

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Efecto de las Poliaminas sobre el crecimiento de  
embriones de rata cultivados *in vitro*, en presencia de  
elevadas concentraciones de glucosa.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**

**PRESENTA:**

**Gladys Chirino Galindo**

Director de Tesis:

Dr. Martín Palomar Morales

Tlalnepantla, Estado de México



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.

## **DEDICATORIAS:**

**A Dios**, por el milagro de la vida, por permitir que llegara a este momento y por dejarme estar con las personas que amo.

**A Jesús y Antonieta**, por ser maravillosos, por darme alas y enseñarme a volar, por el amor incondicional, por el apoyo y la confianza, por el ejemplo de vida, por dejarme caer y ayudarme a levantar, por estar unidos estando tan lejos y por amarlos tanto.

**A Martín**, por los sueños compartidos y la felicidad lograda, por el camino recorrido y las metas alcanzadas, por el respeto y la admiración, por creer en mí, por ser amigo, esposo y padre, por los momentos tristes que hemos pasado.

**A Gibrán**, por ser como es, por darme alegría en los momentos tristes, por su insaciable curiosidad y su alma sensible, por haber nacido y ser lo más maravilloso que me ha pasado en la vida y por el gran amor que me inspira.

**A Jesús y Ulises**, por saber que puedo contar con ustedes en cualquier momento, por haber crecido juntos, por ser mis amigos antes que mis hermanos, por el amor que nos tenemos.

**A Mago y Gaby**, por ser mis amigas, por las confianzas, por querer a mis hermanos y por haber tenido dos maravillosos tesoros y compartirlos conmigo.

**A Ana Karen**, por los momentos tan felices que hemos compartido, por las cosas que haces y dices y por ser tan cariñosa y ocurrente.

**A Giannina**, por haber venido al mundo, y darnos una inmensa alegría.

**A Irma y José**, por contar con ellos en cualquier circunstancia, por estar siempre cerca y alentarme a seguir adelante.

**A Ladislao, Juana y Raquel**, por estar ahí cuando los he necesitado, por los momentos felices y tristes que hemos compartido.

**A Carmen**, por ser una amiga incondicional, por darme ánimos y por hacer que todo se vea más fácil de lo que es.

**A Martha**, por apoyarme, por estar siempre dispuesta a escuchar y por contar contigo siempre.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Martín Palomar Morales, por haber puesto sus ideas en práctica conmigo, por aceptarme en su laboratorio y por ayudarme en los experimentos.

Al Biól. José Martínez Aguilar, del Taller de Equipo para Laboratorio de Enseñanza, por la construcción del “Rotocell”, y la adaptación del mismo a la cámara de incubación.

A la Biól. Martha Fregoso Padilla, por la ayuda y asesoría prestada, para el manejo de la reglilla y el ocular micrométrico.

A Yolanda Adán, por la ayuda y asesoría prestada en aspectos técnicos.

Al personal académico del Bioterio, por la generosa donación de ratas hembra reproductoras retiradas, necesarias para la obtención del suero que se ocupó en la preparación del medio de cultivo.

A los Sinodales, Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, Dr. Eduardo Barrera Escorcía, M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez y M. en C. Teresa Ramírez Pérez, por su revisión, sus valiosos comentarios y sugerencias para la redacción de esta Tesis.

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
DIABETES MELLITUS	2
DIABETES MELLITUS Y EMBARAZO	3
TERATOGENESIS POR DIABETES MELLITUS	7
POLIAMINAS	9
L-ARGININA	12
ANTECEDENTES	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
OBJETIVOS	17
METODOLOGIA	18
Reactivos	18
Preparación de medio de cultivo	18
Material biológico	20
Cultivo de embriones	20
Control externo	22
Tratamiento estadístico	22
RESULTADOS	27
Crecimiento embrionario en cultivo	27
Efecto de L-arginina y poliaminas sobre el crecimiento embrionario in vitro	27

Concentración de glucosa en el medio de cultivo	45
DISCUSION	47
Crecimiento y desarrollo de embriones en cultivo	47
Efecto de L-arginina y poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	51
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS	59

## RESUMEN

La interacción de la diabetes mellitus tipo 1 con la gestación produce aparición de factores de riesgo neonatal, productos de bajo peso al nacer, malformaciones y muerte intrauterina de acuerdo al grado de severidad del padecimiento. Se ha logrado reproducir estos resultados en modelos animales. Como una estrategia experimental para comprender mejor estos eventos, se ha utilizado el cultivo de embriones postimplantacionales de roedores durante las etapas de neurulación y organogénesis. Previamente, nuestro grupo reportó que la aplicación parenteral de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) y su precursor, el aminoácido L-arginina, revierten parcialmente las alteraciones dismorfogénicas que causa la diabetes mellitus en la rata. Para tratar de entender si el efecto previamente reportado es directamente sobre el embrión, o sobre la rata gestante, se diseñó este experimento. Embriones de 10 días de edad gestacional se obtuvieron de ratas sanas, y se cultivaron por 24 horas en medio de cultivo normal, medio “hiperglucémico” (suplementado con alta concentración de glucosa), y medio hiperglucémico suplementado con L-arginina o poliaminas. Al término de la incubación se evaluaron el desarrollo y el crecimiento embrionarios. Se encontró que, como ha sido previamente reportado por muchos autores, la glucosa en exceso produce retraso del crecimiento y alteración del desarrollo embrionario. Adicionalmente se demostró que la L-arginina revierte parcialmente estos efectos, y que las poliaminas revierten casi totalmente la dismorfogénesis y el retraso del crecimiento. El efecto embrioprotector de las poliaminas pudiera estar mediado por su papel antioxidante, como depurador de especies reactivas de oxígeno (ERO); por su papel promotor de la angiogénesis, ya que promueve el aporte y captura de nutrientes; por su papel promotor de la biosíntesis de DNA y proteínas, al interactuar con éstas y otras macromoléculas; o por su papel regulador de la apoptosis.



## **INTRODUCCIÓN**

La diabetes mellitus (DM) es la expresión clínica de una deficiencia relativa o absoluta de insulina, que afecta a millones de personas en el mundo. No se refiere a una sola condición, sino que engloba una variedad de características con diferentes etiologías. Este síndrome se caracteriza por anormalidades del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, ocasionado por la deficiencia de insulina o por la resistencia a la acción de la misma a nivel celular (The Expert Committee, 1997, 2003).

El efecto de este estado alterado es potenciado durante la gestación por las hormonas placentarias, que tienen efectos antagónicos a la insulina. Los cambios metabólicos que suceden durante la gestación normal o diabética han sido revisados por Buchanan y Kitzmiller (1994) y Reece y cols. (1994). Se sabe que la coexistencia de diabetes mellitus y gestación es una de las causas de aparición de factores de riesgo neonatal, malformaciones congénitas, retraso del desarrollo y muerte embrionaria o fetal (óbito y aborto).

## **DIABETES MELLITUS**

La DM es un síndrome caracterizado por hiperglucemia acompañada por signos y síntomas específicos; y también presenta alteraciones en el metabolismo de lípidos y proteínas. La DM ha sido recientemente reclasificada y de acuerdo a su etiología se reconocen cuatro grupos principales (The Expert Committee, 1997, 2003; American Diabetes Association, 2004).

1. DM tipo 1 (DM1, antes conocida como diabetes insulino-dependiente o diabetes juvenil), en la cual el defecto aparente es la deficiencia de la secreción de insulina, causada por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas. Aún no se conocen las causas del proceso autoinmune y la destrucción de las células  $\beta$ . Representa entre el 5 y el 10 % de los casos.

2. DM tipo 2 (DM2, antes llamada no insulino-dependiente o diabetes del adulto), al parecer no existe deficiencia en la producción de la hormona, sino que

la respuesta de los tejidos a ella está disminuida, hay una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia y la deficiencia de insulina. Representa entre el 90 y el 95 % de los casos.

3. Otros tipos específicos. Un tercer grupo menor, que está formado por alteraciones diversas como endocrinopatías, alteraciones cromosómicas, trastornos del páncreas exócrino, cambios pancreáticos por acciones químicas y otras anormalidades, donde, en contraste con la diabetes primaria, la enfermedad es secundaria. Estos casos representan entre el 1 y 2 %.

4. Diabetes Mellitus Gestacional. Es aquella situación que aparece durante el embarazo de una mujer aparentemente sana, y se acompaña de síntomas característicos, como resistencia o deficiencia relativa de insulina, hiperglucemia de ayuno o intolerancia a la glucosa. Esto ocurre entre el 3 y 5 % de los embarazos. Aunque muchas mujeres con DMG regresan a una condición normal después del parto, se incrementa considerablemente su riesgo a desarrollar DM2 en el futuro (Mayer, 1998).

## **DIABETES MELLITUS Y EMBARAZO**

La influencia de las alteraciones metabólicas del estado diabético sobre el desarrollo es distinta en la gestación complicada por diabetes previa que en pacientes con DMG. Las implicaciones en cada gestación individual pueden ser definidas por el grado del control metabólico en estados específicos de la gestación, cuando el crecimiento embrionario, el desarrollo de la función de las células beta y el crecimiento de tejidos sensibles a insulina son influenciados por el ambiente (Metzger, 1991).

Antes de la introducción de la insulina en la terapéutica médica en 1923, la coexistencia del embarazo y la DM de tipo 1, cuando ocurría, era causa de una gran mortalidad materna, el riesgo de muerte materna o fetal en las mujeres diabéticas embarazadas era más alto que el de la población general. Aunque con la insulina se logró disminuir la mortalidad y morbilidad de estas mujeres, la

incidencia de malformaciones y el retraso del desarrollo en el recién nacido aun es de tres a cuatro veces mas alto que en embarazos de mujeres no diabéticas (Buchanan y Kitzmiller, 1994; Lesser y Carpenter, 1994; Reece y cols., 1994).

El tratamiento profiláctico con insulina ha reducido la mortalidad materna a valores similares a los de la población abierta, pero tuvo poco efecto sobre la morbilidad y mortalidad perinatales, las que se mantuvieron elevadas. La causa de la gran morbimortalidad perinatal involucra aparición de factores de riesgo neonatal (defectos de membrana hialina, hipoglucemia, hipocalcemia, síndrome de deficiencia respiratoria, etc.), traumatismo neonatal y malformaciones congénitas (Freinkel, 1980).

En la especie humana la coexistencia de embarazo y DM1 ha sido ampliamente estudiada y actualmente se conocen sus consecuencias negativas. Las mujeres diabéticas tienen un mayor índice de abortos espontáneos, y sus hijos presentan una mayor tasa de malformaciones congénitas, factores de riesgo neonatal, retraso del desarrollo o incluso muerte (Buchanan y Kitzmiller, 1994).

En los últimos años, un mejor manejo con dieta e insulina, previo a la concepción, ha logrado disminuir la morbilidad y la mortalidad perinatal a valores cercanos a los de la población general (Freinkel y cols., 1986; Ferris y Reece, 1994; Gabbe, 1985).

Las causas de las malformaciones y el retraso del desarrollo aun son desconocidas. Los estudios clínicos han demostrado que el riesgo de presentar malformaciones congénitas depende de la regulación de la glucosa en la sangre durante el primer trimestre, específicamente, durante las primeras siete semanas de embarazo (Buchanan y Kitzmiller, 1994), aunque también hay reportes que sugieren que no todas las malformaciones congénitas pueden prevenirse con un buen control glucémico, por lo cual se piensa que existen otros factores que participan en el proceso teratogénico durante el embarazo diabético, entre los cuales se podrían encontrar los cuerpos cetónicos, los triglicéridos y los

aminoácidos de cadena ramificada (Buchanan y cols., 1994; Eriksson y cols., 2003; Shubert y cols., 1996).

Los diversos factores teratogénicos podrían actuar a través de diferentes mecanismos celulares y metabólicos en el tejido embrionario, entre los que se han propuesto las alteraciones intracelulares en el metabolismo del *mio*-inositol y del sorbitol; metabolismo de ácido araquidónico y prostaglandinas; y la generación de ERO. Se ha sugerido que las proteínas glicadas y los genotipos materno y fetal también están involucrados en los eventos teratológicos en embarazos diabéticos (Eriksson y cols., 2003).

Diversos estudios sugieren que la hiperglucemia actúa como teratógeno primario. Existen demostraciones clínicas de una correlación positiva entre los niveles de hemoglobina glicada en el primer trimestre del embarazo y la proporción de malformaciones fetales, el índice de estas malformaciones se reduce gracias a un estricto control del estado diabético materno durante este periodo (Eriksson y cols., 2003).

La realización de análisis multifactoriales en ratas diabéticas preñadas señala una correlación entre los niveles de glucosa, los cuerpos cetónicos y los aminoácidos de cadena corta con el índice de malformaciones y reabsorciones. Estudios *in vitro* han demostrado que el suero diabético es teratogénico para embriones de roedores. Por todo esto se cree que la hiperglucemia es el teratógeno primario y que las alteraciones en el metabolismo materno y fetal (cuerpos cetónicos y aminoácidos de cadena ramificada) actúan como teratógenos secundarios (Eriksson y cols., 2003). Sin embargo, hay reportes que apuntan a un papel primordial de los cuerpos cetónicos como teratógenos primarios (Buchanan y cols., 1994; Shubert y cols., 1996).

Cronológicamente, las primeras indicaciones de los efectos teratológicos de la DM se detectaron en estudios clínicos. En estos trabajos, se encontró que los neonatos de madres diabéticas presentan una elevada incidencia de malformaciones con respecto a los neonatos de madres sanas. El índice de malformaciones es entre tres y cinco veces mayor que en la población general, y

las malformaciones encontradas más frecuentemente involucran a los sistemas nervioso, cardiovascular y músculo-esquelético (Barker y Fall, 1993).

Entre las malformaciones del sistema nervioso central se han descrito la hidrocefalia, la anencefalia, la exencefalia, la microcefalia, la ciclopía y otras. Las malformaciones más comunes del sistema cardiovascular son una cardiopatía compleja y persistencia del conducto arteriovenoso. Como anomalías del sistema esquelético se ha reportado como más frecuente a la regresión caudal, polidactilia, costillas supernumerarias y otras (Connell y cols., 1985; Moreno-Ruiz y cols., 1988; Ramírez-Torres y cols., 1992; Reece y cols., 1993; Rivera-Rueda y cols., 1993).

Por otra parte, y de manera independiente a la presentación de malformaciones, los neonatos producto de embarazos de madres diabéticas pueden ser pequeños para su edad gestacional, lo que es causado probablemente por una DM de larga duración, asociada con cardiopatía y nefropatía diabéticas (Pearson, 1993). Estos eventos fueron descritos como retraso temprano del desarrollo, y se indicó que existe una diferencia notable entre la edad gestacional esperada por la fecha de última menstruación y la edad gestacional observada por ultrasonido (Pedersen y Mølsted-Pedersen, 1979, 1981). Sin embargo, también se ha postulado que no hay relación entre el grado de retraso del crecimiento temprano con el crecimiento fetal (Mulder y Visser, 1992), y que el retraso del desarrollo temprano pudiera ser debido a una estimación incorrecta de la fecha de ovulación (Steel y cols., 1985). Otros autores han señalado que aunque un producto que se desarrolla en un ambiente alterado pudiera estar en riesgo elevado para manifestar malformaciones o retraso del crecimiento, no hay correlación entre ambas alteraciones (Reece y Eriksson, 1996; Reece y cols., 1996).

## **TERATOGENESIS POR DIABETES MELLITUS**

El desarrollo de un organismo es un orquestamiento complejo de división, migración, interacción, diferenciación y muerte celular, regulados genéticamente. Cualquier factor que interfiera con estos procesos, puede causar malformaciones en el embrión, algunos de los cuales pueden causar la muerte embrionaria temprana, o impedir la implantación. Otras veces el embrión se implanta pero es incapaz de llevar a cabo el desarrollo normal, lo que desencadena en micro aborto (desprendimiento del *conceptus* al tiempo de la menstruación) o en aborto temprano, de manera que la mujer muchas veces no se entera de que estuvo embarazada. Otras veces, cuando el embrión se implanta y su desarrollo progresa, muestra al nacer o al ser abortado, alguna anomalía física o malformación congénita (Gilbert, 1994).

Como ya se ha mencionado, los efectos que la diabetes mellitus causa sobre el desarrollo embrionario, dependen del tipo de la diabetes y de la duración de la misma. De esta manera, en la gestación complicada por DM1, se ha encontrado un espectro amplio de anormalidades que van desde el retraso del desarrollo, hasta la muerte materno-fetal, pasando por la aparición de factores de riesgo neonatal, malformaciones menores no letales, malformaciones mayores incompatibles con la vida, el óbito y el aborto; mientras que en la DMG se ha reportado macrosomía y aparición de factores de riesgo neonatal.

Esto llevó a Freinkel y Metzger (1979) a proponer que el desarrollo y crecimiento embrionarios son un *experimento de cultivo de tejidos*, y a Freinkel (1980) a postular que un ambiente intrauterino constituido de manera anormal resulta en *teratogénesis mediada por energéticos maternos*. Así pues, en la especie humana, la embriopatía diabética resulta de anomalías en el metabolismo materno las primeras seis o siete semanas de la gestación (Freinkel, 1980), mientras que la fetopatía diabética resulta de sobre nutrición e hiperinsulinemia los dos últimos trimestres de la gestación (Buchanan y Kitzmiller, 1994).

Debido a impedimentos técnicos y éticos, no es posible el estudio directo en la especie humana de los efectos que sobre el desarrollo intrauterino produce la

diabetes mellitus. Por estas razones, se han tratado de buscar modelos animales que mimeticen lo que sucede en nuestra especie. La principal estrategia empleada ha sido inducir la diabetes mellitus en animales antes o durante la gestación, y en observar las malformaciones fetales, y las alteraciones del metabolismo materno fetal. Para este fin, se emplean diversos fármacos, siendo los más empleados el aloxán y la estreptozotocina. Aun cuando no se conoce del todo el mecanismo por el cual estas drogas son diabetógenas, se sabe que dañan de manera rápida la membrana de las células  $\beta$  pancreáticas, causando la pérdida de la integridad celular, la muerte masiva de éstas células, y la aparición de un estado metabólico alterado, muy similar a la DM1 de humanos (Méndez y Ramos, 1994).

Con el uso de hembras de roedores preñadas y tratadas químicamente para producir un estado similar a la DM1, los investigadores han podido obtener fetos o embriones con retraso del desarrollo, malformaciones o reabsorciones, y se han tratado de dilucidar los mecanismos responsables de estas alteraciones (Simán y Eriksson, 1997).

Aún cuando los resultados obtenidos son diversos y a menudo contradictorios, es posible, a partir de los estudios realizados en animales, inferir con cautela sobre las causas y mecanismos teratogénicos de la DM. Los roedores no abortan los fetos muertos, en lugar de eso, el o los *concepti* que mueren dentro del útero son reabsorbidos. Durante el primer trimestre del embarazo humano, el feto de una madre diabética es menor que el de una madre sana. Por lo tanto, el tamaño reducido y la tasa de reabsorciones obtenidas en experimentos realizados en roedores, mimetizan los efectos de aborto/óbito y bajo peso al nacer observados en humanos (Simán y Eriksson, 1997)

Las malformaciones fetales han sido ampliamente demostradas en modelos animales *in vivo* (Reece y Eriksson, 1996), pero debido a que la mayor parte de las malformaciones en humanos se producen en las primeras siete semanas de gestación y al hecho de que los roedores reabsorben los fetos muertos en lugar de abortarlos, el cultivo de embriones se ha convertido en el mejor modelo para

estudiar el efecto de la hiperglucemia, de otros posibles teratógenos y de moléculas con probable papel protector sobre el desarrollo embrionario; así como los mecanismos por los cuales los factores teratogénicos llevan a cabo sus efectos. Las condiciones en cultivo no son iguales que la situación *in vivo*: en general la incidencia de malformaciones es menor en condiciones naturales. Sin embargo, el uso de éste sistema permite estudiar aisladamente un probable factor o mecanismo, lo cual en condiciones *in vivo*, es muy difícil. El modelo de cultivo permite el estudio del desarrollo embrionario y el metabolismo a través de la organogénesis, y provee un sistema adecuado para la manipulación del desarrollo (Ellington, 1997).

Este método consiste en alterar el medio en el cual se desarrollan los embriones o fetos, para posteriormente evaluar los efectos de dichas alteraciones sobre el desarrollo y crecimiento. Mediante esta estrategia se demostró hace más de dos décadas, que el suero de ratas diabéticas tiene efectos teratogénicos durante la neurulación (Sadler, 1980), y se le atribuyeron dichas propiedades a la glucosa, los cuerpos cetónicos y los inhibidores de las somatomedinas, así como a los episodios hipoglucémicos. En nuestros días, se mantiene la creencia de que el mecanismo es multifactorial, teniendo participación todos los factores y mecanismos propuestos (Eriksson y cols., 2003).

## **POLIAMINAS**

Las poliaminas naturales, putrescina, espermidina y espermina, se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos, y son necesarias para un crecimiento celular normal (Igarashi y Kashiwagi, 2000). Estos compuestos tienen un peso molecular bajo, una estructura simple (aminas alifáticas), y se encuentran cargadas positivamente en condiciones fisiológicas.

Las células han desarrollado una maquinaria bioquímica regulatoria compleja, con la cual controlan de manera adecuada las concentraciones



intracelulares de las poliaminas, por la acción combinada de la síntesis *de novo*, retroconversión, degradación terminal, secreción y captura de las poliaminas (Morgan, 1999; Schipper y cols., 2000).

La vía de síntesis de poliaminas inicia con la conversión de ornitina en putrescina por acción de la enzima ornitina-descarboxilasa (ODC), la enzima reguladora de la vía metabólica (Morgan, 1999; Schipper y cols., 2000). En mamíferos, la ornitina puede ser tomada del plasma sanguíneo, donde se encuentra en concentraciones micromolares, o ser formada a partir de la arginina por la enzima arginasa (Morgan, 1999).

La putrescina es convertida a espermidina mediante una reacción catalizada por la espermidina-sintasa, que conjuga a la diamina con la descarbo-S-adenosilmetionina. La espermidina, a su vez, por una acción similar, catalizada por la espermina-sintasa, se convierte a espermina. La descarbo-S-adenosilmetionina se produce desde la S-adenosil-metionina por la acción de la S-adenosil-metionina descarboxilasa (SAMDC) (Morgan, 1999; Schipper y cols., 2000).

Para su degradación, la espermina es convertida por la espermidina/espermina N1-acetil-transferasa en N1-acetil-espermina, que por una poliamina-oxidasa (PAO) se convierte en espermidina. De la misma manera, la espermidina origina putrescina. Como subproductos de la reacción de la PAO se obtienen 3-acetamidopropanal y peróxido de hidrógeno. La putrescina es degradada por la diamino-oxidasa y otras enzimas, a ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Morgan, 1999; Schipper y cols., 2000), que es posteriormente convertido a succinato, intermediario del ciclo de Krebs (Morgan, 1999; Schipper y cols., 2000, Seiler, 2004).

La espermina directamente, por una espermina-oxidasa, puede convertirse en espermina y como subproducto 3-aminopropanal. Análogamente, la espermidina puede degradarse a putrescina y como subproducto 3-

aminopropanal, por la diamino-oxidasa (Seiler, 2004). Existe evidencia de que la conversión de poliaminas largas a cortas (espermina a espermidina y putrescina; espermidina a putrescina) no solamente es parte del catabolismo, sino que es necesaria también para regular las concentraciones relativas de cada una, así como las actividades biológicas individuales (Jänne y cols., 2004).

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

Particularmente, se ha acumulado evidencia de que las poliaminas son muy importantes durante el desarrollo embrionario de aves, mamíferos y el nematodo *Caenorhabditis elegans*, ya que la inhibición de la vía de síntesis de poliaminas causa pérdida de la gestación ó fin del desarrollo dichos organismos (Thomas y Thomas, 2001).

Hace más de 20 años, se descubrió que la actividad de la ODC se incrementa sustancialmente el día anterior a la implantación, en el útero de ratas gestantes, aparentemente en respuesta a estímulos embrionarios (Heald, 1979).

La administración oral de DL- $\alpha$ -difluorometil-ornitina (DFMO), inhibidor específico de la ODC, a ratas gestantes, un día antes de la implantación, suprime dicho incremento en la actividad de ODC y retrasa el desarrollo embrionario (Fozard y cols., 1980b; Mannen y cols., 1983).

La administración intrauterina de DFMO tiene el mismo efecto, y si las poliaminas son administradas de manera simultanea al fármaco, el desarrollo embrionario progresa adecuadamente (Méndez y cols., 1983).

Por otra parte, la adición de poliaminas al medio de incubación de ovocitos de ratón aumenta el potencial de desarrollo hasta blastocistos (Muzikova y Clark, 1995), lo cual corrobora que estas moléculas pudieran estar implicadas en el desarrollo embrionario temprano. En ratón, la inhibición de la PAO o de la S-SAMDC arresta el crecimiento embrionario (Mehrotra y cols., 1997), lo que indica que para el desarrollo embrionario son muy importantes las concentraciones relativas de las poliaminas.

Las poliaminas son reguladores clave de la angiogénesis, de la embriogénesis temprana en mamíferos, del crecimiento del trofoblasto placentario y del desarrollo embrionario en el útero (Fozard y cols., 1980b). Mediante unión intracelular al DNA y RNA, los nucleótidos trifosfatados, proteínas, y otras moléculas cargadas negativamente, las poliaminas, por su carácter policationico regulan la expresión genética, la transducción de señales, y la función de canales iónicos, así como la síntesis de DNA y proteínas (Igarashi y Kashiwagi, 2000). También se ha reportado que son depuradores endógenos de ERO por lo cual pueden proteger el DNA, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo (Das y Misra, 2004; Ha y cols., 1998), y que son esenciales para la proliferación, la diferenciación y la función celular (Kwon y cols., 2003).

A pesar de que existen estudios sobre el papel de poliaminas en el desarrollo placentario y fetal, se conoce poco acerca de cambios en la síntesis de poliaminas durante el desarrollo del *conceptus* en mamíferos. Bengtsson y cols. (1994) demostraron que en embriones de rata diabética, la actividad de ODC y las cantidades totales de poliaminas disminuyen drásticamente durante la organogénesis y neurulación.

## **L-ARGININA**

La L- arginina (ácido  $\alpha$ -amino- $\delta$ -guanidín-valeriánico) es un aminoácido alifático, considerado como semiesencial para los mamíferos y las aves; ya que

aún cuando poseen la maquinaria enzimática para su síntesis, es requerido en la dieta durante las etapas tempranas del desarrollo, con el fin de sostener una síntesis activa de proteínas y para realizar múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos (Pau y Milner, 1981). Los destinos metabólicos que puede seguir este aminoácido son múltiples (Wu y Morris, 1998):

1. Hidrólisis por la enzima arginasa, para producir L-ornitina, precursor de las poliaminas; o para participar en el ciclo de la urea.

2. Desaminación oxidativa, por la cual es precursor de la síntesis de creatina y otros productos.

3. Producción de óxido nítrico (NO), una molécula bioactiva muy importante.

4. Síntesis de proteínas.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los mayores peligros a nivel mundial. En las últimas décadas se registró un incremento alarmante de casos de diabetes, particularmente en zonas muy pobladas. Los costos directos e indirectos asociados a diabetes son enormes. A pesar de que el uso de la insulina logró disminuir significativamente la mortalidad en todos los pacientes diabéticos y mejorar considerablemente el nivel de vida, aun queda mucho por investigar.

Una de las cuestiones que continua preocupando a investigadores y clínicos, es el alto índice de malformaciones congénitas que se presentan en hijos de madres diabéticas. Esto quizá debido a las implicaciones psicológicas, sociales y económicas que conllevan tanto a la familia como a las instituciones de seguridad social y pública del país.

Todos los estudios que se realicen en este campo, contribuirán en un futuro al entendimiento de cada uno de los procesos bajo los cuales se desarrollan las malformaciones congénitas y con esto, a prevenir y mejorar el nivel de vida tanto de mujeres diabéticas como de sus hijos.

El cultivo de embriones ha sido empleado por más de 20 años para estudiar el efecto de la hiperglucemia, de otros posibles teratógenos y de moléculas con posible actividad protectora sobre el desarrollo embrionario; así como los mecanismos por los cuales los factores teratogénicos llevan a cabo sus efectos.

Debe tomarse en cuenta que las condiciones en cultivo no son del todo iguales a lo que ocurre *in vivo*: en general, la incidencia de malformaciones y la severidad de éstas es menor en una situación natural. Sin embargo, por muchas razones el uso de éste sistema permite estudiar aisladamente un probable factor o mecanismo, lo cual *in vivo*, es difícil; además de que se pueden introducir manipulaciones que en el organismo completo serían imposibles de realizar. En esta estrategia experimental la mayoría de los daños observados implican defecto

del cierre de tubo neural (Ellington, 1997), razón por la cual, en el primer mundo, es muy utilizado; más aún que los experimentos *in vivo*.

Por otra parte, nuestro grupo de trabajo encontró que la L-arginina y las poliaminas poseen la capacidad de promover una mejoría relativa de la hiperglucemia-hipercetonemia de ratas diabéticas gestantes, así como de mejorar el pronóstico de desarrollo de los embriones (Méndez y Palomar-Morales, 1999); estudios posteriores demostraron que el efecto embrio-protector de las poliaminas parece no estar mediado completamente por la mejoría de la diabetes materna, y se sugiere un efecto directo de las poliaminas sobre el desarrollo embrionario (Méndez e Higareda, 2006), por lo que se investigó si la acción embrio-protectora que muestran las poliaminas es por estimular directamente el desarrollo embrionario para lo cual se empleó el modelo de cultivo de embriones.

Este método puede ser utilizado en el análisis de los mecanismos por los cuales ocurre la teratogénesis provocada por diabetes mellitus en rata, y que eventualmente puede ser utilizado para el estudio de estrategias y fármacos que pudieran ser propuestos o empleados con el objetivo de disminuir o abolir los efectos deletéreos sobre el desarrollo del organismo que la diabetes mellitus produce.

## ANTECEDENTES

A partir de los 70s, varios autores describieron métodos de cultivo de embriones de roedores. New y cols. (1973, 1976a, b) delinearon un método de cultivo de embriones *in vitro*, mediante el cual embriones de día nueve de gestación alcanzan el estado de desarrollo de hasta 25 somitas; este método ha sido ampliamente usado en embriología para identificar los requerimientos de los embriones de mamíferos en etapas tempranas (New, 1978; Travers y cols., 1989).

Sadler y cols. en 1989 demostraron el origen multifactorial de las embriopatías inducidas por diabetes, y confirmaron la teratogenicidad de los cuerpos cetónicos y de la hiperglucemia sobre la gastrulación de embriones de rata y durante la neurulación de embriones de ratón.

Travers y cols. en 1989 reportaron que la disminución de los niveles de insulina en embarazos diabéticos, ayuda a incrementar el riesgo de anomalías congénitas.

Posteriormente, Akashi y cols. en 1991, mediante experimentos con los cuales trataban de estudiar el efecto de la insulina y el *mio*-inositol sobre el crecimiento de embriones de ratas diabéticas, encontraron que el retraso del crecimiento ocasionado por la diabetes no puede ser explicado únicamente por la hipótesis de la reducción de éste azúcar-alcohol, que es necesario para el desarrollo embrionario de mamíferos.

Trocino y cols. en 1995 demostraron que una alteración del estado oxidativo y la reducción de los niveles intracelulares de glutatión (GSH) en cultivos de embriones de rata provocan un aumento de la frecuencia y severidad de malformaciones, pero la suplementación del medio de cultivo con GSH mejora la dismorfogénesis inducida por hiperglucemia.

Eriksson y Borg en 1993 encontraron que al cultivar *in vitro* embriones de rata durante la organogénesis temprana se producía retardo del crecimiento y

malformaciones severas al agregar una alta concentración de glucosa y sustratos para la formación de ERO; pero al suplementar al medio de cultivo la enzima superóxido dismutasa, la tasa de dismorfogénesis disminuyó a niveles normales.

Se ha demostrado que los embriones de rata y ratón crecen de manera normal cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo es cercana a 10 mM (Cockroft y Coppola, 1977; Ellington, 1987; Sadler, 1980); un poco mayor a la concentración de glucosa fisiológica. Estos mismos estudios demostraron que la glucosa en exceso es teratogénica en cultivo.



## **OBJETIVOS**

Implementar un modelo de cultivo de embriones post-implantacionales de roedor.

Verificar que, en un modelo de cultivo de embriones post-implantacionales de roedor, las altas concentraciones de D-glucosa manifiestan propiedades teratogénicas.

Demostrar que la suplementación de poliaminas al medio de cultivo de embriones post-implantacionales revierte los daños teratogénicos producidos por las altas concentraciones de D-glucosa.

## METODOLOGÍA

**Reactivos.** Todos los reactivos (con excepción de un estuche comercial para determinar glucosa) se adquirieron de Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA. Cuando era posible, se elegían reactivos aprobados para cultivo de embriones (embryo-tested).

**Preparación de medio de cultivo de embriones.** Para este fin, el bioterio de la FES donó aproximadamente 200 ratas *Rattus norvegicus*, de la cepa *Wistar*, hembras sanas, que habían dado a luz por lo menos tres camadas, o que habían sido colocadas tres veces en presencia del macho y no habían copulado. El procedimiento se llevó a cabo en sesiones de 10 a 15 sujetos. Las ratas donadoras se anestesiaron con éter etílico, y antes de la muerte cardíaca, se obtuvo la sangre del corazón con ayuda de una jeringa de 10 mL, con aguja de calibre 21 x 32. La sangre se centrifugó a 3000 rpm antes de coagular, ya que si se permite la coagulación, el crecimiento embrionario se deteriora. Al suero que se obtuvo, se le denomina “inmediatamente centrifugado” (New, 1978), y se almacenó en ultra congelación hasta el momento de la preparación del medio de cultivo.

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

Para preparar medio suplementado con glucosa, se adicionó ésta hasta una concentración teórica de 500 mg/dL, la usada por la mayoría de los autores en este campo del conocimiento. Se consideró que el medio control tenía una concentración de 100 mg/dL, por lo que se preparó una solución de glucosa concentrada (8000 mg/dL), al momento de uso. Un medio “hiperglucémico” se

preparaba con 4 mL de suero, 0.5 mL de solución de antibióticos, 0.25 mL de glucosa concentrada y 0.25 mL de solución salina.

Para el medio con glucosa y arginina (10 mM) se tomaron 4 mL de suero, 0.5 mL de solución de antibiótico, 0.25 mL de glucosa concentrada y 0.25 mL de arginina 0.2 M. Por último, para los medios con glucosa y poliaminas (25  $\mu$ M), se ajustaron las concentraciones a partir de soluciones concentradas (0.5 mM) de cada poliamina. En la tabla 1 se indican las características de los medios de cultivo utilizados.

El medio preparado se filtró a través de una membrana millipore de 0.45  $\mu$ m de malla, en condiciones de esterilidad, y finalmente se volvió a almacenar a ultra congelación hasta el momento de su uso.

De cada medio de cultivo utilizado, se conservó una pequeña cantidad (50-100  $\mu$ L), en la cual posteriormente se determinó la concentración de glucosa mediante un estuche comercial (Spinreact, glucose GOD-PAP 1001190) que sigue el principio de Trinder (1969).

---

**TABLA 1. CARACTERISTICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE EMBRIONES**

---

<b><u>Grupo</u></b>	<b><u>Características</u></b>
CTR	Suero de rata 80% en solución salina, suplementado con penicilina 1000 UI/mL y estreptomicina 100 $\mu$ g/mL.
GLC	Adicionado con glucosa (final 500 mg/dL)
GLC + ARG	Adicionado con glucosa y L-arginina 10 mM
GLC + PUT	Adicionado con glucosa y putrescina 25 $\mu$ M
GLC + SPD	Adicionado con glucosa y espermidina 25 $\mu$ M
GLC + SPM	Adicionado con glucosa y espermina 25 $\mu$ M

---

**Material biológico.** Se utilizaron 21 ratas hembra *Rattus norvegicus*, de la cepa *Wistar*, vírgenes, de 10 a 12 semanas de edad, con peso de 250 a 300 g, con ciclos estrales definidos, proporcionadas por el bioterio de la FES Iztacala. Se mantuvieron en el mismo bioterio, en condiciones de luz, humedad y temperatura controladas (12 h luz por 12 h oscuridad, 22° C, 50-60% de humedad ambiental), con aserrín (Northeastern products, Warrensburg, NY, USA) esterilizado por autoclave, con agua y alimentación (Rodent diet 2018S, Harlan, Mexico City, Mexico) *ad libitum*. Para el apareamiento de las hembras, se colocaron toda la noche dos de ellas en presencia de un macho sano de fertilidad comprobada, de la misma cepa, y se asignó como tiempo cero la medianoche anterior al día en que se detectaron espermatozoides en el lavado o frotis vaginal.

**Cultivo de embriones.** Al décimo día de gestación, las ratas preñadas fueron anestesiadas con éter etílico, y, antes de la muerte cardíaca, se practicó una insición ventral para obtener el útero, que se colocó en solución salina estéril, en una caja de Petri a 37° C. Bajo condiciones estériles, y con ayuda de pinzas de relojero y tijeras de oftalmología curvas, el útero se limpió de sangre y tejido graso.

Posteriormente, se practicó una insición transversal en el útero, con unas tijeras de oftalmología rectas, y bajo microscopio estereoscópico (Leica MZ 6, aproximadamente a 2 aumentos), cuidadosamente se obtuvo cada decíduoma, que se pasó a otra caja de Petri conteniendo solución salina estéril. Acto seguido el decíduoma fue abierto con ayuda de agujas de disección ultra delgadas, para obtener al embrión, al cual se le retiró la membrana de Reichert, para que se permitiera su óptimo crecimiento, y después se colocó cada embrión individualmente en un tubo Eppendorf de 2.0 mL de capacidad, estéril, con 1.0 mL de medio de cultivo pregasificado por 3-5 minutos con una mezcla de gases (CO<sub>2</sub> 5%, O<sub>2</sub> 5% y N<sub>2</sub> 90%). Los embriones así cultivados se mantuvieron durante 24 h. a 37° C, rotando a 30 - 40 rpm, en un aparato construido en el Taller de Equipo para Laboratorio de Enseñanza de la Facultad, y denominado "Rotocell".

Con el fin de asegurar un control adecuado para trabajar, se cultivaron exclusivamente embriones que se recuperaban intactos; es decir, a los cuales no se les rompía o perforaba el saco vitelino cuando se abría la membrana de Reichert, pues en los ensayos previos para poder lograr montar el sistema, pudo notarse que la membrana del saco vitelino era necesaria para lograr el crecimiento óptimo del embrión.

Por lo menos, un embrión de cada camada fue cultivado en condiciones control (medio de cultivo sin adición), ya que para poder asegurar que un tratamiento tiene efecto sobre el desarrollo, se requiere un mínimo de 20 embriones (Klug y cols., 1985).

Con el fin de mimetizar las condiciones de crecimiento en el embarazo de una hembra diabética, otro grupo de embriones (por lo menos uno de cada camada) fueron cultivados en medio suplementado con glucosa 500 mg/dL. Estas condiciones, se describen en la literatura como “cultivo hiperglucémico” (Cockroft y Coppola, 1977; Ellington, 1987; Sadler, 1980; Sadler y cols., 1989; Travers y cols., 1989).

Finalmente, para probar la hipótesis de que las poliaminas y su precursor la L-arginina tienen efecto embrio-protector, al menos un embrión de cada camada fue cultivado en condiciones “hiperglucémicas”, pero con la adición respectiva de L-arginina 10 mM, putrescina 25  $\mu$ M, espermidina 25  $\mu$ M o espermina 25  $\mu$ M (Méndez y Zarzosa, 1997) como se ejemplifica en la tabla 1. La razón de incubar un embrión de cada camada en cada condición experimental fue con objeto de eliminar o reducir el factor genético que pudiera afectar el desarrollo embrionario.

La incubación se llevó a cabo durante 24 horas. Al término de este tiempo, los embriones se obtuvieron y fueron examinados. Se midieron y se contaron el número de somitas, la longitud cefalocaudal, el diámetro del saco vitelino, el desarrollo del tubo neural y el tamaño de la cabeza, con ayuda de un ocular micrométrico, previamente graduado con una reglilla micrométrica. Además se

obtuvo un registro morfológico de los embriones (Klug y cols., 1985). El registro es un número compuesto por la estimación de otros parámetros (forma del embrión, cierre de tubo neural, desarrollo de la cabeza, sistemas óptico y ótico, sistema cardiaco, extremidades superiores e inferiores, torsión de la cola, presencia o ausencia de sangre), y es un estimador del desarrollo, más que del crecimiento. En la tabla 2 se resume el modo de estimar el registro morfológico. Se tomaron fotografías de los embriones.

Al término de la incubación, se verificó que la membrana del saco vitelino estuviera completa, y que los embriones no mostraran signos de degradación, ya que en los ensayos previos se notó que la incubación de embriones con el saco vitelino roto o perforado no permitía el crecimiento óptimo. En las figuras 1 y 2 se observa un ejemplo de embrión bien cultivado, y se indican las estructuras embrionarias normales. Por último, los embriones fueron lavados en solución salina, y homogeneizados en 0.5 mL de ésta, para posteriormente determinar el contenido de proteínas mediante el método de Bradford (1976).

**Control externo.** Adicionalmente, se tuvieron cuatro ratas hembras, preñadas, que se sacrificaron el día 11 de gestación, para obtener al azar cinco embriones de cada una; con objeto de compararlos con los embriones en cultivo, y de los que también se obtuvieron fotografías. Posteriormente, estos embriones se homogeneizaron, para determinar en ellos la cantidad de proteínas.

**Tratamiento estadístico.** Los datos obtenidos de los parámetros morfológicos se analizaron mediante la prueba de ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis) seguida por la prueba de Dunn. Los datos de concentración de proteínas en los embriones y de glucosa en el medio de cultivo se analizaron empleando la prueba de ANOVA simple seguida de la prueba de Tukey. Para comparar los parámetros morfológicos de embriones de 10 días de desarrollo cultivados 24 horas con los de embriones de 11 días de edad gestacional, se empleó la prueba de *U* de Mann-Whitney, mientras que para comparar el contenido en proteínas de

ambos embriones, se empleó la  $t$  de Student para muestras independientes. Se empleó el programa SPSS para Windows versión 11.0.

---

**TABLA 2. DESCRIPCIÓN DEL ESQUEMA DE REGISTRO MORFOMÉTRICO**

---

<u>Parámetro</u>	<u>Puntos</u>	<u>Significado</u>
Forma del embrión	5	Flexión completa, embrión en forma de "G"
	4	Flexión casi completa, embrión en forma de "C"
	3	Flexión incompleta, embrión en forma de "I"
Desarrollo de tubo neural	5	Completamente cerrado
	4	Neuroporo caudal abierto
	3	Neuroporos craneal y caudal abiertos
Forma de la cabeza	2	Neuroporo craneal abierto
	3	Telencéfalo separado del diencefalo por una fisura
	2	No hay separación entre telencéfalo y diencefalo
Desarrollo del ojo	6	Párpado superior presente
	5	Bolsa del cristalino presente
	4	Vesícula óptica presente
	3	<i>Sulcus</i> óptico presente
Desarrollo del oído	2	Primordio ocular ausente
	6	Saco endolinfático presente
	5	Receso dorsal presente
	4	Vesícula ótica presente
	3	Fosas óticas presentes
	2	Fosas óticas ausentes

---



**TABLA 2 (Continuación)**

<u>Parámetro</u>	<u>Puntos</u>	<u>Significado</u>
Desarrollo de miembros anteriores	6	Completo
	5	Primordio de extremidad (longitud más del doble que la base)
	4	Primordio de extremidad (longitud igual o mayor, pero menor que el doble de la base)
	3	Rudimento de extremidad (longitud menor que la de la base)
	2	Ausencia de primordio
Desarrollo de miembros posteriores	2	Como "desarrollo de miembros anteriores"
Desarrollo de la cola	5	Cola alargada y se pueden reconocer los somitas de la cola
	4	Cola alargada, pero no se reconocen los somitas.
	3	Primordio de la cola
	2	Ausencia de primordio de la cola
Presencia de sangre	4	Circulación sanguínea reconocible
	3	Islotes sanguíneos reconocibles
	2	No hay indicación de la formación de sangre
<b>REGISTRO EMBRIONARIO TOTAL</b>		<b>SUMA DE LOS DIGITOS ASIGNADOS (MAXIMO 50 PUNTOS)</b>

Registro morfológico de los embriones. Cuando hay una anomalía profunda en alguno de los parámetros, se asigna el valor de 100 al embrión, y se detiene el análisis (Modificado de Klug y cols., 1985).

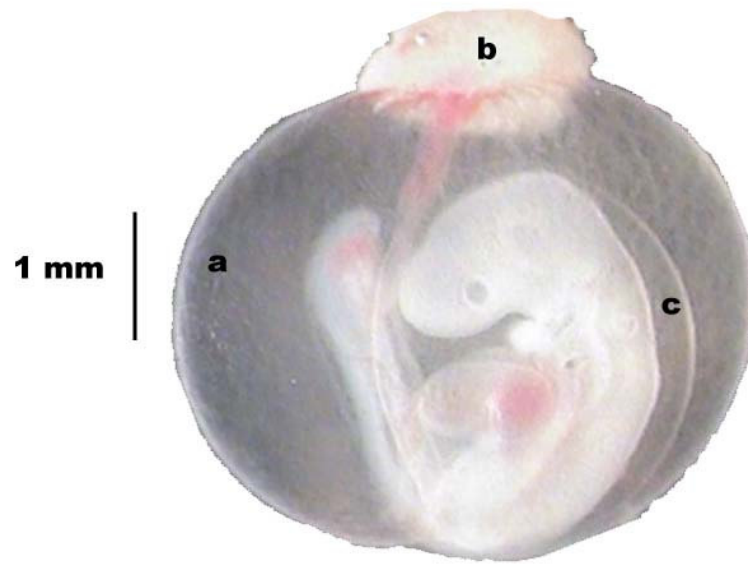


Figura 1. Embrión de 10 días de edad gestacional cultivado por 24 horas, envuelto en su saco vitelino. a: Saco vitelino; b: cono ectoplacentario; c: amnios.

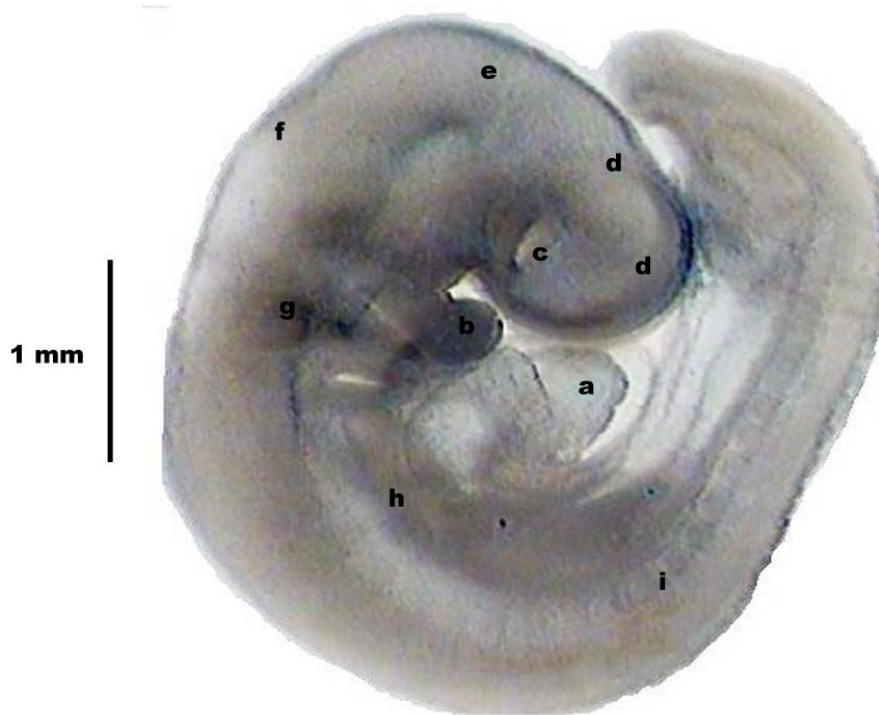


Figura 2. Embrión de 10 días de edad gestacional incubado por 24 horas, vista lateral. a: corazón; b: arcos branquiales; c: vesícula óptica; d: prosencéfalo (telencéfalo y diencéfalo); e: mesencéfalo; f: rombencéfalo (metencéfalo y mielencéfalo); g: vesícula ótica; h: primordios de las extremidades anteriores; i: somitas.

## RESULTADOS

**Crecimiento embrionario en cultivo.** Los embriones normales, de 11 días de edad gestacional, producto de gestación de ratas sanas (control externo) mostraron la morfología normal de la especie (figura 3).

Los embriones de rata de 10 días de edad gestacional cultivados por 24 horas, mostraron una morfología similar a la de los embriones sanos de ratas normales (figura 4). Cuando se comparan los embriones de 11 días de edad gestacional de ratas sanas con embriones de 10 días de edad gestacional cultivados por 24 horas, se observa que aunque los valores de longitud cefalocaudal, diámetro de saco vitelino, número de somitas, longitud de cabeza, registro morfológico y concentración de proteínas son relativamente menores en los embriones cultivados, no hay diferencias significativas entre ambos grupos (tabla 3).

**Efecto de L-arginina y poliaminas sobre el crecimiento embrionario *in vitro*.** Cuando los embriones fueron cultivados en presencia de una alta concentración de glucosa, se encontró en la mayoría de los casos que se alteraba el desarrollo embrionario, al grado tal que la forma de los embriones es anormal (fig. 5). El análisis morfométrico demostró que hay un retraso del crecimiento y un efecto profundo sobre el desarrollo (figs. 6 a 10). Tanto la longitud céfalocaudal (fig. 6), el número de somitas (fig. 7), el diámetro del saco vitelino (fig. 8), y la longitud de la cabeza (fig. 9), indicadores de crecimiento, son menores estadísticamente en embriones cultivados en medio con elevadas concentraciones de glucosa.

Del mismo modo, cuando se compara el registro morfológico de embriones cultivados en presencia de glucosa elevada, se encuentra que hay una disminución estadísticamente significativa, con respecto a embriones cultivados en medio control (fig. 10). El registro morfológico es un indicador del desarrollo, y muestra que éste se afecta profundamente por la incubación en presencia de glucosa.

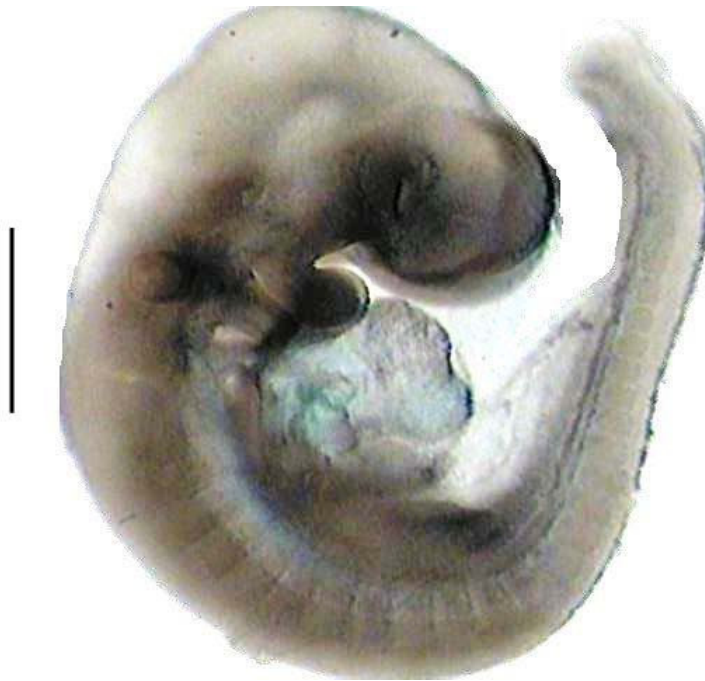
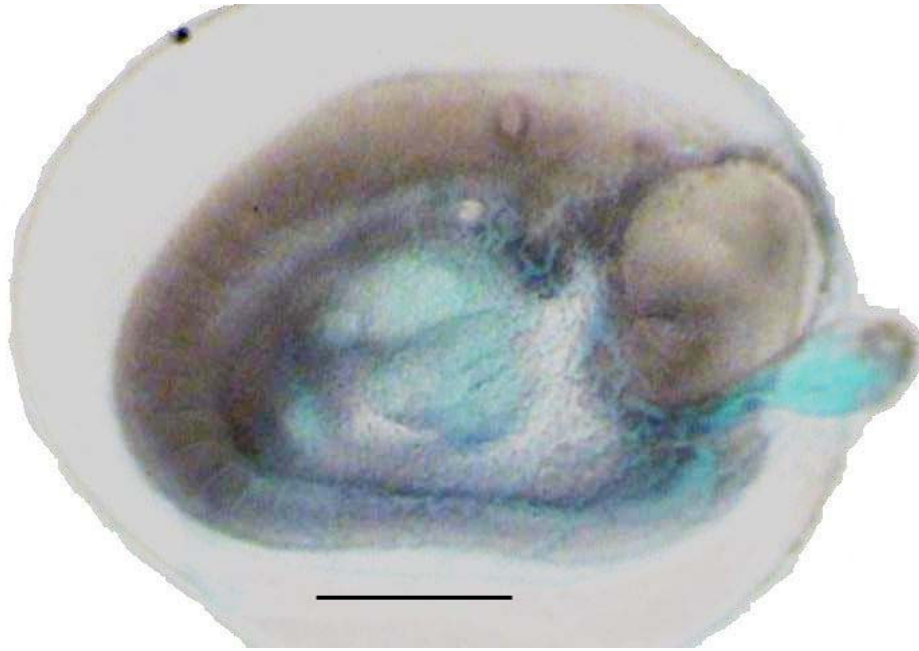


Figura 3. Embrión de 11 días de edad gestacional, de una rata sana (control externo). En la foto superior se observa el embrión dentro del saco vitelino, y en la inferior una vez libre de éste anexo. En ambas fotos la barra representa 1 mm.

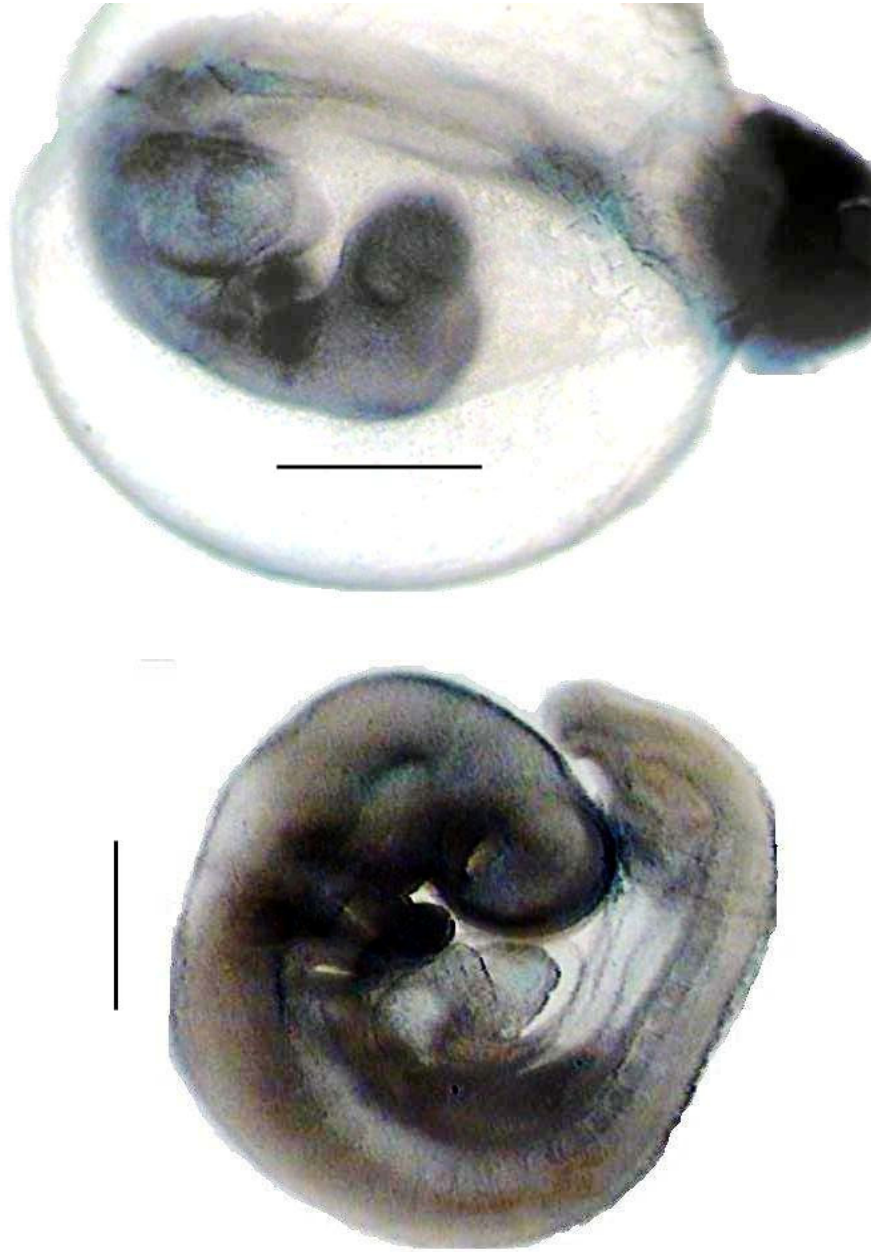


Figura 4. Embrión de 10 días de edad gestacional, cultivado en medio normal durante 24 horas (CTR). En la foto superior se observa el embrión dentro del saco vitelino, y en la inferior una vez libre de éste anexo. En ambas fotos la barra representa 1 mm.

**TABLA 3. COMPARACION ENTRE EMBRIONES DE 11 DÍAS DE EDAD  
GESTACIONAL (*IN VIVO*) Y EMBRIONES DE 10 DÍAS DE EDAD  
GESTACIONAL CULTIVADOS 24 HORAS (*IN VITRO*)**

<b><u>PARAMETRO EVALUADO</u></b>	<b><u><i>IN VIVO</i></u></b>	<b><u><i>IN VITRO</i></u></b>
LONGITUD CEFALOCAUDAL (mm)	3.858 ± 0.051	3.655 ± 0.088
NUMERO DE SOMITAS	29.75 ± 0.45	27.30 ± 0.47
DIAMETRO DEL SACO VITELINO (mm)	4.858 ± 0.051	4.655 ± 0.088
LONGITUD DE LA CABEZA (mm)	2.058 ± 0.051	1.930 ± 0.047
REGISTRO MORFOLOGICO	39.33 ± 0.50	38.00 ± 0.65
PROTEINAS, mg/embrión	237.8 ± 41.0	208.1 ± 86.0

Como control externo, se obtuvieron, a partir de cinco ratas hembra preñadas, el día 11 de desarrollo, 20 embriones (*IN VIVO*), que fueron evaluados por el método de Klug y cols. (1985). Estos embriones se compararon contra los embriones obtenidos el día 10 de desarrollo, y cultivados 24 h en medio normal (*IN VITRO*). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (1976). No hay diferencias significativas, evaluado por *U* de Mann Whitney (morfología) o *t* de Student (proteínas), entre ambos grupos.



Figura 5. Embrión de 10 días de edad gestacional, cultivado en medio suplementado con una concentración elevada de glucosa durante 24 horas (GLC). En la foto superior se observa el embrión dentro del saco vitelino, y en la inferior una vez libre de éste anexo. En ambas fotos la barra representa 1 mm.



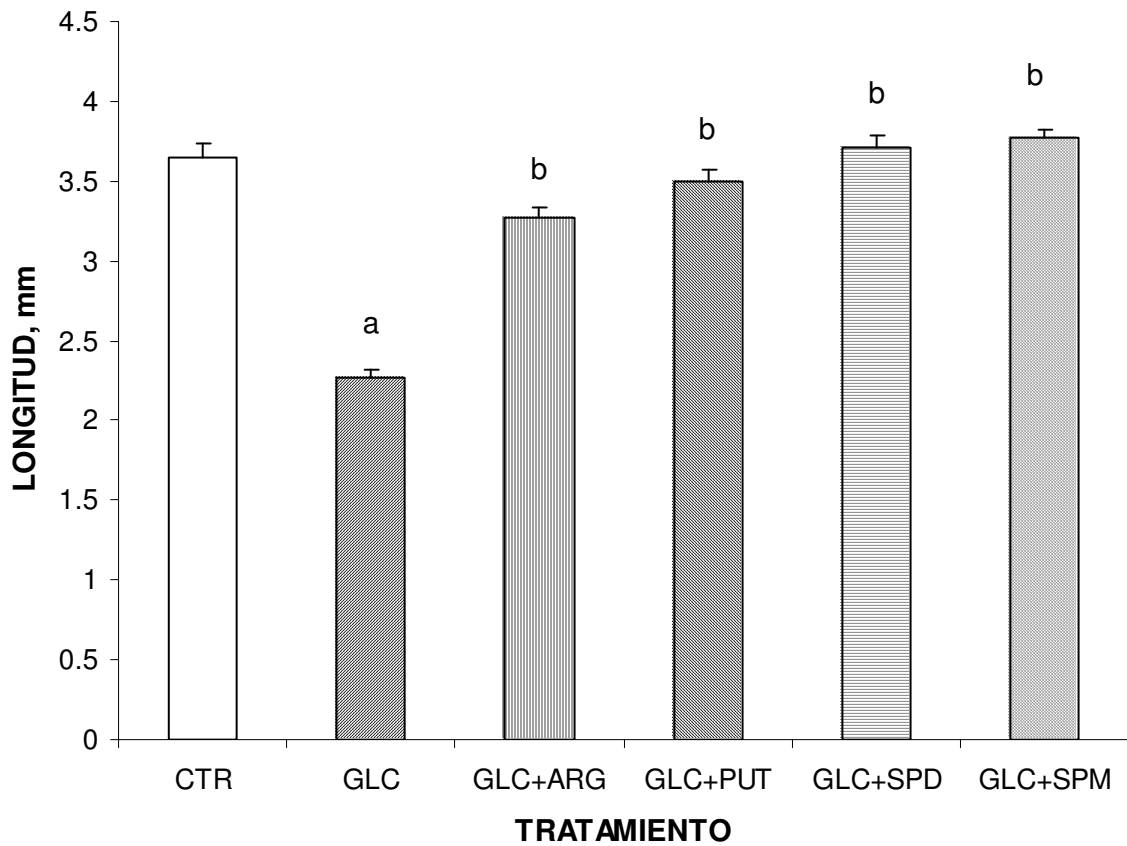


Figura 6. Longitud cefalocaudal de embriones de 10 días de edad gestacional cultivados en medio normal (CTR), medio hiperglucémico (GLC), o medio hiperglucémico suplementado con L-arginina (GLC + ARG), putrescina (GLC + PUT), espermidina (GLC + SPD), o espermina (GLC + SPM), durante 24 horas. Promedio ± D.E. de 20 – 21 embriones. <sup>a</sup>P < 0.001 vs. el control; <sup>b</sup>P < 0.001 vs. el medio con glucosa.

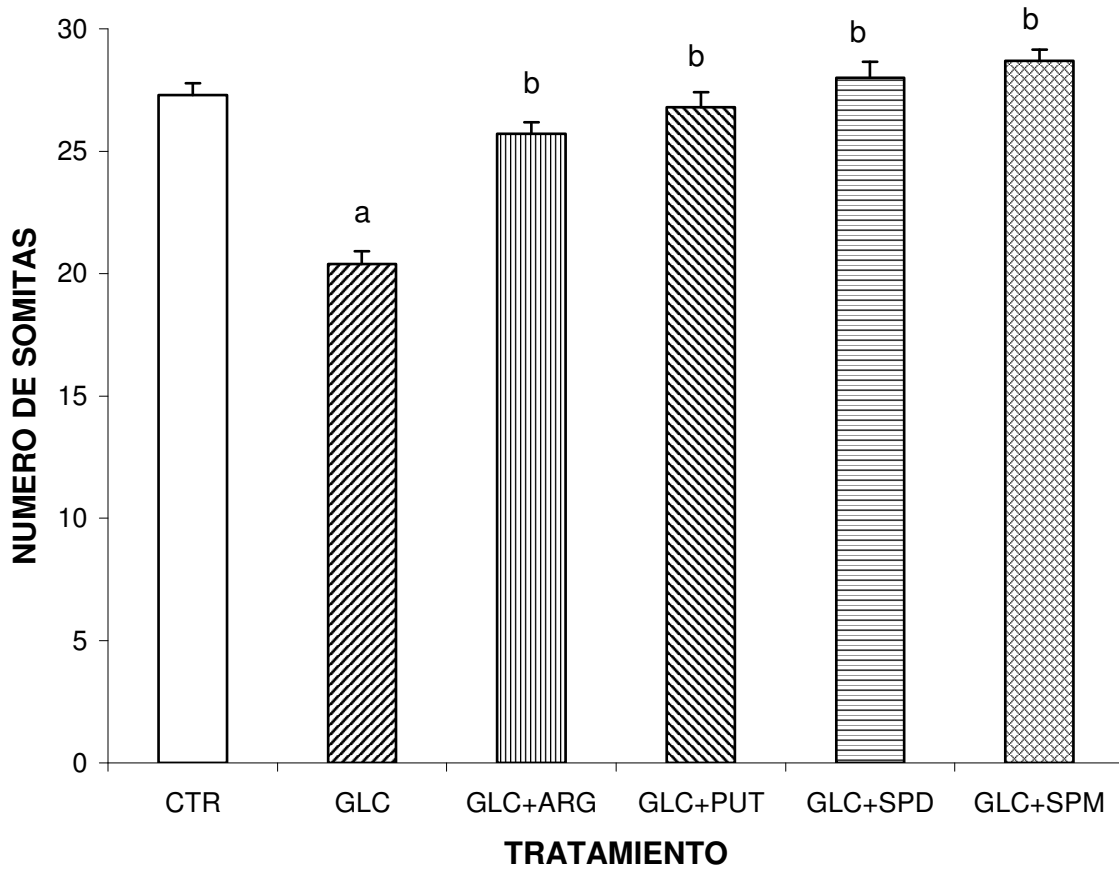


Figura 7. Número de somitas de embriones de 10 días de edad gestacional cultivados en medio normal (CTR), medio hiperglucémico (GLC), o medio hiperglucémico suplementado con L-arginina (GLC + ARG), putrescina (GLC + PUT), espermidina (GLC + SPD), o espermina (GLC + SPM), durante 24 horas. Promedio ± D.E. de 20 – 21 embriones. <sup>a</sup>P < 0.001 vs. el control; <sup>b</sup>P < 0.001 vs. el medio con glucosa.

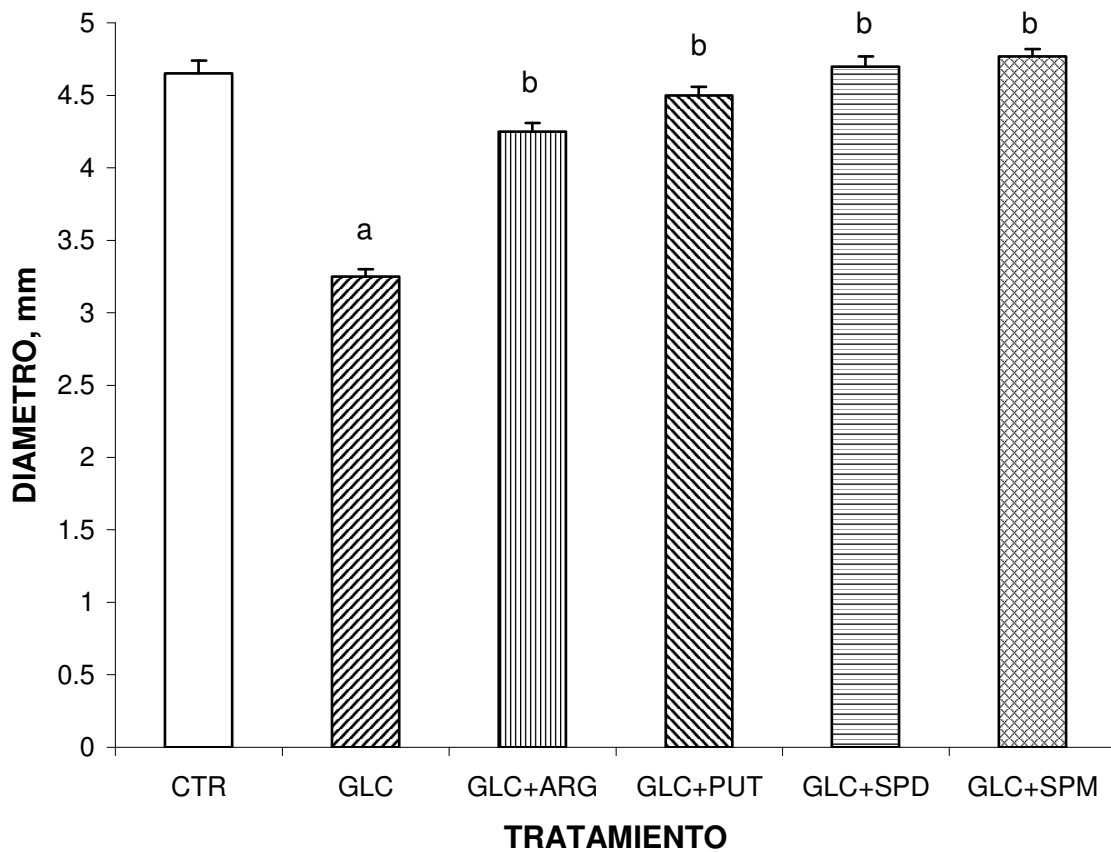


Figura 8. Diámetro del saco vitelino de embriones de 10 días de edad gestacional cultivados en medio control (CTR), medio hiperglucémico (GLC), o medio hiperglucémico suplementado con L-arginina (GLC + ARG), putrescina (GLC + PUT), espermidina (GLC + SPD), o espermina (GLC + SPM), durante 24 horas. Promedio  $\pm$  D.E. de 20 – 21 embriones. <sup>a</sup>P < 0.001 vs. el control; <sup>b</sup>P < 0.001 vs. el medio con glucosa.

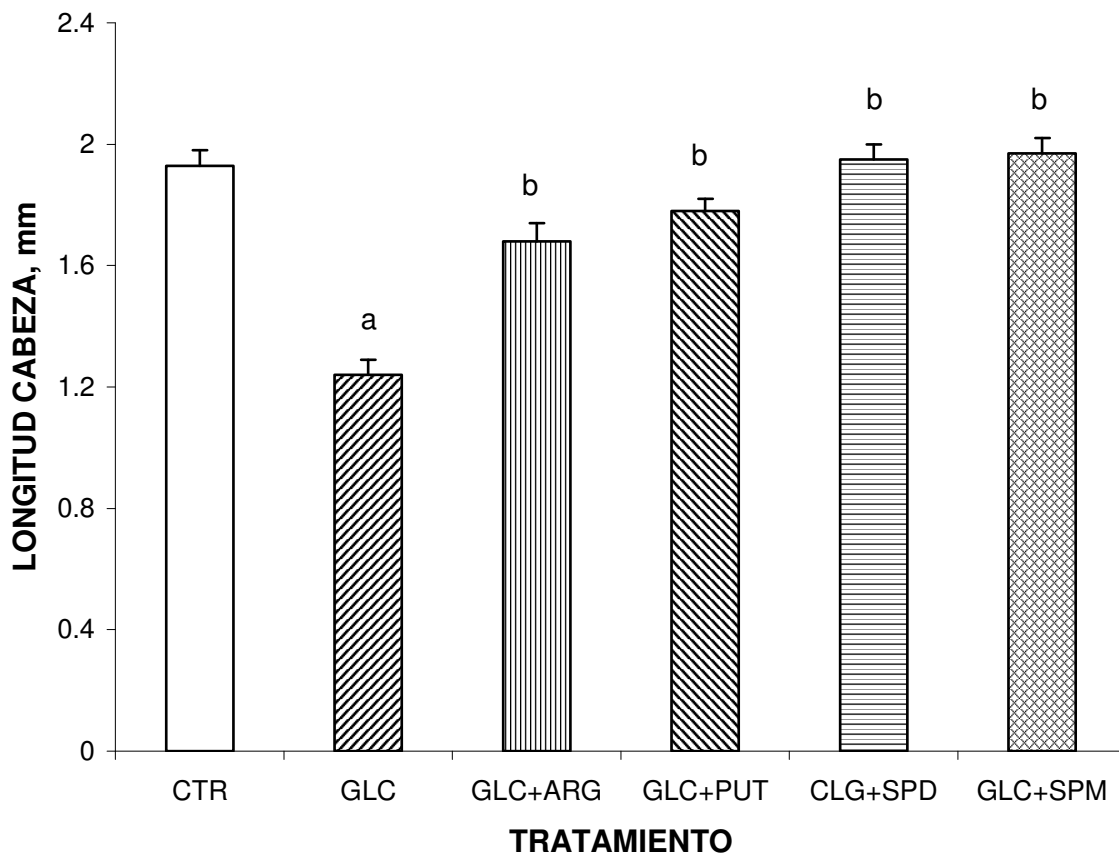


Figura 9. Longitud de la cabeza de embriones de 10 días de edad gestacional cultivados en medio normal (CTR), medio hiperglucémico (GLC), o medio hiperglucémico suplementado con L-arginina (GLC + ARG), putrescina (GLC + PUT), espermidina (GLC + SPD), o espermina (GLC + SPM), durante 24 horas. Promedio  $\pm$  D.E. de 20 – 21 embriones. <sup>a</sup>P < 0.001 vs. el control; <sup>b</sup>P < 0.001 vs. el medio con glucosa.

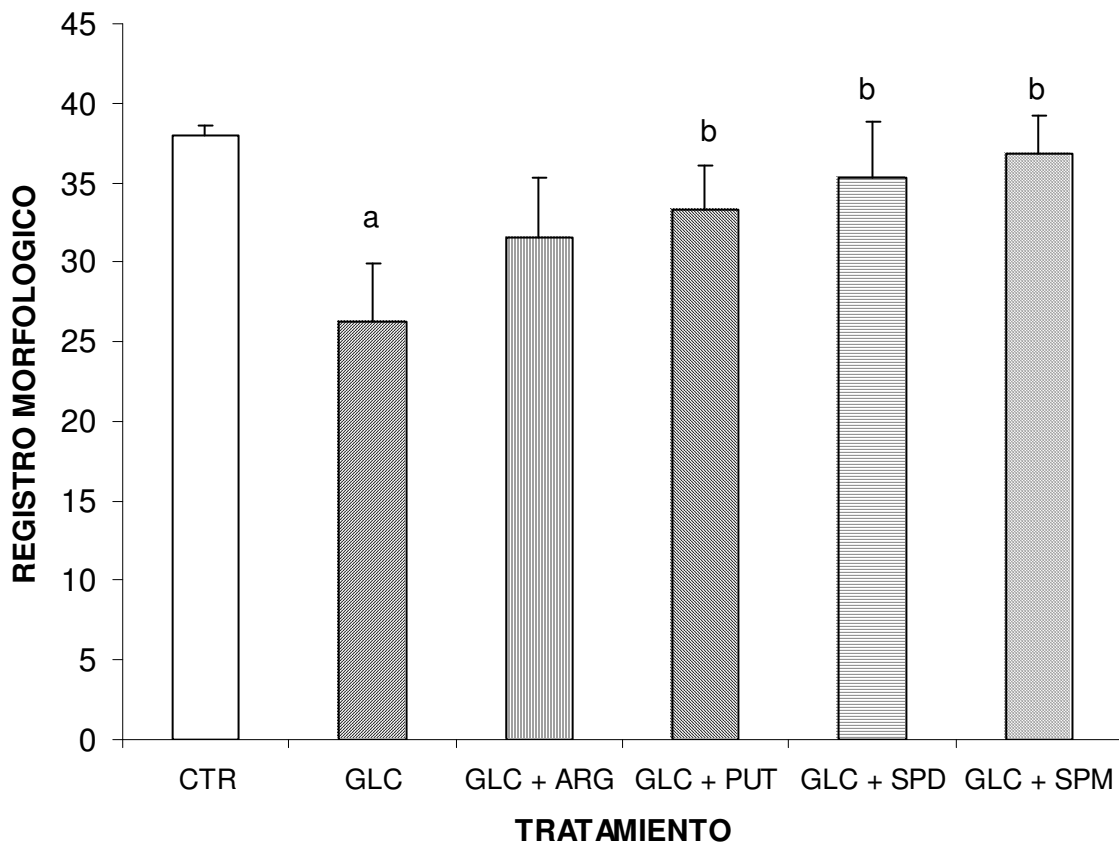


Figura 10. Registro morfológico de embriones de 10 días de edad gestacional cultivados en medio normal (CTR), medio hiperglucémico (GLC), o medio hiperglucémico suplementado con L-arginina (GLC + ARG), putrescina (GLC + PUT), espermidina (GLC + SPD), o espermina (GLC + SPM), durante 24 horas. Promedio ± D.E. de 20 – 21 embriones. <sup>a</sup>P < 0.001 vs. el control; <sup>b</sup>P < 0.001 vs. el medio con glucosa.

Con respecto al contenido de proteínas en el embrión, se observa que hay una tendencia a la disminución con respecto a las cuantificadas en embriones incubados en medio control; sin embargo, este resultado no mostró diferencias significativas (fig. 11).

Cuando los embriones se cultivaron en medio con elevada concentración de glucosa y suplementado con L-arginina 10 mM, se observó que, en la mayoría de los casos, se mejoraba el desarrollo embrionario (fig. 12), mientras que en algunos, no se observó este efecto. El análisis morfométrico demostró que la L-arginina revierte de manera parcial los efectos dismorfogénicos de la glucosa sobre el crecimiento (figs. 6 a 9) y sobre el desarrollo (fig. 10). El análisis estadístico indicó que el crecimiento es diferente con respecto al de embriones incubados en presencia de glucosa elevada, pero no es diferente del crecimiento de embriones incubados en medio normal. En contraste, el desarrollo, evaluado por el registro morfológico, aun cuando muestra un valor intermedio entre el determinado para embriones controles y embriones cultivados en presencia de glucosa elevada, no es diferente de ninguno de los dos (fig. 10). El contenido proteico mostró valores similares a los encontrados para embriones cultivados en medio con elevadas concentraciones de glucosa, y muy bajos con respecto a los obtenidos en medio normal, pero no diferentes estadísticamente de ellos (fig. 11).

La incubación de embriones en presencia de glucosa elevada y putrescina 25  $\mu$ M también mejoró el crecimiento con respecto a embriones cultivados en presencia de glucosa alta, evaluado por longitud cefalocaudal (fig. 6), número de somitas (fig. 7), diámetro del saco vitelino (fig. 8) y longitud de la cabeza (fig. 9): Igualmente, se estimuló el desarrollo embrionario (fig. 10). Tanto para los parámetros indicadores de crecimiento como para el indicador de desarrollo, los valores fueron estadísticamente diferentes de los observados para embriones cultivados en presencia de elevadas concentraciones de glucosa, pero no diferentes de los encontrados para embriones cultivados en medio control. Las proteínas tampoco mostraron diferencia estadística, pero sí una tendencia a la normalización (fig. 11). Un embrión representativo se muestra en la fig. 13.

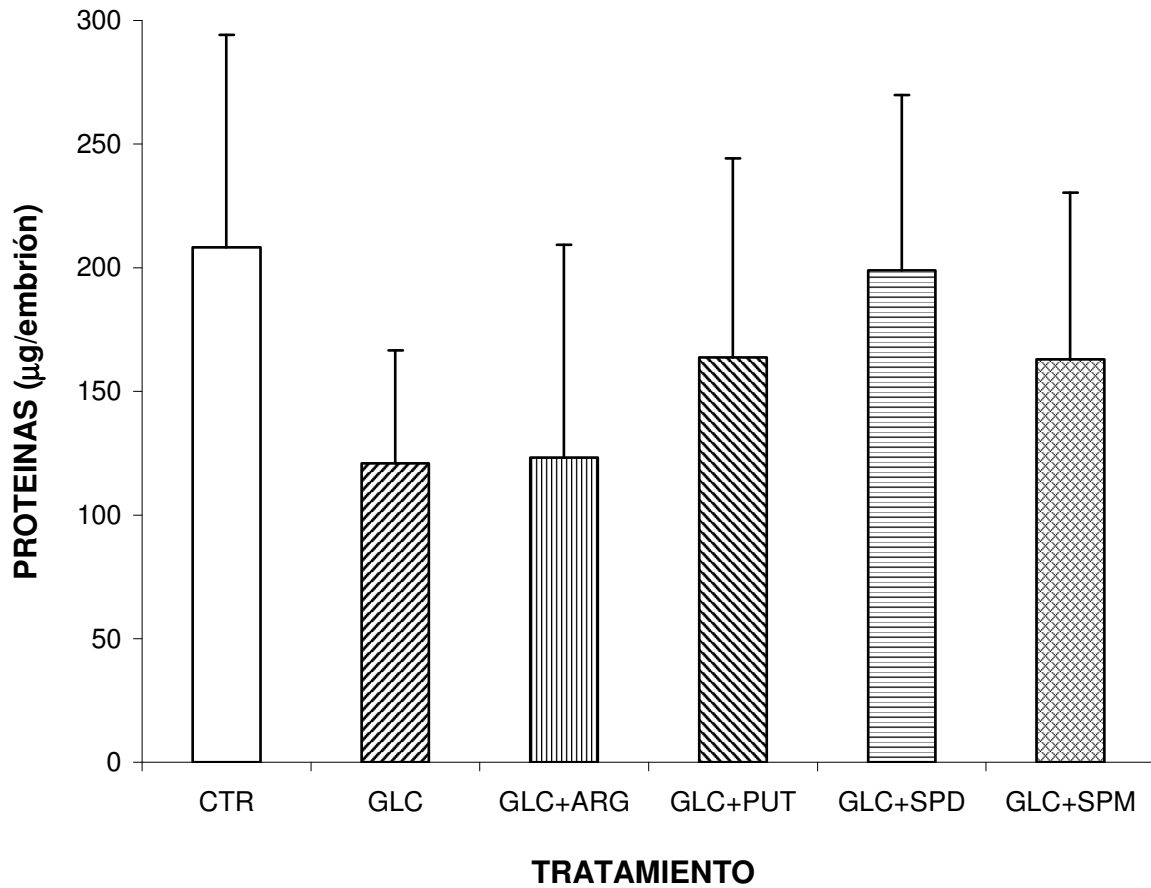


Figura 11. Contenido en proteínas de embriones de 10 días de edad gestacional cultivados en medio normal (CTR), medio hiperglucémico (GLC), o medio hiperglucémico suplementado con L-arginina (GLC + ARG), putrescina (GLC + PUT), espermidina (GLC + SPD), o espermina (GLC + SPM), durante 24 horas. Promedio  $\pm$  D.E. de 20 – 21 embriones. No hay diferencias significativas entre grupos.

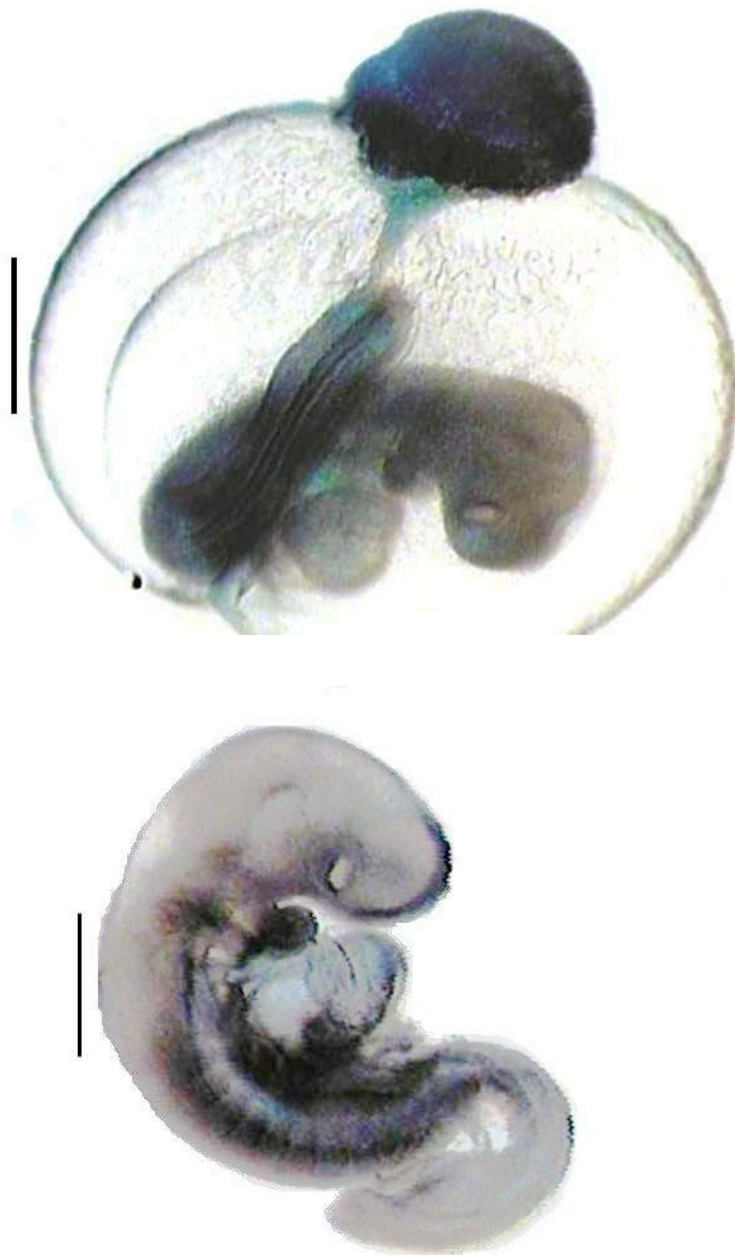


Figura 12. Embrión de 10 días de edad gestacional, cultivado en medio suplementado con una concentración elevada de glucosa durante 24 horas y L-arginina 10 mM (GLC + ARG). En la foto superior se observa el embrión dentro del saco vitelino, y en la inferior una vez libre de éste anexo. En ambas fotos la barra representa 1 mm.



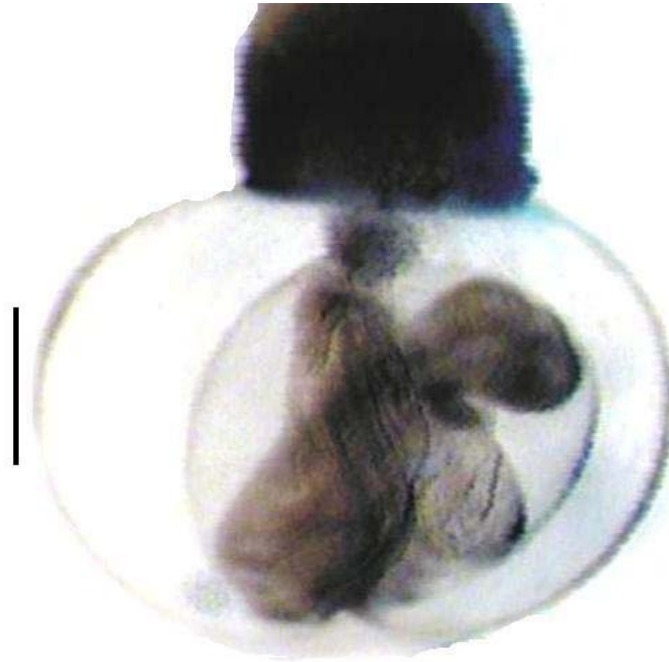


Figura 13. Embrión de 10 días de edad gestacional, cultivado en medio suplementado con una concentración elevada de glucosa durante 24 horas y putrescina 25  $\mu$ M (GLC + PUT). En la foto superior se observa el embrión dentro del saco vitelino, y en la inferior una vez libre de éste anexo. En ambas fotos la barra representa 1 mm.

La poliamina intermedia, espermidina, mostró de igual manera, una reversión de los efectos nocivos de la glucosa elevada sobre el crecimiento y el desarrollo: de hecho, la longitud cefalocaudal (fig. 6), el número de somitas (fig. 7), el diámetro del saco vitelino (fig. 8) y la longitud de la cabeza (fig. 9), son ligeramente mayores, aunque no estadísticamente diferentes, de los observados para embriones controles; mientras que el registro morfológico es ligeramente menor, aunque estadísticamente no diferente (fig. 10). En la fig. 14 se observa un embrión representativo.

Por último, la espermina mostró también un efecto embrio-protector sobre los efectos deletéreos del exceso de glucosa en el medio. Para esta molécula, tanto la longitud cefalocaudal (fig. 6), el número de somitas (fig. 7), el diámetro del saco vitelino (fig. 8) y la longitud de la cabeza (fig. 9), son ligeramente mayores, aunque no estadísticamente diferentes, de los observados para embriones controles; de hecho, son los valores más altos encontrados en este estudio; mientras que el registro morfológico es ligeramente menor, aunque estadísticamente no diferente del control (fig. 10). En la fig. 15 se observa un embrión representativo.

Al comparar los embriones cultivados en distintas condiciones entre sí, es evidente que una concentración elevada de glucosa en el medio de cultivo produce una alteración profunda del desarrollo; la L-arginina revierte sólo un poco dichas alteraciones, pero las poliaminas tienen un profundo efecto protector directo, relacionado con el tamaño de la poliamina. Una comparación directa de los embriones se observa en la figura 16.



Figura 14. Embrión de 10 días de edad gestacional, cultivado en medio suplementado con una concentración elevada de glucosa durante 24 horas y espermidina  $25 \mu\text{M}$  (GLC + SPD). En la foto superior se observa el embrión dentro del saco vitelino, y en la inferior una vez libre de éste anexo. En ambas fotos la barra representa 1 mm.

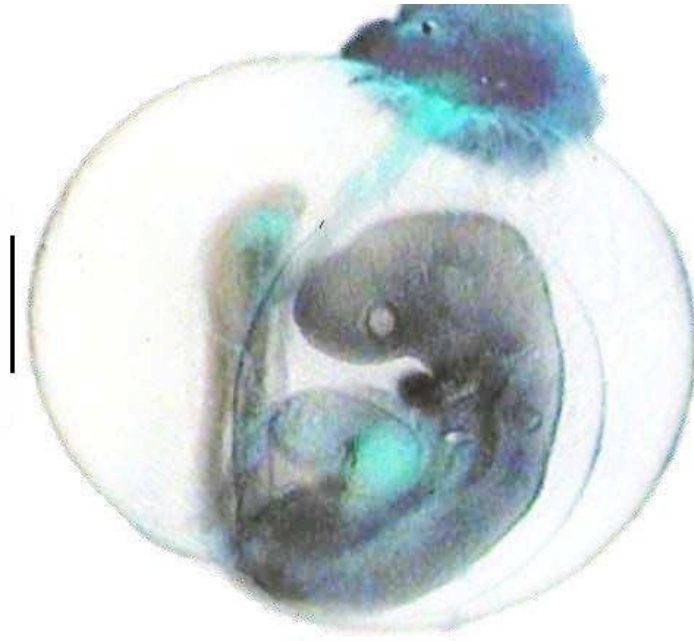


Figura 15. Embrión de 10 días de edad gestacional, cultivado en medio suplementado con una concentración elevada de glucosa durante 24 horas y espermina 25  $\mu$ M (GLC + SPM). En la foto superior se observa el embrión dentro del saco vitelino, y en la inferior una vez libre de éste anexo. En ambas fotos la barra representa 1 mm.

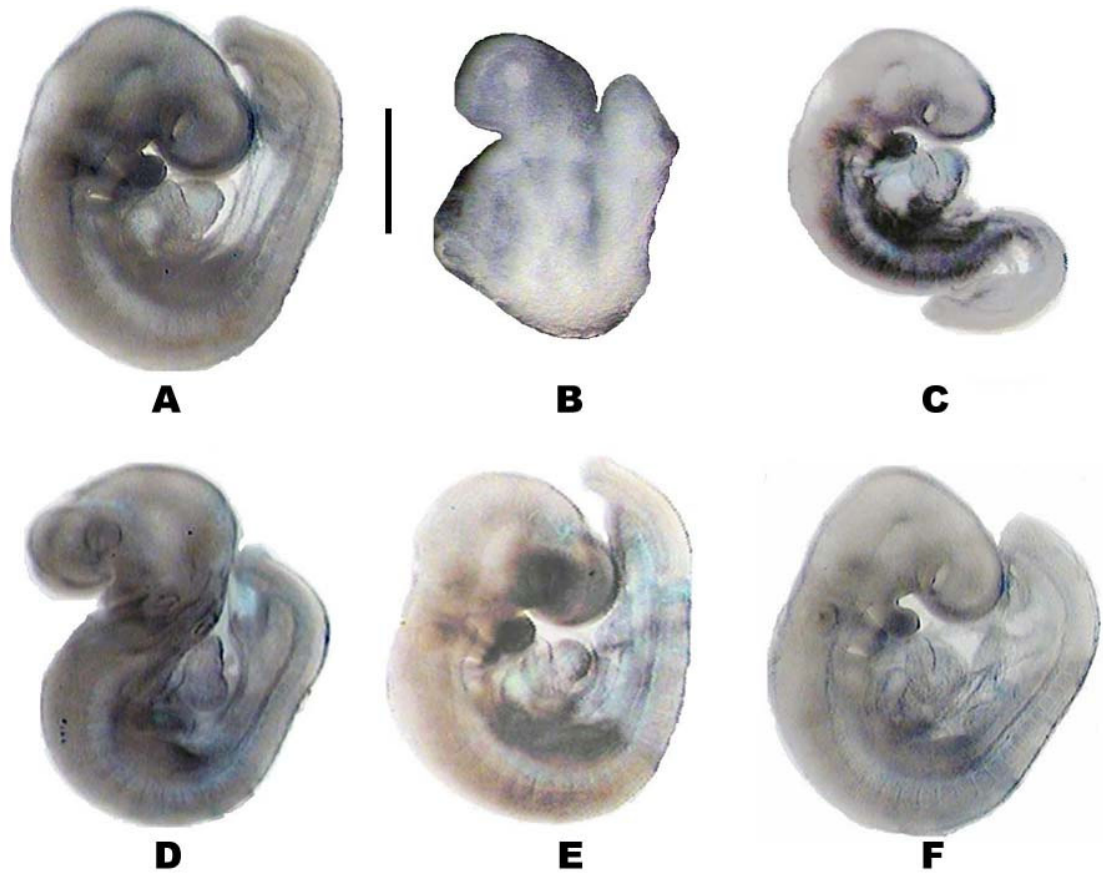


Figura 16. Comparación directa entre un embrión representativo, de cada incubación. A: embrión cultivado en medio control; B: embrión cultivado en presencia de glucosa 500 mg/dL; C: embrión cultivado en presencia de elevada glucosa y L-arginina 10 mM; D: embrión cultivado en presencia de elevada glucosa y putrescina 25  $\mu$ M; E: embrión cultivado en presencia de elevada glucosa y espermidina 25  $\mu$ M; F: embrión cultivado en presencia de elevada glucosa y espermina 25  $\mu$ M. La barra entre los embriones A y B representa 1 mm.

**Concentración de glucosa en el medio de cultivo.** Una pequeña alícuota de cada medio preparado fue tomada para determinar glucosa con el método de Trinder. La concentración de glucosa en el medio normal fue ligeramente mayor a 100 mg/dL (figura 17), que es la concentración utilizada por la mayoría de los autores para este tipo de estudios, y que es cercana a la fisiológica. Los medios “hiperglucémicos” mostraron una concentración ligeramente menor de 500 mg/dL, mientras que la esperada teóricamente era de 500 - 520 mg/dL. La discrepancia entre el valor real y el observado puede explicarse porque, aun cuando el instructivo del estuche comercial indica linealidad y proporcionalidad de la reacción hasta 500 mg/dL, las concentraciones saturadas de cromóforo (en este caso el producto de la reacción) siempre muestran un ligero efecto hipercrómico. El análisis estadístico demostró diferencia en la concentración de glucosa en todos los grupos con respecto al control.

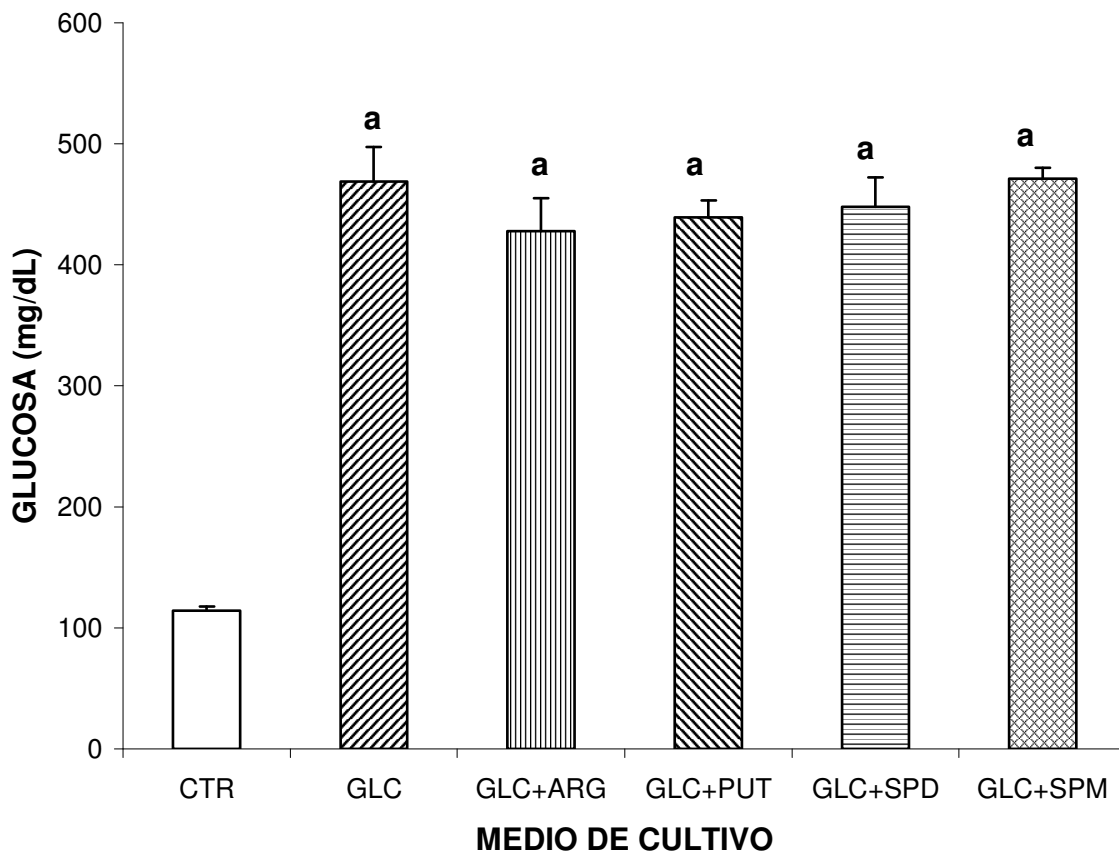


Figura 17. Concentración de glucosa en medio control y en medios suplementados con glucosa, a una concentración estimada de glucosa 500 mg/dL. Promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 determinaciones independientes. <sup>a</sup>P < 0.001 con respecto a la glucosa encontrada en el medio control, cuando se analizaron con ANOVA simple, seguido de prueba de Tukey.

## DISCUSION

**Crecimiento y desarrollo de embriones en cultivo.** El método de cultivo de embriones de roedor *in vitro* representa una estrategia muy empleada en el primer mundo, para estudiar el posible efecto que sustancias exógenas, ya sea fármacos, moléculas de extracción vegetal, contaminantes ambientales, análogos de biomoléculas activas, etc., pudieran tener sobre el desarrollo.

Para probar la hipótesis de que el efecto embrio-protector de las poliaminas, previamente reportado (Méndez y Palomar-Morales, 1999), y que parece no ser mediado por la economía materno-placentaria (Méndez e Higareda, 2006) pudiera explicarse por acción directa de las poliaminas sobre el embrión, fue primero necesario estandarizar el sistema de cultivo de embriones postimplantacionales desarrollado por el grupo de New (New y cols., 1976a, b; New, 1978).

Paralelo a la estandarización del modelo, hubo necesidad de implementar y adaptar un método de análisis y comparación del crecimiento y desarrollo embrionarios, para lo cual, en ensayos previos, se cultivaron embriones de 9.5 días de edad gestacional por 48 h, o de 10.5 días por 24 h, y se compararon contra embriones de rata de 11.5 días de edad gestacional, con el uso de los esquemas propuestos por Brown y Fabro (1981) y Klug y cols., 1985. Estos resultados previos (no mostrados) indicaron que, en las condiciones de la FES Iztacala, que obviamente no pueden competir con las de primer mundo, es mejor cultivar embriones de 10.5 días gestacionales por 24 h. De ambos esquemas, se prefirió trabajar con el de Klug y cols. (1985), ya que, además de ser más sencillo, fue primeramente descrito para ratas *Wistar*.

De acuerdo a la literatura, los embriones de 11 días de edad gestacional muestran de 21 a 33 somitas en las regiones torácica y lumbar; aparecen los primordios de las extremidades anteriores, seguidos aproximadamente medio día después por los primordios de las extremidades posteriores; aparecen los arcos branquiales tercero y cuarto; son reconocibles los procesos medial y lateral nasal;



las fosas nasales se forman; los senos cervicales comienzan a desarrollarse (Beaudoin, 1980).

En el sistema nervioso central, se presentan cinco vesículas cerebrales: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo; el neuroporo anterior se cierra primero, y muy cercanamente después se cierra el neuroporo posterior; las vesículas ópticas comienzan a formar dos capas: las placodas ópticas; las vesículas ópticas se cierran y los conductos endolinfáticos surgen; las placodas olfatorias aparecen, y comienzan a transformarse en fosas nasales; el proceso de Rathke hace contacto con el *infundibulum*; formando el primordio de la hipófisis; en el diencefalo el hipotálamo se puede diferenciar del área talámica dorsal (Beaudoin, 1980).

Con respecto al sistema circulatorio, los arcos aórticos III y IV están bien desarrollados; los arcos I y II están en regresión; se empieza a formar el *septum* interventricular y el *septum primum* aparece en el atrio (Beaudoin, 1980).

En las condiciones de este estudio, los embriones de 10.5 días de edad gestacional incubados 24 h en medio normal crecen de manera natural, y muchas de las estructuras descritas en los párrafos anteriores son reconocibles. Una somera comparación con la literatura (ver tabla 4) mostró que los resultados obtenidos de longitud cefalocaudal, longitud de cabeza, diámetro de saco vitelino y número de somitas son similares a los reportados por otros autores para embriones normales, ya sea que en dichos trabajos se estudie el efecto de la hiperglucemia, factores embrioprotectores, o sustancias teratogénicas. La comparación no pretende ser exhaustiva, sólo se incluyen los trabajos de los últimos cinco años que pudieron ser rescatados de la red.

Una inspección de esos resultados y los aquí reportados indica que no existe una clara correlación entre un parámetro y otro: autores que muestran la longitud cefalocaudal más elevada indican un número de somitas modesto (p. ej. Andrews y cols., 2004), y para quienes obtienen un mayor número de somitas, la longitud de la cabeza no es mayor (p. ej. Liu y cols., 2006).

**Tabla 4. Comparación del crecimiento *in vitro* de embriones de 9.5 días de edad gestacional por 48 h, o de 10.5 por 24 h, reportado por otros autores.**

Longitud cefalocaudal (mm)	Número de somitas	Longitud de la cabeza (mm)	Diámetro del saco vitelino (mm)	Referencia
4.0 ± 0.04	25.5 ± 0.4	2.0 ± 0.04	—	Andrews y cols., 2004
3.0 ± 0.21	23.9 ± 1.5	—	—	Brown-Woodman y cols., 2004
3.3 ± 0.3	22.4 ± 1.5	—	4.4 ± 0.5	Chan y cols., 2001
3.2 ± 0.5	20.5 – 23.0	—	4.0 ± 0.5	Chan y cols., 2002
3.0 – 3.4	20 – 22	—	3.5 – 4.1	Chan y cols., 2004
3.0 – 3.5	20.3 – 22	—	3.8 – 4.2	Chan y cols., 2006
3.42 – 3.74	25 – 27	—	4.31 – 4.7	Klug y cols., 2001
3.88 ± 0.51	31.1 ± 1.11	1.85 ± 0.31	5.29 ± 0.48	Liu y cols., 2006
3.93 ± 0.16	24.9 ± 0.57	1.82 ± 0.11	4.37 ± 0.27	Menegola y cols., 2001
3.0 ± 0.07	26.5 ± 0.47	—	—	Ulger y cols., 2004
3.88 ± 0.25	25.6 ± 1.17	2.04 ± 0.14	—	Usami y cols., 2002
3.8 ± 0.05	29.9 ± 0.2	—	—	Wentzel y cols., 2003
3.7 ± 0.1	29.3 ± 0.4	—	—	Wentzel y Eriksson, 2005
<b>3.66 ± 0.09</b>	<b>27.3 ± 0.47</b>	<b>1.93 ± 0.05</b>	<b>4.66 ± 0.09</b>	<b>Este trabajo</b>

Una raya significa que los autores no cuantificaron el parámetro referido. Se muestra el resultado reportado por los autores para el grupo control, en la primera o segunda tabla.

En conjunto, la comparación de los datos obtenidos con respecto a los de otros autores, apoya la noción de que el crecimiento y desarrollo embrionario *in vitro* son una aproximación adecuada al crecimiento y desarrollo normales: las medidas morfométricas que aquí se reportan son similares a las previamente señaladas por diversos grupos, considerando que los autores utilizan diversas cepas de ratas, que existen diferencias en la infraestructura, y que los objetivos de estudio de los grupos de investigación son diversos.

Cabe hacer notar que algunos autores no toman en cuenta todos los parámetros morfométricos. Algunos de ellos sólo miden dos o tres, y sólo en dos estudios se determinan los cuatro parámetros. Hay que tomar en cuenta también que aunque en la mayoría de los estudios se reportan el promedio y la desviación estándar, en algunos se reporta el intervalo.

El cultivo de embriones de rata en medio normal permite un crecimiento de los embriones un poco menor que el crecimiento *in vivo*, lo cual no es sorprendente. Esto ha sido reportado previamente por numerosos autores, y se debe a que las condiciones en cultivo mimetizan de manera incompleta el medio en el cual los embriones crecen de manera natural. Sin embargo, el modelo de cultivo de embriones de roedor *in vitro* permite el estudio del desarrollo embrionario y el metabolismo a través de la organogénesis, y provee un sistema adecuado para la manipulación del desarrollo (Ellington, 1997).

A pesar de sus limitantes, este modelo permite estudiar aisladamente un probable factor o mecanismo, lo cual en condiciones *in vivo*, es más difícil; además de que se pueden introducir manipulaciones que en sistemas *in vivo* serían imposibles de realizar (Ellington, 1997).

Por otra parte, no se puede realizar una comparación entre el registro morfológico obtenido por diversos investigadores y el aquí reportado para embriones cultivados en medio normal, ya que en algunos casos (Anderson y cols., 2004; Liu y cols., 2006; Menegola y cols., 2001; Usami y cols., 2002) se utiliza el esquema de Brown y Fabro (1981), mientras que en otros (Klug y cols.,

2001) se emplea el método de Klug y cols. (1985), y hay quienes emplean el reportado para embriones de ratón (Chan y cols., 2001, 2002, 2004, 2006; Ulger y cols., 2004). Aún más, hay autores que no utilizan ninguno de los esquemas propuestos, pero en su lugar manejan valores de acuerdo a su propio criterio (Brown-Woodman y cols., 2004), o indican el porcentaje de malformaciones considerando los embriones cultivados como el 100% (Wentzel y cols., 2003).

De esta forma, hay grupos de investigación que reportan como normal un registro de 35 – 37 (Klug y cols., 2001), mientras otros consideran normal un valor de  $57.7 \pm 0.87$  (Ulger y cols., 2004). En este trabajo se empleo el de Klug y cols. (1985), ya que este grupo utiliza ratas *Wistar*, que son de la misma cepa que las que proporciona esta facultad; mientras que otros investigadores utilizan otras cepas.

Por último, con respecto a la cantidad de proteínas embrionarias, en sólo tres estudios de los incluidos en la tabla 4 se determinaron, obteniendo valores de 165 – 214 (Klug y cols., 2001);  $204.43 \pm 28.26$  (Menegola y cols., 2001) y  $160.5 \pm 7.41$   $\mu\text{g}/\text{embrión}$  (Ulger y cols., 2004). Klug y cols. (2001) no indican el método que utilizan; Menegola y cols. (2001) estiman las proteínas por el método de Bradford, y Ulger y cols. (2004) por el de Lowry. El método empleado también puede afectar los resultados obtenidos. El valor promedio que se obtuvo en este trabajo,  $208.1 \pm 86.0$ , es muy cercano al de Menegola y cols. (2001), y se traslapa con el intervalo reportado por Klug y cols. (2001). Por otra parte, como se demuestra en el artículo de Brown y Fabro (1981), este parámetro es muy variable, y sólo da una indicación cuando se analiza en conjunto con las determinaciones morfométricas y el registro morfológico.

**Efecto de L-arginina y poliaminas sobre el crecimiento y desarrollo embrionario *in vitro*.** Debido a que se ha demostrado que las poliaminas juegan un papel importante en el desarrollo embrionario temprano de mamíferos (Heald, 1979; Mannen y cols., 1983; Méndez y cols., 1983), y nuestro grupo de trabajo encontró que las poliaminas manifiestan un papel protector sobre la

embriotoxicidad causada por la diabetes mellitus; aunado al hecho de que dichos efectos embrio-protectores no son del todo mediados por la economía materno-placentaria (Méndez e Higareda, 2006), pareció sugestiva la idea de probar el papel que las poliaminas pudieran tener sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.

Por estas razones, se planteó la suplementación de medio de cultivo “hiperglucémico” con las poliaminas o su precursor, la L-arginina. Esta estrategia experimental, como se ha mencionado, aporta evidencia sustancial acerca de los mecanismos mediante los cuales los factores teratogénicos ejercen sus efectos nocivos sobre la progenie; pero también es un acercamiento muy utilizado para poder estudiar el posible efecto protector de sustancias o moléculas antiteratogénicas sobre la diabetes mellitus (hiperglucemia) o sobre otros factores teratogénicos.

En la búsqueda de protección contra los efectos nocivos que causa la glucosa en concentraciones elevadas sobre los embriones en cultivo, se ha demostrado que el *mio*-inositol (Baker y cols., 1990); las prostaglandinas (Baker y cols., 1990; Goto y cols., 1992); los inhibidores de aldosa-reductasa (Hashimoto y cols., 1990); las enzimas depuradoras de radicales libres (Eriksson y Borg, 1991, 1993; Wentzel y Eriksson, 1998); la N-acetil-cisteína, un antioxidante (Wentzel y cols., 1997, 2003); el ácido araquidónico (Wentzel y Eriksson, 1998); la vitamina C (Wentzel y Eriksson, 1998; Zaken y cols., 2001); la vitamina E (Zaken y cols., 2001); y el ácido fólico (Wentzel y Eriksson, 2005) protegen a embriones de rata o ratón en cultivo de los efectos dismorfogénicos de la glucosa en exceso.

En el presente trabajo, se demostró que las poliaminas tienen un efecto embrio-protector profundo, corroborado tanto por las medidas morfométricas obtenidas (longitud cefalocaudal, longitud de la cabeza, diámetro de saco vitelino, número de somitas), como por el registro morfométrico. Al comparar las medidas morfométricas y el registro morfológico, se puede observar que hay una correlación muy cercana entre unas y otras, lo que apoya la argumentación anterior: el grupo control muestra valores muy cercanos a los descritos por Brown

y Fabro (1981) y por Klug y cols. (1985) para mediciones y desarrollo, y que, como se señaló, está dentro del intervalo de otros autores para registro y medidas.

Por otra parte, con respecto a los embriones cultivados en medio suplementado con glucosa, el desarrollo (registro) y el crecimiento (medidas morfométricas) son los mas bajos, lo que correlaciona con el cúmulo de evidencia, tanto clínica, como experimental *in vivo* e *in vitro*, que señala que la diabetes mellitus mal controlada, la hiperglucemia experimental, o la incubación de embriones en medio con elevada glucosa, produce en la progenie alteración del crecimiento (productos con bajo peso al nacer o fetos menos desarrollados) y del desarrollo (malformaciones en neonatos o en fetos; dismorfogénesis en cultivo) (Eriksson y cols., 2003).

La determinación de proteínas embrionarias, si bien no mostró diferencias significativas, apoya este razonamiento: la incubación por 24 h en presencia de glucosa, causa una tendencia a la disminución (cerca del 40%) en el contenido de proteínas del embrión. Esta tendencia a la disminución, tomada en conjunto con los datos morfométricos y el registro morfológico, demuestran que la glucosa afecta sobremanera el desarrollo embrionario.

La incubación de los embriones en medio glucosado y suplementado con arginina, mostró, como nuestro grupo había reportado (Méndez y Palomar-Morales, 1999; Méndez e Higareda, 2006), que este aminoácido protege parcialmente a los embriones de los efectos dismorfogénicos que causa la diabetes mellitus. Sin embargo, un resultado sorprendente fue que, en los estudios *in vivo* previos, la L-arginina mostró un efecto mayor que el de las poliaminas, mientras que en este trabajo, sólo mejora ligeramente el desarrollo y el crecimiento, con respecto al grupo diabético, mientras que las poliaminas tienen un mayor efecto. Una explicación puede ser que, en los estudios previos, el efecto observado del aminoácido sobre el desarrollo embrionario sea la suma o cooperación del efecto secretagogo que tiene sobre las células  $\beta$  pancreáticas (Grill y Herberg, 1983; Nogowski y Nowak, 1986), y el efecto producido por las

poliaminas, como resultado del metabolismo de este  $\alpha$ -amino ácido; mientras que en este trabajo, debido a que no hay participación materna directa, el primer efecto no se presenta.

En animales de granja, utilizando modelos de desnutrición y sobrenutrición, se ha demostrado que la L-arginina es transformada en placenta y fluidos de anexos embrionarios a poliaminas y óxido nítrico, que a su vez contribuyen a incrementar la angiogénesis placentaria, lo que produce un aumento en el flujo sanguíneo feto-placentario, y ayuda a un aporte adecuado de nutrientes y oxígeno al feto, y mantiene un crecimiento y desarrollo fetal adecuado: la inhibición de la vía de síntesis de poliaminas y óxido nítrico, o la disminución de la L-arginina en la dieta causa una alteración de este proceso fisiológico; la realimentación de las hembras gestantes desnutridas aumenta los niveles de poliaminas en fluidos fetales y maternos (Kwon y cols., 2004; Wu y cols., 2004, 2006). Estos hallazgos, si bien por un lado apoyan que las poliaminas son importantes para el desarrollo embrionario y fetal, por otra parte aportan una posible explicación al hecho de que, en el modelo de cultivo *in vitro*, la L-arginina, a pesar de haber sido empleada en dosis mayor que las poliaminas, muestre un efecto menor: durante la organogénesis y la neurulación de la rata, la placenta aún no está formada, y tal vez la L-arginina no sea completamente metabolizada a moléculas biológicamente activas como son las poliaminas y el óxido nítrico.

En este trabajo, los efectos embrioprotectores encontrados para las poliaminas muestran concordancia con los previamente demostrados (Méndez y Palomar-Morales, 1999): el orden de efecto es espermina > espermidina > putrescina; es decir, a mayor longitud de la poliamina o a mayor número de grupos amino cargados positivamente, el efecto es mayor.

En roedores, el metabolismo de poliaminas es importante para el desarrollo embrionario temprano: la inhibición de la ODC, la enzima clave de la biosíntesis de poliaminas, detiene o retarda el desarrollo embrionario preimplantacional (Fozard y cols., 1980b; Luzzani y cols., 1982; Mannen y cols., 1983; Méndez y cols., 1983).

Sin embargo, poca atención se ha prestado al hallazgo de que el metabolismo de poliaminas es necesario también para el desarrollo embrionario en la etapa de organogénesis y neurulación (Fozard y cols., 1980a). La actividad de la ODC aumenta dramáticamente en embriones de rata el día 10.5 de desarrollo embrionario intrauterino (Huber y Brown, 1982), en la cual no existe crecimiento tisular rápido o proliferación celular elevada, pero que, como se ha remarcado, corresponde con la neurulación.

Recientemente, se ha reportado que, para roedores, la inhibición de la ODC placentaria produce retraso del desarrollo (Ishida y cols., 2002), mientras que la deficiencia de arginina en la dieta causa retraso del desarrollo, e incrementa el riesgo de reabsorción fetal y mortalidad perinatal en ratas (Vosatka y cols., 1998), lo cual apoya la idea de que un mecanismo similar al descrito en animales de granja pudiera ocurrir en roedores.

Por otra parte, durante la organogénesis y la neurulación, en embriones de ratas diabéticas gestantes, se reportó que la actividad de ODC y las concentraciones de poliaminas disminuyen drásticamente en comparación con las encontradas en embriones de gestación no diabética (Bengtsson y cols., 1994). En embriones de rata *in vivo*, durante la etapa de neurulación/organogénesis, las actividades de ODC y SAMDC muestran un importante incremento, al igual que las concentraciones de cada una de las poliaminas; tanto las actividades enzimáticas como las concentraciones de poliaminas se reducen al comenzar la etapa fetal, cuando la diferenciación tisular termina, y comienza la de crecimiento fetal (Russell y McVicker, 1972). La administración de DFMO a ratas y conejas durante la organogénesis produce toxicidad en el desarrollo, sin provocar toxicidad materna. En ambas especies produce disminución de peso fetal, y pérdida de gestación, de manera dependiente de la dosis, sin provocar malformaciones (Kirchner y cols., 1999).

La parte fetal de la placenta es un participante crucial de estos eventos: de los días 10 a 12 de desarrollo (correspondientes a los días 9 a 11 de acuerdo a



nuestro sistema) la actividad de ODC se incrementa en la placenta, siendo más evidente en la parte fetal que en la materna (Guha and Jänne, 1976). En los días posteriores, la actividad de ODC disminuye, tanto en fetos como en placentas (Williams y McAnulty, 1976). La inhibición de la actividad de ODC durante la organogénesis causa una disminución del desarrollo (O'Toole y cols., 1989). Estos hallazgos apoyan la idea de que las poliaminas son importantes durante las fases de organogénesis y neurulación en mamíferos, y sustentan los resultados encontrados.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la elevada frecuencia de malformaciones y pérdida de gestación provocadas por la diabetes mellitus, pudiera ser la inducción de apoptosis o muerte celular programada en los embriones de embarazo diabético por la hiperglucemia (Moley, 2001). Recientemente, se encontró que en embriones de ratas diabéticas existe disminución de la expresión de los factores antiapoptóticos *Pax-3* y *Akt*, y activación de la expresión del factor proapoptótico *Bax* y de la enzima caspasa-3 (Reece y cols., 2005). Otros autores encontraron disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica *Bcl-2* y aumento de la expresión de *Bax* y p53, al igual que aumento en la actividad de caspasa-3, en embriones de ratas diabéticas *in vivo* y en embriones cultivados en presencia de glucosa elevada (Gäreskog y cols., 2007). Se ha postulado que las poliaminas pudieran inhibir o reducir la apoptosis en diversos sistemas, por unión a macromoléculas por enlaces iónicos, formación de enlaces covalentes por acción enzimática, o por depuración de ERO (Seiler y Raul, 2005).

Existe evidencia experimental de que las poliaminas se unen y estabilizan macromoléculas, tales como ácidos nucleicos y proteínas. La interacción de las poliaminas con los ácidos nucleicos, mediada por interacciones electrostáticas entre los grupos amino cargados positivamente de las poliaminas y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos es importante para estabilizar las estructuras de la cromatina, el tRNA, el rRNA, y procurar una buena función celular. Se sabe que el

efecto de la espermina sobre la estabilización molecular es mayor entre las tres poliaminas, y que el de la putrescina es el menor (Bachrach, 2005).

Por otra parte, la espermidina, pero no la espermina ni la putrescina, es precursor de un residuo especial llamado hipusina, presente en el factor de iniciación de la traducción proteica de eucariotes 5A (eIF-5A), y si se inhibe la producción de la hipusina, se detiene o arresta el crecimiento y división celular (Bachrach, 2005; Jänne y cols., 2004; Seiler y Raul, 2005). Probablemente esta sea la razón de que, en este estudio, se encontró que la incubación con espermidina en el medio de cultivo produce una mayor tendencia al aumento de la cantidad de proteínas embrionarias, que las otras dos poliaminas.

Por último, las poliaminas son depuradores endógenos de ERO, por lo cual pueden proteger al DNA, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo (Das y Misra, 2004; Ha y cols., 1998). En la diabetes mellitus mal controlada o no controlada, existe una producción excesiva de ERO, debido a oxidación incompleta de la glucosa (Ha y Lee, 2000). Se ha propuesto que esta sobreproducción de ERO es causante de los daños dismorfogénicos que la diabetes mellitus produce sobre los embriones *in vivo* e *in vitro* (Eriksson y Borg, 1991, 1993; Eriksson y cols., 2003; Ornoy y cols., 1999; Reece y Eriksson, 1996; Reece y cols., 1996; Wentzel y cols., 1997, 2003; Wentzel y Eriksson, 1998, 2005; Zaken y cols., 2001).

En roedoras diabéticas gestantes o en cultivo, se ha demostrado que las enzimas depuradoras de radicales libres (Eriksson y Borg, 1991, 1993; Wentzel y Eriksson, 1998), la N-acetil-cisteína (Wentzel y cols., 1997, 2003), la vitamina C (Wentzel y Eriksson, 1998; Zaken y cols., 2001) y la vitamina E (Zaken y cols., 2001) protegen a los embriones de los efectos dismorfogénicos de la glucosa en exceso, a causa de sus propiedades antioxidantes. Es probable que los efectos embrioprotectores de las poliaminas aquí observadas sean debidos a sus propiedades antioxidantes (Das y Misra, 2004; Ha y cols., 1998), lo que se apoya por el orden de acción: mayor para espermina que para espermidina, y para ésta

que para putrescina: a más número de grupos amino, mayor capacidad depuradora de radicales libres.

## CONCLUSIONES

1. Los embriones de rata de 10 días de edad gestacional cultivados en medio normal por 24 horas crecen un poco menos que los embriones *in utero*, lo cual está considerado como aceptable.

2. La incubación de los embriones en medio suplementado con glucosa 500 mg/dL causa una elevada frecuencia de dismorfogénesis y un retraso del crecimiento.

3. La adición de L-arginina 10 mM a medio suplementado con glucosa revierte parcialmente los daños sobre el desarrollo y el crecimiento que provoca el azúcar.

4. La adición de poliaminas 25  $\mu$ M a medio suplementado con glucosa revierte casi totalmente los efectos deletéreos del azúcar.

5. El orden de acción de las poliaminas es espermina > espermidina > putrescina, lo que está de acuerdo con resultados previos de nuestro grupo y de otros.

6. El mecanismo de acción de las poliaminas pudiera ser a través de regulación de la apoptosis, por estabilización de la estructura de macromoléculas, por estimular la síntesis de proteínas, o por depuración de ERO.

7. La L-arginina pudiera tener un menor efecto debido tal vez a que es necesaria para la síntesis de poliaminas y NO, y a que se requiere la participación maternoplacentaria para estos procesos.

**Este trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en el Laboratorio de Biorregulación y Diabetes Mellitus, bajo la asesoría del Doctor Martín Palomar Morales.**

**El Proyecto tuvo apoyo económico de la División de Investigación y Postgrado de la FES Iztacala (PAPCA 2003); de la Unidad de Morfología y Función de la FES Iztacala y del PAPIIT (proyecto IN-205103).**

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza (ANalysis Of VAriance)
ARG	L-Arginina
DFMO	$\alpha$ -DiFluoro Metil Ornitina
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus de tipo 1
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DNA	Ácido DesoxirriboNucleico
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
GLC	Glucosa
GSH	Glutación reducido
NO	Oxido Nítrico
ODC	Ornitina DesCarboxilasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAO	PoliAmina Oxidasa
PUT	Putrescina
RNA	Ácido RiboNucleico
rRNA	Ácido RiboNucleico ribosomal
SAMDC	S-Adenosil-Metionina- Descarboxilasa
SPD	Espermidina
SPM	Espermina
tRNA	Ácido RiboNucleico de transferencia.

## REFERENCIAS

Andrews, J.E.; Nichols, H.P.; Schmid, J.E.; Mole, L.M.; Hunter, E.S. III; Klinefelter, G.R. (2004). Developmental toxicity of mixtures: the water disinfection by-products dichloro- dibromo- and bromochloro acetic acid in rat embryo culture. *Reprod. Toxicol.* 19: 111-116.

Akashi, M.; Akazawa, S.; Akazawa, M.; Trocino, R.; Hashimoto, M.; Maeda, Y.; Yamamoto, H.; Kawazaki, E.; Taino, H.; Yokota, A. (1991). Effects of insulin and myo-inositol on embryo growth and development during early organogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 40: 1574-1579.

American Diabetes Association. (2004). Diagnosis and classification of diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 27 (suppl): s5-s10.

Baker, L.; Piddington, R.; Goldman, A.; Eagler, J.; Moehring, J. (1990). Myo-inositol and prostaglandins reverts the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos. *Diabetologia* 33: 593-596.

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

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

Barker, D.J.P.; Fall, C.H.D. (1993). Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch. Dis. Child.* 68: 797-799.

Beaudoin, A.R. (1980). Embryology and teratology. En: Baker, H.J.; Lindsey, J.R.; Wesibruth, S.H. (editors). The laboratory rat. Vol. II, Academic Press, San Diego, CA, USA. 75-101.

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

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microquantities of protein. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.

Brown, N.A.; Fabro, S. (1981). Quantitation of rat embryonic development in vitro: A morphological scoring system. *Teratology* 24: 65-78.

Brown-Woodman, P.D.C.; Ritchie, H.E.; Korabelnikoff, A.; Emmanuel, C. (2004). Replacement of ether with alternative volatile anesthetics for collection of rat serum used in embryo culture. *Toxicol. In Vitro* 18: 719-724.

Buchanan, T.A.; Denno, K.M.; Sipos, G.F.; Sadler, T.W. (1994). Diabetic teratogenesis: in vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution of glucose per se. *Diabetes* 43: 656-660.

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

Chan, L.Y.-S.; Chiu, P.-Y.; Lau, T.-K. (2001). A study of hypericin-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model. *Fertile. Steril.* 76: 1073-1074.

Chan, L.Y.-S.; Chiu, P.Y.; Siu, N.S.S.; Wang, C.C.; Lau, T.K. (2002). Diclofenac-induced embryotoxicity is associated with increased embryonic 8-isoprostaglandin F<sub>2α</sub> level in rat whole embryo culture. *Reprod. Toxicol.* 16: 841-844.

Chan, L.Y.; Chiu, P.Y.; Lau, T.K. (2004). Embryotoxicity study of ginsenoside R<sub>c</sub> and R<sub>e</sub> in in vitro rat whole embryo culture. *Reprod. Toxicol.* 19: 131-134.

Chan, L.Y.; Lau, T.K. (2006). Effect of rosiglitazone on embryonic growth and morphology: a study using a whole rat embryo culture model. *Fertil. Steril.* 86: 490-492.

Cockroft, D.L.; Coppola, P.T. (1977). Teratogenic effects of excess glucose on head-fold rat embryos in culture. *Teratology* 16: 141-146.



Connell, F.A.; Vadheim, C.; Emanuel, I. (1985). Diabetes in pregnancy: A population-based study of incidence, referral for care, and perinatal mortality. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151: 598-603.

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

Ellington, S.K.L. (1987). Development of rat embryos cultured in glucose-deficient media. *Diabetes.* 36: 1372-1378.

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

Eriksson, U.J.; Borg, L.A.H. (1991). Protection by free oxygen radical enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* 34: 325-331.

Eriksson, U.J.; Borg, L.A.H. (1993). Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* 42: 411-419.

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

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

Fozard, J.R.; Part, M.L.; Nellikunja, J.P.; Grove, J. (1980a). Inhibition of murine embryonic development by  $\alpha$ -difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *Eur. J. Pharmacol.* 65: 379-391.

Fozard, J.R.; Part, M.L.; Prakash, N.J.; Grove, J.; Schechter, P.J.; Sjoerdsma, A.; Koch-Weser, J. (1980b). L-ornithine decarboxylase: an essential role in early mammalian embryogenesis. *Science* 208: 505-509.

Freinkel, N.; Metzger, B.E.T. (1979). Pregnancy as a tissue culture experience. The critical implications of maternal metabolism for fetal development. En: Pregnancy, metabolism, diabetes and the fetus. CIBA Foundation symposium no. 63. Amsterdam; *Excerpta Médica*, pp. 3-23.

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

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

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

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

Gilbert, S.F. (1994). Developmental biology. Sinauer Associates. Sunderland, MA, USA. 4a. ed., pp. 633-642.

Goto, M.P.; Goldman, A.S.; Uhing, M.R. (1992). PGE<sub>2</sub> prevents anomalies induced by hyperglycemia or diabetic serum in mouse embryos. *Diabetes* 41: 1644-1650.

Grill, V.; Herberg, L. (1983). Glucose and arginine-induced insulin and glucagon responses from the isolated perfused pancreas of the BB-Wistar diabetic rat.

Evidence for selective impairment of glucose regulation. *Acta Endocrinol.* 102: 561-566.

Guha, S.K.; Jänne, J. (1976). The synthesis and accumulation of polyamines in reproductive organs of the rat during pregnancy. *Biochim. Biophys. Acta* 437: 244-252.

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

Hashimoto, M.; Akazawa, S.; Akazawa, M.; Akashi, M.; Yamamoto, H.; Maeda, Y.; Yamaguchi, Y.; Yamasaki, H.; Tahara, D.; Nakanishi, T.; Nagataki, S. (1990). Effect of hyperglycemia on sorbitol and myo-inositol content of cultured embryos: treatment with aldose reductase inhibitors and myo-inositol supplementation. *Diabetologia* 33: 597-602.

Heald, P.J. (1979). Changes in ornithine decarboxylase during early implantation in the rat. *Biol. Reprod.* 20: 1195-1199.

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

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

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

Jänne, J.; Alhonen, L.; Pietilä, M.; Keinänen, T.A. (2004). Genetic approaches to cellular functions of polyamines in mammals. *Eur. J. Biochem.* 271: 877-894.

Kirchner, D.L.; Mercieca, M.D.; Crowell, J.A.; Levine, B.S. (1999). Developmental toxicity studies of 2-(difluoromethyl)-dl-ornithine (DFMO) in rats and rabbits. *Toxicol. Sci.* 50: 127-135.

Klug, S.; Lewandowski, C.; Neubert, D. (1985). Modification and standardization of the culture of early postimplantation embryos for toxicological studies. *Arch. Toxicol.* 58: 84-88.

Klug, S.; Merker, H.-J.; Jäckh, R. (2001). Effects of ethylene glycol and metabolites on in vitro development of rat embryos during organogenesis. *Toxicol. In Vitro* 15: 635-642.

Kwon, H.; Ford, S.P.; Bazer, F.W.; Spencer, T.E.; Nathanielsz, P.W.; Nijland, M.J.; Hess, B.W.; Wu, G. (2004). Maternal nutrient restriction reduces concentrations of amino acids and polyamines in ovine maternal and fetal plasma and fetal fluids. *Biol. Reprod.* 71: 901-908.

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

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

Liu, P.; Yin, H.; Xu, Y.; Zhang, Z.; Chen, K.; Li, Y. (2006). Effects of ginsenoside Rg1 on postimplantation rat and mouse embryos cultured in vitro. *Toxicol. In Vitro* 20: 234-248.

Luzzani, F.; Colombo, G.; Galliani, G. (1982). Evidence for a role of progesterone in the control of uterine ornithine decarboxylase in the pregnant hamster. *Life Sci.* 31: 1553-1558.

Mannen, C.A.; Hood, R.D.; Farina, J. (1983). Ornithine decarboxylase inhibitors and fetal growth retardation in mice. *Teratology.* 28: 237-242.

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

Mehrotra, P.K.; Kitchlu, S.; Farheen, S. (1997). Effects of inhibitors of enzymes involved in polyamine biosynthesis pathway on pregnancy in mouse and hamster. *Contraception*. 57: 55-60.

Méndez J.C.C.; Higareda A.J.C. (2006). Participación de las especies reactivas de oxígeno en la teratogenesis causada por diabetes mellitus y protección por poliaminas. Tesis. Licenciatura en Biología, FES Iztacala, UNAM, 78 pp.

Méndez, J.D.; Díaz-Flores, M.; Durán, G.; Hicks, J.J. (1983). Inhibition of rat embryonic development by the intrauterine administration of  $\alpha$ -difluoromethylornithine. *Contraception* 28: 93-98.

Méndez, J.D.; Palomar-Morales, M. (1999). Embryotoxicity for diabetes induced in rat: prevention for L-arginine and polyamines. *Reprod. Toxicol.* 13(6): 501-509.

Méndez, J.D.; Ramos, H.G. (1994). Animal models in diabetes research. *Arch. Med. Res.* 25: 367-375.

Mendez, J.D.; Zarzosa, E. (1997). Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43: 311-318.

Menegola, E.; Broccia, M.L.; Di Renzo, F.; Giavini, E. (2001). Antifungal triazoles induce malformations in vitro. *Reprod. Toxicol.* 15: 421-427.

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

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

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

Morgan, D.M.L. (1999). Polyamines: an overview. *Mol. Biotechnol.* 11: 229-250.

Mulder, E.J.H.; Visser, G.H.A. (1992). Impact of early growth delay on subsequent fetal growth and functional development: a study on diabetic pregnancy. *Early Hum. Develop.* 31: 91-95.

Muzikova, E.; Clark, D.A. (1995). Polyamines may increase the percentage of in-vitro fertilized murine oocytes that develop into blastocysts. *Human. Reprod.* 10: 1172-1177.

New, D.A.T.; Coppola, P.T.; Cockroft, D.L. (1976a). Comparison of growth in vitro and in vivo of post-implantation rat embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 36: 133-144.

New, D.A.T.; Coppola, P.T.; Cockroft, D.L. (1976b). Improved development of head-fold rat embryos in culture resulting from low oxygen and modifications of the culture serum. *J. Reprod. Fert.* 48: 219-222.

New, D.A.T.; Coppola, P.T.; Terry, S. (1973). Culture of explanted rat embryos in rotating tubes. *J. Reprod. Fert.* 35: 135-138.

New, D.A.T. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.* 53: 81-122.

Nogowski, L.; Nowak, K.W. (1986). Arginine, administered in various ways, as a stimulator of insulin secretion in the rabbit. *Horm. Metab. Res.* 18: 730-733.

O'Toole, B.; Huffman, K.W.; Gibson, J.P. (1989). Effects of eflornithine hydrochloride (DFMO) on fetal development in rats and rabbits. *Teratology* 39: 103-113.

Ornoy, A.; Zaken, V.; Kohen, R. (1999). Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology* 60: 376-386.

Pau, M.Y.; Milner, J.A. (1981). Arginine deficiency during gestation and lactation in the rat. *J. Nutr.* 111: 184-193.

Pearson, J.F. (1993). Pregnancy and complicated diabetes. *Br. J. Hosp. Med.* 49: 739-742.

Pedersen, J.F.; Mølsted-Pedersen, L. (1979). Early growth retardation in diabetic pregnancy. *Br. Med. J.* 1: 18-19.

Pedersen, J.F.; Mølsted-Pedersen, L. (1981). Early fetal growth delay detected by ultrasound marks increased risk of congenital malformations in diabetic pregnancy. *Br. Med. J.* 283: 269-277.

Ramírez-Torres, M.A.; Barranco, J.A.; Espinosa de los Monteros, M.A.; Shor, P.V.; Cornejo, J.; Karchmer, S.; Parra, A. (1992). Alteración del metabolismo de la glucosa durante la gestación: Experiencia institucional. *Ginec. Obstet. Méx.* 60: 217-225.

Reece, E.A.; Eriksson, U.J. (1996). The pathogenesis of diabetes-associated malformations. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 23: 29-45.

Reece, E.A.; Homko, C.; Wu, Y.K.; Wiznitzer, A. (1993). Mezclas energéticas metabólicas y embriopatía por diabetes. *Clin. Perinatol.* (version en español) 20: 521-536.

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

Reece, E.A.; Homko, C.J.; Wu, Y.K. (1996). Multifactorial basis of the syndrome of diabetic embryopathy. *Teratology* 54: 171-182.

Reece, E.A.; Ma, X.-D.; Zhao, Z.; Wu, Y.-K.; Dhanasekaran, D. (2005). Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy in rats: II. Apoptotic pathways. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192: 967-972.

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

Russell, D.H.; McVicker, T.A. (1972). Polyamines in the developing rat and in supportive tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 259: 247-258.

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

Sadler T.W.; Hunter, E.S.; Wynn, R.E.; Phillips, L.S. (1989). Evidence for multifactorial origin of diabetes-induced embryopathies. *Diabetes* 38: 70-74.

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

Seiler, N. (2004). Catabolism of polyamines. *Amino Acids.* 26: 217-233.

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

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

Simán, C.M.; Eriksson, U.J. (1997). Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* 46: 1054-1061.



Steel, J.M.; Wu, P.S.; Johnstone, F.D.; Muir, B.B.; Sweeting, V.M.; Hillier, S.G. (1985). Does early growth delay occur in diabetic pregnancy? *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 102: 224-227.

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

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

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

Thomas, T.; Thomas, T.J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutical applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 244-248.

Travers, J.; Pratten, M.; Beck, F. (1989). Effects of low insulin levels on rat embryonic growth and development. *Diabetes* 38: 773-777.

Trinder P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6: 24-27.

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

Ulger, H.; Özdamar, S.; Unur, E.; Pratten, M.K. (2004). The effect of vascular endothelial growth factor on in vitro embryonic heart development in rats. *Anat. Histol. Embryol.* 33: 334-338.

Usami, M.; Tabata, H.; Ohno, Y. (2002). Effects of methionine on selenium embryotoxicity in cultured rat embryos. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 22: 401-308.

Vosatka, R.J.; Hassoun, P.M.; Harvey-Wilkes, K.B. (1998). Dietary L-arginine prevents fetal growth restriction in rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178: 242-246.

Wentzel, P.; Ejdesjö, A.; Eriksson, U.J. (2003). Maternal diabetes in vivo and high glucose in vitro diminish GAPDH activity in rat embryos. *Diabetes* 52: 1222-1228.

Wentzel, P.; Eriksson, U.J. (1998). Antioxidants diminish developmental damage induced by high glucose and cyclooxygenase inhibitors in rat embryos in vitro. *Diabetes* 47: 677-684.

Wentzel, P.; Eriksson, U.J. (2005). A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E<sub>2</sub> in rat embryos; reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth. Defects. Res A: Clin. Mol. Teratol.* 73: 506-511.

Wentzel, P.; Thunberg, L.; Eriksson, U.J. (1997). Teratogenic effect of diabetic serum is prevented by supplementation of superoxide dismutase and N-acetylcysteine in rat embryo culture. *Diabetologia* 40: 7-14.

Williams, J.P.G.; McAnulty, P.A. (1976). Foetal and placental ornithine decarboxylase activity in the rat. Effect of maternal undernutrition. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 35: 545-559.

Wu., G.; Bazer, F.W.; Cudd, T.A.; Meininger, C.J.; Spencer, T.E. (2004). Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* 134: 2169-2172.

Wu, G.; Bazer, F.W.; Wallace, J.M.; Spencer, T.E. (2006). Intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J. Anim. Sci.* 84: 2316-2337.

Wu, G.; Morris, S.M. Jr. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336: 1-17.

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