



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“EFECTO DEL EXTRACTO DE *BUDDLEJA
CORDATA* EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO
EN RATAS DIABÉTICAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ILSE VALERIA LÓPEZ QUINTERO

DIRECTOR DE TESIS DR. MARTÍN PALOMAR MORALES



Tlalnepantla, Edo. de México 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Este trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores
Iztacala, en el laboratorio de Metabolismo de la Diabetes Mellitus
(UMF) bajo la asesoría del Dr. Martín Palomar Morales.**

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Ariadna Quintero:

Por tu apoyo incondicional, tu motivación, tu amor infinito y fortaleza. Porque me diste todo lo que necesitaba a pesar de las dificultades. Por ser una grandiosa mujer y nunca rendirte. Por siempre enseñarme que todo se puede si uno lo quiere. ¡Gracias mami eres la mejor!

A mi tío Salomón Mercado Q.E.P.D.:

Por ser como un padre para mí y estar en todo, porque en los problemas tú siempre me tendiste la mano. Por tantas pláticas, aventuras, por ser ese padre que yo necesitaba. Gracias por darme todo tu amor y apoyo. Sé que en donde quiera que estés estarás orgulloso de mí. ¡Tu gordis lo logró!

A mi tía Frida Quintero:

Por apoyarme y saber que sí podía lograrlo. Gracias por estar conmigo. Como siempre, en las buenas y en las malas puedo contar contigo.

A mis amigas Stephanie y Sacnité:

Fanny te quiero mucho, me acompañaste en esta etapa universitaria y no lo hubiera logrado sin tu amistad. Werita gracias por siempre motivarme, por creer que podía lograrlo, por ser única. Las adoro.

A Ricardo Gutiérrez:

Por acompañarme en esta etapa y saber que contigo siempre puedo contar. Gracias.

A mis profesores Martín Palomar y Gladys Chirino:

Por echarme la mano a pesar de todo, siempre estuvieron para mí. Por las pláticas motivacionales, porque nunca se rindieron conmigo. ¡Ustedes lo lograron!

A mis sinodales Rodolfo Cárdenas, Alonso Vilches y Ana Ma. García Bores

Por darme el visto bueno y ayudarme a que este trabajo se realizara.

ÍNDICE

Resumen	6
Introducción	7
1. Diabetes mellitus	7
2. Clasificación de DM	7
3. Cambios metabólicos asociados a la gestación	8
4. Estrés oxidativo y DM en embarazo	12
5. Inducción de diabetes mellitus	13
6. Especies reactivas del oxígeno (ERO)	14
7. <i>Buddleja cordata</i>	17
8. Efectos antioxidantes de <i>B. cordata</i>	18
Justificación	20
Objetivo general y particulares	21
Material y métodos	22
Resultados	25
Discusión	35
Conclusiones	38
ANEXO 1	39
Referencias	42

Abreviaturas empleadas en este trabajo

DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
EO	Estrés oxidativo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HL	Lipasa hepática
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipasa de lipoproteínas (lipoproteín-lipasa)
PL	Peroxidación lipídica
RL	Radicales libres
STZ	Estreptozotocina

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad común durante el embarazo, que causa defectos congénitos y abortos espontáneos. En México, la DM ocupa el primer lugar en número de defunciones por año. Los efectos embriotóxicos que causa la DM al parecer se deben a aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Gracias a muchos antioxidantes que existen, las ERO pueden ser neutralizadas y por consiguiente disminuir las reacciones evitando la formación de radicales libres (RL). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto de *Buddleja cordata* en el desarrollo embrionario en ratas diabéticas. En la primera etapa de esta investigación, para la selección de la dosis de extracto, se utilizaron 15 ratas hembra, las cuales, una vez preñadas, se asignaron al azar en tres grupos de 5 ratas cada uno. A dos de ellos se les suministró extracto de *B. cordata* disuelto en PBS estéril, a dosis de 50 y 100 µg/día los días 8 a 10 de desarrollo, y el restante grupo fue tratado con el vehículo. Se obtuvieron los fetos el día 19 de gestación y fueron analizados morfológicamente. Los resultados mostraron que no hay efecto embriotóxico con las dos dosis que se emplearon. En la segunda etapa se estudió el efecto del extracto de *B. cordata* sobre las malformaciones, para lo cual se utilizaron 19 ratas hembra, de la cepa Wistar, que se cruzaron con machos, y una vez preñadas, se asignaron al azar a 3 grupos de 6 a 7 individuos cada uno. El primero fue tratado con Buffer de citratos 100 mM, pH 4.5 en el día 4 de gestación, y los días 8 a 10 con DMSO, y fue considerado como testigo. El segundo grupo fue inducido con estreptozotocina (STZ) 60 mg/Kg de peso en amortiguador de citratos, el día 4 de gestación, y se les trató con DMSO los días 8 a 10 de gestación. El último grupo fue inducido con STZ 60 mg/Kg de peso en amortiguador de citratos y se trató con extracto de *B. cordata* a dosis de 50 y 100 µg/Kg de peso corporal, disuelto en DMSO, los días 8 a 10 de gestación. Se obtuvieron los fetos el día 19 de gestación y fueron analizados morfológicamente. Se obtuvo sangre de las madres para realizar pruebas a nivel de colesterol, glucosa, triglicéridos y lípidos totales. Los resultados indican que el extracto de *B. cordata* es efectivo para reducir el porcentaje y severidad de las malformaciones producidas por la STZ en ratas preñadas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que manifiesta un trastorno metabólico, el cual cursa con hiperglucemia crónica, consecuencia de una deficiencia en la secreción de insulina o en el efecto biológico de la misma (Ramos y Méndez, 1994). En su etapa inicial no produce manifestaciones muy notorias de síntomas y signos, pero cuando se detecta tardíamente y no se trata de la manera adecuada, ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura (DeFronzo, 2004). Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años (Donnelly y cols., 2000). La epidemia de la DM es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial. Se calcula que en el mundo existen más de 180 millones de personas con DM y es probable que esta cifra aumente a más del doble para 2030 (OMS, 2005). En México la edad promedio de las personas que murieron por diabetes en 2010 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años en la esperanza de vida (OMS, 2010).

1.2 Clasificación de la Diabetes mellitus

La clasificación más aceptada de la DM es la que propuso hace cerca de 20 años El Comité de Expertos (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of diabetes mellitus, 1997), y que después adoptó la American Diabetes Association.

DM tipo 1: Se caracteriza por destrucción masiva de las células β , lo que causa una deficiencia absoluta de la secreción de insulina. Las primeras manifestaciones clínicas ocurren cuando la función se ha perdido en alto grado y la insulina es necesaria para que el paciente sobreviva. En el 90% de los casos, es un proceso autoinmune que ocurre en los islotes pancreáticos, con presencia de marcadores genéticos específicos.

DM tipo 2: Se presenta en personas con un tipo de resistencia a la insulina y una respuesta de secreción de insulina inadecuada. Es la más común y representa el 90% de los casos. En esta categoría, durante un lapso prolongado y antes de que la DM sea detectada y aparezcan síntomas clínicos, puede haber hiperglucemia suficiente para causar alteraciones patológicas y funcionales en los diferentes tejidos blanco.

Diabetes mellitus gestacional (DMG): Es cualquier grado de intolerancia a la glucosa en el transcurso o primer diagnóstico durante el embarazo (Catálogo maestro de guías de práctica clínica, 2010). Según análisis realizados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (American Diabetes Association, 2014), se calcula que la prevalencia de diabetes gestacional es de 9.2%.

El padecimiento de DMG se presenta en el tercer trimestre de gestación en mujeres aparentemente sanas (The Expert Committee, 1997). Es una de las enfermedades que más repercute sobre el embarazo, debido a las alteraciones metabólicas que se producen cuando no existe un control dietético adecuado, lo cual puede incrementar la mortalidad en la mujer gestante o su hijo, así como la posibilidad de tener descendientes con malformaciones congénitas de todo tipo (Valdez y Márquez, 1989). Las mujeres que desarrollan DMG tienen alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, en los 10 años que siguen al embarazo. La exposición del feto a concentraciones elevadas de glucosa plasmática de la madre, durante el segundo y tercer trimestre, resulta en crecimiento fetal excesivo, hipoglucemia, ictericia, hipocalcemia y enfermedad por deficiencia de surfactante pulmonar en el neonato, y posteriormente, en niños y en adultos, en obesidad y diabetes (Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica IMSS, 2010). A esta condición clínica se le conoce también como fetopatía diabética.

1.3. Cambios metabólicos asociados a la gestación

Durante el embarazo, la madre debe adaptar su metabolismo para mantener las demandas nutricionales del feto. Para ello, se producen múltiples adaptaciones metabólicas, más acentuadas en los últimos meses de gestación, que están mediadas por las hormonas placentarias, especialmente el incremento de los estrógenos y el lactógeno placentario y también por el

incremento de los niveles de insulina junto a cambios de sensibilidad a la misma. Estos cambios afectan principalmente al metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos para asegurar al feto un aporte continuo de energía y nutrientes. Además, una parte de la ganancia del peso materno durante la gestación es debido a estos cambios metabólicos que implican un aumento en los depósitos de grasa, proteínas y agua en el compartimento intracelular. Estas modificaciones metabólicas se hacen más patentes al final del embarazo donde se produce el máximo crecimiento fetal y, por tanto, un aumento de la demanda de nutrientes por parte del mismo. La respuesta materna a esta necesidad es un cambio en la utilización de grasas en vez de hidratos de carbono para cubrir sus propias necesidades, lo cual es mediado por el aumento en la resistencia a la insulina y el aumento de hormonas lipolíticas. De este modo, la madre utiliza fuentes de energía alternativas a los hidratos de carbono y reserva la glucosa para el feto (Nasri y cols., 2015).

La gestación es una situación que requiere de una adaptación metabólica especial. Durante esta condición fisiológica, la unidad fetoplacentaria se desarrolla a expensas de la madre. En las diferentes etapas por las que transcurre este episodio, hay dos que desde el punto de vista metabólico se diferencian. La primera, que corresponde a los dos primeros tercios del embarazo es anabólica y el desarrollo de las estructuras fetoplacentarias es pequeño. Se caracteriza por hiperfagia que contribuye a que se incrementen los depósitos grasos de la madre. La segunda etapa es catabólica; ahora el feto crece a expensas de la madre y se produce una movilización acelerada de las reservas grasas que se incrementaron antes (Herrera, 1997). El feto no sintetiza glucosa por lo que existe una transferencia constante de este metabolito de la circulación materna a la fetal. La unidad fetoplacentaria consume hasta 50 % de la glucosa de la madre, por lo que si ésta es diabética le proporciona al feto un medio hiperglucémico, que causará estimulación del páncreas para una mayor secreción de insulina y en general a adaptaciones metabólicas para las cuales puede estar aún inmaduro (Clapés 2000).

Por otra parte, para la madre diabética, el embarazo puede generar serios trastornos que involucran también a su descendencia. Esto se debe a que en las primeras etapas de la gestación, cuando aún no se evidencian cambios en la sensibilidad frente a la insulina, el páncreas de la mujer embarazada produce mayor cantidad de esta. La adaptación del tratamiento hipoglucemiante en la embarazada diabética será difícil e imprescindible durante todo el embarazo. En el último tercio de la gestación además, se produce una resistencia generalizada a la insulina. Estos cambios se acompañan de incremento en la actividad lipolítica del tejido adiposo, por lo que llega al hígado mayor cantidad de

sustratos para la síntesis de triglicéridos, los que salen a la circulación asociados con las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Herrera 1997).

También se producen cambios en la lipasa de lipoproteínas (LPL), la cual disminuye su actividad; y en la actividad de la lipasa hepática (HL), de cuya inactivación es responsable el incremento en la cantidad de estrógeno (Montelongo y cols., 1992).

El incremento en los triglicéridos circulantes en el embarazo, potenciado también por la diabetes, hace que se incrementen la oxidación de las LDL, y otras fracciones lipídicas y productos derivados de la oxidación de los lípidos. Estos productos pueden afectar la integridad de la membrana celular y causar daños en el material genético y en órganos y sistemas que comprometen la vida de la madre y el feto (Wickens y cols., 1991).

La modificación de las LDL por acetilación, oxidación o glicosilación disminuye la secreción de progesterona de los cultivos de placenta, por lo que se vincula con los daños que puede sufrir la unidad feto placentaria y por lo tanto podrá tener implicaciones negativas para el adecuado término del embarazo, pues la sangre materna está en contacto con el trofoblasto de la placenta por perder ésta la cubierta endotelial de sus vellosidades. Se conoce que sustancias procedentes de la peroxidación lipídica (PL) inducen la formación de sustancias con actividad clastogénica y por lo tanto producen rompimientos cromosómicos. En general es importante considerar que tanto la diabetes como la gestación pueden producir estrés oxidativo (Clapés 2000). La unión de estas situaciones de adaptación metabólica pudiera estar relacionada con algunas de las complicaciones que aparecen en las mujeres con diabetes gestacional como son: preeclampsia, alteraciones de la placenta y malformaciones en la descendencia (Emerit, 1990).

El embarazo se vincula con dos alteraciones en el metabolismo de lípidos:

1. Estimulación progresiva de la lipólisis y cetogénesis conforme avanza la gestación. Datos *in vitro* indican que la lipólisis es producto de la acción de hormonas placentarias, como el lactógeno placentario humano y otras, las cuales estimulan directamente la secreción de AGL del tejido adiposo. El efecto lipolítico normalmente es contrarrestado por las acciones antilipolíticas de la insulina (Harris, 2003).
2. Aumento de la concentración circulante de triglicéridos de 1.5 a 2 veces en el tercer trimestre de la gestación. Esto parece resultar de una combinación de tres factores:

- a) Mayor concentración de AGL circulantes e hiperinsulinemia, que se combinan para promover la síntesis de triglicéridos en el hígado.
- b) Mayor ingestión de alimentos, que eleva la presencia de quilomicrones en el intestino.
- c) Disminución de la actividad de la lipasa en tejido adiposo, que causa una menor depuración de triglicéridos circulantes (Harris 2003).

El metabolismo de los hidratos de carbono durante la gestación va encaminado a satisfacer las necesidades maternas y fetales de glucosa y aminoácidos. A su vez, la glucosa es para la madre fuente de energía mediante la producción de ácidos grasos, cetonas y glicerol. En el primer trimestre del embarazo la prolactina y el lactógeno placentario estimulan la hiperplasia de los islotes de células β pancreáticas y aumentan la secreción de insulina. El mecanismo que regula esta hiperplasia no es del todo conocido; estudios en animales sugieren la mediación de otras moléculas como la serotonina o la melanina en el aumento de la masa de células β . Por tanto, durante las primeras semanas de gestación existe un aumento de sensibilidad a la insulina con respecto al estado no gestante. A partir de la semana 20 y hacia el final del embarazo, se establece un estado de resistencia a la insulina, de manera que al término de la gestación se estima que la actividad de la insulina se encuentra disminuida entre un 40-60% (Ding y cols., 2015).

Los cambios en la respuesta secretora de las células β ocurren en paralelo al crecimiento de la unidad feto placentaria, por lo que, aunque los mecanismos que producen la resistencia a la insulina no se conocen por completo, se sabe en gran medida están mediados por el efecto diabetogénico de las hormonas placentarias como el lactógeno placentario, la prolactina, la progesterona, la hormona de crecimiento y la hormona liberadora de cortisol. Además del efecto hiperglucémico directo de estas hormonas, parece ser que la disminución en la acción de la insulina durante el embarazo podría ser debido también a cambios a nivel post receptor. El aumento de las concentraciones séricas del TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), también se ha relacionado con la resistencia a la insulina durante el embarazo. Debido a estos cambios en la producción y sensibilidad de la insulina, la homeostasis de la glucosa durante el embarazo muestra importantes diferencias con respecto al estado no gestante (Takhshid y cols., 2015).

Entre el 8 y el 12 % de los embarazos complicados con DMG presentan anomalías congénitas. Varios estudios han aportado evidencias de que la glucosa puede causar efectos embriotóxicos, y el

mecanismo más probable es a través del aumento en el estrés oxidativo (Cederberg y cols., 2001; Ornoy, 2007).

1.4 Estrés Oxidativo y DM en embarazo

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, que preserva el equilibrio entre la producción de moléculas pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo y éste se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y muerte celular. Esto ocurre en patologías degenerativas, de tipo infeccioso, inmune, inflamatorio, etc. (Beckman y Ames 1998; Ghadge y cols., 1997; Halliwell y Gutteridge, 1999; Harman 1986; Rivas y cols., 2001).

La implicación del estrés oxidativo en diversas patologías ha sido estudiada por numerosos investigadores. Entre estas patologías se encuentra la diabetes mellitus y el embarazo; aunque este último no es propiamente un estado patológico sino de adaptación metabólica (Baynes 1991; Brownlee, 1991; Bucala, 1993).

Los efectos teratogénicos de la diabetes están relacionados, entre otros aspectos con el aumento del estrés oxidativo que la acompaña, lo cual afecta directamente a la unidad fetoplacentaria e, incluso, también a la madre diabética (Djordjevic, 2004; Persson, 2001).

Se sabe que en 8 a 12% de los hijos de madres con DM aparecen malformaciones fetales; estos eventos se producen fundamentalmente durante las primeras 10 semanas de gestación, periodo de desarrollo del producto conocido como embriogénico (Clapés, 2000).

1.5 Inducción de diabetes mellitus

El uso de agentes químicos para producir diabetes permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético (Rerup, 1970). Existen varias clases de agentes químicos. Los primeros (Tabla I) son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células β del páncreas y causan un estado de deficiencia primaria de insulina. El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre las células β pero no las destruyen. Una tercera clase incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencia se produce la diabetes. Este último grupo incluye a las hormonas antagonistas de la insulina, anticuerpos anti-insulina y algunos agentes quelantes, en particular del zinc (Tabla I) (Epanand y cols., 1985; Kadota 1950).

Los agentes químicos más utilizados son la aloxana y la estreptozotocina (STZ). Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células β induciendo diabetes o síndromes hiperglucémicos reversibles, según sea el caso (Grunert y Phillips 1951).

La STZ es un derivado de la nitrosourea, aislado de *Streptomyces achromogenes*, manifiesta actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro (Bono, 1976). Se trata de un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa (Wang y Gleichmann, 1998) y la función de la glucocinasa (Zahner y Malaisse, 1990), e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA (Bolzan y Bianchi, 2002). La molécula de STZ consta esencialmente de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea, y es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa. Una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica. Dado que las células β pancreáticas son más activas que las demás en la captación de glucosa (tienen que monitorizar continuamente sus niveles plasmáticos), también resultan más sensibles al efecto tóxico de la STZ (Arias-Díaz y Balibrea, 2007). Algunas evidencias indican que la toxicidad de la STZ está mediada por el reconocimiento específico de receptores sobre la célula beta ya que provoca un decremento en los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), puede disminuir tanto su síntesis como incrementar su hidrólisis. La nicotinamida protege a los animales contra la citotoxicidad tanto de STZ como de aloxana. Pero los efectos de esta última pueden ser prevenidos por algunos carbohidratos; de los cuales la 3-O-metilglucosa es la más efectiva (Agius y Gidari, 1985).

1.6 Especies reactivas del oxígeno (ERO)

El oxígeno molecular (O_2) es uno de los gases más importantes de la Tierra, constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua de mar y al menos 47% de la corteza terrestre (Cárdenas y Pedraza, 2005). Por lo mismo, la mayor parte de los seres vivos utilizan el oxígeno para obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula se forman moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO), como el superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($^{\circ}OH$) y el peróxido de hidrógeno, así como los oxirradicales (singulete y doblete) Las especies reactivas de oxígeno más importantes y sus características fundamentales se presentan en la tabla 2. Debido a su función primordial de producción de energía química, la mitocondria es considerada la mayor productora de ERO (Macedo-Márquez, 2012). Las ERO regulan varios procesos celulares, en los mamíferos intervienen en la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas (comunicación entre células), la unión de las proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, regulación de los transportadores y canales de iones (Bartozs, 2009). Sin embargo, las ERO también resultan nocivas para los organismos cuando se producen en grandes cantidades dañando los constituyentes celulares e induciendo la muerte celular. Así, el estrés oxidativo generado por la sobreproducción de ERO está asociado al envejecimiento y patologías como la obesidad y la DM tipo 2, entre otras (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Tabla I: Agentes con capacidad diabetogénica

I. Químicos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Efecto irreversible Oxina-9-hidroxiquinolona Vacor 2. Efecto reversible 6-Aminococinamida 1-Asparaginasa Azida Cianuro Ciproheptadina Fluoruro Yodaacetato Malonato Tiazidas 2-Desoxiglucosa
II. Péptidos	<p>Anticuerpos contra Insulina Glucagón Catecolaminas</p>
III. Esteroides	<p>Glucorticoides Hidrocortisona</p>
IV. Otros	<p>Ac. Monometildialúrico Nitrosfenil hidroxilamina deamino Glucosa Diazóxido Ditizona Radanina Ciclosporina</p>
V. Potenciadores	<p>Sobrealimentación (malnutrición) Subalimentación (desnutrición) Ayuno Dietas especiales Cortisol ACTH</p>

La molécula de oxígeno es un birradical libre, es decir, posee dos electrones no apareados, cada uno localizado en un orbital π antienlazante (π^*) (Fig. 1). En la molécula de oxígeno, los electrones no apareados poseen giros paralelos, de tal manera que para que el O_2 oxide otro átomo o molécula, éste tendría que aceptar un par de electrones con giro contrario o aceptar un solo electrón a la vez (limitación del giro o “spin”). Si un solo electrón se adiciona al O_2 , éste se localizará en uno de los orbitales π^* antienlazantes y el producto será el radical superóxido ($O_2 \bullet^-$). De la adición de un electrón más, resultará el ión peróxido, el cual se protona rápidamente en el ambiente celular para producir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Folch-Mallol, y cols., 2004).

Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno y sus principales características.

Radical	Nombre	Características
O2-	Superóxido	Es muy reactivo en medio hidrofóbico, pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas puede transformarse en peróxido de hidrógeno.
.OH	Hidroxilo	Es el más reactivo y se le ha relacionado con el daño sufrido directamente en ADN, proteínas y lípidos.
H2O2	Peróxido de Hidrógeno	No es un radical, pero puede generarlos rápidamente al estar en contacto con iones metálicos, como el hierro y el cobre.
ONOO-	Peroxinitrito	Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico. Se le ha relacionado directamente con la patología de varios desordenes neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer.
O2	Oxígeno	Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido, y durante la lipoperoxidación. Juega un papel importante en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y desordenes degenerativos.

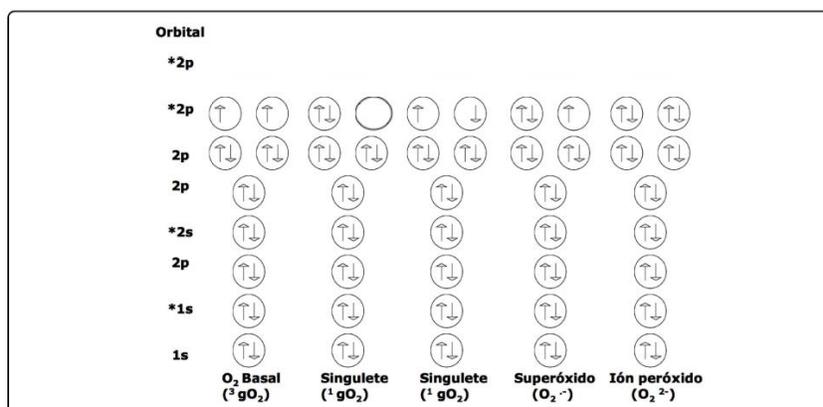


Figura 1. Estructura electrónica del O_2 y de las diferentes especies reactivas de oxígeno (Macedo 2012).

El H_2O_2 , producto de la dismutación del superóxido, puede cruzar las membranas biológicas y aunque es relativamente poco reactivo, a partir de éste y en presencia de metales de transición

reducidos, la reducción parcial del peróxido genera el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza (Halliwell y Gutteridge, 1984). Cuando el metal involucrado es el Fe^{2+} , la reacción es conocida como reacción de Fenton (Herrero, 2008) (Fig. 2). En los sistemas vivos la reacción que genera radicales hidroxilos además de la reacción de Fenton, es conocida como la reacción de Haber-Weiss (Kehrer, 2000) (Fig. 2), en la cual en presencia de superóxido y peróxido de hidrógeno se generan más radicales hidroxilo (Czapski y Goldstein, 1986).

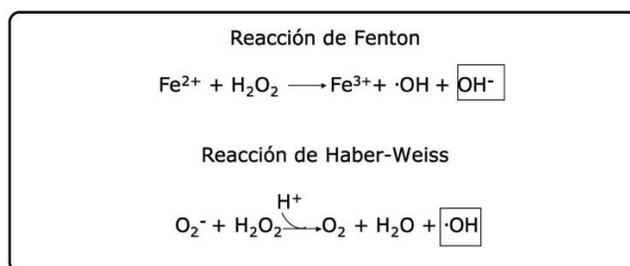


Figura 2. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss en las cuales se produce el radical hidroxilo (Macedo 2012).

Un radical libre es una especie química (molécula o átomo) que presenta al menos un electrón no apareado. La mayoría de los radicales libres son en extremo reactivos y tienden a asociarse “apareando” el electrón libre (Bunker, 1992). Los radicales derivados del oxígeno son altamente tóxicos y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas, mecanismo a través del cual provocan daño a nivel celular y tisular, con la consiguiente alteración de su función (Delanty y Dichter, 1998).

1.7 Buddleja cordata

Por otra parte, se han encontrado compuestos en las plantas que refuerzan la resistencia biológica contra la oxidación, particularmente en frutas y vegetales (Pérez, 2000). Una de las plantas con muchos compuestos fenólicos con capacidad antioxidante es *Buddleja cordata*, conocida como Tepozán (Ávila y cols., 1999). Se encuentra ampliamente distribuida en México, principalmente en el Altiplano, extendiéndose hasta Guatemala. Se desarrolla en una gran variedad de hábitats, sobre todo en lugares con vegetación secundaria, parcelas de cultivo y ambientes urbanos, tanto en

Guanajuato, como en Querétaro y en el norte de Michoacán, en altitudes de 1400 a 3200 m (Ocampo 2003).

El género *Buddleja* pertenece a la familia Loganiaceae, en la cual se agrupan árboles o arbustos hasta de 30 m de altura, con corteza rugosa y ramas jóvenes usualmente pubescentes; hojas opuestas, bicoloradas con envés estrellado tomentoso, pecioladas o sésiles, lanceoladas, elípticas u ovaladas; flores en glomérulos, pequeñas, bisexuales, usualmente bracteadas con cáliz de 4 a 5 partes; inflorescencias en panículas, capitadas o en cabezuelas esféricas axilares (Standley y Williams, 1969; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 1985). El género se encuentra representado en México por 15 especies (Norman, 1966); donde destacan *B. skutckii* Morton, *B. cordata* H.B.K., *B. crotonoides* A. Gray, *B. americana* L., *B. nitida* Benth y *B. parviflora* (Gómez y Pérezgrovas, 1990).

Las especies del género *Buddleja*, tienen diversos usos como el medicinal; el cocimiento de las hojas se utiliza para curar úlceras, para bajar la temperatura y como desinflamante (Rzedowski y Rzedowski, 2001); también como propiedades analgésicas, antisépticas, eupépticas, de remedio contra la tos, los calambres, el cáncer, mordeduras de víbora entre otros (Argueta y cols., 1994); la madera se utiliza en la construcción, para elaborar mangos de implementos agrícolas, y en menor grado como forraje, el follaje y las ramas tiernas (Terrones y cols., 2004); en particular, *B. cordata*, *B. nitida* y *B. skutckii* se emplean en las construcciones rurales, como combustible y para fabricar herramientas (Camacho y cols., 1994).

1.8 Efectos antioxidantes de *B. cordata*

En el reino vegetal se encuentran glucósidos fenilpropanoides (PP's) que son compuestos solubles en agua, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Korkina, 2007). Existe una creciente evidencia de que los PP's, de los polifenoles vegetales en general y PP, en particular, son poderosos antioxidantes, actuando en el rompimiento de las cadenas de radical peroxilo (Esposito y cols., 2010). El verbascósido, producto del extracto de *Buddleja* muestra una notable capacidad anti-inflamatoria que se correlaciona con su capacidad de inhibir la liberación de especies reactivas de oxígeno (Esposito y cols., 2010).

Backhouse y cols., (2008) demostraron los efectos protectores de verbascósido contra la peroxidación de lípidos plasmáticos durante la inmovilización, que causa el aumento en los niveles de radicales libres. Su aplicación redujo el daño a la membrana eritrocítica, reduciendo el nivel de estrés oxidativo, dando lugar a una potencial aplicación clínica. El alto potencial redox, como donante de electrones del verbascósido, protege las células contra la glucosa oxidasa y la citotoxicidad mediada por apoptosis, y su potencial preventivo puede ser utilizado para el tratamiento de estrés oxidativo (Backhouse y cols., 2008).

Avila y cols. (2005) evaluaron la actividad fotopreventiva del extracto metanólico de *B. scordiodes* en *E. coli* y en *C. albicans*, y determinaron que el extracto poseía un efecto fotoprotector elevado en comparación con el control negativo así como los compuestos aislados del extracto: la linarina y el verbascósido, ya que ambos disminuían la muerte celular de *E. coli* inducida por la RUV. Además determinaron el factor de protección solar de estas sustancias en *C. albicans* obteniendo incluso mejores resultados que el control positivo (filtro comercial escalol). También observaron que el verbascósido tuvo un mayor efecto que la linarina tanto en *E. coli* como en *C. albicans*.

Apabalaza (2006) evaluó la actividad analgésica tópica de un extracto activo de *B. globosa* Hope (recolectada en diferentes temporadas) en ratones. Este autor observó que el extracto recolectado en verano fue más rico en compuestos flavonoides que el de otoño, y ambos presentaron actividad analgésica pero muy baja actividad antioxidante.

2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha observado un alto índice de malformaciones neonatales que provoca la DM, y como consecuencia, una disminución en el índice de progeñe. Es de gran importancia un aumento en la investigación sobre el efecto que provoca esta enfermedad. Debido a que muchos de los fármacos empleados en la terapéutica actual de la DM (hipoglucemiantes orales como la metformina) y de otras enfermedades potencialmente pueden causar malformaciones, es necesario que se realice una búsqueda de compuestos que logren disminuir los daños de teratógenos. El propósito de éste trabajo fue utilizar el extracto metanólico de *B. cordata* con el fin de reducir la frecuencia y severidad de las malformaciones causadas por la DM presente en la gestación.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto metanólico de *B. cordata* en el desarrollo embrionario en ratas diabéticas preñadas.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los niveles de glucosa, lípidos, colesterol y triglicéridos en suero de ratas diabéticas preñadas tratadas con extracto metanólico de *B. cordata*.

Identificar alteraciones al desarrollo embrionario (malformaciones) mediante la determinación de parámetros morfológicos en los fetos de ratas tratadas con STZ.

Demostrar una posible reversión de malformaciones en fetos por administración del extracto metanólico de *B. cordata* en ratas preñadas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Primera fase: Selección de la dosis de extracto

El extracto metanólico de *B. cordata* fue donado por la Dra. Ana María García Bores, del Laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO. Se utilizaron 15 ratas hembra, de la cepa Wistar, de 250-300 g, que se obtuvieron en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, las cuales en etapa de proestro fueron alojadas con ratas macho fértiles, durante 12 horas. Para determinar si la fertilización fue efectiva, se realizó un frotis vaginal y la presencia de espermatozoides determinó el día 0 de gestación. Una vez preñadas, las ratas se asignaron al azar en tres grupos homogéneos de 5 ratas por grupo. A dos de ellos se les suministró extracto de *B. cordata* a dosis de 50 y 100 µg/día (Ávila y cols, 2005) entre los días 8 a 10 de desarrollo, y el grupo restante fue tratado con el vehículo en el cual se administró el extracto (PBS estéril).

Las hembras fueron sacrificadas el día 19 de gestación por inhalación de CO₂ y, a través de una laparatomía, se obtuvieron los fetos, que se pesaron en una balanza de precisión y se midieron con una regleta vernier; dos terceras partes de los fetos fueron fijados en solución Bouin por 24-48 h. El resto de los fetos se fijó en formol salino al 10%.

Los fetos fijados en fluido de Bouin se enjuagaron en agua corriente para eliminar el exceso de ácido pícrico, y fueron cortados en base a la técnica de Wilson, modificada (Barrow y Taylor, 1969). Las secciones de la cabeza se realizan siguiendo la técnica de Wilson. Éste consiste en cortar transversalmente a través de la boca y las orejas con una cuchilla de afeitar de acero inoxidable. La superficie dorsal de la lengua, por lo general adherente a la superficie palatal, es removida y el paladar es examinado. Colocando la superficie palatina abajo, se realizan secciones frontales delante de los ojos, a través de los ojos, y a través del cerebro en el diámetro transversal de la cabeza. Cada una de estas piezas se examina individualmente en una caja de Petri con un microscopio estereoscópico. Estas secciones se hacen principalmente para estudiar el paladar hendido, anomalías de los ojos y la hidrocefalia interna.

Con respecto a los fetos fijados en formol salino, se tiñeron con azul alciano y rojo de alizarina para observar hueso y cartílago por la técnica de Kimmel y Trammell (1981).

5.2 Segunda fase: Tratamiento de ratas diabéticas

Una vez determinada la dosis de extracto a emplear, se procedió a la realización del experimento. Para esto, se utilizaron 19 ratas hembra, de la cepa Wistar, de 250-300 g, que se obtuvieron en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, donde se conservaron, mantuvieron y asignaron como preñadas como se describió arriba.

Una vez preñadas, las ratas se asignaron al azar en 3 grupos de 6 a 7 individuos cada uno. El grupo testigo fue tratado con Buffer de citratos 100 mM, pH 4.5 en el día 4 de gestación, y entre los días 8 a 10 con DMSO. El segundo grupo fue tratado con STZ 60 mg/Kg de peso en amortiguador de citratos, el día 4 de gestación, y se les administró DMSO los días 8 a 10 de gestación. El último grupo fue tratado con STZ 60 mg/Kg de peso en amortiguador de citratos y se administró mediante goteo el extracto de *B. cordata* a dosis de 50 y 100 µg/Kg de peso corporal, disuelto en DMSO, los días 8 a 10 de gestación.

5.3 Sacrificio y obtención de muestras.

Las hembras fueron sacrificadas el día 19 de gestación por sobredosis de anestesia (pentobarbital sódico 50 mg/Kg, i.p.) una vez anestesiadas se obtuvo la mayor cantidad de sangre por punción cardiaca. A través de laparotomía, se obtuvieron los fetos, que se pesaron en una balanza semi analítica, se midieron con una regleta vernier, y fueron fijados en solución Bouin. Posteriormente la sangre se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm para la obtención del suero, en el cual se realizó la determinación de glucosa, colesterol, triglicéridos y lípidos con kits comerciales obtenidos de proveedores locales.

5.4 Observación de fetos, y detección de malformaciones.

Dos días después de fijados, los fetos se recuperaron del fluido de Bouin, se enjuagaron con agua corriente, se transfirieron a alcohol al 70%; y fueron analizados mediante cortes a nivel de cuerpo, céfalo, esófago, e hígado por la técnica de Wilson modificada por Barrow y Taylor (1969).

Los resultados de los parámetros morfológicos y bioquímicos se evaluaron por ANOVA simple, seguida de una prueba de Tukey en un paquete estadístico (SPSS), versión 10.

6. RESULTADOS

Primera fase: Selección de la dosis de extracto

La primera fase del estudio fue encaminada a tratar de detectar si las dos dosis de extracto (50 y 100 mg/kg) causaban toxicidad sobre las hembras. Para esto, se evaluó el tamaño de camada, así como el tamaño y peso fetal obtenidos de los tres grupos. En cuanto al tamaño de camada (Figura 3), se realizó un conteo de fetos por cada hembra preñada, y se encontró que éste parámetro no se afectó. Con respecto al peso fetal (Figura 4) o la longitud cefalocaudal (Figura 5), no se encuentran diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos de 50 y 100 mg/kg, por lo que se infiere que el extracto no afecta el desarrollo o crecimiento fetal. Con respecto a la técnica de Wilson modificada, en la tabla 3 se muestra el primer corte (A) se puede observar el paladar intacto y el cerebro en su tamaño normal, sin alguna disminución en cuanto a su morfología. En el segundo corte (B) se observa que no existen cambios en el tamaño ni en la morfología del lente, retina, bulbo olfativo y paladar. En el tercer corte (C) se observa el ventrículo lateral y el tercer ventrículo bien definidos sin alguna alteración en su estructura. Por último, en el cuarto corte (D) se observan las narinas bien estructuradas, lo que indica que no hubo alteración por el tratamiento de las ratas preñadas con el extracto de *B. cordata*.

Con respecto a la doble tinción para hueso y cartílago, que se evidencian en los fetos de 19 días de gestación cuando se someten a tinción con rojo de alizarina y azul alciano, no se encontraron diferencias en el grado de osificación por efecto del tratamiento con extracto sobre la madre (datos no mostrados).

Tamaño de camada

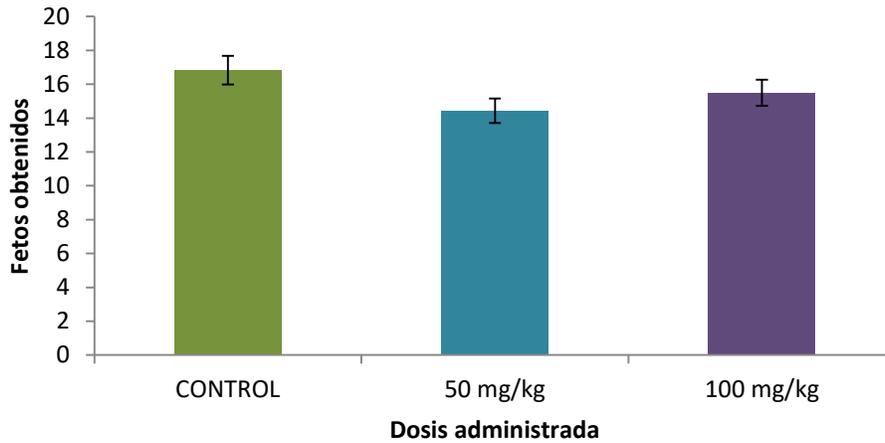


Figura 3. Tamaño de camada de ratas sanas por efecto de la administración de extracto de *B. cordata*. Promedio \pm E.E. de 5 camadas. No hay diferencias significativas con respecto al control.

Peso fetal

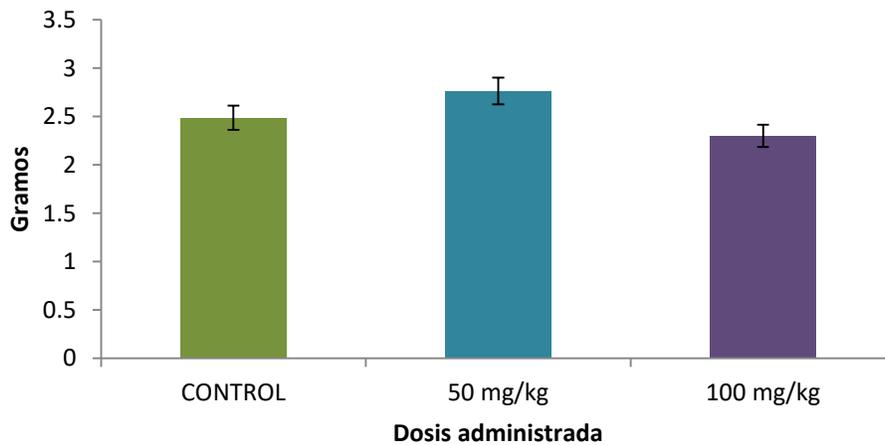


Figura 4. Peso de los fetos de ratas sanas por efecto de la administración de extracto de *B. cordata*. Promedio \pm de E.E. de 40-50 fetos. No hay diferencias significativas con respecto al control.

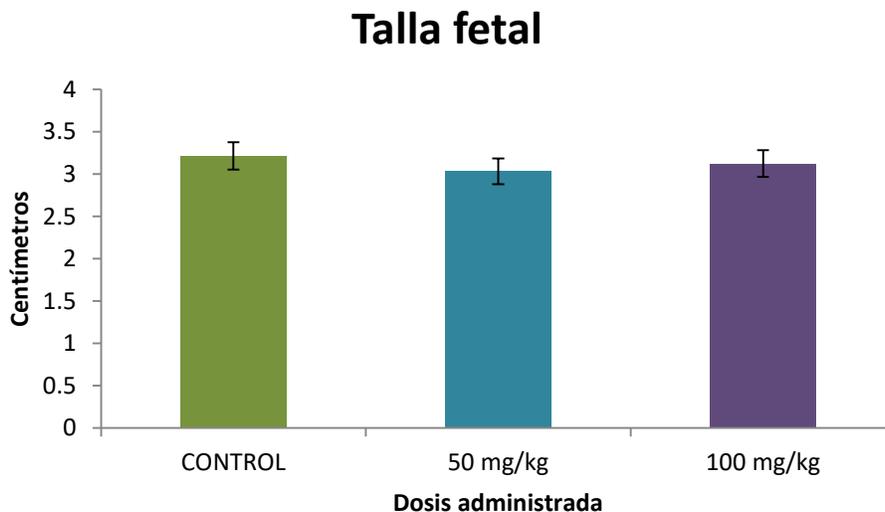
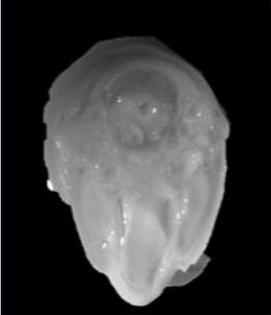
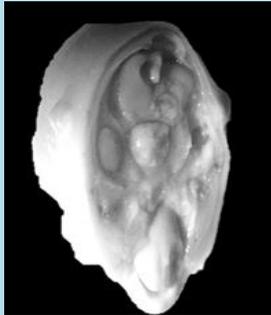
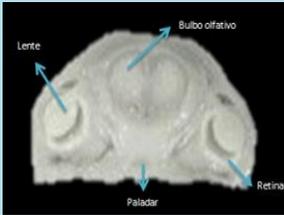
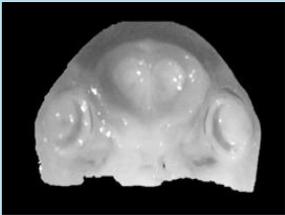
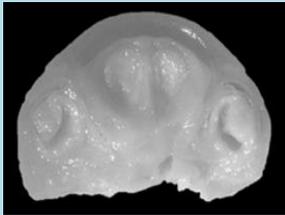
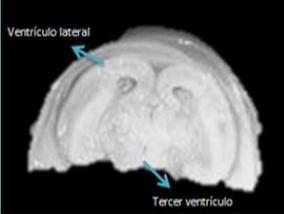
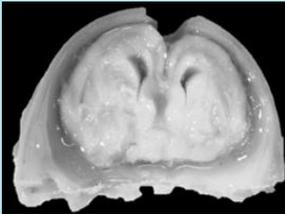
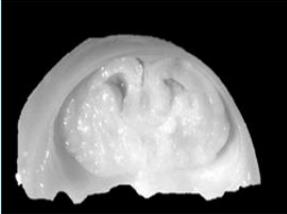
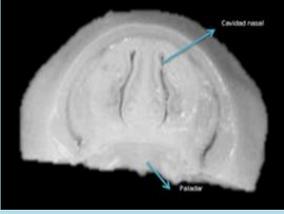
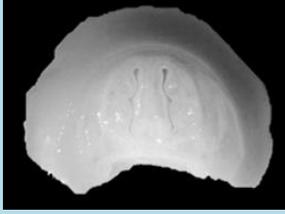
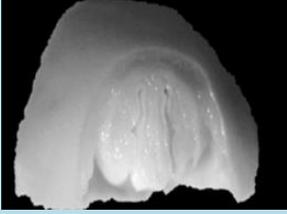


Figura 5. Talla de los fetos de ratas sanas por efecto de la administración de extracto de *B. cordata*. Promedio \pm E.E. de 40-50 fetos. No hay diferencias significativas con respecto al control.

Segunda fase: Tratamiento de ratas diabéticas

Una vez comprobado que el extracto de *B. cordata* no induce efectos nocivos sobre el desarrollo embrionario de la rata, se procedió a administrar el extracto a ratas inducidas con STZ. Se cruzaron ratas hembras como se indica en metodología, y se asignaron a tres grupos: control, STZ y STZ más extracto, que fueron tratadas como se describió arriba. Las hembras fueron sacrificadas el día 19 de gestación, y los fetos fueron obtenidos como en la primera fase del estudio. El peso corporal de los fetos fue registrado al momento de la extracción el día 19. En la figura 6 se muestra el peso al momento del sacrificio. Se observa que el peso de los fetos en todos los grupos fue similar, aunque se aprecia una ligera tendencia a perder peso para los fetos de las madres tratadas con STZ con respecto al resto de los grupos, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Tabla 3. Diferentes cortes morfológicos de cabeza, en la que se pueden observar A. Paladar y cerebro, B. Ojos, paladar y bulbos olfativos, C. Ventriculos laterales y D. Narinas.

	CONTROL	50 mg/kg	100 mg/kg
(A) Cerebro y paladar			
(B) Ojos			
(C) Ventriculos			
(D) Narinas			

No se observan malformaciones en los fetos a nivel interno, por efecto de tratamiento con extracto metanólico de *B. cordata* a dosis de 50 ó 100 mg/Kg de peso corporal.

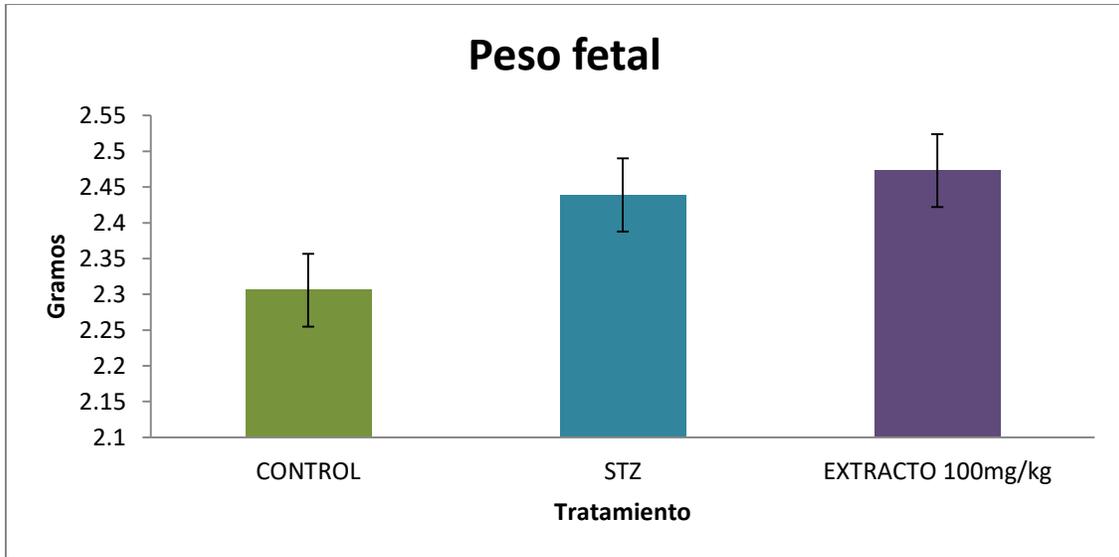


Figura 6. Peso de los fetos de 19 días de edad gestacional de las ratas gestantes en respuesta a tratamiento con STZ y extracto de *B. cordata*. Promedio \pm E.E. de 40-50 fetos. No hay diferencias significativas con respecto al control.

La longitud cefalocaudal (talla) de los fetos de las ratas gestantes tratadas con STZ o con STZ-y extracto vs control se muestra en la figura 7. El análisis estadístico mostró aumento de tamaño significativo entre los fetos de ratas tratadas con STZ y STZ más extracto, con respecto al grupo control.

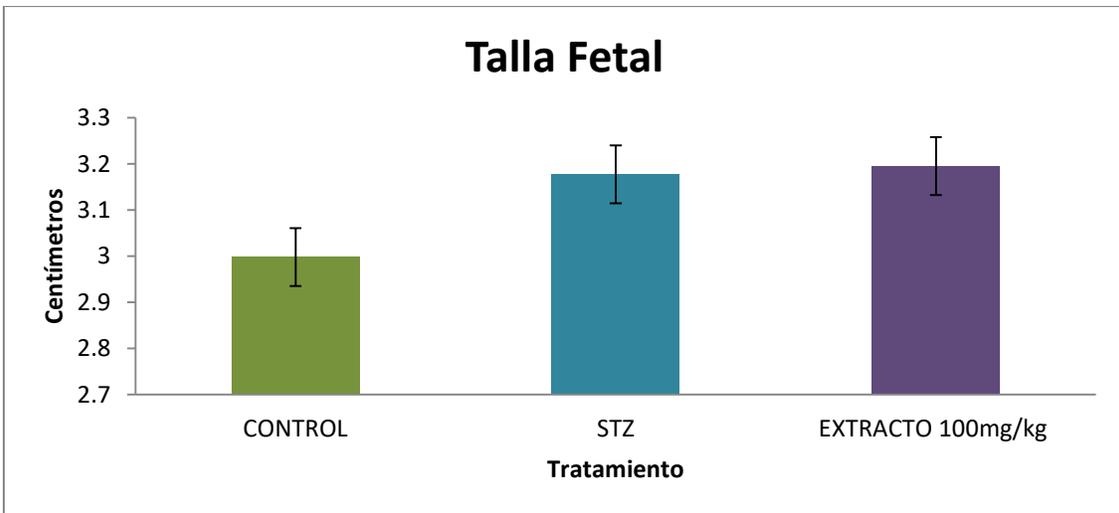


Figura 7. Longitud (talla) de los fetos de 19 días de edad gestacional, de las ratas gestantes en respuesta a tratamiento con STZ y extracto de *B. cordata*. Promedio \pm E.E. de 40-50 fetos. Se muestra un aumento de la talla en las ratas diabéticas y los de extracto, siendo más grandes los fetos tratados con extracto.

En cuanto al tamaño de camada (Figura 8) el análisis estadístico indica que no hay diferencia de este parámetro entre los distintos grupos; como cabe esperar cuando la sustancia administrada no muestra toxicidad general.

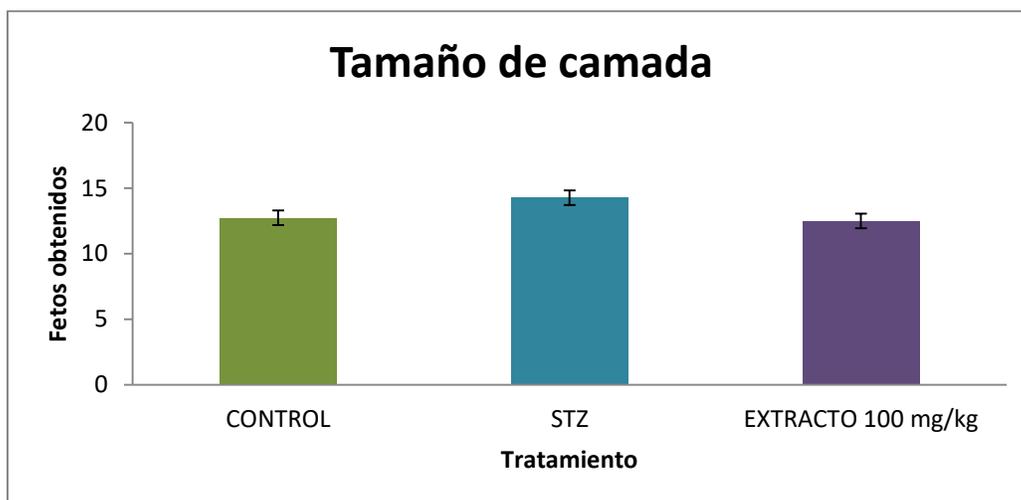


Figura 8. Tamaño de camada de 19 días de edad gestacional, de las ratas gestantes en respuesta a tratamiento con STZ y extracto de *B. cordata*. Promedio ± E.E. de 5 camadas.

Determinación de glucosa, colesterol, triglicéridos y lípidos en suero.

En las figuras 9 a 12 se observan las determinaciones realizadas de parámetros bioquímico-clínicos en suero de las ratas tratadas con STZ, extracto o los vehículos. Se observa que la glucosa en suero es más elevada en ratas tratadas con STZ que en el control (figura 9), mientras que la concentración de glucosa en ratas tratadas con extracto disminuye con respecto al valor hallado en ratas inducidas a diabetes ($p < 0.001$). Este resultado es alentador, e implica un posible efecto antidiabético del extracto, que escapa a los objetivos de este trabajo, pero pudiera ser explorado posteriormente.

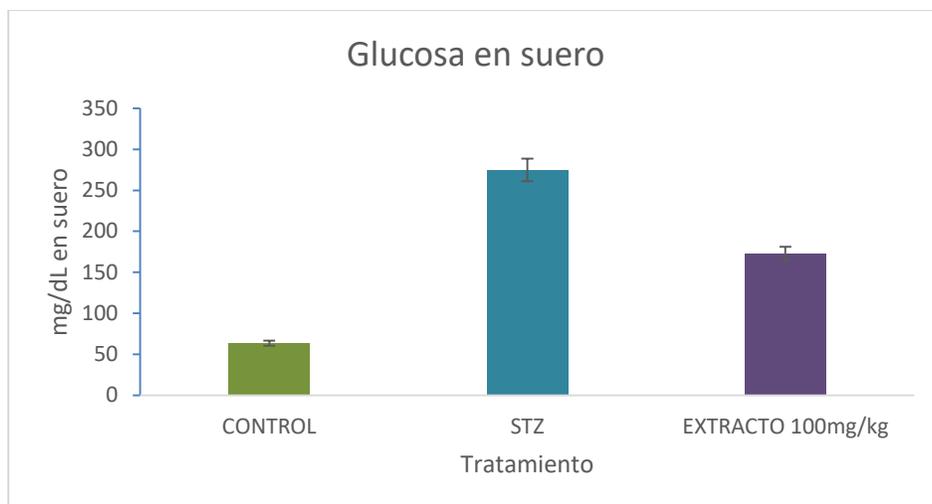


Figura 9. Concentración de glucosa total en suero (mg/dL) de ratas gestantes en respuesta a tratamiento con STZ y extracto de *B. cordata*. Promedio \pm E.E. de 10 ratas. Se encontró diferencia significativa entre los dos grupos experimentales ($p > 0.001$).

Con respecto al colesterol, si bien su nivel sérico es más elevado en ratas tratadas con STZ que en las controles o las tratadas con extracto (figura 10), el análisis estadístico no indicó diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.6$).

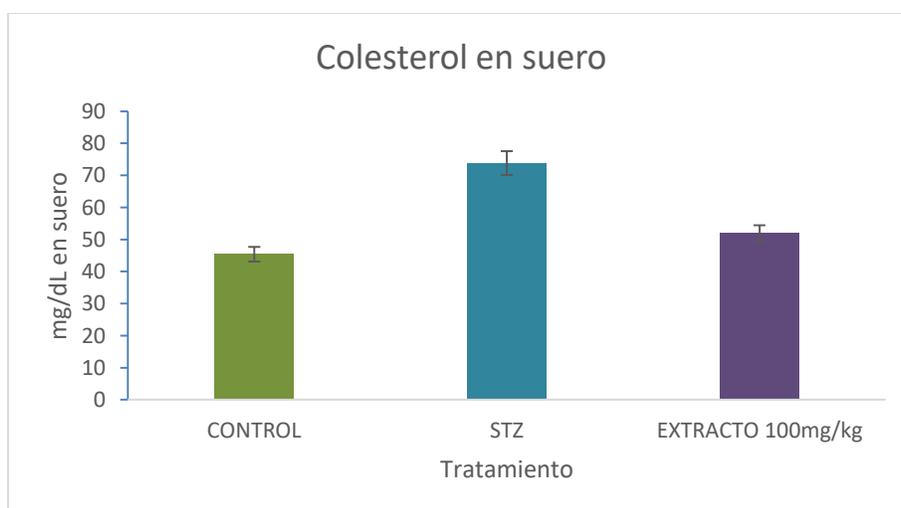


Figura 10. Concentración de colesterol total en suero (mg/dL) de gestantes en respuesta a tratamiento con STZ y extracto de *B. cordata*. Promedio \pm E.E. de 10 ratas. No hay diferencias entre grupos.

En cuanto a los triglicéridos, la administración de STZ causa aumento en la concentración sérica de este grupo de metabolitos ($p < 0.05$), mientras que la administración del extracto reduce los valores, pero sin llegar a los normales (figura 11).



Figura 11. Concentración de triglicéridos total en suero (mg/dL) de ratas gestantes en respuesta a tratamiento con STZ y extracto de *B. cordata*. Promedio \pm E.E. de 10 ratas. Se encontró diferencia significativa entre los dos grupos experimentales ($p < 0.05$).

Por último, como se ve en la figura 12, la concentración de lípidos totales es mayor en ratas tratadas con STZ o con STZ más extracto con respecto al control ($p < 0.001$).

Estudio Morfológico (Técnica de Wilson)

Como se describió, los fetos obtenidos fueron sometidos a análisis morfológico. En la tabla 4 se muestra el primer corte de cerebro y paladar (A) del grupo control se puede observar el paladar intacto y el cerebro en su tamaño normal, sin alguna disminución en cuanto a su morfología, sin embargo en la de las ratas tratadas con STZ se nota la existencia de una cavidad a nivel diencefálico, sin diferenciación de hemisferios cerebrales, el cerebro es grande, no hay cuerpo calloso, posible hidrocefalia. En las ratas tratadas con STZ más extracto se observa el cerebro intacto y en su tamaño normal al igual que el paladar. El porcentaje de malformaciones encontrado para los fetos de ratas tratadas con STZ fue de 39.9 ± 9.2 con respecto al 0.0% manifestado en los grupos control y tratado

con STZ más extracto. El análisis por chi-cuadrada manifestó diferencia altamente significativa de éste porcentaje ($p < 0.0001$); lo que demuestra el poder embrioprotector del extracto de *B. cordata*.

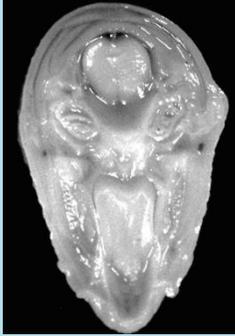
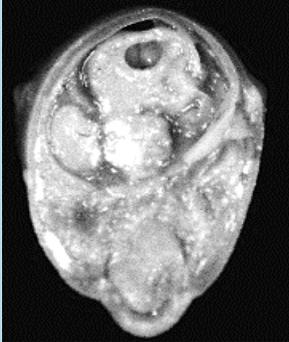
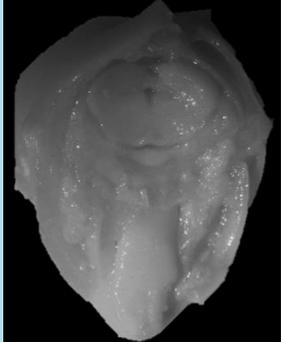
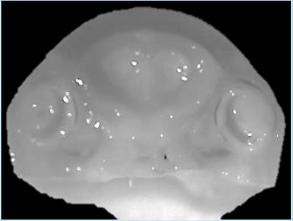
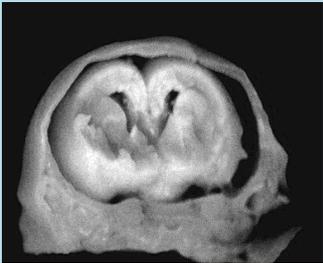
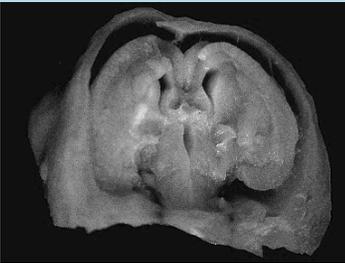
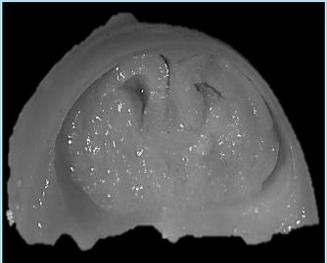
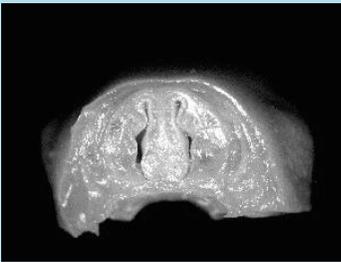


Figura 12. Concentración de lípidos total en suero (mg/dL) de ratas gestantes en respuesta a tratamiento con STZ y extracto de *B. cordata*. Promedio \pm de 10 ratas. Se encontró diferencia significativa entre los dos grupos experimentales ($p < 0.001$).

Se encuentran malformaciones internas en fetos de ratas tratadas con STZ a nivel de ojos (B), ventrículos (C), y narinas (D).

Se agrega un anexo (Anexo 1) mostrando malformaciones a nivel cerebro en las ratas tratadas con STZ.

Tabla 4. Diferentes cortes morfológicos de cabeza, en la que se pueden observar A. Paladar y cerebro, B. Ojos, paladar y bulbos olfativos, C. Ventriculos laterales y D. Narinas. Se nota una cavidad (hoyo) a nivel diencefálico a nivel cerebro (rata DIABÉTICA), posible hidrocefalia.

	CONTROL	DIABÉTICA	EXTRACTO 100 mg/kg
(A) Cerebro y paladar			
(B) Ojos			
(C) Ventriculos			
(D) Narinas			

7. DISCUSIÓN

En los parámetros evaluados de glucosa, triglicéridos y colesterol la administración de extracto de *B. cordata* a 100 mg/kg arrojó diferencias significativas, ya que disminuye parcialmente los niveles de los mismos con respecto a los valores hallados para las ratas tratadas con STZ, lo que permite señalar que la dosis de extracto de *B. cordata* empleada podría tener efecto a nivel de la economía total del organismo y no solamente en los embriones. Es alentador el hecho de que el extracto de *B. cordata*, a las dos dosis empleadas, no causó daño fetal.

La STZ se ha reportado ampliamente como inductora de DM experimental debido a la destrucción selectiva de los islotes β pancreáticos productores de insulina. Es conocido que después de la administración de la STZ, la glucosa en sangre presenta una respuesta trifásica, a las dos horas los niveles se elevan, posiblemente por un efecto glicogenólico en el hígado, más tarde tiene un decaimiento muy marcado a las 10 horas, para después incrementarse a las 24 horas, y posteriormente origina hiperglucemia permanente (Szkudelski, 2001). En este estudio se pudo observar el efecto hiperglucemiante de la STZ, ya que en los individuos inducidos a diabetes, la medición de glucosa en sangre arrojó resultados muy por encima de los reportados para ratas gestantes normoglucémicas.

En cuanto a la medición de los parámetros del metabolismo lipídico, cabe mencionar que, todos los grupos diabéticos tanto en colesterol, triglicéridos, glucosa y lípidos totales mostraron un aumento en los resultados de medición (comparando las ratas tratadas con STZ y las tratadas con STZ y extracto contra el control), si bien no todos son estadísticamente diferentes del control. Esto es algo que se esperaba ya que la diabetes está asociada a cambios en el metabolismo de los lípidos (Shenoy y Goyal, 2002). Debido a la falta de insulina, la enzima lipasa sensible a hormona se activa energéticamente, provocando hidrólisis de los triglicéridos almacenados, con lo que se liberan grandes cantidades de ácidos grasos libres comienza a elevarse en minutos. El exceso de éstos en el plasma promueve la conversión hepática de parte de los ácidos grasos en fosfolípidos y colesterol, dos de los principales productos de los lípidos (Guyton y Hall, 2011).

Por otra parte, sabemos que la naturaleza de las alteraciones de la diabetes asociadas al embarazo y al desarrollo del feto hace necesario el estudio de aspectos fundamentales como áreas de

prioridad en la investigación. La STZ se usa de manera constante para la inducción de la DM experimental en diferentes modelos, muchos de los cuales emplean la rata; la manera más simple de hacerlo es inyectar a las ratas en algún momento de la gestación y estudiar las alteraciones en el desarrollo de sus fetos (Polanco y cols., 2005).

Los resultados obtenidos con este método de inducción, el cual se hizo a partir de una inyección intraperitoneal de STZ, deben tomarse con precaución ya que la STZ puede atravesar la barrera placentaria y ocasionar daños en el producto, en general y en las células pancreáticas en desarrollo, en particular (Polanco y cols., 2005). Una manera de evitar esto es inyectar a las ratas antes del sexto día de gestación, es decir antes de la implantación, lo cual da como resultado que las alteraciones observadas en los embriones sean consecuencia de la hiperglucemia materna y no de la acción de la STZ (Polanco, 2001). En este estudio, la STZ fue administrada a las ratas el día 4 de gestación, por lo que todas las malformaciones encontradas en los productos son atribuidos completamente al estado diabético de las progenitoras. Los resultados obtenidos corroboran y a la vez contrastan con lo obtenido por nuestro grupo previamente (Trejo-González y cols., 2015), donde se encontró un porcentaje de malformaciones menor que lo reportado en este trabajo (14.42 ± 11.16 en dicho estudio vs 39.9 ± 9.2 en el trabajo actual), aunque no se encontraron reabsorciones en este trabajo, mientras Trejo-González y cols. (2015) reportaron un valor de 15.3 ± 2.8 .

Para tratar de asignar un nombre para las malformaciones encontradas, se utilizó la nomenclatura propuesta por Solecki y cols., (2015). Las malformaciones que se pudieron identificar se incluyen en el anexo 1.

Al igual que en humanos, la diabetes materna afecta el desarrollo de los fetos de rata, lo cual produce aumento del número de reabsorciones, disminución del número de crías por camada, disminución del peso de las crías, retraso en el crecimiento y aumento de la frecuencia de malformaciones congénitas (Palomino y cols., 1998). En este trabajo se pudieron obtener fetos con malformaciones después de haber sido inducidas con STZ, aunque no se obtuvieron malformaciones; pero también se obtuvieron resultados en cuanto a los análisis bioquímicos que indican hiperglucemia en ratas tratadas con STZ y con STZ más extracto.

Se ha reportado que la hiperglucemia materna es uno de los principales factores en la producción de las malformaciones. El estudio de la patogénesis de los defectos congénitos, realizados en animales de experimentación, ha revelado un complejo proceso en el cual el estado diabético induce alteraciones en una serie de vías metabólicas interrelacionadas que conducen a la teratogenicidad al interferir en importantes genes del desarrollo embrionario (Goldman y cols. 1985).

Con respecto al extracto de *B. cordata*, la determinación de la exactitud del efecto del posible agente embrioprotector, depende de varios factores, entre ellos la definición del individuo de examen macroscópico, los procedimientos de cada uso, las cepas y especies de animales utilizados, y los porcentajes de animales examinados. En este caso, se utilizaron para los experimentos ratas *Rattus norvegicus*, de la cepa Wistar, preñadas, ya que el interés de nuestro grupo es el estudio de la diabetes mellitus complicada con gestación; y en experimentos posteriores se pretende probar que el extracto de *B. cordata* pueda tener un efecto antiteratogénico; sin embargo, hay numerosas sustancias que se han empleado en la medicina tradicional con el fin de contrarrestar los efectos nocivos de determinadas patologías como diabetes, cáncer, etc., pero que en realidad causan más daño que bien. Este tipo de estudios deben realizarse antes de probar extractos o moléculas novedosas en alguna patología.

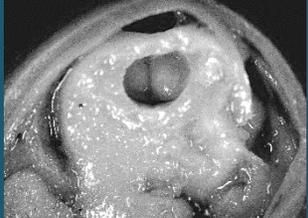
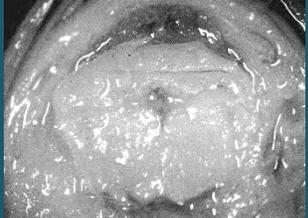
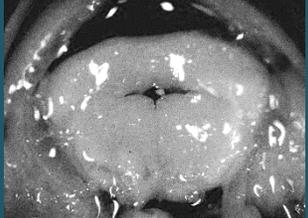
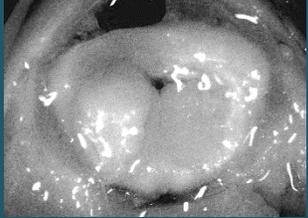
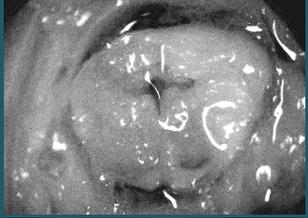
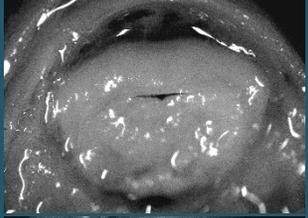
Sin embargo, el hallazgo de que los fetos de ratas inducidas a diabetes con STZ y tratadas posteriormente con extracto de *B. cordata* no mostraron malformaciones tanto externas como internas, indica que en dicho extracto alguna o varias moléculas presentes pueden revertir los efectos nocivos que el estado tipo diabetes inducido por STZ provoca sobre el desarrollo.

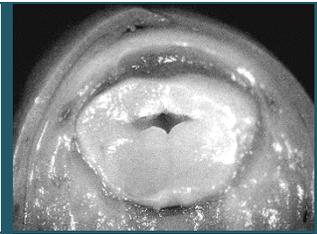
8. CONCLUSIONES

Por lo anterior, podemos concluir que:

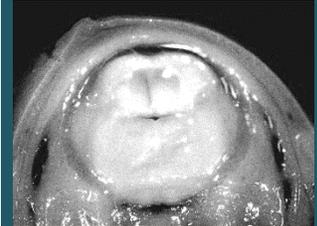
1. El extracto de *B. cordata* a dosis de 50 o 100 mg/kg no es tóxico en embriones de rata.
2. El extracto de *B. cordata* a dosis de 100 mg/kg tiene un efecto hipoglucemiante.
3. La DM inducida por STZ en ratas Wistar gestantes, provoca malformaciones, pero no reabsorciones.
4. El extracto de *B. cordata* a dosis de 100 mg/Kg, revierte las malformaciones producidas por diabetes inducida con STZ en ratas gestantes.

ANEXO 1. Observaciones a nivel cerebro de fetos de ratas tratadas con STZ.

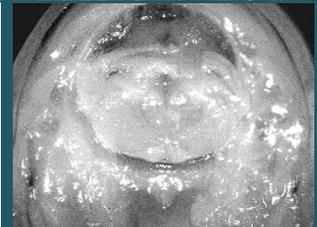
CEREBRO	HALLAZGO
	<p>Cavidad (hoyo) a nivel diencefálico, sin diferenciación de hemisferios cerebrales, el cerebro es chico, no hay cuerpo calloso, no hay división de ventrículos laterales, ni siquiera están presentes, no hay tercer y cuarto ventrículos cerebrales, posible hidrocefalia.</p>
	<p>Se aprecian esbozos de hemisferios cerebrales, hay esbozo de cuerpo calloso, el cerebro es chico, no hay diferenciación ni división de ventrículos laterales, esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.</p>
	<p>No hay diferenciación de hemisferios cerebrales, el cerebro es muy chico, no hay división de ventrículos laterales, hay esbozo del tercer ventrículo, y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.</p>
	<p>Se aprecian esbozos de hemisferios cerebrales, el cerebro es chico, no hay división de ventrículos laterales, hay esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.</p>
	<p>Se aprecian esbozos de hemisferios cerebrales, el cerebro es chico, hay esbozo de cuerpo calloso, no hay diferenciación y división de ventrículos laterales, y este espacio es muy grande, esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.</p>
	<p>No hay diferenciación de hemisferios cerebrales, el cerebro es muy chico, no hay división de ventrículos laterales, no hay tercer y cuarto ventrículo cerebral, posible hidrocefalia.</p>
	<p>Hoyo a nivel diencefálico, esbozos de hemisferios cerebrales, el cerebro es chico, no hay cuerpo calloso, no hay división de ventrículos laterales, ni siquiera están presentes, no hay tercer y cuarto ventrículos cerebrales, posible hidrocefalia.</p>



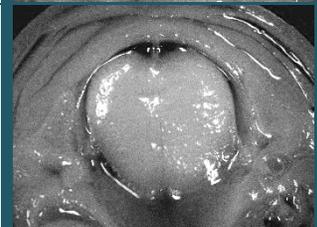
Se aprecian esbozos de hemisferios cerebrales, el cerebro es chico, no hay diferenciación ni división de ventrículos laterales, esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.



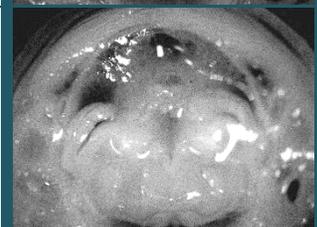
No hay diferenciación de hemisferios cerebrales, no hay diferenciación ni división de ventrículos laterales, esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo.



Cerebro chico, se aprecian esbozos de hemisferios cerebrales, no hay diferenciación ni división de ventrículos laterales, esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.



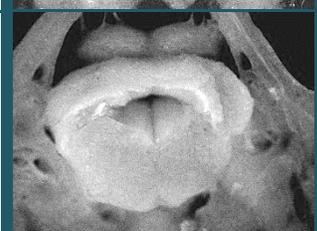
Se aprecian esbozos de hemisferios cerebrales, no hay diferenciación ni división de ventrículos laterales, no hay tercer ni cuarto ventrículo cerebral.



Cerebro chico, se aprecian esbozos de hemisferios cerebrales, no hay diferenciación ni división de ventrículos laterales, esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.



Cerebro chico, se aprecian esbozos de hemisferios cerebrales, no hay diferenciación ni división de ventrículos laterales, esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.



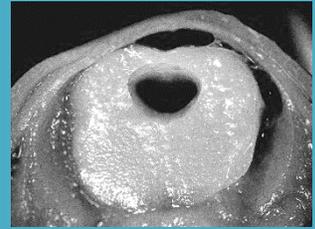
Hoy a nivel diencefálico, cerebro chico, sin hemisferios cerebrales, no hay diferenciación ni división de ventrículos laterales, esbozo del tercer ventrículo cerebral y no hay cuarto ventrículo, posible hidrocefalia.



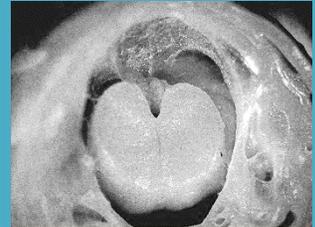
Hoyo a nivel diencefálico, cerebro chico, sin hemisferios cerebrales, no hay ventrículos laterales ni tercer y cuarto ventrículo cerebral.



Hoyo a nivel diencefálico, cerebro chico, sin hemisferios cerebrales, no hay ventrículos laterales ni tercer y cuarto ventrículo cerebral, posible hidrocefalia.



Hoyo a nivel diencefálico, cerebro chico, sin diferenciación de estructuras cerebrales.



Esbozos de hemisferios cerebrales, sin diferenciación de otras estructuras.

Nota: El término “hoyo” es utilizado por Solecki y cols., (2015), como nombre para la malformación más frecuentemente encontrada.

LITERATURA CITADA

Agius, C.; Gidari, A.S. (1985). Effect of streptozotocin on the glutathione S- transferases of mouse liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 34: 811-819.

Apablaza, E.C. (2006). Diseño de la estandarización química y evaluación de la actividad analgésica tópica de *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae, matico. Tesis de Químico Farmacéutico, para obtener el grado de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 27 (suppl. 1): s1-s10.

Arias-Díaz, J.; Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2 Departamento de Cirugía. Hospital Clínico San Carlos. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. España. *Nutr Hosp.* 22(2):160-68.

Argueta-Villamar, A.; Cano-Asseleih, L.M.; Rodarte, M.E. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F., 450 pp.

Avila A.J.C.; Castañeda C.M.C.; Benitez F.J.C.; Durán D.A.; Barroso V.R.; Martínez C.G.; Muñoz L.J.L.; Martínez C.A.; Romo de Vivar A. (2005). Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia.* 76: 301-309.

Avila A.J.C.; Liverant J.G.; Martínez A.; Martínez G.; Muñoz J.L.; Arciniegas A.; Romo de Vivar A. (1999). Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 66: 75-78.

Backhouse, N.; Rosales, L.; Apablaza, C.; Goity, L.; Erazo, S.; Negrete, R.; Theodoluz, C.; Rodríguez, J.; Delporte, C. (2008). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *J. Ethnopharmacol.* 116: 263-269.

Barrow, M.V.; Taylor, J. (1969). A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morph.* 127: 291-306.

Bartozs, G. (2009). Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* 77: 1303-1315.

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

Beckman, K.B.; Ames, B.N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *J. Am. Physiol. Soc.* 78: 547-581.

Brownlee, M.; Cerami, A. (1991). The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 385-432.

Bolzan, A.D.; Bianchi, M.S. (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat. Res.* 512 (2-3): 121-34.

Bono, V.H. Jr. (1976). Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas. *Cancer Treat. Rep.* 60 (6): 699-702.

Bucala, R.; Makita, Z.; Konschinsky, T. (1993). Lipid advanced glycosylations; pathway for lipid oxidations *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6434-6438.

Bunker, V.W. (1992). Free radicals, antioxidants and ageing. *Med. Lab. Sci.* 49: 299-312.

Camacho, D.; Nahed, J.; Ochoa, S.; Jiménez, G.; Soto, L.; Grande, D.; Pérez-Gil, F.; Carmona, J.; Aguilar, C. (1994). Traditional knowledge and fodder potential of the genus *Buddleia* in the Highlands of Chiapas, Mexico. *Anal. Feed Sci. Technol.* 80: 123-134 .

Cárdenas, R.N.; Pedraza, C.J. (2005) Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. México, D.F. México.

Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-320-10. (2010). Diagnóstico y tratamiento de la Diabetes en el embarazo (Evidencias y Recomendaciones). 54 pp.

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

Clapés, S. (2000). Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo. *Rev. Cub. Invest. Biomed.* 19 (3): 191-195.

Czapski, G., Goldstein, S. (1986). When do metal complexes protect the biological system from superoxide toxicity and when do they enhance it? *Free Rad. Res. Comm.* 1(3): 157-161.

DeFronzo, R.A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North. Am.* 88(4): 787-835.

Delanty, N.; Dichter, M.A. (1998). Oxidative injury in the nervous system. *Acta. Neurol. Scand.* 98: 145-53.

Ding, Y.; Li, S.; Ma, R.L., Guo, H.; Zhang, J.; Zhang, M.; Liu, J.; Guo, S. (2015). Association of homeostasis model assessment of insulin resistance, adiponectin and low grade inflammation with the course of metabolic syndrome. *Clin. Biochem.* 48(7-8): 503-507.

Donnelly, R.; Emslie-Smith, A.M.; Gardner, I.; Morris, A. (2010). ABC of vascular disease: Vascular complications of diabetes. *Brit. Med. J.* 320(7245): 1062-1066.

Djordjevic, A.; Spasic, S.; Jovanovic-Galovic, A.; Djordjevic, R.; Grubor-Lajsic, G. (2004). Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 16 (6): 367-372.

Emerit, I. (1990). Clastogenic factors: Detección and assay. *Methods Enzymol.* 186:555-64.

Epand, R.M.; Stafford, A.R.; Tyers, M.; Nieboer, E. (1985). Mechanism of action of diabetogenic zinc-chelating agents. *Mol. Pharmacol.*, 27:366-374.

Esposito, E.; Dal Toso, R.; Pressi, G.; Bramanti, P.; Meli, R.; Cuzzocrea, S. (2010). Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms. *Arch. Pharmacol.* 381: 93–105.

Folch-Mallol, J.L.; Garay-Arroyo, A.; Lledías, F.; Covarrubias Robles, A.A. (2004). La respuesta al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* Vol. (1-2): 24-46.

Ghadge, G.D.; Lee, J.P.; Binodokas, V.P.; Jordan, J.; Ma, L.; Miller, R.J.; Roos, R.P. (1997). Mutant Superoxide Dismutase-1- Linked Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: Molecular Mechanisms of Neuronal Death and Protection. *J. Neurosci.* 17: 8756.

Goldman, A.S.; Baker, L.; Piddington, R.; Max, B.; Herold, R. (1985). Hiperglicemia induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 82: 8227-31.

Gómez L.M.; Perezgrovas, G.R. (1990). "El sistema tradicional de manejo de ovinos". En: Perezgrovas G., R. (Ed.). Los carneros de San Juan. Ovinocultura indígena en los Altos de Chiapas. Centro de Estudios Indígenas. Universidad Autónoma de Chiapas. San Cristóbal de las Casas, Chis.

Grunert R.R.; Phillips P. H. (1951.) Uric acid diabetes in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76: 642-645.

Guyton, C.G.; Hall, J.E. (2011). Tratado de Fisiología Médica. 12ª Edición. Elsevier.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. (1984). Oxigen toxicity oxigen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.

Halliwell B.; Gutteridge J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publication, 3rd ed.

Harman, D. (1986). Free radicals theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes. In: Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases. Alan R. Liss, Inc. Ed.: 3-49.

Harris, M.I. (2003). Definición y clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para el diagnóstico. En: Diabetes mellitus fundamentos y clínica. LeRoith, H., Taylor, S. I., y Olefsky, J. M. Editores. 2a ed. Ed. Mc Graw Hill. México. Pp. 406-416.

Herrera, E. (1977). Metabolismo lipídico durante la gestación. *Aliment. Nutr. Salud.* 42:43-9.

Herrero, E.; Ros, J.; Bellí, G.; Cabiscol, E. (2008) .Redox control and oxidative stress in the yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1780(11): 1217-1235.

Kadota, I. (1950). Studies on experimental diabetes mellitus, as produced by organic reagents J. *Lab. Clin. Med.* 35: 568-591.

Kehrer, P.J. (2000).The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149: 43-50.

Kimmel, C.A.; Trammell, C. (1981). A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technol.* 56: 271-273.

Korkina, L.G. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell. Mol. Biol.* 53(1): 15–25.

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

Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 15(2): 97-103.

Montelongo, A.; Lasunción, M.A.; Pallardo, L.F.; Herrera, E. (1992). Longitudinal study of plasma LP and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes* 41: 1651-1659.

Nasri, K.; Razavi, M.; Reza, R.M.; Mashhadi, E.; Chehrei, A.; Mohammadbeigi, A. (2015). Mid-Gestacional serum uric acid concentration effect on neonate birth weight and insulin resistance in pregnant women. *Int. J. Crit. Ill. Inj. Science.* 5(1): 17-20.

Norman, M.E. (1966). The genus *Buddleia* in North America. *Gentes Herbarium* 10: 47-116.

Ocampo A.G. (2003) Flora del bajo y de regiones adyacentes. Fascículo 115. Instituto de Ecología. Disponible en: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOBA/Buddlejaceae115.pdf>

Organización Mundial de la Salud. Diabetes. OMS. 2005. Disponible en: http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/

Organización Mundial de la Salud. Diabetes. OMS. 2010. Disponible en: <http://www.worlddiabetesday.org/es/>

Ornoy, A. (2007). Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod. Toxicol.* 24: 31-41.

Palomino, G.M.A.; Revilla, M.M.A.; Cárdenas, S.A.; Polanco, P.A.C.; Islas, A.S. 1998. Efecto de la diabetes inducida sobre la reproducción y el desarrollo. *Ginecol. Obstet. Méx.* 66(10):403-406.

Persson, B. (2001). Prevention of fetal malformation with antioxidants in diabetic pregnancy. *Pediatr. Rev.* 49 (6): 755-762.

Polanco, A. (2001). Efecto de la diabetes inducida sobre la gestación y el desarrollo de las crías de ratas. Tesis presentada para obtener el grado de Maestría en Biología de la Reproducción, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. 94 pp.

Polanco, P.A.C.; Revilla, M.M.C.; Palomino, G.M.A.; Islas, A.S. (2005). Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas. *Ginecol. Obstet. Mex.* 73: 544-52.

Pérez, P.L.M. (2000). Estrés oxidativo: la paradoja del oxígeno. *Rev. Cub. Endocrinol.* 11(3): 139-42.

Ramos, H.; Méndez, J. (1994). Diabetes mellitus experimental. *Rev. Ciencia Veterinaria,* 12 (6): 347-377.

Rerup, C.C. (1970). Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 22(4):485-518.

Rivas, A.S.; Colín-Barenque, L.; Dorado-Martínez, C.; Fortoul, T. (2001). Estrés oxidativo y neurodegeneración en temas selectos de neurociencias. *Rev. Fac. Med. UNAM* 46 (6): 229-235

Rzedowski, J.; Calderón de Rzedowski, G. (1985). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, México. 674 p. vol. 2.

Rzedowski, G.C.; Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Solecki, R.; Rauch, M.; Gall, A.; Buschmann, J.; Clark, R.; Fuchs, A.; Kan, H.; Heinrich, V.; Kellner, R.; Knudsen, T.; Li, W.; Makris, S.; Ooshima, Y.; Paumgarten, F.; Piersma, A.; Schönfelder, G.; Oelgeschläger, M.; Schaefer, C.; Shiota, K.; Ulbrich, B.; Ding, X.; Chahoud, I. (2015). Continuing harmonization of terminology and innovations for methodologies in developmental toxicology. *Reprod. Toxicol.* 57: 140–146

Standley, P.C.; Williams, L.O. (1969). Flora of Guatemala. The Loganiaceae by Dorothy N. Gibson Fieldiana: *Botany* 24-8(4):263-474.

Szkudelski T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50:536-546.

Takhshid, M.A.; Zahediannejad, Z.; Aboualizadeh, F.; Moezzi, L.; Ranjbaran, R. (2015). G22A Polymorphism of adenosine deaminase and its association with biochemical characteristics of gestational diabetes mellitus in an Iranian Population. *Iran. J. Med. Sci.* 40(2):170-174.

Terrones R.T.R. González S.S.; Ríos R.A. (2004). Arbustivas nativas de uso múltiple en Guanajuato. Libro Técnico No. 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Guanajuato, México.

Trejo-González, N.L.; Chirino-Galindo, G.; Palomar-Morales, M. (2015). Capacidad antiteratogénica del resveratrol en diabetes inducida por estreptozotocina en ratas. *Rev Peru Med Exp Sal. Pub.* 32(3): 457-463.

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.

Valdéz, A.L.; Márquez, A. (1989). La macrosomía y el gigantismo en el hijo de madre diabética. *Rev. Cub. Obstet. Ginecol.* 15(3):129-39.

Wang, Z.; Gleichmann, H. (1998). GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47 (1): 50-6.

Wickens, D.; Wilkins, M.H.; Lunec, J.; Ball, G.; Dormandy, T.L. (1991). Free radical oxidation products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann. Clin. Biochem* 18: 158-162.

Zahner, D.; Malaisse, W.J. (1990). Kinetic behaviour of liver glucokinase in diabetes. I. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes Res.* 1990; 14 (3): 101-8.