A su vez el receptor de tirosina cinasa c-ret es esencial para el crecimiento y la ramificación del uréter, mientras que Wnt-4 se requiere para la formación de los túbulos metanéfricos ^(57,69).

En los machos los túbulos mesonéfricos y el conducto de Wolf pierden su función excretora y son transformados en el tracto genital. El tracto genital se origina en las hembras a partir del conducto de Müller, que también se deriva del mesodermo intermedio, y se

desarrolla paralelo al conducto de Wolf mucho más tarde en el desarrollo ^(57,69).

Cuando se establece el dimorfismo sexual el conducto de Wolf y el mesonefros degenera en las hembras mientras que el conducto de Müller degenera en los machos ^(57,69).

Se considera que Pax2 es crucial para la conversión de mesénquima en epitelio durante la diferenciación del metanefros. Se sugiere que Pax2 es el regulador primario del desarrollo urogenital, por lo que Pax2 controlaría la jerarquía de genes implicados en la diferenciación del mesodermo intermedio ⁽⁶⁸⁾.

La diferenciación gonadal ocurre por la interacción de dos tipos celulares: las células germinales primordiales que migraron y poblaron la región gonadal, y las células somáticas formadas en la cresta urogenital ⁽⁶⁷⁾. Se realiza en tres fases: la formación de la cresta urogenital, el establecimiento de la gónada indiferenciada y la diferenciación sexual gonadal. Independientemente del sexo cromosómico machos y hembras llevan a cabo las dos primeras etapas ^(67,70-72).

Cuando las CGPs llegan a la cresta urogenital, se encuentran con diferentes tipos de células somáticas de origen mesodérmico. Entre ellas células mesoteliales, mesenquimatosas, mesonéfricas y endoteliales. Los dos primeros tipos celulares son los que participan directamente en la formación de la gónada indiferenciada como células precursoras. Las células mesonéfricas y endoteliales en cambio, son parte de tejidos ya diferenciados (el mesonefros y sistema circulatorio respectivamente) que sólo indirectamente participan en la morfogénesis de la gónada, aunque este punto sigue siendo controversial ya que algunos estudios apoyan la intervención de células mesonéfricas durante el desarrollo gonadal ^(73,70).

1.2.3. Gónada Indiferenciada

La diferenciación tisular que antecede a la diferenciación fisiológica del testículo o del ovario se realiza en el primordio gonadal ⁽⁷⁰⁻⁷⁵⁾.

La línea celular somática del primordio gonadal comprende a tres tipos celulares; las células mesenquimatosas que se encuentran laxamente distribuidas, células mesoteliales originadas del epitelio celómico y las células endoteliales que provienen de los vasos sanguíneos que invaden la zona⁽⁷⁰⁻⁷⁵⁾.

A la llegada de las CGPs a la gónada indiferenciada, las células mesenquimatosas y las mesoteliales adquieren una alta actividad proliferativa. En este momento se observa una condensación de células de origen mesotelial y mesenquimático que forman un agregado compacto denominado blastema gonadal⁽⁷⁰⁻⁷⁵⁾.

A partir de este primordio embrionario, se diferencian dos tejidos gonadales: los cordones sexuales y el estroma.

Los cordones sexuales son arreglos epiteliales delimitados por una lámina basal que contienen en su interior a las CGPs; en el estroma se encuentran células de tipo mesenquimatoso y vasos sanguíneos que irrigan a la gónada indiferenciada. Están presentes algunos túbulos del mesonefros que desde esta etapa inicial mantienen estrecha relación con la gónada^(70, 75).

Las células mesonéfricas son reclutadas hacia el epitelio gonadal, contribuyendo también a las poblaciones celulares del primordio gonadal. En estos estados tempranos del desarrollo gonadal, los túbulos mesonéfricos forman puentes continuos hacia las células epiteliales de la gónada tanto en crestas genitales de machos como de hembras^(70,73,74,76).

Por lo tanto, el estado indiferenciado de la gónada corresponde a la colonización de la cresta gonadal por parte de las CGPs, y a la proliferación de las células somáticas de la región urogenital, que darán origen tanto al tejido epitelial como al tejido estromático que constituyen a su vez los elementos histológicos precursores del ovario o del testículo en hembras o machos respectivamente^(70, 75).

En etapas tempranas del desarrollo de roedores (11dpc), las gónadas de ambos sexos son morfológicamente idénticas, pero en el caso de los machos genéticos ya existe una diferenciación de la gónada a nivel molecular. A partir de los 10.5 dpc se inicia la expresión del factor determinante del testículo (Sry) y se continúa hasta los 12.5

dpc momento en el que se inicia la diferenciación histológica del testículo^(70, 74, 75).

Las gónadas emergen sobre la superficie ventromedial del mesonefros, por un engrosamiento del epitelio celómico de ésta región, tanto en hembras como en machos de entre 10.5 y 11.5 d.p.c. (8-18 somitas). Durante el desarrollo temprano de la gónada el epitelio celómico es una superficie de múltiples linajes celulares que se delaminan de la superficie celómica y se mueven hacia el interior de la gónada, tanto en embriones XY como en XX^(70,72,74). En este estado el primordio de la gónada semeja a un epitelio estratificado sobre la superficie del mesonefros⁽⁷⁰⁾.

Subsecuentemente las células somáticas proliferan y forman un agregado denominado "blastema gonadal"; posteriormente se inicia el depósito de lámina basal entre las células del blastema gonadal, permitiendo que se formen cordones sexuales de tipo epitelial, este tejido queda entonces separado del estroma mesenquimatoso, situado en el área dorsal de la cresta genital a lo largo del mesonefros; constituyéndose la gónada indiferenciada que presenta un componente epitelial en donde quedan incluidas las CGPs, y un componente estromático en donde se encuentran vasos sanguíneos, células precursoras del tejido conjuntivo de la gónada y de las células intersticiales de la gónada^(70,74,75).

Al terminar esta etapa se puede apreciar en la gónada indiferenciada un componente epitelial que contiene a la mayoría de las células germinales y un componente estromático a partir del que se desarrollarán los vasos sanguíneos, las células precursoras del tejido conectivo de las gónadas y las células intersticiales esteroideogénicas. Esta etapa abarca de 9.5-11.5d.g^(70,74,75).

1.2.4. Diferenciación de testículo.

En los mamíferos la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual, se detecta en la gónada de los machos. En el ratón la diferenciación del testículo se inicia a los 12 dpc y lo primero que se observa es una separación gradual de los cordones sexuales del epitelio superficial de la gónada. Esta separación se produce una invasión y proliferación de tejido mesenquimatoso y vasos sanguíneos

provenientes de la región mesonéfrica, que provoca la compactación de los cordones, ahora denominados cordones seminíferos^(70, 74, 75).

El traslado de los cordones sexuales a la región medular de la gónada es un movimiento morfogénico que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un depósito de moléculas de lámina basal, principalmente laminina y colágena⁽⁷⁵⁾.

Las células que rodean a los cordones testiculares se aplanan en forma paralela a la lámina basal, estas células al diferenciarse se les denomina células mioides, que son las encargadas de formar la lámina basal⁽⁷⁵⁾ junto con las células de Sertoli⁽⁷⁰⁾

Las células mioides ultra-estructuralmente se caracterizan por tener un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, en el espacio extracelular adyacente a ellas se observa gran cantidad de material fibrilar como colágena y fibronectina⁽⁷⁵⁾.

En el interior del cordón seminífero se encuentran las células germinales, que son de tamaño grande (> a 10 μ), redondas, localizadas en el centro del cordón^(74,76).

Las células de Sertoli se polarizan en la base del cordón seminífero, son elongadas y colindan unas con otras por encima de la lámina basal^(70,74,76).

Las funciones principales de las células de Sertoli son el soporte de las CGPs y la síntesis de la hormona anti-Mülleriana (AHM), responsable de la regresión de los conductos de Müller; la síntesis de AHM se presenta tanto en testículo fetal como en testículo adulto⁽⁷⁵⁾.

Las células de Sertoli forman un epitelio de tipo columnar y presentan prolongaciones citoplásmicas que rodean a las CGPs; proliferan solo durante la etapa fetal y por un corto período de la etapa postnatal⁽⁷⁵⁾.

El origen de las células de Sertoli es controversial, se plantea, un origen dual, siendo este tanto de los conductos mesonéfricos que invaden a la gónada en estadios tempranos (11.5 dpc) y del epitelio celómico en estadios posteriores de la diferenciación (12.5)^(70,74,76).

Las células de Leydig se diferencian a partir del tejido intersticial, y son las encargadas de la síntesis de andrógenos en el testículo. Se diferencian poco después que los cordones seminíferos⁽⁷⁵⁾.

En el ratón la diferenciación de las células de Leydig se hace evidente a los 14 dpc⁽⁷⁶⁾, y en la rata entre los 18.5-19.5 dpc⁽⁷⁷⁾; presentan gran cantidad de mitocondrias de crestas tubulares que son características de células productoras de esteroides⁽⁷⁵⁾.

El origen de las células de Leydig es controvertido, sin embargo se ha detectado la presencia de dos marcadores de células esteroideogénicas, comunes a las adrenales y a las gónadas: Factor esteroideogénico 1 (Sf1) y Dax1 (dosage sensitive reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X gene1) en la región anterior del mesonefros. Mediante el uso de anticuerpos anti-SF1 se ha observado que esta población celular tiene un comportamiento migratorio en estadios posteriores distribuyéndose una parte a las adrenales y otra en relación con las células germinales hacia el interior de la gónada⁽⁷⁰⁾. Estas evidencias, así como estudios con Microscopía Electrónica y marcadores específicos establecen también la posibilidad de un origen mesonéfrico de las células de Leydig⁽⁷⁰⁾.

1.2.5. Regulación génica de la diferenciación gonadal

En mamíferos se requieren cuando menos cuatro genes para el desarrollo de la gónada bipotencial: *SF-1* (Factor esteroideogénico 1); *Wt-1* (gene asociado al tumor de Wilms); *Lim 1* y *Lhx 9*⁽⁷⁸⁾.

SF-1 se expresa en el primordio gonadal durante la embriogénesis temprana, es un factor de transcripción que pertenece a un ordenado sistema de regulación y determina la expresión "down-stream" de los genes requeridos para la gonadogénesis^(70-72,79-81).

En estadios muy tempranos de la gonadogénesis los embriones tanto masculinos como femeninos expresan *SF-1* cuando el mesodermo intermedio se condensa para formar la cresta urogenital⁽⁸⁰⁾.

SF-1 regula la expresión adrenal y gonadal de genes requeridos para la esteroideogénesis, en los que se incluyen las esteroide hidroxilasas, la 3β hidroxisteroide deshidrogenasa, el receptor de

adrenocorticotropina y la proteína aguda reguladora esteroideogénica^(79,80). Además de este mecanismo regulador, *SF-1* también se expresa en la hipófisis anterior y en el hipotálamo y regula la expresión de *MIS* (AHM, hormona antimülleriana); de acuerdo a estas evidencias se considera que *SF-1* regula la expresión de las hormonas responsables de la diferenciación sexual masculina, sin descartar la posibilidad de que tenga otros efectos en el eje endocrino⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾.

Al término de la diferenciación testicular *SF-1* se localiza en las células de Leydig y en las células de Sertoli⁽⁷⁹⁾.

Un segundo gen esencial para el desarrollo renal y gonadal es *WT-1*, este gen codifica un factor de transcripción con 3 dedos de zinc, e inicialmente fue identificado por su asociación con el tumor de Wilms⁽⁸²⁾. Durante el desarrollo se expresa en altos niveles en derivados del mesodermo intermedio, encontrándose en el desarrollo de riñón de testículo y ovario y del mesotelio^(80,83), con lo que se establece que *WT-1* regula la expresión de genes blanco esenciales para la gonadogénesis tanto en hembras como en machos^(80,83).

Otro gen relacionado con el desarrollo de la gónada bipotencial es *LIM-1*, deleciones homocigas de este gen en ratón, producen una pérdida del desarrollo de las gónadas y riñones⁽⁸⁴⁾. *LIM-1* es un gene con caja homeótica que regula la producción de una molécula organizadora en muchas especies estudiadas experimentalmente. Junto con *WT-1* y *SF-1* se relaciona en la maduración de la cresta urogenital, pero su papel preciso en la inducción gonadal no ha sido analizado en detalle, debido en parte a la letalidad producida en embriones con supresión de *Lim-1*⁽⁸⁵⁾.

Lhf-9 es un gen con caja homeótica LIM; está presente en la cresta urogenital de ratones al día 9.5 dpc, se expresa en el epitelio y en las células mesenquimatosas subyacentes, regulando su proliferación y la expresión de *Sf-1*, como un paso esencial para la formación de la gónada indiferenciada. Se considera que *Lhf-9* es parte de la regulación corriente arriba de *SF-1*⁽⁸⁵⁾.

Una vez que la gónada se ha constituido, el evento que desencadena la diferenciación sexual masculina es la expresión del gene *SRY* (región determinante del sexo del cromosoma Y). *SRY* es

necesario y suficiente para iniciar la cascada del desarrollo masculino⁽⁸⁰⁾.

El papel principal del cromosoma Y en la regulación de la morfogénesis testicular fue primeramente elucidado a finales de los años 50s. Posteriormente la investigación sobre la identidad de un factor determinante testicular (TDF) fue restringida hacia el brazo corto del cromosoma Y; y se propuso el antígeno de histocompatibilidad masculina-específico H-Y como responsable de la diferenciación masculina; sin embargo esta región fue descartada debido a que se encontró tanto en hombres como en ratones machos que poseían testículos, la ausencia del antígeno HY^(72,87-89).

Posteriormente mediante el análisis de translocaciones en machos fenotípicos XX y análisis de deleción en hembras fenotípicas XY, definieron una región determinante del testículo en el brazo corto del cromosoma Y. Dentro de ésta región identificaron un segmento de 140 kilobases presente en un paciente masculino XX y ausente en pacientes femeninos XY, que corresponde a un gen conservado en esta porción de Y, (denominado dedo de zinc Y, o ZFY), que codifica una proteína de unión al DNA que contiene un dedo de zinc. Sin embargo este gen posteriormente se demostró que estaba ausente en machos XX^(72,87-89).

En las últimas décadas mediante análisis citogenéticos en ratones y humanos se ha demostrado que el cromosoma Y lleva un locus que induce el desarrollo masculino de individuos XY y XX con traslocación. En este locus se ha identificado un gen denominado *Sry* (región determinante sexual del Y) en ratones y *SRY* en humanos^(72,78-80,84,85,87-89). *Sry* codifica un factor de transcripción que presenta un motivo de 79 aminoácidos que pertenece a la clase de proteínas de alta movilidad (HMGbox), y son proteínas no histonas que presentan sitios específicos de unión al DNA provocando el plegamiento de la cromatina^(78-81,84, 85).

Aparentemente el plegamiento del DNA es parte del mecanismo mediante el cual *Sry* induce la "down-regulation" de la transcripción de genes que pertenecen a la cascada génica que dirige la diferenciación masculina, sin embargo los factores que disparan la activación de *Sry* permanece sin ser totalmente identificados^(72,78-80,84,85,87-89).

En roedores la expresión de *Sry* comienza en las células somáticas de la cresta urogenital a los 10.5 días dpc, alcanzando su máxima expresión a los 11.5 dpc y se mantiene hasta que se presentan las primeras evidencias morfológicas de diferenciación testicular, evento que sucede aproximadamente a los 12.5 dpc ^(70,72,85, 90,91)

Existen evidencias de que *SRY* se une al promotor del gen de AMH (MIS) controlando la expresión de enzimas esteroideogénicas, de este modo probablemente induce la expresión de AMH para inhibir la formación de los conductos derivados de Müller⁽⁸⁴⁾.

Uno de los genes que son parte de la cascada de regulación corriente debajo de *Sry* es *Sox9*, se expresa en la crestas genitales masculinas a los 11.5 dpc ^(79,85).

La expresión de *Sox9* se mantiene en el testículo durante y después de su diferenciación. La expresión de RNA de *Sox9* se asocia con el desarrollo de los cordones testiculares, específicamente en las células de Sertoli, en las que la expresión de *Sox9* se mantiene hasta la vida adulta ^(78,79, 80, 85)

Sox9 codifica para un factor de transcripción relacionado con *Sry*, debido a que contiene la caja HMG. Al igual que *Sry*, mutaciones en *Sox9* interrumpen el desarrollo masculino, pero a diferencia de *Sry* el papel de *Sox9* no se restringe a mamíferos ^(79,85).

DMRT1 es otro gene involucrado en la diferenciación testicular. Este gen codifica una proteína de unión al DNA semejante a dedos de zinc; se expresa muy tempranamente de una manera sexo-específico en la gónada masculina de todas las clases de vertebrados. En el ratón se expresa en la cresta urogenital de ambos sexos, pero se convierte en testículo específico al final del período de determinación sexual ^(78,79,80,92)

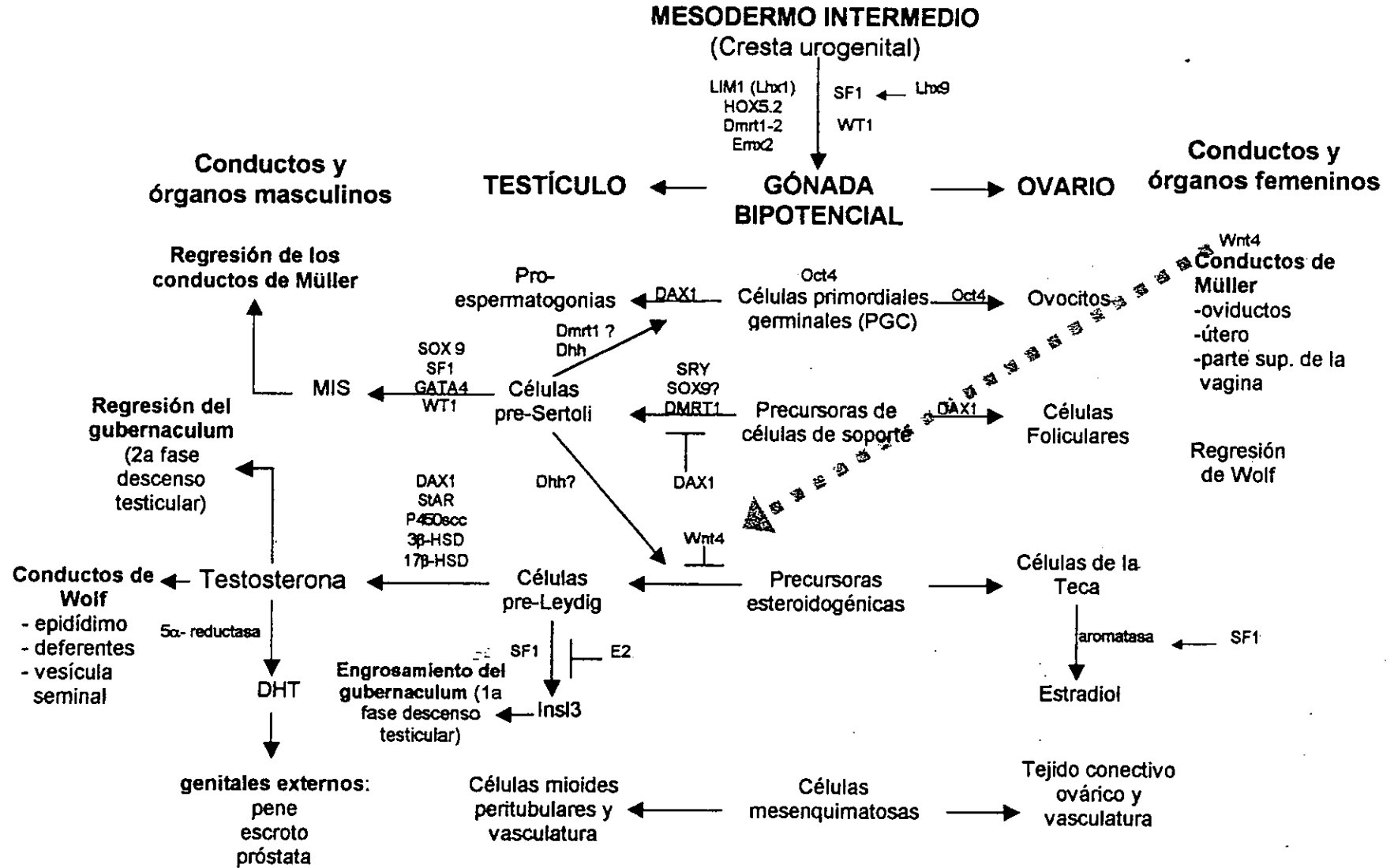
En el testículo *Dmrt1* se expresa tanto en células germinales como en células de Sertoli, se ha demostrado que se requiere para la diferenciación testicular, pero no para la diferenciación ovárica ^(78,79,80,92)

DAX1 participa también en la diferenciación testicular, codifica para un miembro de la familia de receptores nucleares huérfanos; mapeado en el cromosoma X que ha sido propuesto como el gene determinante del ovario o bien como un gene anti-SRY^(78-80,82,93,94).

La diferenciación gonadal requiere de una serie de eventos complejos que se realizan en el tejido apropiado en el momento adecuado del desarrollo. Aunque *SRY* es el controlador dominante de la determinación sexual masculina, permanecen ciertas dudas de cómo *SRY* regula los eventos críticos de la diferenciación gonadal.

La Figura No. 7 resume las interacciones génicas reportadas que regulan la diferenciación gonadal.

Figura 7. Interacciones génicas durante la diferenciación gonadal



2. Planteamiento del Problema.

La diabetes materna ejerce su mecanismo teratogénico desde la blastogénesis temprana, afectando las tres capas blastodérmicas y como consecuencia la diferenciación de diferentes órganos. El efecto teratogénico de la diabetes sobre el mesodermo intermedio altera en los productos de rata la diferenciación de los testículos, lo que repercutirá en la gametogénesis y en funciones hormonales.

3. Hipótesis

La diabetes materna provocará alteraciones en la diferenciación de los testículos de los fetos machos.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Determinar el efecto de la condición diabetes materna de la madre sobre la diferenciación testicular.

4.2. Objetivos particulares.

1. Determinar el efecto de la condición diabética de la madre sobre el desarrollo embrionario de los productos y la presencia de malformaciones congénitas.
2. Determinar el efecto de la diabetes materna de la madre sobre la diferenciación y desarrollo del testículo de los fetos.
3. Evaluar la condición diabética materna con los medición de los niveles de glucosa cetonuria, glucosuria, colesterol, triglicéridos, VLDL en insulina, a lo largo de la gestación.

5. Material y Métodos

Se utilizaron 85 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con un peso entre 250 y 350 gramos. Se aparearon con machos de la misma cepa en proporción de 3:1 durante toda la noche. Al día

siguiente se realizó frotis vaginal y la presencia de tapón vaginal y/o espermatozoides confirmó el inicio de la gestación (día 1). Todas las hembras gestantes fueron colocadas en jaulas individuales con 12 hrs. luz por 12 hrs. oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. Se separaron aleatoriamente en 4 grupos:

- ❖ Lote EI. 23 ratas a las cuales se les inyectó al 6° día de la gestación 60 mg/kg de peso de estreptozotocina (STZ) ip en dosis única.
- ❖ Lote EII. 51 ratas a las cuales se les inyectó al 6° día de gestación 50 mg/kg de peso de STZ ip, en dosis única.
- ❖ Lote CI. 6 ratas a las cuales se les inyectó amortiguador de acetatos al 0.1M, pH 4.3 ip en dosis única.
- ❖ Lote CII. 5 ratas que fueron puncionadas con aguja del mismo calibre que el utilizado por los lotes anteriores.

A todas las ratas entre las 8 y 10 AM se les hicieron las siguientes mediciones durante la gestación.

- Peso corporal 2 veces a la semana.
- Glucosa de la vena caudal: 1 vez a la semana (con glucómetro de Bayer con tira reactiva de Glucotyde).
- Glucosuria: 1 vez a la semana (con tiras reactivas de Bayer "ketodiastix").
- Cetonuria: 1 vez a la semana (con tiras reactivas de Bayer "ketodiastix").

Todas las ratas se sacrificaron el día 20 de la gestación mediante dislocación cervical. Se tomó sangre total de la aorta y se realizó inmediatamente la determinación de HbA_{1c}.

El resto de la sangre se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos. Se separó el suero y se congeló a -70° C para su análisis posterior. Se realizaron determinaciones de glucosa, colesterol total, triglicéridos, VLDL (analizador Kodak Ektachem DT 60 II) e insulina (RIA).

Todas las hembras se les realizó disección abdominal, anotando el número y posición de los fetos en los cuernos uterinos, así como el número y posición de las reabsorciones.

Los fetos fueron separados y se les midió: peso, longitud cabeza-rabadilla, longitud cefálica (fronto-occipital) y longitud caudal. Se sexaron y se extrajeron los testículos. Los testículos izquierdos, se fijaron en formol al 10% y procesaron para microscopía de luz. Los testículos derechos se fijaron con glutaraldehído al 2.5%, y se procesaron para su observación al microscopio electrónico de barrido.

5.1 Microscopía de Luz:

Mediante las técnicas histológicas, convencionales se realizó inclusión en parafina, se realizaron cortes en microtomo de rotación de 4 μm , que se tiñeron con las siguientes técnicas: Hematoxilina Eosina (HE), Masson, Azul alciano (PAS) y Van Giesson. Se realizaron las observaciones y descripciones pertinentes y se fotografiaron con fotomicroscopio Nikon.

5.2 Microscopía electrónica de barrido.

Las muestras se fijaron en formol al 10%, se deshidrataron en alcoholes graduales (30% al 100% 1 hora en cada cambio) y se incluyeron en paraplast.

Se realizaron cortes en microtomo de parafina de 10 a 12 μm , y se montaron en cubreobjetos de 22 x 22 m. Se desparafinaron en xilol y rehidrataron en alcoholes graduales 100% al 30%, hasta llegar a agua destilada. Se postfijaron con tetróxido de Osmio al 1%, durante 1 hora y se lavaron con amortiguador de cacodilatos 3.4% pH 7.3. Se desecaron por punto crítico, se recubrieron con oro, y se observaron en el microscopio electrónico de barrido JEOL10.

5.3 Parámetros bioquímicos.

Se determinaron por química seca en el analizador Kodak Ektachem DT 60 II.

- ❖ Glucosa.- reacción en la que la glucosa de la muestra reacciona con el oxígeno en presencia de glucosa oxidasa.
- ❖ Triglicéridos.- separación de los triglicéridos de los acarreadores lipoprotéicos, los triglicéridos son hidrolizados por una lipasa y se retiran los residuos de ácido ascórbico con ascorbato oxidasa.
- ❖ Colesterol.- el colesterol se disocia de los acarreadores de lipoproteínas. Los ésteres de colesterol se hidrolizan a colesterol

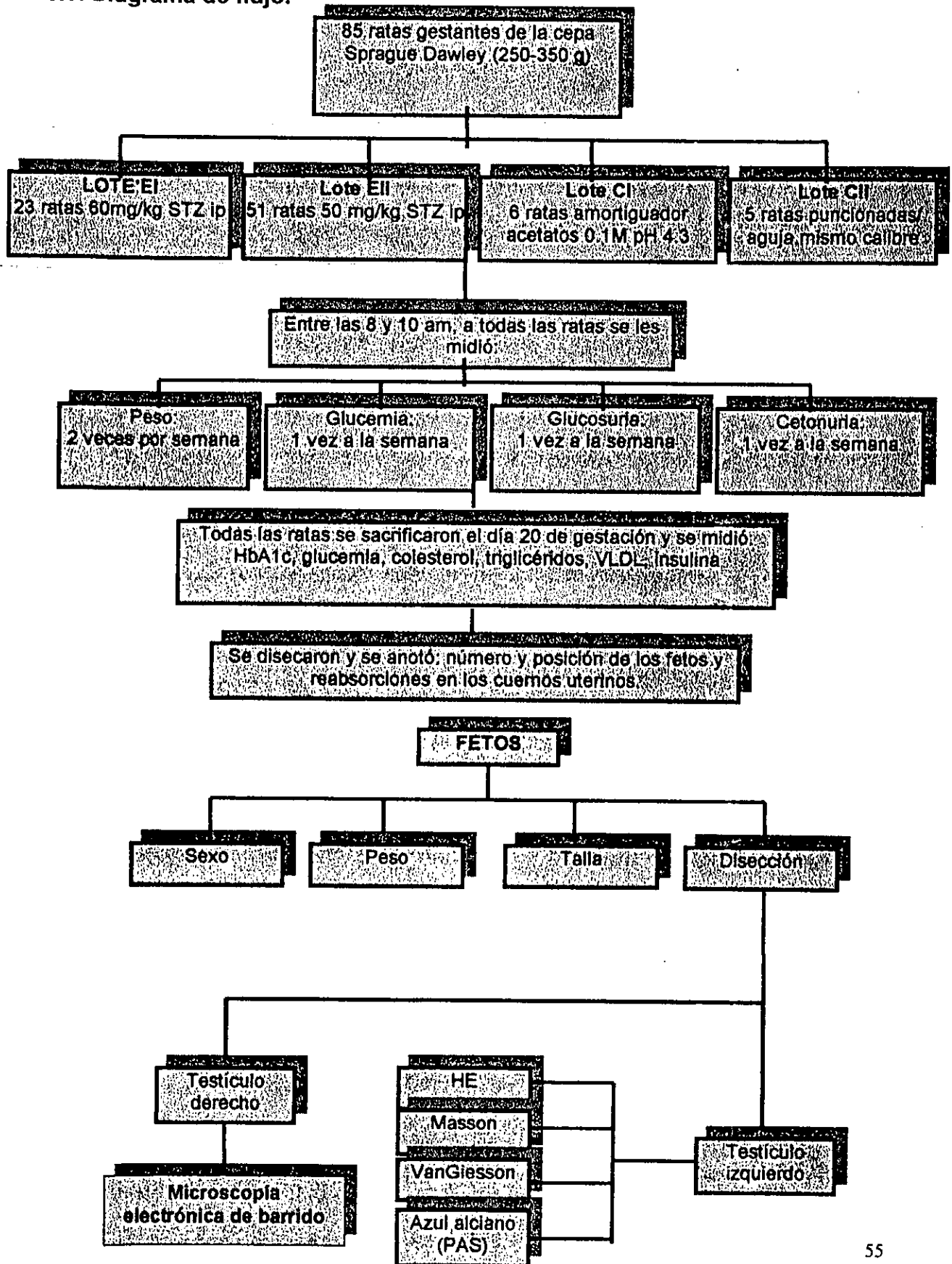
libre que se oxida con colesterol oxidasa. La reacción final produce color a través de la cual se calcula la cantidad de colesterol presente.

Las determinaciones de insulina se realizaron por RIA. Se utilizaron estuches comerciales CIS-Bio-International. La determinación de hemoglobina glucosilada se realizó en el DCA 2000 de Bayer. En este análisis se determinan las concentraciones de HbA_{1c}, la concentración de Hb total y la relación entre ambas, que se reporta como porcentaje de HbA_{1c}. Para la determinación de Hb total, se usa ferricianuro potásico, el cual oxida la Hb de la muestra a metahemoglobina. La metahemoglobina forma entonces un complejo con el tiocianato, formándose tiocianmeta-hemoglobina, que es la que se mide. Para la medida específica de la HbA_{1c} se utiliza la inhibición de la aglutinación de partículas de látex, recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón, específico para HbA.

5.4. Análisis Estadístico.

Los resultados se expresan como promedio aritmético \pm desviación estándar. Se realiza la prueba de análisis de varianza (ANOVA) la cual consiste en la comparación de las diferencias cuadráticas (varianzas) entre e intra-grupos. Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de $p \leq 0.05$. Para la comparación específica de los grupos, se realizó una post-prueba de Tukey.

5.5. Diagrama de flujo.



6. Resultados

El porcentaje de ratas del lote EI que alcanzaron niveles de glucosa mayores a 200 mg/dl fue similar al de las ratas del lote EII (p=NS), sin embargo, la mortalidad de las ratas EI fue significativamente mayor que la de las ratas EII (p=0.020). (tabla 1, gráfica 1).

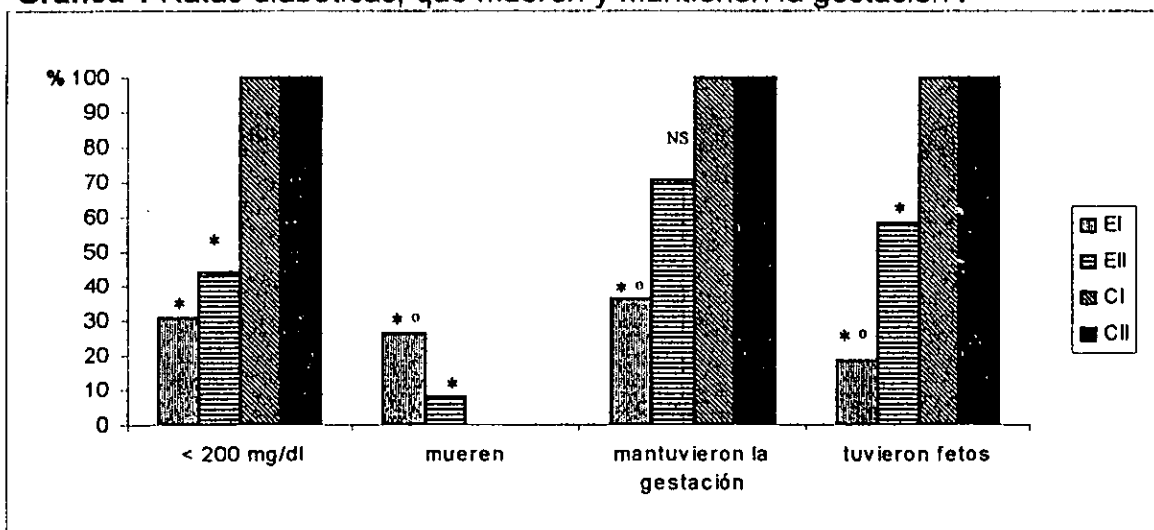
El porcentaje de ratas que mantienen la gestación del lote EI fue significativamente menor que el de las ratas del lote EII (p=0.003). El porcentaje de ratas que tuvo fetos del lote EI fue significativamente menor que el de las ratas del lote EII (p=0.001). (tabla 1, gráfica 1)

Tabla 1. Ratas diabéticas, que mueren y mantienen la gestación

LOTE	>200 mg/dl (%)	mueren (%)	mantuvieron la gestación (%)	tuvieron fetos (%)
EI n=23	69.57*	26.09* ^o	36.36* ^o	18.18* ^o
EII n=51	56*	8*	70.38 ^{NS}	58.33*
CI n=6	0	0	100	100
CII n=5	0	0	100	100

Datos expresados en porcentaje. *p<0.05 vs CI/CII, ^op<0.05 vs EII, ^{NS}p= no significativa vs CI/CII

Gráfica 1 Ratas diabéticas, que mueren y mantienen la gestación .



Datos expresados en porcentaje. *p<0.05 vs CI/CII, ^op<0.05 vs EII, ^{NS}p= no significativa vs CI/CII

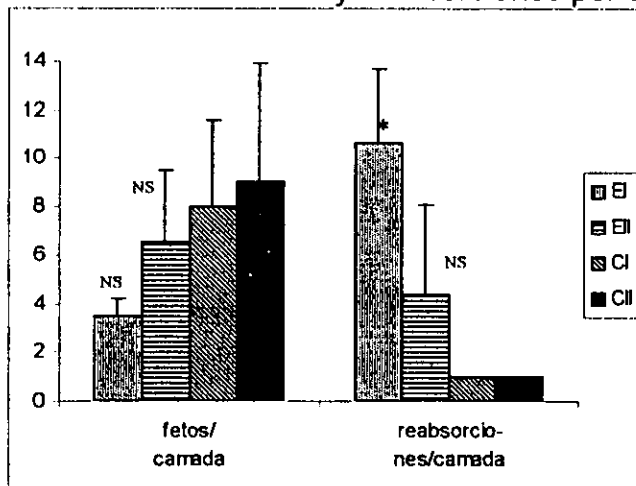
El número de fetos por camada de las ratas del lote EI no presentó diferencia significativa con el lote EII ($p=NS$), sin embargo, el número de reabsorciones sí fue significativamente mayor en las ratas EI que en las ratas EII ($p=0.014$) (tabla 2, gráfica 2).

Tabla 2. Promedio de fetos y reabsorciones por camada.

LOTE	fetos/ camada	reabsorciones/ camada
EI n=11	3.5 ± 0.71^{NS}	$10.67 \pm 3.06^*$
EII n=26	6.57 ± 2.9^{NS}	4.33 ± 3.77^{NS}
CI n=6	8 ± 3.6	1
CII n=5	9 ± 4.9	1

Datos expresados en promedio \pm DE. * $p < 0.05$ vs EII, CI, CII, ^{NS} $p =$ no significativa vs CI/CII.

Gráfica 2. Promedio de fetos y reabsorciones por camada.



Datos expresados en promedio \pm DE. * $p < 0.05$ vs EII, CI, CII, ^{NS} $p =$ no significativa vs CI/CII.

6.1. Pesos

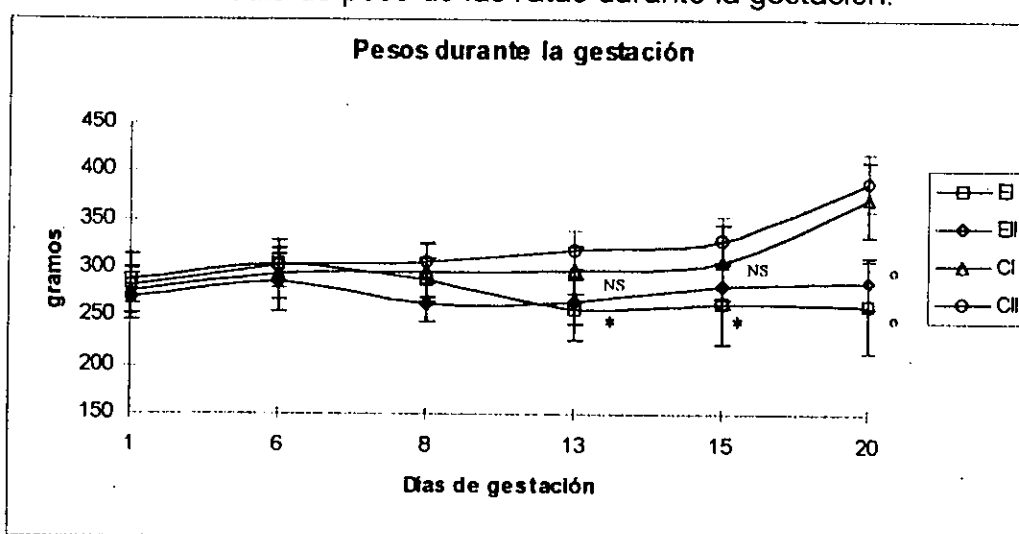
El peso de las ratas del lote EI presenta diferencia significativa con las ratas de los lotes control a partir del día 13 de la gestación y hasta el día del sacrificio, mientras que no hay diferencia con las ratas del lote EII (tabla 3, gráfica 3).

TABLA 3. Promedio de peso de las ratas durante la gestación.

LOTE	día 1	día 6	día 8	día 13	día 15	día 20
EI N= 11	288.39 ± 26.29	303.48 ± 24.95	287.35 ± 22.53	257.35 ± 30.98*	262.66 ± 41.04*	261 ± 46.56°
EII N=26	270.08 ± 22.83	285.18 ± 29.62	263.79 ± 19.66	266.07 ± 23.56 ^{NS}	282.11 ± 23.52 ^{NS}	285.43 ± 27.19°
CI n=6	276.33 ± 23.17	293.83 ± 25.87	296.67 ± 27.42	297.67 ± 24.9	305.83 ± 39.67	371.33 ± 38.99
CII n=5	280.6 ± 17.21	302.6 ± 16.07	305.2 ± 21.06	319.2 ± 18.9	328 ± 25.52	389.33 ± 28.88

Datos expresados en promedio ± DE. *p<0.05 vs CII, °p<0.05 vs CI/CII. ^{NS} p= no significativa

Gráfica 3. Promedio de peso de las ratas durante la gestación.



Datos expresados en promedio ± DE. *p<0.05 vs CII, °p<0.05 vs CI/CII. ^{NS} p= no significativa

6.2. Niveles de glucosa:

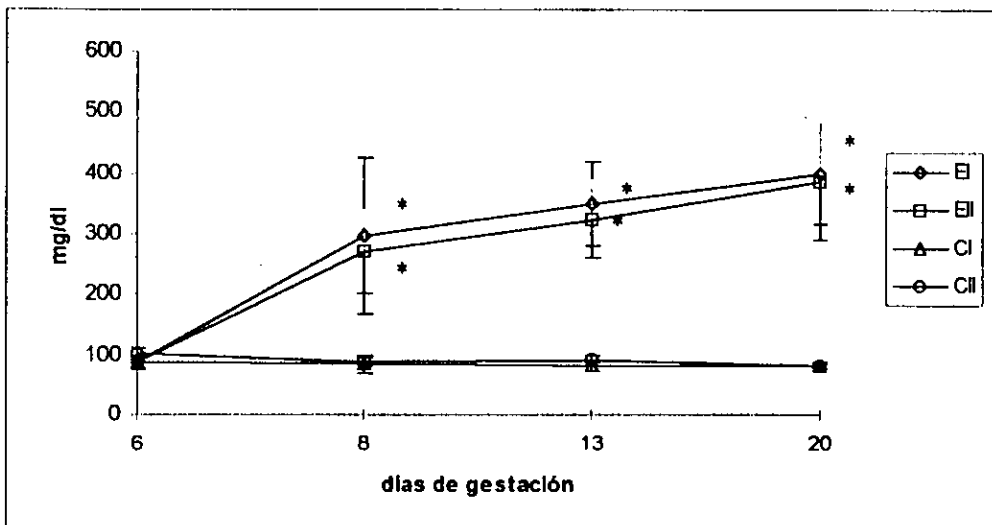
Los niveles de glucosa para los lotes EI y EII se mantuvieron en una constante elevación a lo largo de la gestación, alcanzando niveles por arriba de 380 mg/dl al día 20 de gestación sin presentarse diferencia significativa entre ellos. Los lotes control mantuvieron niveles constantes de glucosa no rebasando los 100 mg/dl durante toda la gestación. Los lotes experimentales con respecto a los lotes control sí presentaron diferencias significativas. (Tabla 4 y gráfica 4)

Tabla 4. Niveles de glucosa durante la gestación.

	Día 6	día 8	día 13	día 20
EI n=11	87.7 ± 9.16	296.67 ± 127.99*	350.43 ± 69.69*	399.2 ± 81.33*
EII n=26	89.4 ± 14.98	269.04 ± 69.19*	323.68 ± 64.33*	385.66 ± 95.31*
CI n=6	88.33 ± 11.02	84.50 ± 15.25	82.33 ± 9.16	82.00 ± 3.16
CII n=5	101.40 ± 11.71	89.6 ± 6.88	93.00 ± 5.00	82.33 ± 5.51

Datos expresados en promedio ± DE *p<0.001vsCI/CII

Gráfica 4. Niveles de glucosa durante la gestación.



Datos expresados en promedio ± DE *p<0.001vsCI/CII

6.3 Cetonuria:

En el lote EI los niveles de cetonas en orina se elevaron hasta alcanzar su máximo nivel el día 13 de la gestación, disminuyendo gradualmente hasta el día del sacrificio. Al comparar EI y EII se encontró diferencia significativa los días 13 y 20 ($p < 0.001$). La comparación entre EI con respecto a CI y CII fue significativa ($p < 0.05$) los días 13 y 20 de la gestación.

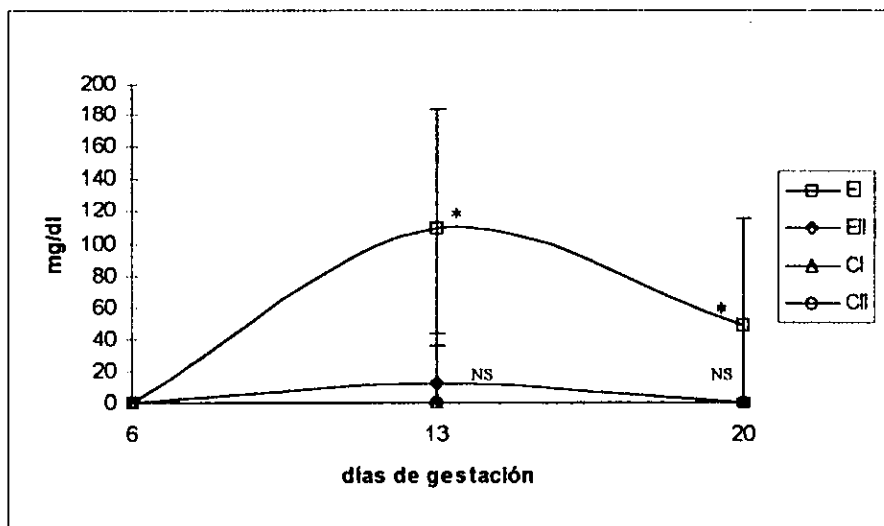
El lote EII no presenta diferencia significativa con respecto a los lotes CI y CII. (Tabla 5, gráfica 5)

Tabla 5. Cetonuria durante la gestación

LOTE	día 6	día 13	día 20
EI n=11	0	109.46 ± 73.96*	48.00 ± 67.46*
EII n=26	0	12.29 ± 90.89 ^{NS}	0.48 ± 1.50 ^{NS}
CI n=6	0	0	0
CII n=5	0	0	0

Datos expresados en promedio ± DE. *p<0.05 vs EI, CI,CII. ^{NS} p=no significativa vs CI/CII

Gráfica 5. Cetonuria durante la gestación



Datos expresados en promedio ± DE. *p<0.05 vs EI, CI,CII. ^{NS} p=no significativa vs CI/CII

6.4 Glucosuria.

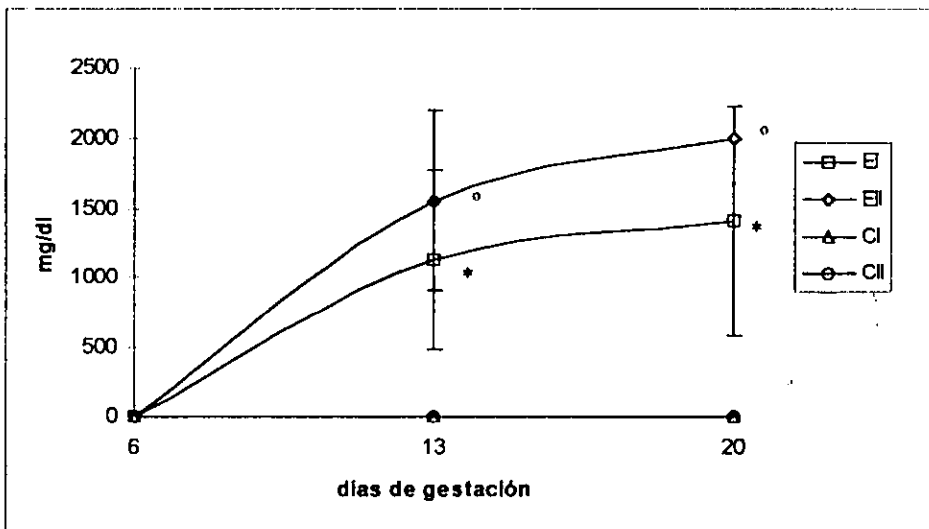
Las ratas del lote EI presentaron niveles de glucosa en orina significativamente más elevados que las ratas de los lotes control (p<0.001), y significativamente menores que la de las ratas del lote EII (p<0.001). Las ratas del lote EII, presentaron niveles significativamente mayores que las ratas de los lotes control (p<0.001). (Tabla 6, gráfica 6)

Tabla 6. Glucosuria durante la gestación:

LOTE	día 6	día 13	día 20
EI n=11	0	1130.77 ± 653.37*	1410.00 ± 825.22*
EII n=26	0	1557.14± 648.89°	2000.00°
CI n=6	0	0	0
CII n=5	0	0	0

Datos expresados en promedio ± DE. *p<0.001 vs EI,CI,CII. °p<0.001 vs CI/CII.

Gráfica 6. Glucosuria durante la gestación.



Datos expresados en promedio ± DE. *p<0.001 vs EI,CI,CII. °p<0.001 vs CI/CII.

6.5. Química sanguínea

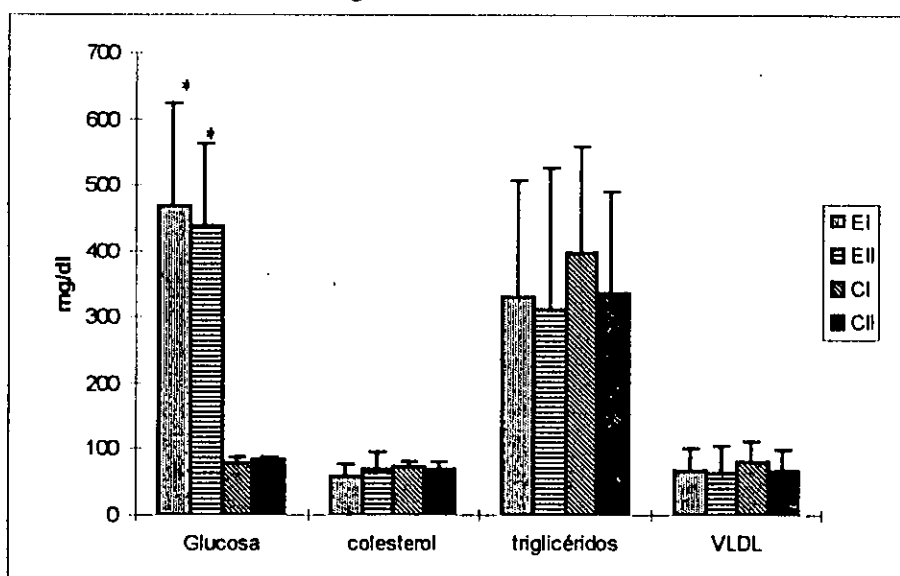
Las ratas del lote EI y EII presentaron niveles significativamente más elevados de glucosa y HbA_{1c} y menores de insulina que lo que presentaron las ratas de los lotes CI/CII. (tabla 7, gráfica 7, 7a y 7b)

Tabla 7. Química sanguínea de las ratas al sacrificio.

LOTE	Glucosa	colesterol	triglicéridos	VLDL	Insulina	HbA1c
EI n=11	467.64 ± 154.81*	58.54 ± 18.64 ^{NS}	330.64 ± 175.29 ^{NS}	66.18 ± 35.07 ^{NS}	8.03 ± 3.44*	5.95 ± 0.79*
EII n=26	437.17 ± 125.78*	68.04 ± 27.17 ^{NS}	313.3913 ± 213.19 ^{NS}	62.61 ± 42.52 ^{NS}	13.19 ± 5.50*	7.42 ± 0.61*
CI n=6	79.167 ± 8.52	73.2 ± 8.44	398 ± 161.58	80.5 ± 30.54	15.71 ± 4.88	1.6 ± 0.61
CII n=5	83 ± 4.55	69.2 ± 12.17	337.25 ± 152.35	67.5 ± 30.39	14.28 ± 3.68	2.9 ± 0.3

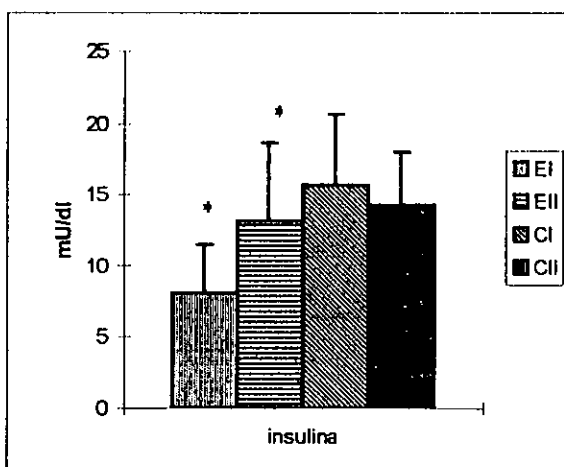
Datos expresados en promedio ± DE. *p<0.009 vs CI/CII. ^{NS}p= no significativa

Gráfica 7. Química sanguínea



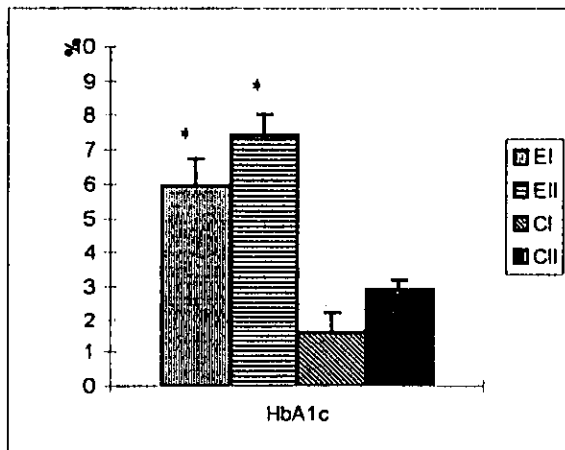
*p<0.001

Gráfica 7a. Insulina



*p= 0.009

Gráfica 7b. HbA_{1c}



*p<0.001

6.6. Fetos.

El promedio de peso de los fetos fue significativamente mayor para los lotes control que para los lotes experimentales (p<0.001). Los fetos del lote EI presentaron peso significativamente mas bajo que el lote EII (p< 0.001).

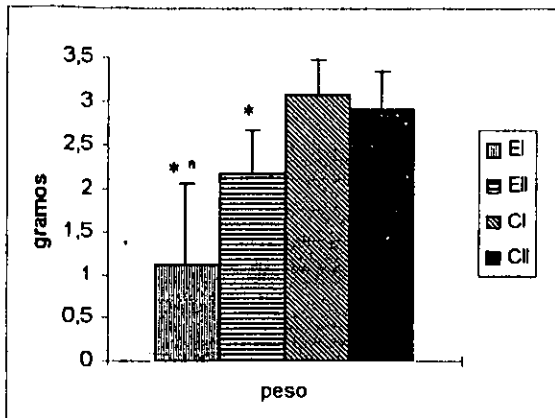
En cuanto al promedio de la talla también se observa que los fetos de los lotes control tuvieron una talla significativamente mayor que los fetos experimentales (p<0.001). En los fetos experimentales el lote EI fue el que tuvo significativamente menor de talla (p=0.008).

Tabla 8: Peso y talla de los fetos de 20 días

LOTE	PESO	TALLA
EI n=8	1.13 ± 0.93 ^{*a}	41.94 ± 5.98 ^{*o}
EII n=94	2.18 ± 0.50 [*]	48.95 ± 4.32 [*]
CI n=60	3.08 ± 0.39	54.47 ± 5.40
CII n=45	2.91 ± 0.42	52.45 ± 4.95

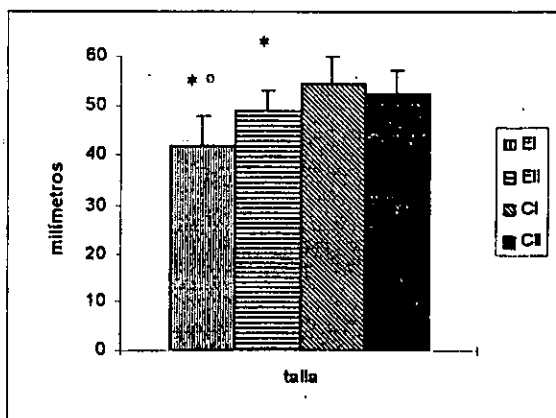
Datos expresados en promedio ± DE. *p<0.001 vs CI/CII, ^ap<0.001 vs EII, ^op=0.008 vs EII

Gráfica 8a: Peso de los fetos



*p<0.001 vs CI/CII, *p<0.001 vs EII

Gráfica 8b: Talla de los fetos



*p<0.001 vs CI/CII, °p=0.008 vs EII

6.6.1. Proporción de hembras y machos.

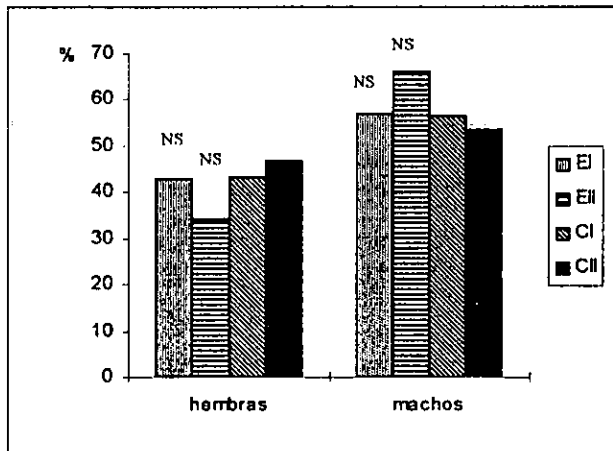
No hubo diferencia significativa en la proporción de machos y hembras entre los lotes EI/EII y CI/CII. (Tabla 9, gráfica 9).

Tabla 9: Proporción de hembras y machos

LOTE	Hembras (%)	Machos (%)
EI n=7	42.86 ^{NS}	57.14 ^{NS}
EII n=94	34.04 ^{NS}	65.96 ^{NS}
CI n=60	43.33	56.67
CII n=45	46.67	53.33

Datos expresados en porcentaje. ^{NS} p=no significativo vs CI/CII

Gráfica 9: Proporción de hembras y machos



Datos expresados en porcentaje. ^{NS} p=no significativo vs CI/CII

6.6.2. Placentas

En lo que respecta al peso de las placentas no hubo diferencia significativa entre el lote EI y los lotes control (Tabla 10). El lote EII sí presenta diferencia significativa al compararlo con los lotes control, pero no con el lote EI (Gráfica 10).

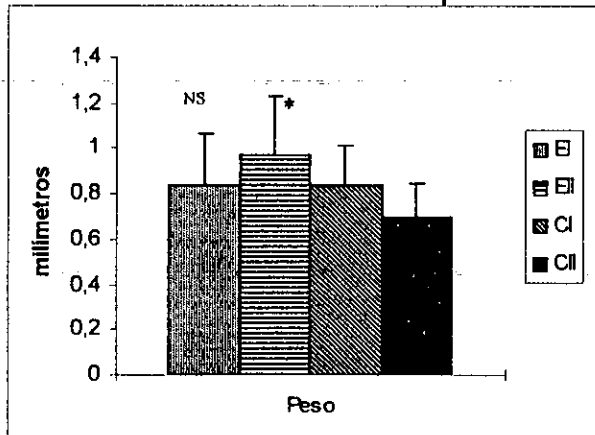
El diámetro de la placenta fue significativamente mayor en los lotes experimentales al compararlos con los controles. La diferencia entre EI y EII es también significativa (tabla 10, gráfica 10).

Tabla 10: Peso y diámetro de las placentas

LOTE	Peso	Diámetro
EI N=7	0.83 ± 0.23 ^{NS}	15.92 ± 3.26 ^o
EII N=94	0.97 ± 0.27*	17.87 ± 2.05*
CI N=60	0.83 ± 0.17	16.64 ± 1.17
CII N=45	0.70 ± 0.14	15.61 ± 1.25

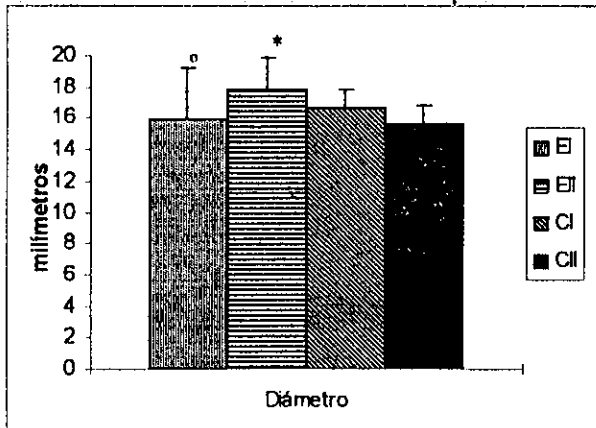
Datos expresados en promedio ± DE. ^{NS} p= no significativa. ^op<0.001 vs EII, *p<0.005 vs CI/CII.

Gráfica 10a: Peso de las placentas



Datos expresados en promedio \pm DE. ^{NS} p= no significativa. *p<0.005 vs CI/CII.

Gráfica 10b: Diámetro de las placentas



Datos expresados en promedio \pm DE. °p<0.001 vs EII, *p<0.05 vs CI/CII

6.6.3. Descripciones histológicas.

Al comparar las observaciones histológicas entre los lotes EI y EII así como entre CI y CII no se encontraron diferencias relevantes por lo que se consideraron las observaciones sólo como grupos experimentales y grupos control.

El análisis histológico de los testículos de fetos de 20 días de gestación aportó la siguiente información:

Grupos Control:

El testículo se encuentra recubierto por la túnica albugínea que está constituida principalmente por fibroblastos que son células alargadas con núcleos fusiformes; inmediatamente después de esta estructura se encuentran vasos sanguíneos de calibre medio que presentan un recubrimiento endotelial, con gran cantidad de elementos sanguíneos en su interior (Micrografía 1).

Hacia el interior del testículo se encuentran los cordones seminíferos (35 en promedio). Los cordones seminíferos están delimitados por una lámina basal en donde se presentan células de un aspecto similar a las células musculares lisas que han sido denominadas células mioideas (Micrografía 1,3)

En contacto con la lámina basal se encuentran las células de Sertoli que presentan núcleos piramidales, y se distribuyen a lo largo de la base del cordón seminífero, en este tipo celular se aprecian figuras mitóticas, lo que demuestra su actividad proliferativa (Micrografía 1,3).

Hacia el centro del cordón se encuentran las espermatogonias; que ocupan todo el diámetro del cordón; presentan un núcleo esférico en una posición central de mayor tamaño que el de las células de Sertoli, y presentan puentes citoplásmicos entre sí (Micrografía 1,3).

Los cordones seminíferos se encuentran inmersos en tejido intersticial, el que es escaso entre ellos (Micrografía 1).

En el tejido intersticial se encuentran abundantes vasos sanguíneos y son evidentes células mesenquimatosas y fibroblastos. Las células de Leydig son abundantes, forman grupos situados cerca de los vasos sanguíneos. Las células de Leydig son globosas, de gran tamaño, con núcleo excéntrico (Micrografía 3).

Grupos experimentales:

En el caso de los grupos experimentales, la túnica albugínea, recubre a la gónada y está constituida por gran cantidad de fibroblastos. Los vasos sanguíneos son escasos con un calibre menor

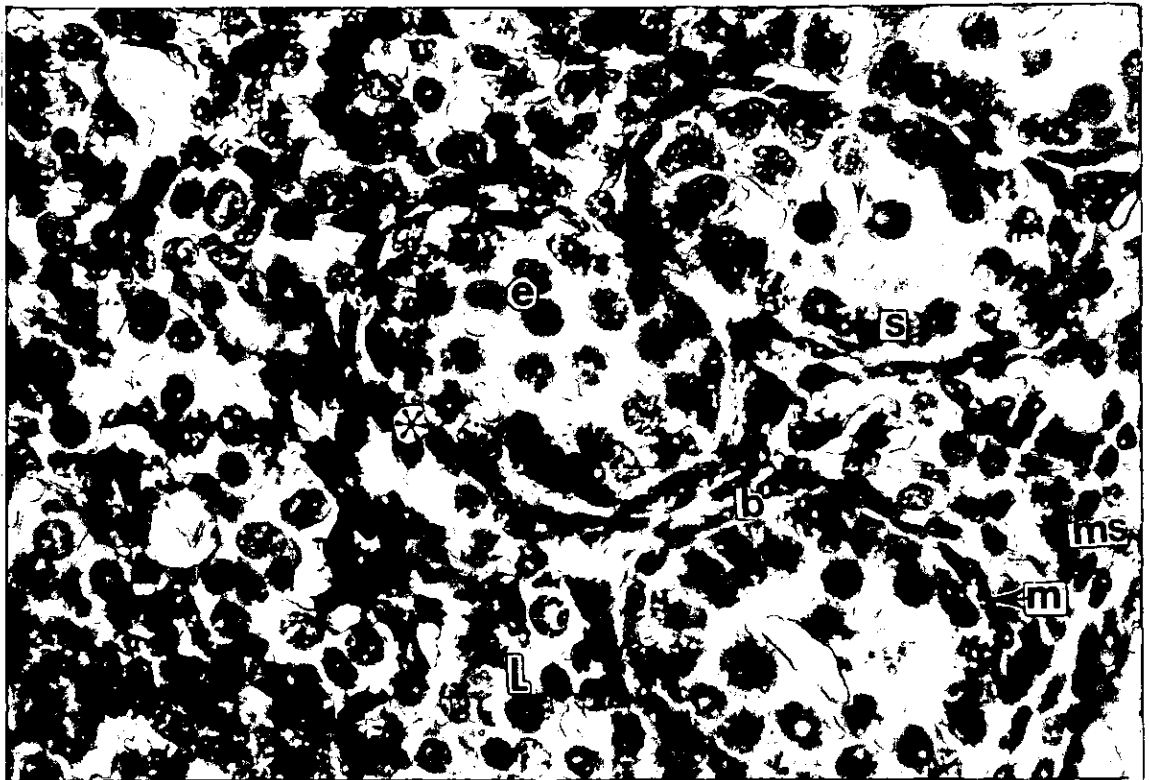
que en los grupos control, característica que se repite en todo el testículo (Micrografía 2).

En la base del cordón seminífero se observa la lámina basal, en la que están presentes las células mioideas, en menor número que en los grupos controles. En la base interna de estos cordones se observan las células Sertoli, que a diferencia de lo que sucede en los grupos testigos pierden el arreglo regular, encontrándose pocas de ellas y de menor tamaño (Comparar micrografías 3,4 y6).

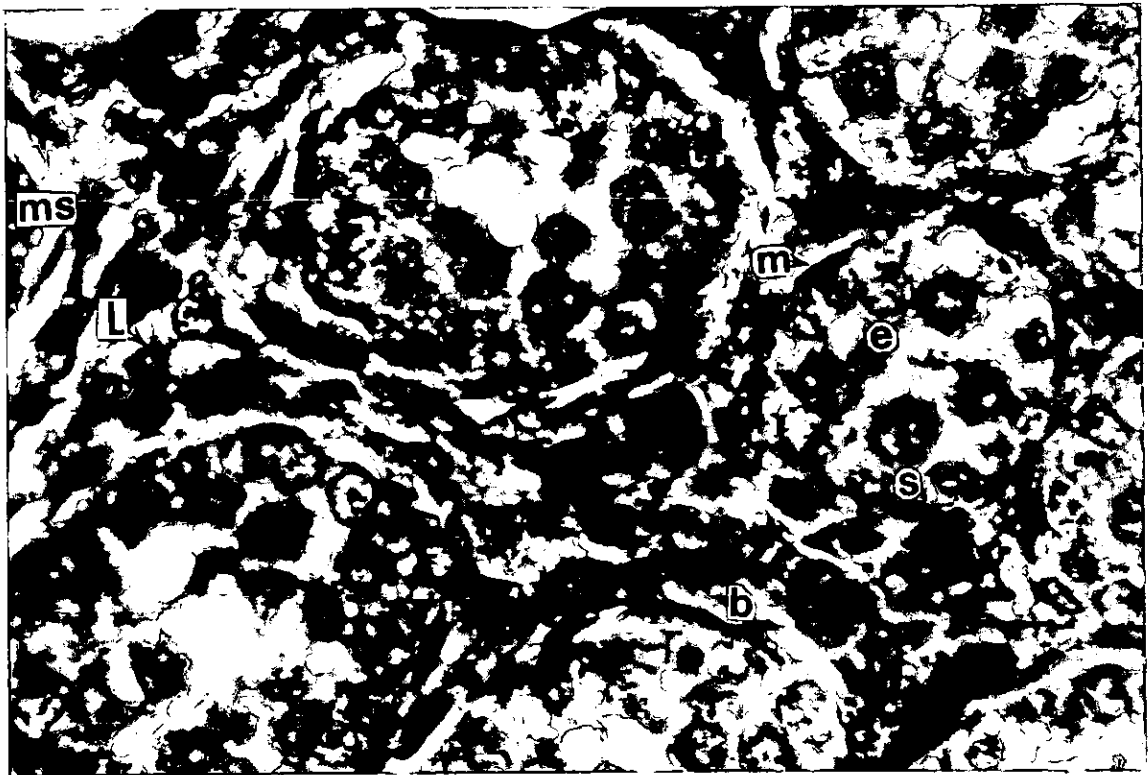
Las espermatogonias se encuentran hacia el interior del cordón seminífero, se observan en una cantidad mucho menor que en los grupos control, presentan el núcleo central y disminución en su volumen, lo que establece que los puentes citoplásmicos entre ellas sean muy delgados, sin embargo existen sitios en los que la relación entre ellas se ha perdido por completo, lo que ocasiona que se presenten espacios en el centro del cordón seminífero (Micrografías 4,5,6).

Al igual que en los grupos control los cordones seminíferos están inmersos en tejido intersticial sólo que en este caso el tejido intersticial es más abundante (Micrografías 4,5,6).

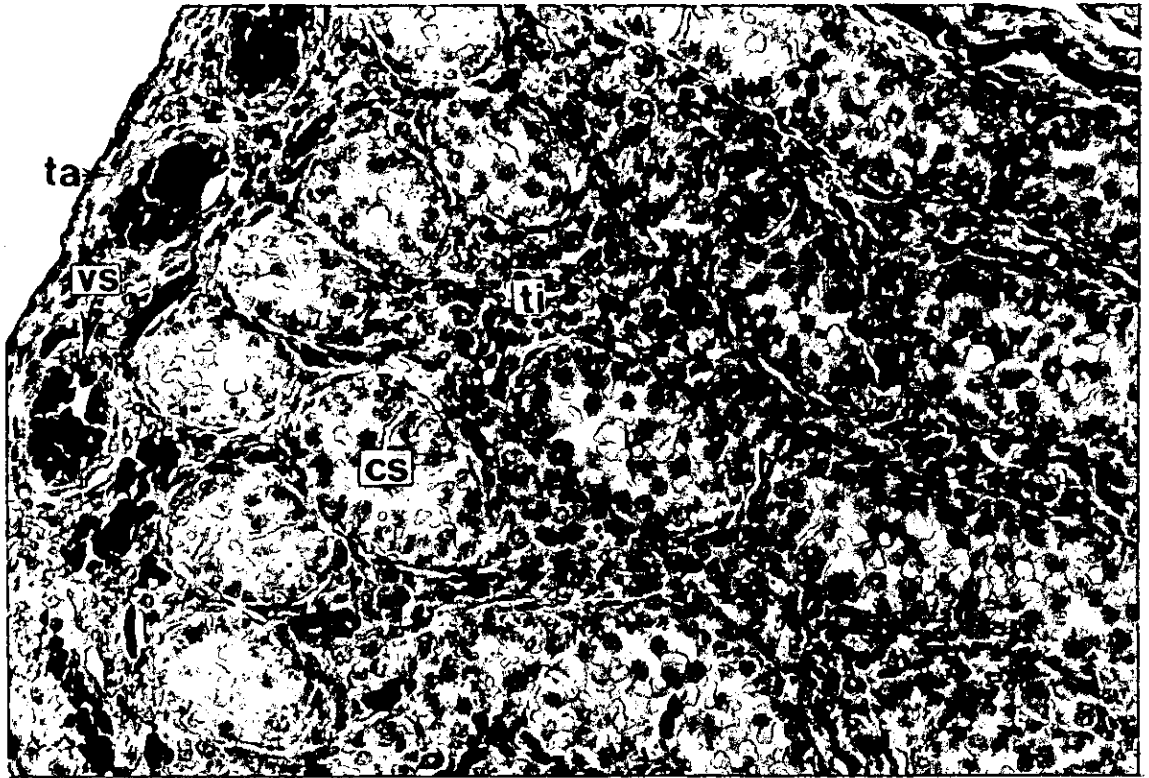
El tejido intersticial es laxo, con escasos vasos sanguíneos, y células mesenquimatosas en gran cantidad. Las células de Leydig están presentes aunque en un menor número, y se distribuyen de una manera aislada entre los cordones; sin embargo en la porción central de la gónada se observa la mayor cantidad de tejido conectivo. En esta región los cordones seminíferos son escasos y las células de Leydig se observan en mayor cantidad que en el resto de la gónada (Micrografías 4,5,6).



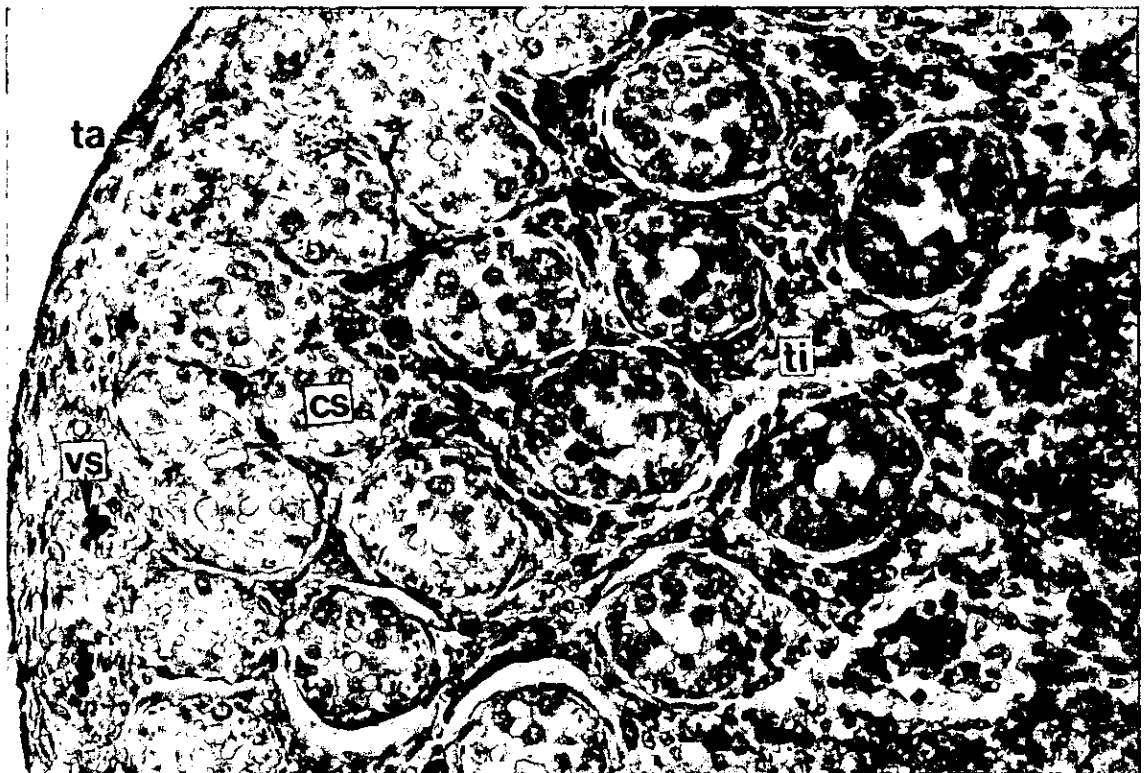
Micrografía 3. Corte transversal de testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Control. s: Célula de Sertoli; e: espermatogonias; L: Células de Leydig; m: célula mioide. * célula en mitosis. → puentes citoplásmicos. Tec. Azul alciano-Pass. 500x.



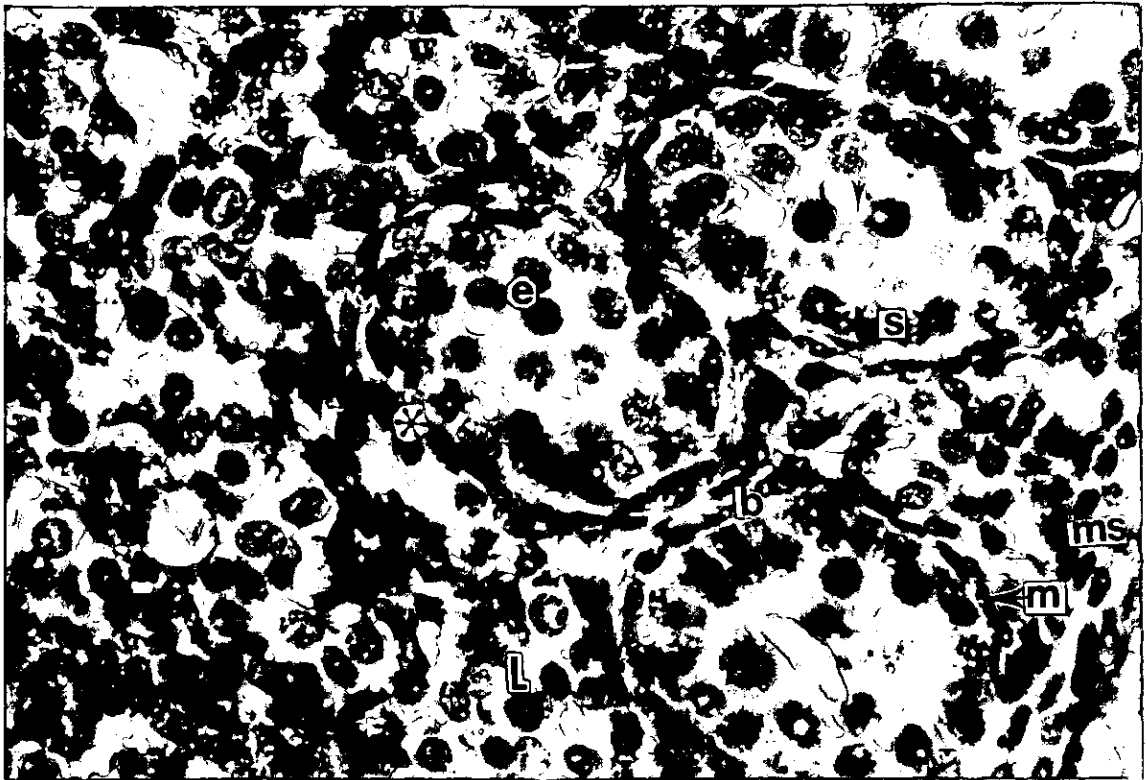
Micrografía 4. Corte transversal de testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. s: Célula de Sertoli; e: espermatogonias; L: Células de Leydig; m: célula mioide. → puentes citoplásmicos. Tec. Masson. 500x.



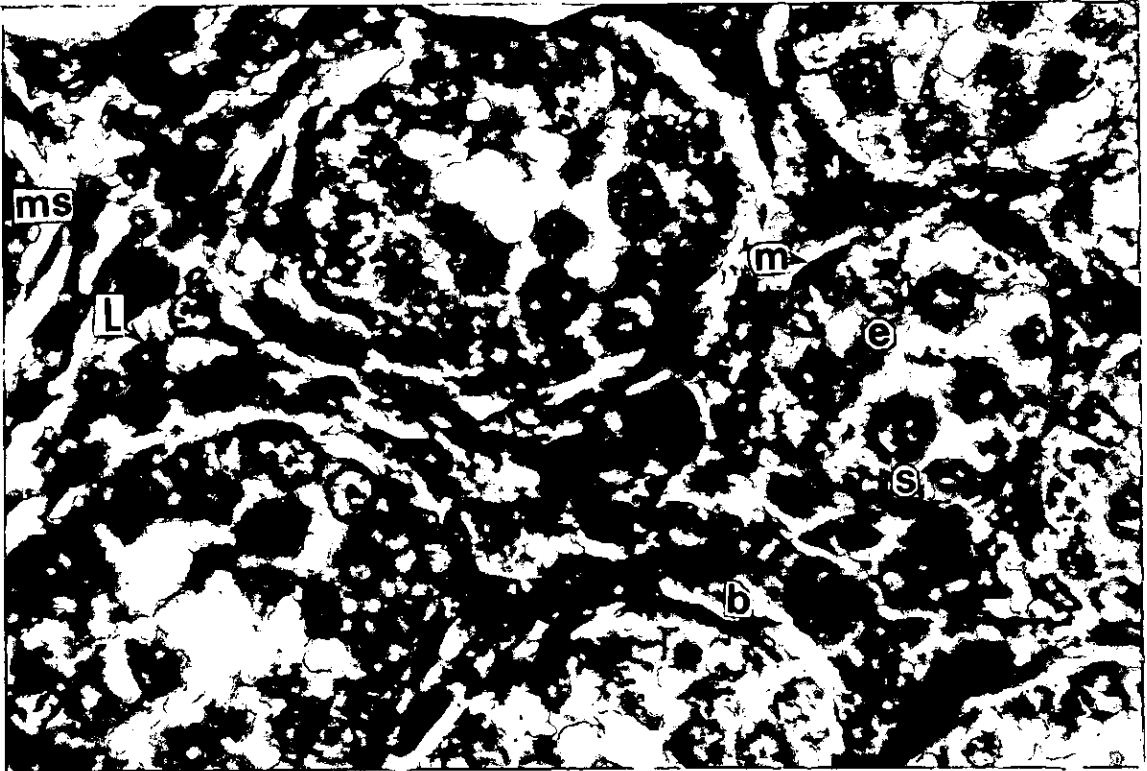
Micrografia 1. Corte transversal de testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote control. ta: túnica albugínea; vs: vaso sanguíneo; ti: tejido intersticial; cs: cordón seminífero. Tec. Masson. 200x.



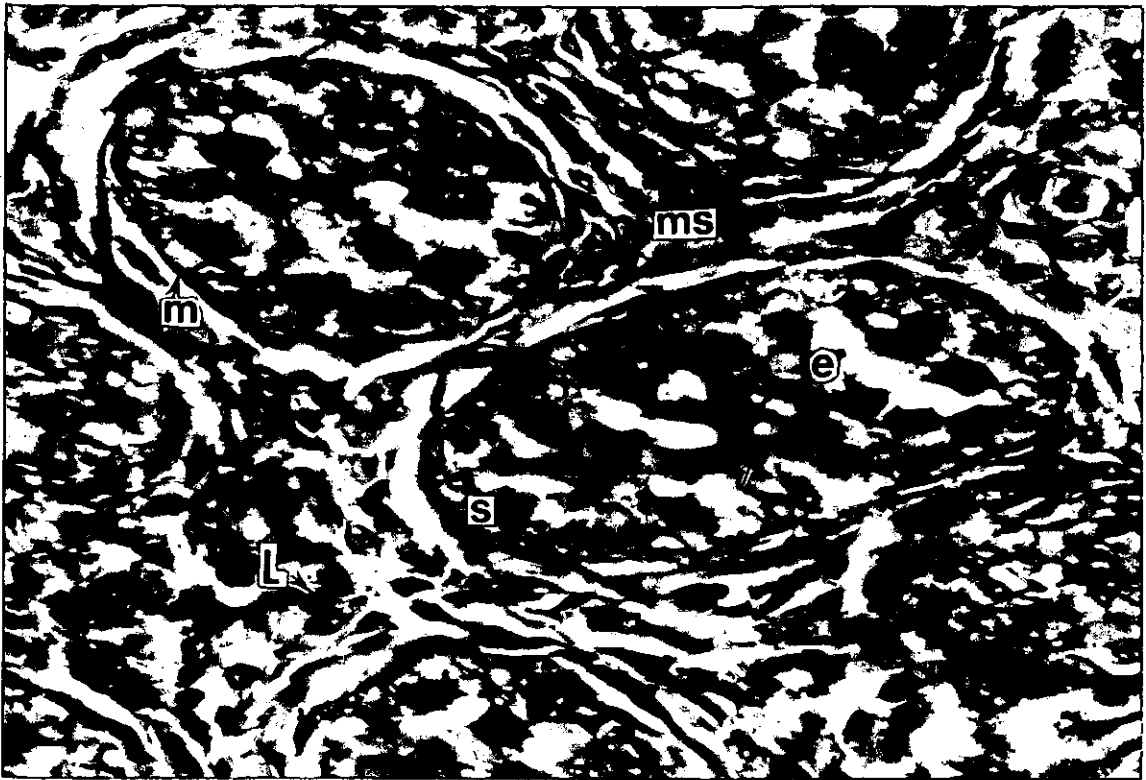
Micrografia 2. Corte transversal de testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. ta: túnica albugínea; vs: vaso sanguíneo; ti: tejido intersticial; cs: cordón seminífero. Tec. Masson. 200x.



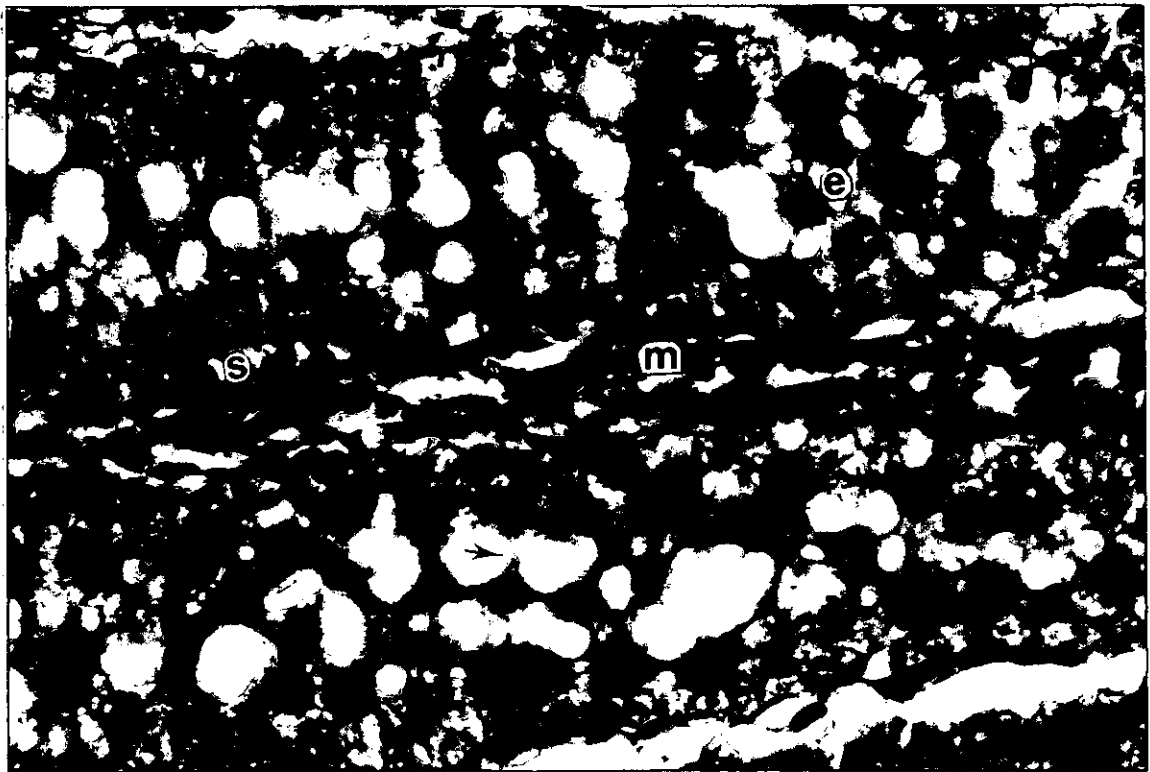
Micrografía 3. Corte transversal de testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Control. s: Célula de Sertoli; e: espermatogonias; L: Células de Leydig; m: célula mioide. * célula en mitosis. → puentes citoplásmicos. Tec. Azul alciano-Pass. 500x.



Micrografía 4. Corte transversal de testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. s: Célula de Sertoli; e: espermatogonias; L: Células de Leydig; m: célula mioide. → puentes citoplásmicos. Tec. Masson. 500x.



Micrografía 5. Corte transversal de testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. s: Célula de Sertoli; e: espermatogonias; L: Células de Leydig; m: célula mioide. → puentes citoplásmicos. Tec. Van Giesson. 500x.



Micrografía 6. Corte sagital de testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. s: Célula de Sertoli; e: espermatogonias; m: célula mioide. → puentes citoplásmicos. Tec. Azul alciano-Pass. 500x.

6.6.4. Microscopía electrónica de barrido:

Las observaciones con Microscopía Electrónica de Barrido revelan la estructura fina de los testículos fetales de ratas de 20 días de gestación.

Grupos Control.

Las observaciones del testículo fetal en un aumento de 100x muestran que está recubierto por la túnica albugínea, la que se observa como una franja delgada que recubre y contiene a los cordones seminíferos. Los vasos sanguíneos se distinguen en la región inmediata inferior a la túnica albugínea (Micrografía 7).

Los cordones seminíferos se observan inmersos en un estroma de tejido conjuntivo (Micrografía 7).

A una mayor amplificación (2000x) se observan los cordones seminíferos delimitados por una lámina basal, hacia el interior de ellos se encuentran las células de Sertoli y las espermatogonias (Micrografías 9 y 10).

Se observan en la lámina basal las células mioideas, que recubren toda la base del cordón, y están en una matriz fibrilar (Micrografías 9 y 10).

Descansando internamente sobre la lámina basal, se encuentran las células de Sertoli, que presentan una forma piramidal con una base amplia y un ápice estrecho dirigido hacia el centro del cordón, estas células presentan gran cantidad de prolongaciones citoplásmicas que se interdigitan entre las mismas células y las espermatogonias (Micrografías 9 y 10).

Hacia el centro del cordón se observan las espermatogonias, que ocupan todo el interior del cordón, y entre ellas son evidentes los grandes puentes citoplásmicos, lo que no permite distinguir claramente sus límites entre ellas y las células de Sertoli que las envuelven (Micrografías 9, 10 y 11).

Los cordones seminíferos se encuentran inmersos en tejido intersticial que está constituido de células mesenquimatosas que son estrelladas, con grandes prolongaciones citoplásmicas. Entre el mesénquima se observan células más grandes que tienen un aspecto menos irregular, y que se encuentran formando grupos, en algunos casos se aprecian puentes citoplásmicos entre ellas, estas son las células de Leydig (Micrografía 15).

Grupos Experimentales:

En las observaciones a 100x el testículo está recubierto por una capa de tejido conectivo que presenta mayor grosor que en los grupos control y corresponde a la túnica albugínea. Los vasos sanguíneos se identifican inmediatamente por debajo de la túnica. Hacia el interior del testículo se encuentran los cordones seminíferos, contenidos en un estroma de tejido conectivo (Micrografía 8).

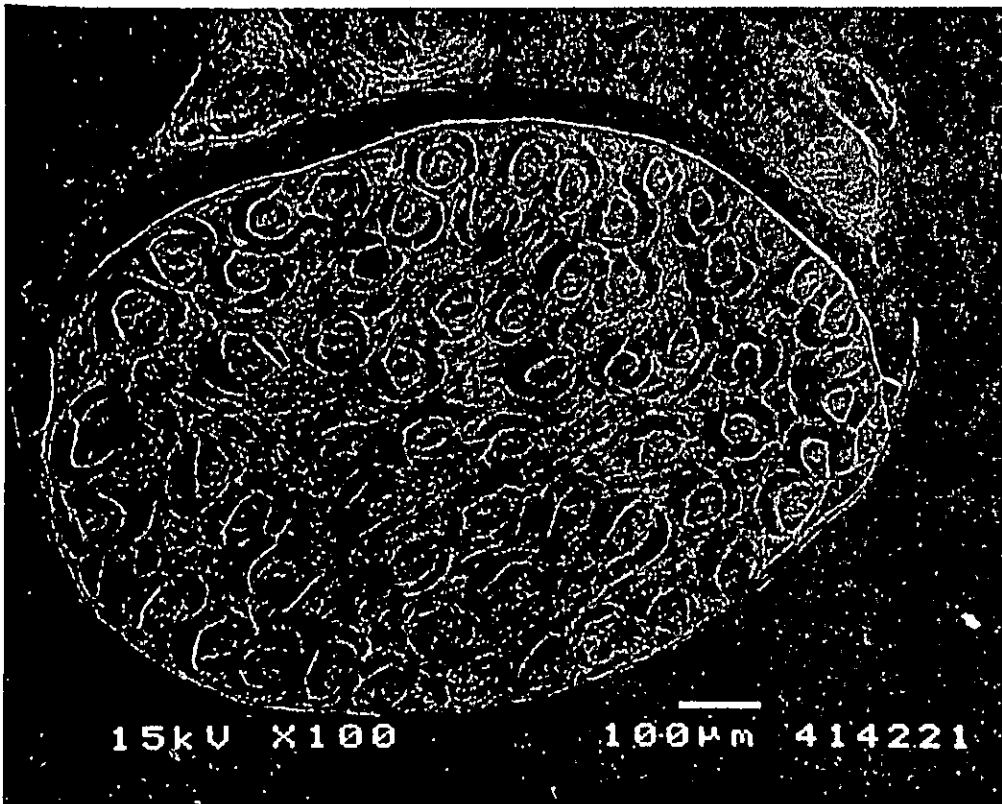
En este caso los cordones seminíferos se encuentran en menor cantidad que en los grupos control, con mayor cantidad de tejido conectivo intersticial (Micrografía 8).

En una amplificación de 2000x se observa que los cordones seminíferos están delimitados por una lámina basal, de menor grosor que en los grupos control, en ella se observan algunas células mioideas, y una mayor cantidad de fibras de matriz (Micrografías 12,13 y 14).

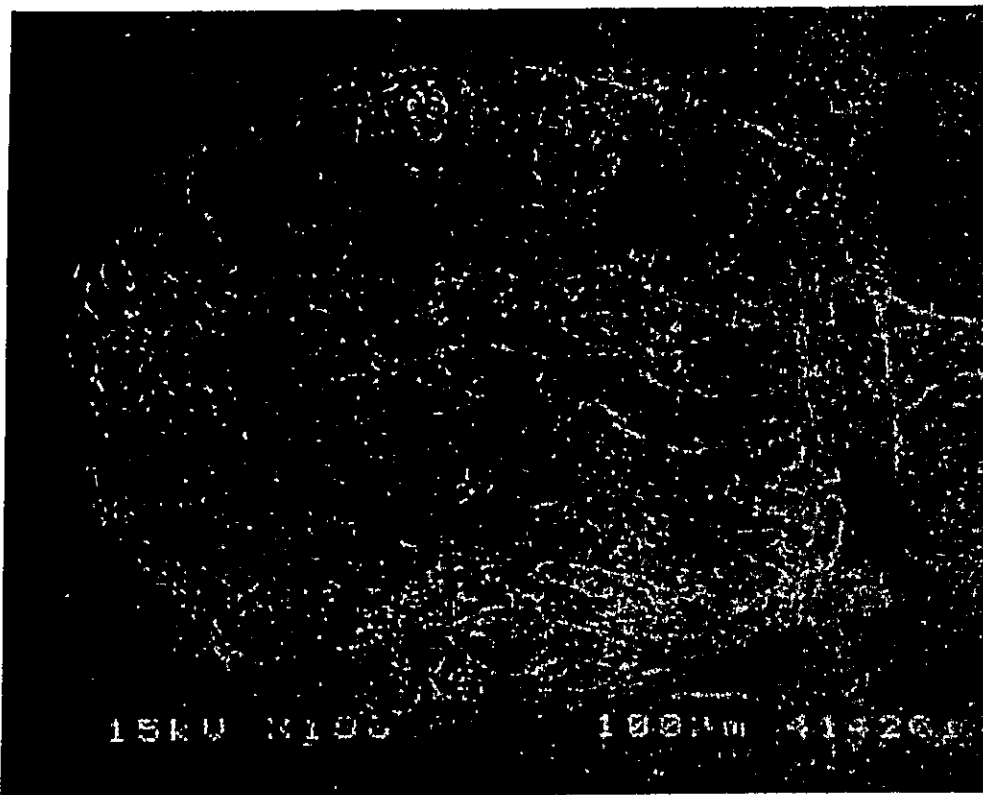
Por arriba de la lamina basal hacia el interior del testículo se observan las células de Sertoli, que están presentes en un menor número que en los grupos control. Las células de Sertoli son de una forma triangular, y de un tamaño menor que en los grupos controles, estas células presentan pocas prolongaciones citoplásmicas, lo que es evidente al no existir tanta relación entre las mismas células de Sertoli (Micrografías 12,13 y 14).

Las espermatogonias están hacia la luz, y a diferencia de los grupos controles son muy evidentes debido a que han perdido los puentes entre ellas, son más pequeñas, lo que favorece que en el centro del cordón se presenten espacios que semejan una luz (Micrografías 12,13 y 14).

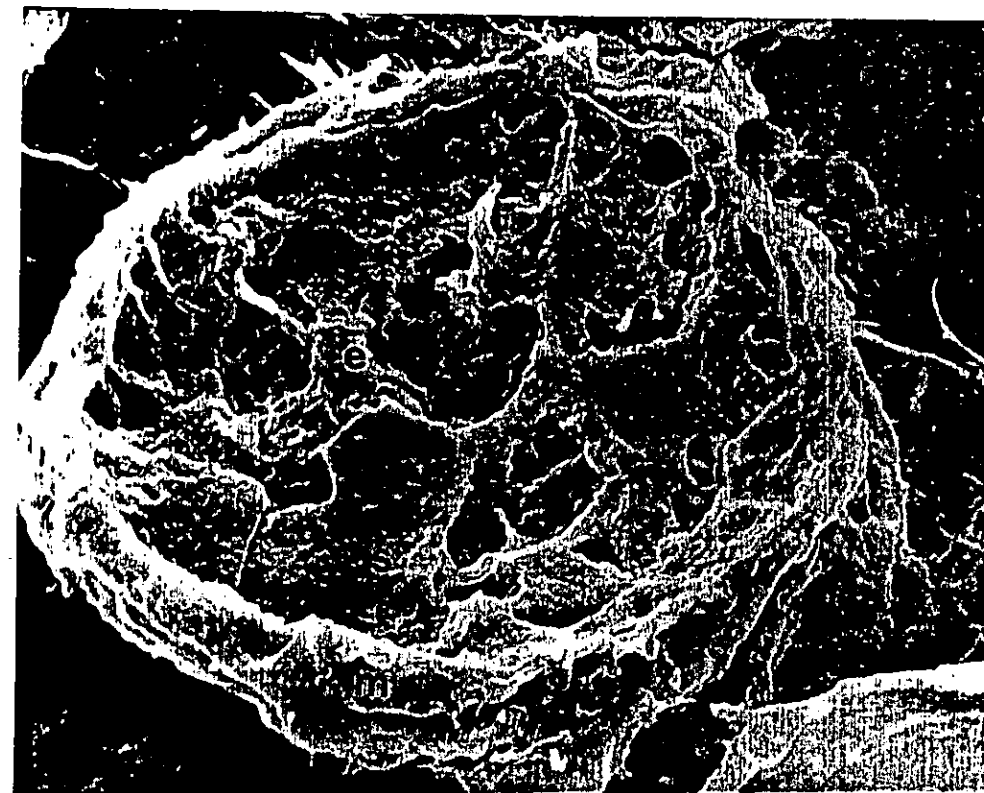
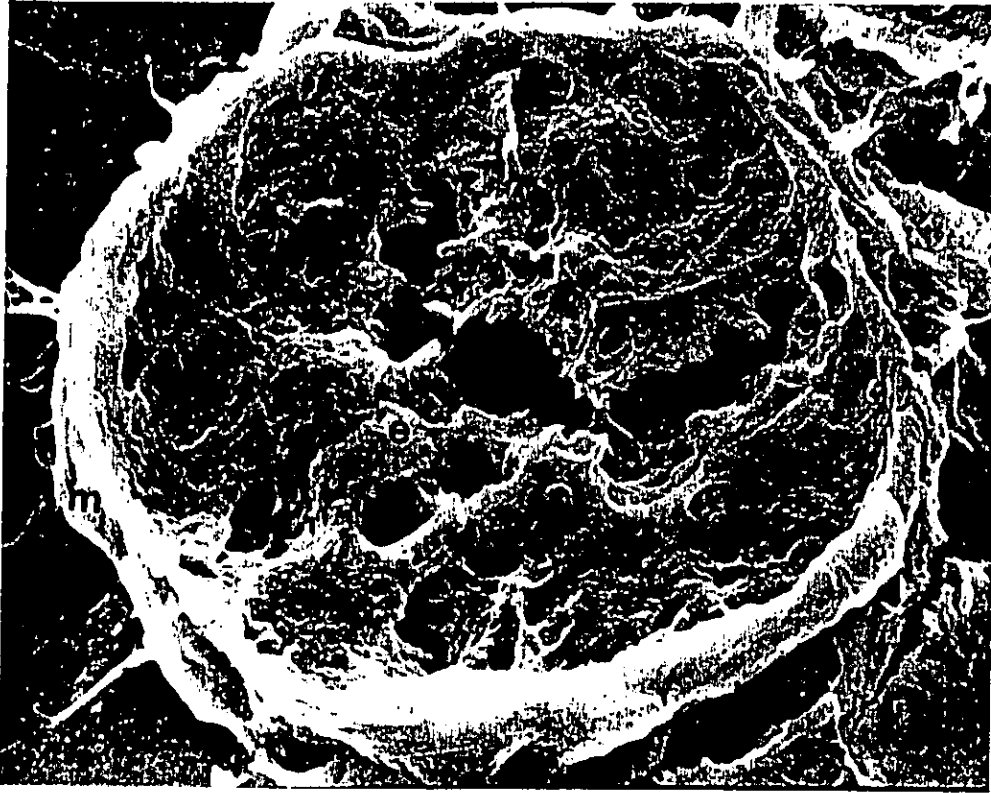
El tejido intersticial es abundante y en él se observan en el células mesenquimatosas con forma estrellada, las células de Leydig son escasas y aisladas entre los cordones seminíferos (Micrografía 16).



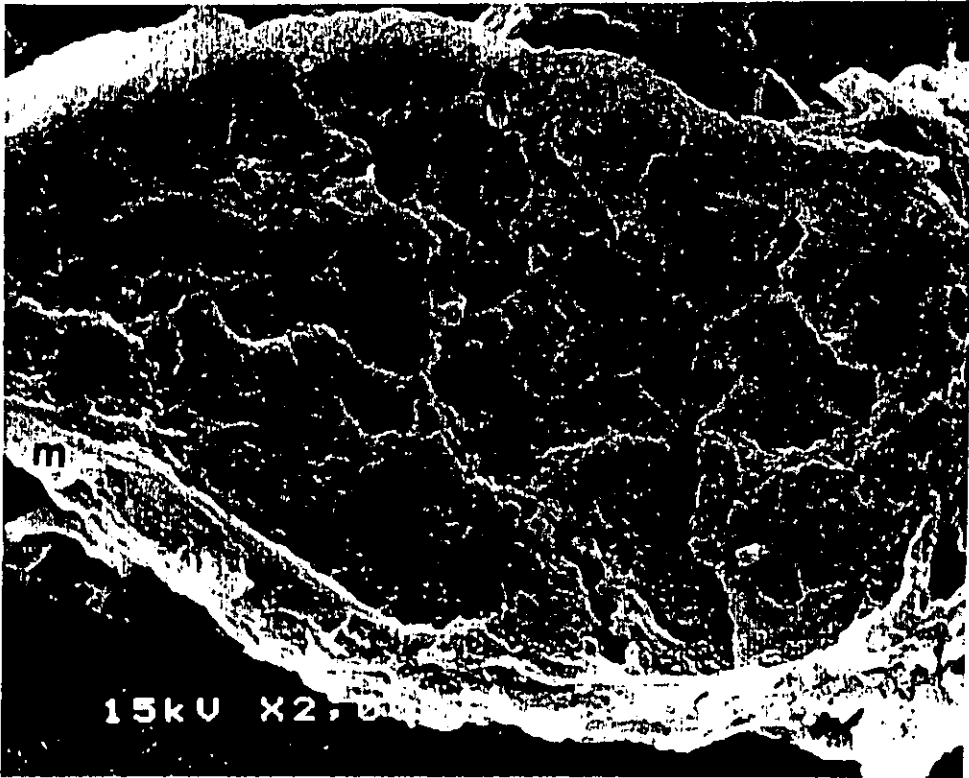
Micrografía 7. Microscopía Electrónica de barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Control. ta: túnica albugínea; vs: vaso sanguíneo; cs: cordón seminífero; ti: tejido intersticial. 100 X.



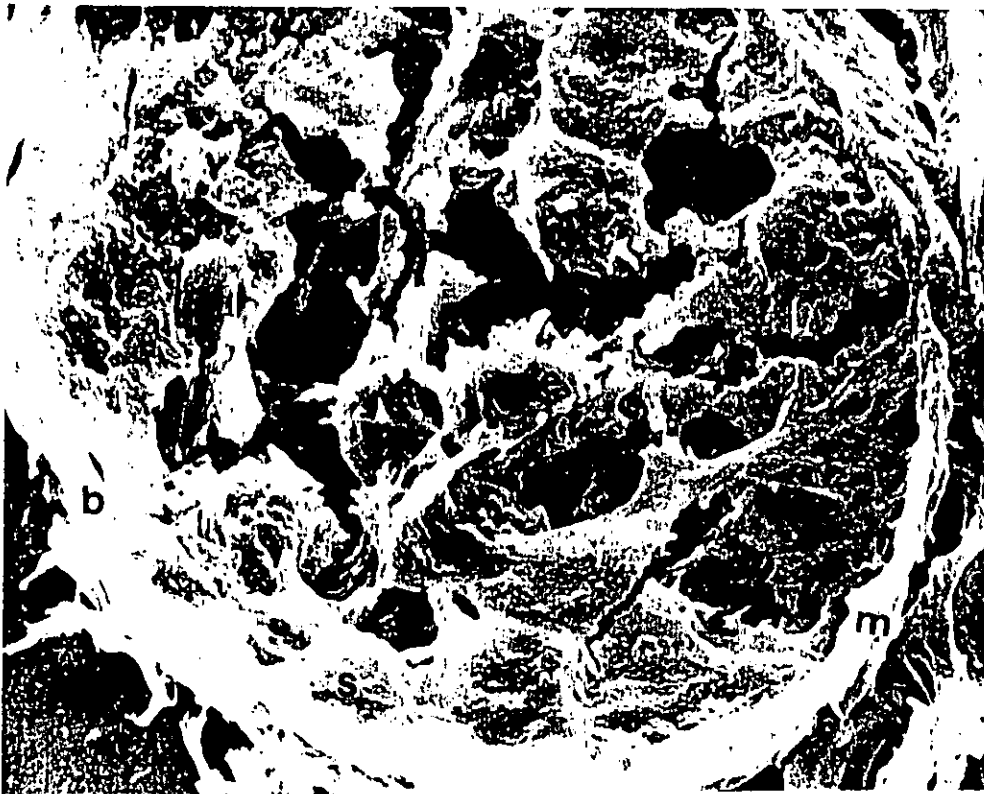
Micrografía 8. Microscopía Electrónica de Barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. ta: túnica albugínea; vs: vaso sanguíneo; cs: cordón seminífero; ti: tejido intersticial. 100 X.



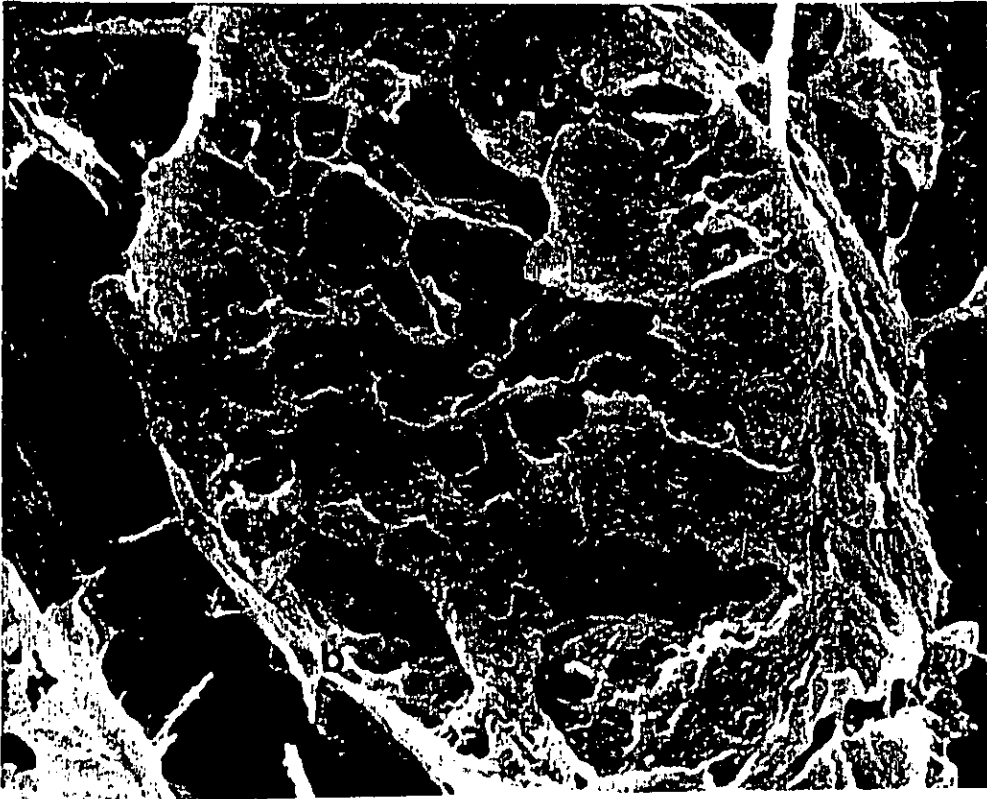
Micrografía 10. Microscopía Electrónica de Barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote control. e: espermatogonias; s: célula de Sertoli; m: célula mioide; b: lamina basal. → puentes citoplásmicos. 2000 X.



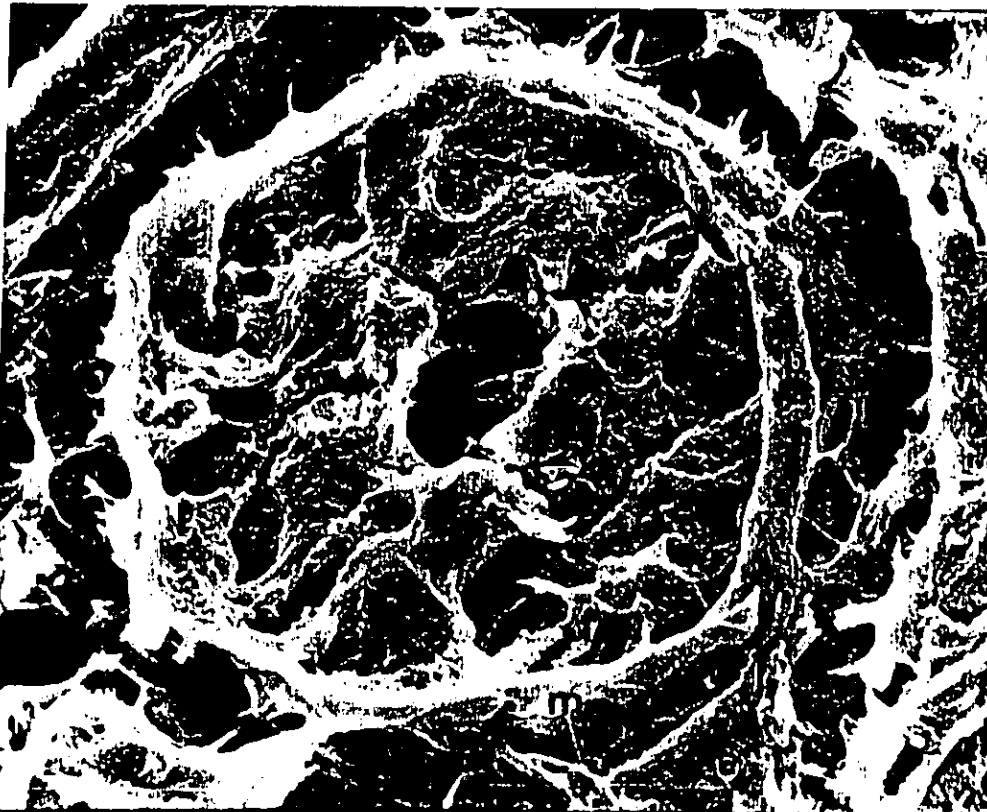
Micrografía 11. Microscopía electrónica de barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Control. e: espermatogonias; s: célula de Sertoli; m: célula mioide; b: lamina basal. → puentes citoplásmicos. 2000 X.



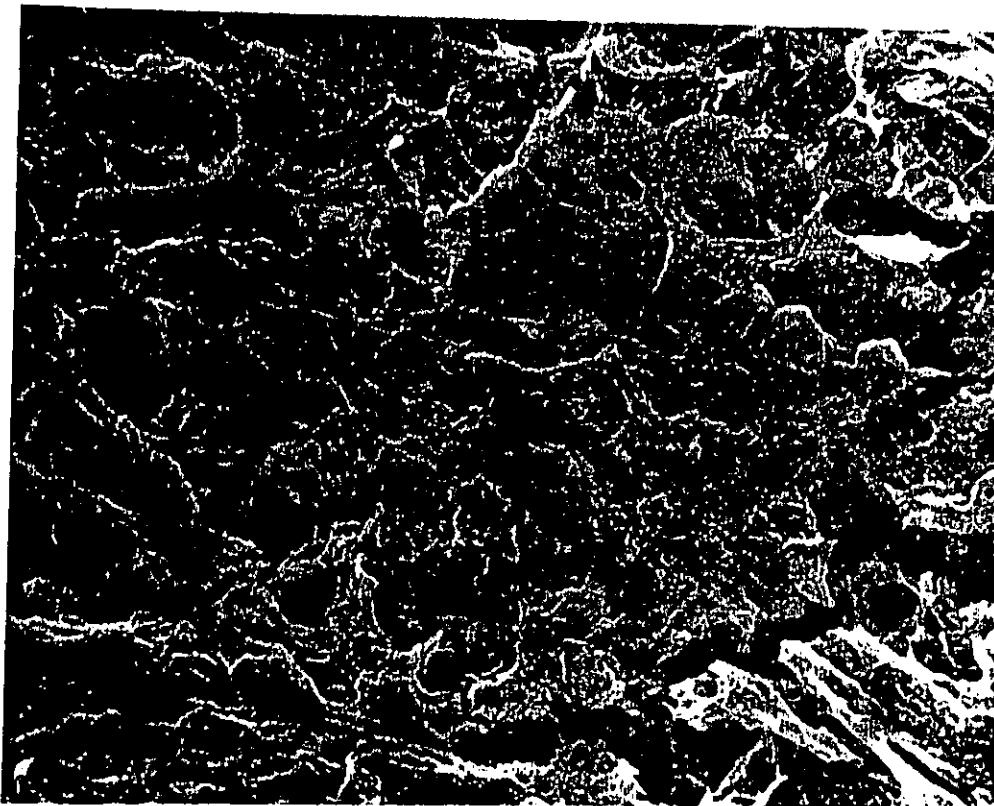
Micrografía 12. Microscopía electrónica de barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. e: espermatogonias; s: célula de Sertoli; m: célula mioide; b: lamina basal. → puentes citoplásmicos.. 2000 X.



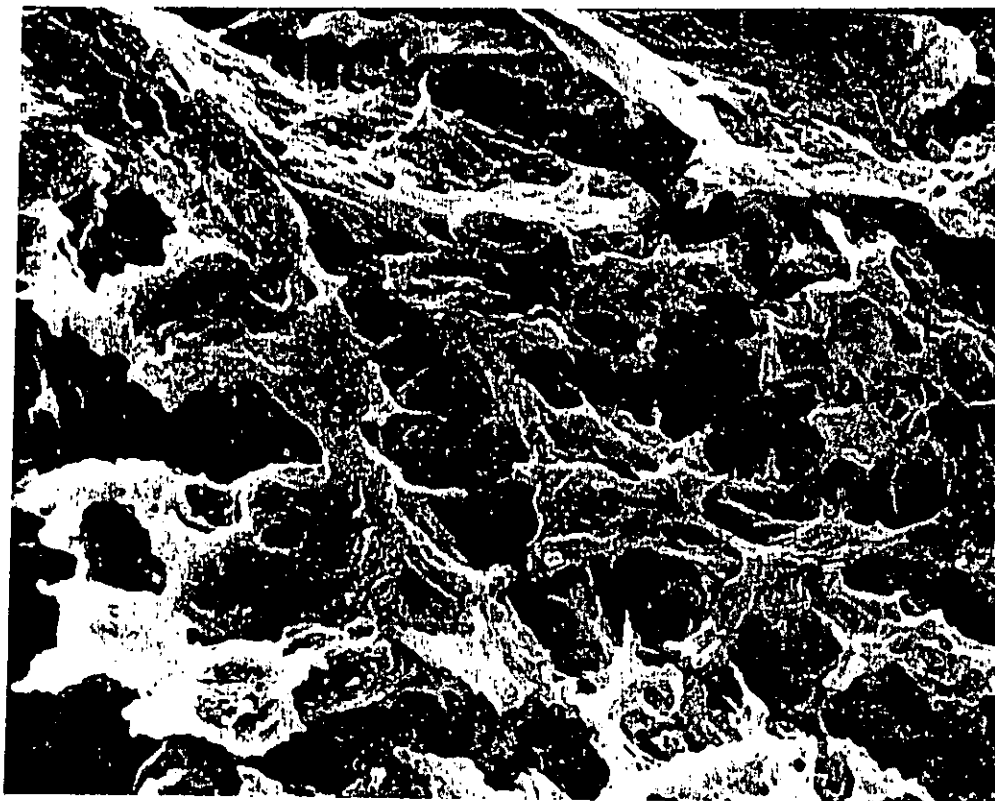
Micrografía 13. Microscopía Electrónica de Barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. e: espermatogonias; s: célula de Sertoli; m: célula mioide; b: lamina basal. → puentes citoplásmicos. * fibras de matriz extracelular. 2000 X.



Micrografía 14. Microscopía Electrónica de Barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. e: espermatogonias; s: célula de Sertoli; m: célula mioide; b: lámina basal → puentes citoplásmicos. * fibras de matriz extracelular. 2000 X.



Micrografía 15. Microscopía Electrónica de Barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Control. M: Células Mesenquimatosas; L: Células de Leydig. 2000 X.



Micrografía 16. Microscopía Electrónica de Barrido en testículo fetal de rata de 20 días de gestación. Lote Experimental. M: Células mesenquimatosas; L: célula de Leydig. 2000 X.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

7. Discusión

La STZ ha sido reportada como una de las drogas más eficaces en la inducción de la diabetes en diferentes modelos experimentales (31,32,37,95-97). Su eficiencia está relacionada con el modelo animal y con la dosis empleada para lograr establecer un carácter permanente del efecto diabetogénico (31,32,37).

Se han probado diversas dosis de STZ encontrándose que la administración de dosis en rangos de entre 25 y 100 mg/kg de peso son las que producen efectos diabetogénicos los cuales varían en su intensidad y en la aparición de las complicaciones (32). La dosis de 100 mg/kg de peso es considerada como la más drástica, debido a que con ella se obtiene una intensa necrosis de las células β , con la muerte del animal a las 24 horas posteriores a la administración (32). Se ha reportado que este rango de dosis de STZ no inducen la producción de cuerpos cetónicos (32,97).

Con el fin de evitar el efecto letal de las dosis elevadas, se ha propuesto dividir la dosis total en varias administraciones, sin embargo los resultados no representan ningún cambio significativo del efecto con la administración en una sola dosis (32,97).

Las dosis utilizadas con mayor frecuencia son de 45 a 70 mg/kg de peso. Las dosis de 30 y 40 mg/kg de peso producen una elevación de los niveles de glucosa entre el día 1 al 7 posteriores a la administración, pero este efecto se pierde al día 10 en el que los niveles tienden a regularizarse (32). Las dosis entre 50/70 mg/kg de peso inducen un estado diabético a largo plazo. Las dosis utilizadas con mayor frecuencia son las de 50 mg/kg de peso (37,38,46,48,56,100), de 60 mg/kg de peso (40,43,98-100), 75mg/kg de peso (101).

En los lotes experimentales los niveles de glucosa se elevaron a las 48 horas posteriores a la inducción, y se mantuvieron con valores superiores a 200 mg/dl hasta el día de sacrificio (día 20), el porcentaje promedio de ratas que alcanzaron estos niveles fue de 69.57% para EI y de 56 % para EII. La mortalidad fue mayor para el lote EI de 26.09 % y en el lote EII de 28% con una $p < 0.05$.

Se ha planteado que la forma de acción inicial de la STZ para inducir el efecto diabetogénico es la destrucción de las células β lo que promueve un descenso de insulina que produce una hipoglucemia que da por resultado un efecto letal sobre los animales durante las primeras 48 horas de la inducción. Los animales que sobreviven adquieren un estado de hiperglucemia a largo plazo, presentándose las complicaciones propias de la diabetes; en nuestro estudio este efecto podría ser la causa de la mortalidad en los lotes EI y EII si los porcentajes hubieran sido similares, pero se debe aclarar que todas las ratas tanto del lote EI como del lote EII que mueren, lo hacen cuando ya se ha instalado la diabetes, o sea 48 horas después de la inducción. Por ello la tasa de mortandad, se atribuiría a la intensidad de la diabetes proporcional a la dosis de STZ empleada, obteniéndose que la dosis de 50 mg/kg de peso produce un estado hiperglucémico a largo plazo.

La pérdida de peso también se ha asociado con la severidad de la diabetes, reportes de ratas inyectadas con 55 mg/Kg de peso y 65 mg/kg de peso, describen que estas ratas son incapaces de aumentar de peso durante la gestación ⁽³¹⁾.

En nuestro estudio los lotes CI y CII, aumentaron constantemente de peso a lo largo de la gestación, presentando una diferencia significativa con los lotes EI y EII; los cuales no tuvieron una elevación considerable del peso a lo largo de toda la gestación e incluso al día de sacrificio el lote EI presentó un peso promedio menor que al inicio del estudio. Esto se debe a la hiperglucemia ⁽³¹⁾.

Diferentes factores como el hipoinsulinismo y la alteración en los niveles de glucosa han sido reportados como agentes responsables de la producción de anomalías en fetos y crías de rata ^(37,38,40,43,45,56,98).

Dentro de las complicaciones que han sido descritas en los estudios sobre diabetes experimental se encuentra la cetonuria, la que también se ha relacionado con alteraciones en el desarrollo ^(12,14).

La cetonuria es el reflejo de la disminución de insulina, la reducción de la disponibilidad tisular de glucosa y el consecuente

aumento de la lipólisis al interior de las células, lo que produce una sobreproducción de cuerpos cetónicos como el β -hidroxibutirato, el ácido acetoacético y la acetona, que el hígado es incapaz de metabolizar por lo que son excretados en la orina ^(12,14). La consecuencia de la carencia de glucosa tisular lleva a un incremento de la glucogenólisis en el hígado, lo que se refleja en una mayor hiperglucemia ^(12,14).

Otro factor que afecta el desarrollo de los fetos de madres diabéticas es la alteración de los niveles de insulina. Esta tiene un efecto protector para la producción de cuerpos cetónicos ⁽¹⁴⁾. En este estudio observamos que las ratas del lote EI presentaron niveles significativamente menores de insulina que las ratas del EII y que los lotes control. La falta casi absoluta de insulina, provoca un aumento en la lipólisis y por consiguiente en los niveles de ácidos grasos libres, los cuales son oxidados en el hígado, incrementando la producción de cuerpos cetónicos, cetonuria y en el último de los casos acidosis (\downarrow pH) ⁽¹⁴⁾. Aún cuando no se observó un incremento significativo en los niveles de triglicéridos de las ratas del lote EI al compararlas con el resto de los lotes, éste parámetro suele estar alterado en ratas diabéticas, de tal forma que la correlación de hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipoinsulinemia puede servir para predecir el desarrollo de los productos de madres diabéticas y su estricto control puede prevenir la aparición de malformaciones e incluso la muerte intrauterina ^(108,109).

Existen estudios controversiales tanto en humanos como en ratas diabéticas en los que las concentraciones de colesterol plasmático se encuentran elevadas, no presentan cambio o están disminuidas. Las ratas de este estudio presentaron aumentos muy ligeros, ningún cambio o disminución en las concentraciones plasmáticas de colesterol el día de sacrificio. En este estudio, los niveles de colesterol de las ratas EI no son diferentes de los presentados por las ratas de los otros 3 lotes.

En lo que respecta al porcentaje de fetos por camada, en los lotes control se observó que hubo un mayor número de fetos (CI 8 ± 3.57 ; CII 9 ± 4.95) durante la gestación, mientras que en los lotes

experimentales el número de fetos fue mucho menor, EI 1.75 ± 2.06 , EII 5.75 ± 3.519 .

En cuanto a las reabsorciones el lote EI presento 10.67 ± 3.06 reabsorciones, seguido por EII 4.33 ± 3.77 en los lotes control, en CI fue de 0.33 ± 0.56 y en CII fue de 0.20 ± 0.45 . Estos datos muestran que la gestación en un ambiente hiperglucémico está relacionada con un aumento en el porcentaje de reabsorciones y por lo tanto una disminución en el número de fetos por camada.

El efecto de la hiperglucemia sobre el desarrollo se ha relacionado con la dosis y la edad del embrión, los estudios de Sadler en cultivos de embriones concluyen que la hiperglucemia afecta los embriones desde las etapas de la embriogénesis temprana tales como la gastrulación, la inducción del tubo neural, el establecimiento de los ejes de simetría, etc. ⁽¹⁰³⁾. Durante estos períodos de la embriogénesis temprana se encuentran activados la mayor parte de los genes que controlan los procesos del desarrollo, por lo que el efecto hiperglucémico puede acrecentarse, lo que demuestran estudios como los de Phellan, en los que establece una alteración del gen Pax3 que se produce alteraciones en la formación del tubo neural; estas alteraciones dependen de la concentración de glucosa en cultivo de embriones de rata ⁽⁵⁴⁾.

Tomando en consideración la relación dosis-efecto sobre el desarrollo se sabe que las concentraciones de glucosa por arriba de 50 mM/l (900mg/dl) o más son necesarias para producir efectos dismorfogénicos en el desarrollo *in vitro* ^(103,104).

En este estudio se utilizaron dosis de 60 mg/kg de peso y 50 mg/kg de peso, estas dosis produjeron hiperglucemia que en el lote EI fue de $467 \pm 1.54.81$ mg/dl y para EII de 437.17 ± 125.78 mg/dl. El lote EII tuvo mayor número de embriones y menos reabsorciones que el EI. La tasa de mortandad en este lote fue menor que en el lote EI, podemos especular que la dosis de 6k0 mg/kg de peso probablemente ejerce un efecto mayor sobre la sobrevida y que los animales que sobreviven a este efecto establecen un cuadro hiperglucémico, y que el efecto teratogénico se manifiesta muy tempranamente por lo que el número de embriones es menor, y la tasa de reabsorción es mayor,

concordando estos resultados con lo establecido en sistemas *in vitro*, que el efecto de la teratogénesis depende de la dosis de inducción del efecto diabetogénico.

Se ha asociado la excesiva producción de cuerpos cetónicos durante la gestación con un retraso en el desarrollo y producción de malformaciones congénitas en el embrión ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁾. Este daño sinergiza con la hiperglucemia.

El lote EI presentó los niveles significativamente más elevados de cetonuria, al día 13 de la gestación, pero sin embargo los niveles disminuyen conforme progresa la gestación. Este lote presentó el menor número de productos y el mayor número de reabsorciones, por lo que podríamos pensar que el efecto de sinergia entre la cetonuria y la hiperglucemia es la responsable de el número de reabsorciones por una amplificación del efecto teratogénico en etapas clave del desarrollo. En el caso del lote EII los niveles de cetonuria fueron más elevados, sin embargo tuvieron un comportamiento similar que en EI, al alcanzar un pico máximo y disminuir gradualmente al día de sacrificio, probablemente en este lote la relación cetonuria-hiperglucemia fue menor debido a la dosis de inducción empleada, lo que se refleja en un mayor número de fetos y menor número de reabsorciones.

Los estudios realizados por Sybulski con ratas gestantes a las que se les administró una dosis de 50 mg/kg de peso de STZ en los que solo una rata tuvo evidencias de gestación, presentó disminución de peso y cetonuria ⁽⁹⁶⁾, hay discordia con nuestros datos, debido a que el porcentaje de ratas con embriones y cetonuria fue considerablemente mayor en nuestro estudio utilizando la misma dosis.

Con respecto al peso y la talla de los fetos existen diversos reportes que establecen un retraso en el desarrollo de los productos de madres diabéticas, relacionándolo con una disminución de la talla y el peso de los fetos que está en relación con la severidad de la diabetes ^(37,103,104). En nuestro estudio estos datos se confirmaron porque los fetos de los lotes CI y CII, tuvieron una talla y peso significativamente mayor que los de los lotes EI y EII. El lote EI

presentó menor talla y peso que el lote EII, lo que puede atribuirse a niveles de glucosa más altos.

El retraso en el desarrollo y la disminución en la talla de los fetos en la diabetes experimental, también han sido atribuidas a alteraciones en el desarrollo de la placenta. Forsberg manifiesta que las placentas de los fetos que se desarrollan en un ambiente diabético sufren alteraciones en el momento del desarrollo en que se está llevando a cabo la vascularización corioalantoidea, lo que provoca un decremento en la eficiencia placentaria que se refleja en una disminución en la talla del embrión y a un retraso en el desarrollo. Considera que las placentas de madres diabéticas presentan un mayor volumen debido a una alteración de las proteínas de matriz extracelular que regulan su establecimiento, con lo que las placentas adquieren un fenotipo proliferativo, más que un fenotipo invasivo, lo que le confiere a esta un posible carácter de inmadurez, que se refleja en una ineficiencia placental⁽¹⁰⁷⁾.

Las placentas de los lotes CI y CII presentaron un menor diámetro y peso que las placentas de los lotes EI y EII, y de estas las del lote EII alcanzaron un mayor diámetro y peso. Estos resultados concuerdan con lo planteado por Forsberg.

Al analizar la estructura del testículo se observó a la túnica albugínea delimitando a la gónada, mediante microscopía de luz no se observaron grandes diferencias en su estructura entre los grupos experimentales y los grupos controles; sin embargo, con microscopía de barrido esta estructura se observa de mayor grosor en los grupos experimentales con un mayor número de capas de fibroblastos. Inmediatamente por debajo de la túnica se observaron los vasos sanguíneos, que en el caso de los grupos experimentales son escasos y de menor calibre que en los grupos control. Esta característica de los vasos sanguíneos se observa en todo el intersticio del testículo.

Teniendo en cuenta que una de las complicaciones diabéticas reportadas con mayor frecuencia son las alteraciones en los procesos de vasculogénesis en diferentes órganos del embrión^(48,50-52,55,56,103,104) así como en el establecimiento de la placenta⁽¹⁰⁷⁾, se puede considerar la reducción en el número y calibre de los vasos

sanguíneos en el testículo como un efecto de la diabetes inducida. Es importante considerar también que la disminución en el número u calibre de los vasos sanguíneos podría alterar los mecanismos de comunicación y transporte extragonadal, lo que probablemente repercutiría en el aporte de factores tróficos necesarios para el desarrollo y maduración testicular.

Durante la diferenciación testicular los cordones sexuales se separan y se establecen en la región medular, en este momento las células de Leydig han proliferado activamente y producen testosterona en altas concentraciones^(70,72-74). Se ha planteado que la proliferación y la estimulación de la actividad de las células de Sertoli es debida a una relación parácrina establecida entre las células de Sertoli y las células de Leydig.

Considerando que en los lotes experimentales las células de Sertoli presentan una disposición irregular y un número menor, y que las células de Leydig también son escasas y dispersas, podemos suponer que los cambios que se presentan en ambas células al compararlas con los grupos control, son consecuentes de una alteración en la relación parácrina existente entre ellas. Asimismo, al estar modificada la estructura de la célula de Sertoli probablemente se ha modificado su actividad, y esto se reflejará también en la actividad y disposición de las células de Leydig, por lo que ellas también presentan variaciones con respecto a los grupos control.

Otra de las diferencias morfológicas observadas entre lotes control y lotes experimentales es la cantidad de tejido intersticial. En los lotes experimentales se observó un aumento considerable del tejido intersticial con un aumento en el número de células mesenquimatosas, si consideramos que la formación del tejido intersticial se realiza simultánea a la separación de los cordones sexuales, la cantidad de células podría atribuirse a hipertrofia tisular que afectaría específicamente al tejido mesenquimatoso, o bien podría ser consecuencia de que se presenta un número menor de cordones, y por lo tanto el tejido intersticial ocupa un mayor espacio.

8. Conclusiones

1. La inducción de diabetes con 60 y 50 mg/dl de STZ es igualmente efectiva, siendo ésta última menos tóxica, lo que reduce en forma significativa la mortalidad de los animales.
2. La combinación de hiperglucemia, hipercetonemia e hipoinsulinemia ejercen mayor influencia en la génesis de las alteraciones del desarrollo de los fetos de ratas diabéticas
3. La diabetes materna altera la diferenciación testicular de sus fetos provocando:
 - a. Disminución en el número de los cordones seminíferos.
 - b. Alteración en la distribución de los cordones seminíferos
 - c. Reducción en el número de espermatogonias
 - d. Alteración de la distribución de las células de Sertoli
 - e. Reducción en el número de células de Leydig.

9. Bibliografía.

1. Brownlee, M. and A. Cerami. The Biochemistry of the Diabetes Mellitus. *Ann.Rev.Biochem.* 1981; 50:385-427.
2. Islas, A. S. y M.C. Revilla. Diabetes mellitus: Concepto y nueva clasificación. En **DIABETES MELLITUS**. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana.1999; 448pp.
3. Islas, S, Revilla M.C., González, V.C., Méndez, J.D. y S. Sánchez de la Peña. Diabetes mellitus, ventajas de la nueva clasificación. *Revista Médica del IMSS.* 1997;35(4):321-325.
4. Report of the expert committee on diagnosis and classification of the diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20: 1183-1197.
5. Revilla, M. C. y S. Islas. El laboratorio clínico: su utilidad en el paciente con diabetes mellitus. En **DIABETES MELLITUS**. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana.1999; 448pp.
6. Sperling, M.A. *Physician's guide to insulin-dependent (type I) diabetes: diagnosis and treatment.* Alexandria VA: American Diabetes Association, Inc, 1988; 44-45.
7. Sox, H.C. Common diagnostic tests: use an interpretation, 2nd. Edition. Philadelphia. P.A. American College of Physicians, 1990; 122,133-134,138-140.
8. Mayer, T.K. and Z.R. Freedman. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and other clinical utility. *Clin Chim Acta.* 1983; 127: 147-184.
9. Baynes, J.W., Bun, H.F., Godstein, D.E., Harris, M., Martin, D:B:, Peterson, C. and K. Winterhalter. National diabetes data group: Report of the expert committee of glycosylated hemoglobin. *Diabetes Care,* 1984; 7: 602-606.
10. Koenig, R.J., Peterson, C.M., Kilo, C., Cerami, A., and Williamson J.R. Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes,* 1976; 25:230-232.
11. Nathan, D.M., Singer, D.E., Hurxthal, K., and J.D:, Goodson. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *New England Journal of Medicine.* 1984; 310:341-346.
12. Castro, M. y C. Liceaga. Complicaciones agudas de la diabetes mellitus. En **DIABETES MELLITUS**. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana.1999; 448pp.
13. Cullen, M.T., Reece, A., Homko, C.J. and E. Silvian. The changing presentations of diabetic ketoacidosis during

- pregnancy. *American Journal of Perinatology*, 1996; 13(7):449-451.
14. Hagay, Z.J. Diabetic ketoacidosis in pregnancy: etiology, pathophysiology and management. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1994; 37 (1):39-49.
 15. Chauhan, S.P., Perry, K.G. McLaughlin, B.N., Roberts, E.E., Sullivan, C.A., and J.C. Morrison. Diabetic ketoacidosis complicating pregnancy. *Journal of Perinatology*. 1996;16(3):173-175.
 16. Islas, S. Complicaciones crónicas. Introducción. En **DIABETES MELLITUS**. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana. 1999; 448pp.
 17. Slack, J.W.M. Developmental biology of the pancreas. *Development*. 1995; 121:1569-1580.
 18. St-Onge, L., Wehr, E., and P. Gruss. Pancreas development and diabetes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1999; 9:295-300.
 19. Ham, A.W, and D.H. Cormack. *Tratado de Histología*. Octava Edición Interamericana. México, D.F. 1983. 1080pp.
 20. Debas, T.H. Molecular Insights into The Development of the Pancreas. *Am J Surg*. 1997;174:227-231.
 21. Pickup, J. And W.S. Goseth. The hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In *Textbook of Diabetes*. Second edition. Volume I. Blackwell Science. 1997:9.1-9.17.
 22. Edlund. H. Transcribing Pancreas. *Diabetes*. 1998; 47:1817-1823.
 23. Pickup, J. And W.S. Goseth. The biosynthesis and secretion of insulin. In *Textbook of Diabetes*. Second edition. Volume I. Blackwell Science. 1997:8.1-8-13.
 24. Lang, J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur. J. Biochem*. 1999; 259:3-17.
 25. Mordes, J.P. and A. A. Rossini. Animal models of diabetes. *American Journal of Medicine*. 1981; 70:353-360.
 26. Kalter. H. Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. *Reproductive Toxicology*. 1996; 10(6):417-438.
 27. Pickup, J. And W.S. Goseth. Environmental factors in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. In *Textbook*

- of Diabetes. Second edition. Volume I. Blackwell Science. 1997;14.2-14.3.
28. McIntosh, C.H.S. and R.A. Pederson. Non-insulin-dependent animal models of diabetes mellitus. In *Experimental Models of Diabetes*. John H. McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999;337-398.
 29. Leiter, E.H., Gerling, I.C., and J.C. Flynn. Spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in non obese diabetic (NOD) mice: Comparisons with Experimental induced IDDM. In *Experimental Models of Diabetes*. John H. McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999;257-294.
 30. Field, C.J. and S.C. Butler. The BB rat: A unique model of human type 1 diabetes. In *Experimental Models of Diabetes*. John H. McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999; 295-336.
 31. Rodriguez, B., Poucheret, P. Battell, M.L. and J.H. McNeill. Streptozotocin-induced diabetes: induction, mechanism(s) and dose dependency. In *Experimental Models of Diabetes*. John H. McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999;3-17.
 32. Islas-Andrade, S, Revilla Monsalve M. C., Escobedo de la Peña, J., Polanco Ana C., Palomino M. A. and A. Feria Velasco. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of the Two Models in rats. *Acta histochem. Cytochem.* 33(3):201-208,2000.
 33. Jacobs, H.R. Hyperglycemic action of alloxan. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1937; 37:407-409.
 34. Battell. L.M., Yuen, V.G., Verma, S. and J.H. McNeill. Other Models of type I diabetes. In *Experimental Models of Diabetes*. John H. McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999; 219-229.
 35. Sybulsky, S. and G.B. Maughan. Use of Streptozotocin as Diabetic Agent in Pregnant Rats. *Endocrinology.* 1971;89:1537-1540.
 36. Donat, M.Y., Gross, D.J., Cerasi, E. and N. Kaiser. Hyperglycemia-Induced β -Cell Apoptosis in Pancreatic Islets of *Psammomys obesus* During Development of Diabetes. *Diabetes.* 1999;48:738-744
 37. Eriksson. U.J. Diabetes in pregnancy: retarded fetal growth, congenital malformations and feto-maternal concentrations of zinc, copper and manganese in the rat. *J. Nutr.* 1984;14:477-84.

38. Eriksson, U. J., Styriud J. And R.S.M. Eriksson. Diabetes in Pregnancy: genetic and temporal relationships of male developmental in the offspring of diabetic rats. In Carbohydrate metabolism in pregnancy and the newborn-IV. New York: Springer;1989:51-63.
39. Ford, W.C.L. and D.W. Hamilton. The effect of Experimentally Induced Diabetes on the Metabolism of Glucose by Seminiferous Tubules and Epididymal Spermatozoa from the Rat. *Endocrinology*. 1984;115:716-722.
40. Hassan, A.A., Hassouna, M.M., Taketo, T., Gagnon, C. and M.M: Elhilali. The effect of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *The Journal of Urology*, 1993; 149:148-154.
41. Clark, J.T. Sexual Function in altered Physiological States: Comparison of Effects of Hypertension, Diabetes, Hyperprolactinemia, and Others to "Normal" Aging in Male Rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1995;19(2):279-302.
42. Chandrashekar, V., Steger, R:W., Bartke, A., Fadden, C.T. and G.S. Kienast. Influence of diabetes on the gonadotropin response to the negative feedback effects of testosterone an hypothalamic neurotransmitter turnover rates in adult male rats. *Neuroendocrinology*. 1991;54:30-35.
43. McLean, M.P., Warden, K.J., SandHoff, T.W., Irby, R:B., and D:B: Hales. Altered Ovarian Sterol Carrier Protein Expression in the Pregnant Streptozotocin-Treated Diabetic Rat. *Biology of Reproduction*. 1996;55:38-46.
44. Valdes, C.T., Elkind-Hirsch, K.E., Rogers, D.G. and J.P. Adelman. The hypothalamic-Pituitary Axis of Streptozotocin Induced Diabetic Female Rats is Not Normalized By Estradiol Replacement. *Endocrinology*. 1991;128(1):433-440.
45. Steger, R:W., Amador, A., Lam, E., Rather, J., Weiss, J. And M.S: Smith. Streptozotocin induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. *Endocrinology*. 1989;124:1737.
46. Steger, R. W., Kienast., S.G., Pilai, S. and M. Rabé. Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes on Neuroendocrine Responses to Ovariectomy and Estrogen Replacement in Female Rats. *Neuroendocrinology*. 1993;57(3):525-531.

47. Rondeel, J.M., Greef, W.J., Heide, R. And T.J. Visser. Hypothalamo-Hipophysial-Tthyroid Axis in Streptozotocin-Induced Diabetes. *Endocrinology*.1992;30(1):216-220.
48. Kienast, S.G.,Fadden, C., and R.W. Steger. Streptozotocin-induced Diabetes Blocks the Positive Feedback Release of Luteinizing Hormone in the Female Rat. *Brain Research Bulletin*. 1993;32:399-405.
49. Pillai S. Snf M. Rabe. Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes on Neuroendocrine Responses to Ovariectomy and Estrogen Replacement in Female rats. *Neuroendocrinology* .1993;57:525-531.
50. Goldman, A.S., Baker, L., Piddington. R., Marx, B., Herold, R. And J. Egler. Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by functional deficiency of araquidonic acid. *Proc Natl Acad Sci*. 1985;82:8227-8231.
51. Eriksson, U.J., Karlsson, M. and J. Styru. Mechanisms of congenital malformations in diabetic pregnancy. *Biol. Neonate*.1987;51:113-118.
52. Travers, J.P., Pratten, M.K. and F. Breck. Effects of low insulin levels on rat embryonic growth and development. *Diabetes*. 1989;38:773-778.
53. Buchanan, T.A., Denno, K.M., Sipos, G.F. and T.W. Sadler. Diabetic teratogenesis. In vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose per se. *Diabetes*. 1994;43:656-660.
54. Phellan, A.S., Ito, M. and M.R. Loeken. Neural tube defects in embryos of diabetic rats. Role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes*. 1997;46:1189-1197.
55. Atkins, V., Flozack, A.S., Ogata, E:S: and R:A: Simmons. The Effects of Severe Maternal Diabetes on Glucose Transport in the Fetal Rat. *Endocrinology*. 1994;135(1):409-415
56. Menegola, E., Prati, M., Broccia, M.L., Ricolfi, R. and E. Giviani. In vitro development of rat embryos obtained from diabetic mothers. *Experientia*. 1995;51:394-397.
57. Gilbert S.F. *Developmental Biology*. USA. Sinauer Associates, 2^a. Ed. 1988:843p.
58. Blyth, B. And J.W. Duckett, JR. Gonadal differentiation: a review of the physiological process and influencing factors based on recent experimental evidence. *The Journal of Urology*.1991;145:689-694.

59. Gomperts, M.; García Castro, M.; Wylie, C. and J. Heasman. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*. 1994;120:135-141 .
60. Buehr, Mia. The Primordial Germ Cells of Mammals: Some Current Perspectives. *Experimental Cell Research*. 1997; 232:194-207.
61. Saffman, E. E. and P. Lasko. Germline development in vertebrates and invertebrates. *CMLS. Cell. Mol. Life. Sci.* 1999;55: 1141-1163.
62. Wylie, C. Germ Cells. *Cell*. 1999;96:165-174.
63. Ginsburg, M., Snow, M. H. L. and McLaren A. Primordial Germ cells in mouse embryo during gastrulation. *Development*, 1990;110: 521-528.
64. Buehr, M. The Primordial Germ Cells of Mammals: Some Current Perspectives. *Experimental Cell Research*. 1997;232:194-207.
65. Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T.Y., Quigley, C. and C.P. Crum. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *PNAS*. 2000;97(17):9585-9590.
66. Fröjdman, Kim and L. J. Pelliniemi. Differential distribution of the $\alpha 6$ subunit integrins in the development and sexual differentiation of the mouse testis. *Differentiation*. 1994;57:21-29.
67. Merchant-Larios, H., Mendlovic, F. and A. Alvarez-Buylla. Characterization of alkaline phosphatase from primordial germ cells and ontogenesis of this enzyme in the mouse. *Differentiation*. 1985;29:145-151.
68. Godin, I. and C. C. Wylie. TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development*. 1991;113:1451-1457.
69. Torres, M., Gómez-Pardo, E., Dressler, G.R. and P. Gruss. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*. 1995;121:4057-4065.
70. Capel Blanche, The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*. 2000; 92: 89-103
71. Scherer, G. Introduction: vertebrate sex determination and gonadal differentiation. *CMLS. Cell. Mol. Life. Sci.* 55 (1999): 821-823.
72. Gustafson, M.L. and P. K: Donahoe. Male sex determination: Current Concepts of Male Sexual Differentiation. *Annu. Rev. Med.* 1999; 45:505-24.

73. Buehr, M., Gu, S. and A. McLaren. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*. 1993;117:273-281.
74. Tilmann, C. and B. Capel. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*. 1999;126:2883-2890.
75. Moreno-Mendoza. N., y. Merchant-Larios H. Desarrollo embrionario de las gónadas. En memorias del Curso Internacional pre-congreso de Actualización en Fisiología. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. A. C. Septiembre de 1997. Morelia Michoacán.
76. Karl, J. and B. Capel. Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium. *Developmental Biology*. 1998; 203:3233-333.
77. Huhtraniemi, I. Fetal testis-a very special endocrine organ. *European Journal of Endocrinology*. 1994;130:25-31.
78. Nef, S and L. F. Parada. Hormones in male sexual development. *Genes & Development*. 2000;14:3075-3086.
79. Parker, K.L., Schimmer, B.P: and A. Schedt. Genes essential for early events in gonadal development. *CMLS. Cell Mol Life Sci*. 1999; 55: 831-838.
80. Parker, K.L., Schedt, A. and B.P. Schimmer. Gene Interactions in Gonadal Development. *Annu. Rev. Physiol*. 1999; 61:417-433.
81. Parker, K.L. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1998; 140: 59-63.
82. Nachtigal, M.W., Hirokaga, Y., Enyeart, D.L., Flanagan, J.N. Hammer, G., and H.A. Ingraham. Wilms' and Dax-1 modulate the Orphan Nuclear Receptor SF-1 in Sex-Specific Gene Expression. *Cell*. 1998;93:445-454.
83. Schedl, A. and N. Hastie. Multiple roles for the Wilms', tumor suppressor gene, WT1 in genitourinary development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1998;140:65-69.
84. Hiort, O. and P.M. Holterhus. The molecular basis of male sexual differentiation. *European Journal of Endocrinology*. 2000; 142:101-110.
85. Koopman, P. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *CMLS. Cell Mol Life Sci*. 1999; 55: 839-856.
86. Birk, O.S., Casiano, D.E., Wassif, C.A., Cogliatti, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S.P., Kreidberg, J.A., Parker, K.L.,

- Porter, F.D. and Westphal, H. The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature*. 2000;403:909-913.
87. Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N. and M. Fellows. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*.1990; 348:448-450.
88. Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. and R. Lovell-Badge. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*.1990; 348:450-452.
89. Jäger, R.J., Anvret, M., Hall, Kerstin, and G. Scherer. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature*.1990; 348:452-454.
90. Swain, A., Narvaez V., Burgoyne, P., Camerino, G. And R. Lovell-Badge. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature*.1998;391:761-767.
91. Swain, A. and R. Lovell-Badge. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & Development*. 1999; 13(7): 755-767.
92. Moniot, B., Berta, P., Scherer, G., Südbeck, P. and F. Poulat. Male specific expression suggest role of DMRT1 in human sex determination. *Mechanisms of Development*. 2000;91:323-325.
93. Josso, N., Racine C., di Clemente, N., Rey R., F. Xavier. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1998; 145: 3-7.
94. Wertz, K. and B.G. Herrmann. Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mechanisms of Development*. 2000; 98:51-70.
95. Rakieten, N., Rakieten, M. and M. V. Nadkarni. Studies on diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Reports*. 1963;29:91-98.
96. Sybulski, S. and G.B. Maughan. Use of Streptozotocin as diabetic agent in pregnant rats. *Endocrinology*.1971;89:1537-1540.
97. Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W. And A.E. Renold. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation*. 1969;48:2129.
98. Sakamaki. H., Akasawa, S., Ishibashi, M., Izumino, K., Takino, H., Yamaguchi, Y., Goto, S., Urata, K. and S. Nagasaki. Significance of glutathione-dependent antioxidants system in

- diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes*. 1999;48(3):1138-1144.
99. Rondeel, J.M.M., De Greef, W.J., Heide, R. And T.J. Visser. Hypothalamo-hypophysial-thyroid axis in streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology*. 1992;130:216-220.
 100. Giavini, E., Broccia, M.L., Prati, M., Roversi, G.D. and C. Vismara. Effect of streptozotocin-induced diabetes on fetal development of the rat. *Teratology*. 1986;34:81-88.
 101. Gélöen, A., Roy, P.E. and L.J. Bukowiecki. Regression of wide adipose tissue in diabetic rat. *American Journal of Physiology*. 1989;257:E547.
 102. Cockroft, D.L. and P.T. Coppola. Teratogenic effects of excess glucose on head-fold rat embryos in culture. *Teratology*. 1977;16:141-103.-
 103. Sadler, T.W. Effects of Maternal Diabetes on Early Embryogenesis: I. Hyperglycemia-Induced Exencephaly. *Teratology*. 1980;21:349-356.
 104. Sadler, T.W. Effects of Maternal Diabetes on Early Embryogenesis: II. Hyperglycemia-Induced Exencephaly. *Teratology*. 1980;21:339-3347.
 105. Eriksson, U.J., Borg, L.A.H., Forsberg, H. and J. Styrod. Diabetic embryopathy. Studies with animal and in vitro models. *Diabetes*. 1991;40 (Suppl2):94-98.
 106. Hunter, E.S., Sadler, T.W., and R.E. Wynn. A potential mechanism of DL-B-hydroxybutyrate-induced malformations in mouse embryos. *American Journal of Physiology*. 1987; 253(1):E72-E80.
 107. Forsberg, H., Wentzel, P., and U.J. Eriksson. Maternal diabetes alters extra cellular matrix protein levels in rat placentas. 1998. *Am J Obstet Gynecol*;179:772-8
 108. Polanco A. Efecto De la diabetes inducida sobre la gestación y el desarrollo de las crías de ratas. Tesis para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción, UNAM, México, 2001.
 109. Styrod J, Thunberg L, Nybacka O and Eriksson U.J. Correlation between maternal metabolism and deranged development in the offspring of normal and diabetic rats. *Pediatric Research*, 1995; 37(3):343-353.

II. Índice de Abreviaturas

STZ	Estreptozotocina
DM	Diabetes mellitus
NDDG	National Diabetes Data Group
OMS	Organización Mundial de la Salud
FPG	Glucosa Plasmática en ayuno
GTG	Curva de Tolerancia a la glucosa
HbA	Hemoglobina glucosilada
HbA _{1c}	Fracción 1C de la hemoglobina glucosilada
CAD	Cetoacidosis diabética
aa	Aminoácidos
Ip3	Trifosfato de inositol
DAG	Diacilglicerol
ACTH	Adenocorticotropina
AL	Aloxana
NO	Óxido nítrico
Mmol	Milimolar
mM	Milimolar
L	Litro
ATP	Adenosin trifosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
LH	Hormona luteinizante
FSH	Folículo estimulante
T	Testosterona
CGPs	Células germinales primordiales
Dpc	Días post-coito
SSEA 1	Antígeno estado específico embrionario 1 Dominant
W	White spotting
Sl	Steel
TGFβ1	Factor Transformante del crecimiento beta 1
AHM	Hormona antimülleriana
Sf1	Factor esteroideogénico 1
Wt1	Tumor de Wilms 1
SRY	Región determinante del sexo de cromosoma Y
TDF	Factor determinante testicular
DAX 1	Región crítica de reversión sexual en el cromosoma X
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
RIA	Radio inmuno-análisis
HE	Hematoxilina eosina

III. Índice de cuadros	PAG
Cuadro 1. Clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías relacionadas.	6
Cuadro 2. Clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías relacionadas (ceoms 1985).	7
Cuadro 3. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus	8
Cuadro 4. Criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus e intolerancia a la glucosa según la nueva clasificación.	9
Cuadro 5. Complicaciones crónicas en pacientes diabéticos	17
Cuadro 6. Agentes químicos inductores de la diabetes	26
Cuadro 7. Modelos animales de diabetes espontánea	27
Cuadro 8. Factores de crecimiento que controlan la Migración de las Células Germinales en el Ratón	39
IV. Índice de Figuras	
Figura 1. Fisiopatología de la cetoacidosis diabética	15
Figura 2. Desarrollo del páncreas	20
Figura 3. Mecanismo regulador de la liberación de Insulina	25
Figura 4. Aloxana	28
Figura 5. Estreptozotocina	29
Figura 6. Mecanismo de migración de las células germinales primordiales de la rata.	37
Figura 7. Interacciones génicas durante la diferenciación gonadal	50
V. Índice de Tablas	
Tabla 1. Ratas diabéticas, que mueren y mantienen la gestación	56
Tabla 2. Promedio de fetos y reabsorciones por camada	57
Tabla 3. Promedio de pesos de las ratas durante la gestación	58
Tabla 4. Niveles de glucosa durante la gestación	59
Tabla 5. Cetonuria durante la gestación	60
Tabla 6. Glucosuria durante la gestación	61
Tabla 7. Química sanguínea de las ratas al sacrificio	62
Tabla 8. Peso y talla de los fetos de 20 días	63
Tabla 9. Proporción de hembras y machos	64
Tabla 10. Placentas	65

VI. Índice de Gráficas	PAG
Gráfica 1. Ratas diabéticas, que mueren y mantienen la gestación	56
Gráfica 2. Promedio de fetos y reabsorciones por camada	57
Gráfica 3. Promedio de pesos de las ratas durante la gestación	58
Gráfica 4. Niveles de glucosa durante la gestación	59
Gráfica 5. Cetonuria durante la gestación	60
Gráfica 6. Glucosuria durante la gestación	61
Gráfica 7. Química sanguínea	62
Gráfica 7a. Insulina	62
Gráfica 7b. HbA _{1c}	63
Gráfica 8a. Peso de los fetos	64
Gráfica 8b. Talla de los fetos	64
Gráfica 9. Proporción de hembras y machos	65
Gráfica 10a. Peso de las placentas	66
Gráfica 10b. Diámetro de las placentas	66

VII. Índice de Micrografías

Micrografía 1. Microscopía de luz, lote control	69
Micrografía 2. Microscopía de luz, lote control	69
Micrografía 3. Microscopía de luz, lote control	70
Micrografía 4. Microscopía de luz, lote experimental	70
Micrografía 5. Microscopía de luz, lote experimental	71
Micrografía 6. Microscopía de luz, lote experimental	71
Micrografía 7. MEB, lote control	75
Micrografía 8. MEB, lote experimental	75
Micrografía 9. MEB, lote control	76
Micrografía 10. MEB, lote control	76
Micrografía 11. MEB, lote control	77
Micrografía 12. MEB, lote experimental	77
Micrografía 13. MEB, lote experimental	78
Micrografía 14. MEB, lote experimental	78
Micrografía 15. MEB, lote control	79
Micrografía 16. MEB, lote experimental	79