



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**EXPRESIÓN DEL GEN *BCL-2* EN UN MODELO *IN VITRO* DE EMBRIOPATÍA DIABÉTICA BAJO TRATAMIENTO CON ESPERMIDINA Y ESPERMINA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :**

**Hernández Hernández Dennis Eber**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Martín Palomar Morales**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Metabolismo de la Diabetes Mellitus (L-511), de la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección del Dr. Martín Palomar Morales.

Se contó con el apoyo parcial de PAPIIT (Proyecto IN215414). Durante año y medio se gozó de beca de licenciatura del mismo proyecto.

¿Has entrado tú hasta las fuentes del mar,  
Y has andado escudriñando el abismo?

Job 38:16

## **Agradecimientos**

A Dios incomparable, por proveer de las cosas y personas necesarias en mi vida, por cuidar de mí y permitirme llegar hasta este punto, por el crecimiento que ha generado, por lo que ha hecho y hará en mi vida, por darme tantas oportunidades aun sabiendo que no lo merezco.

A mi papá por ser un hombre esforzado que ama a su familia, por las veces que me ha animado a seguir adelante y decirme que no me preocupe que el buscara los medios.

.

A mi mamá por ser una mujer perseverante y muy trabajadora, por lo que me enseña a diario, por su amor y cuidados.

A mi hermano Hugo, por ser un gran ejemplo, por enseñarme, cuidarme, amarme y ser de gran apoyo en mi vida en este tiempo.

A mi hermana Abigail por sus los cuidados que ha tenido conmigo.

A Sandi por ser un gran apoyo y ejemplo en mi vida, por las cosas que me ha enseñado en este tiempo, por la paciencia que me demuestra día a día y por su amor.

A Hugo, Laura y Roberto, por ser verdaderos amigos, por las veces que compartimos risa, tristezas, preocupaciones y también necesidades en este camino.

A Martín y Gladys, por su paciencia, por enseñarme a resolver problemas y por los conocimientos compartidos.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADC</b>	<b>Arginina descarboxilasa</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosín trifosfato</b>
<b>Bcl-2</b>	<b>Proteína linfoma folicular de células B</b>
<b><i>BCL-2</i></b>	<b>Gen linfoma folicular de células B</b>
<b>cDNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico complementario</b>
<b>CC</b>	<b>Cultivo control</b>
<b>DG</b>	<b>Grupo control <i>in vivo</i></b>
<b>DM</b>	<b>Diabetes mellitus</b>
<b>DM1</b>	<b>Diabetes mellitus de tipo 1</b>
<b>DM2</b>	<b>Diabetes mellitus de tipo 2</b>
<b>DMG</b>	<b>Diabetes mellitus gestacional</b>
<b>ERO</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b><i>GAPDH</i></b>	<b>Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa</b>
<b>GLC</b>	<b>Grupo alta glucosa</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutación reducido</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrógeno</b>
<b>MC</b>	<b>Malformaciones congénitas</b>
<b>mRNA</b>	<b>Ácido ribonucleico mensajero</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	<b>Oxígeno singulete</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>Anión superóxido</b>

<b>ODC</b>	<b>Ornitina descarboxilasa</b>
<b>'OH</b>	<b>Radical hidroxilo</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa inversa</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido dismutasa</b>
<b>GLC + SPD</b>	<b>Grupo glucosa suplementado con Espermidina</b>
<b>GLC+ SPM</b>	<b>Grupo glucosa suplementado con Espermina</b>

## ÍNDICE GENERAL

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
2.1	DIABETES MELLITUS	2
2.2	EMBARAZO Y DIABETES MELLITUS	3
2.3	POLIAMINAS	6
2.4	ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO	8
2.5	ESTRÉS OXIDATIVO	13
2.6	APOPTOSIS	15
2.7	APOPTOSIS Y EMBARAZO COMPLICADO CON DIABETES MELLITUS	16
2.8	<i>BCL-2</i>	17
2.9	ANTECEDENTES	18
2.10	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
2.11	HIPÓTESIS	22
3	OBJETIVOS	22
4	MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1	Material biológico	23
4.2	Preparación de medios de cultivos	23
4.3	Cultivo de embriones	23
4.4	Análisis morfológico	24
4.5	Extracción de DNA	24
4.6	PCR de punto final de gen <i>BCL-2</i>	24

4.7	Extracción de RNA total	25
4.8	RT-PCR gen <i>BCL-2</i>	25
4.9	Inmunohistoquímica de la proteína Bcl-2	25
4.10	Tratamiento estadístico	26
5	RESULTADOS	27
5.1	Morfología y Morfometría	27
5.2	PCR gen <i>BCL-2</i>	35
5.3	RT-PCR gen <i>BCL-2</i>	35
5.4	Inmunohistoquímica de la proteína Bcl-2	38
6	DISCUSIÓN	42
7	CONCLUSIONES	46
8	REFERENCIAS	47
9	ANEXOS	54
9.1	Extracción de ADN	54
9.2	Electroforesis horizontal	55
9.3	Diseño de <i>primers</i>	56
9.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
9.5	Extracción total de RNA total	58
9.6	Cuantificación de RNA total	59
9.7	RT-PCR	60
9.8	Técnica histológica	62
9.9	Inmunohistoquímica	63

## 1 RESUMEN

La Diabetes mellitus (DM) es un síndrome metabólico caracterizado por un estado de hiperglucemia, que afecta a millones de personas en el mundo, de acuerdo a la OMS su prevalencia va en aumento. En madres con DM pregestacional, se encuentra una elevada frecuencia de malformaciones congénitas, de 3 a 5 veces más que en la población abierta, Al parecer causadas por cambio en la expresión de proteínas apoptóticas y antiapoptóticas, debido al estrés oxidativo producido por la DM; como la proteína del gen *BCL-2*, que está relacionada directamente en el control y la inhibición de la apoptosis en situaciones de estrés oxidativo, se ha reconocido su actividad antioxidante y de supervivencia celular. Las células que sobreexpresan Bcl-2 sobreviven más tiempo con un incremento en la capacidad de reparación del daño en el DNA. Para estudiar la expresión del gen *BCL-2* durante la embriopatía diabética se obtuvieron embriones de rata de 10 días de edad gestacional, que se incubaron en cuatro condiciones: medio normal, medio suplementado con glucosa, medio suplementado con glucosa y espermina, y medio suplementado con glucosa y espermidina, por 24 h a 37 °C, en un aparato rotatorio a 30 rpm. Además, se tuvo un control externo de 11 días (*in vivo*). Los embriones post-cultivo se recuperaron, se observaron para obtener el registro morfológico como indicador de desarrollo y se fotografiaron. De un embrión por cada grupo se obtuvo el RNA con Trizol, y se realizó la técnica de RT-PCR para estudiar la expresión del gen *BCL-2* a nivel de mRNA. Otros embriones se fijaron en paraformaldehído, para ser deshidratados, aclarados, embebidos e incluidos en Paraplast plus, y por último se cortaron a 8 µm de espesor, para ser utilizados en la técnica de inmunohistoquímica para la proteína Bcl-2. El mayor porcentaje y severidad de dismorfogénesis se encontró en los embriones incubados con glucosa, mientras que las poliaminas espermidina y espermina revierten las malformaciones que la glucosa causa, como ya se había reportado. En cuanto el mRNA de *BCL-2* se expresa en todos los grupos, al parecer en niveles muy similares. Con respecto a la detección inmunohistoquímica, de la proteína Bcl-2, ésta sólo se observó en los individuos del grupo control normal. En conclusión, al parecer existe una regulación positiva por parte de la glucosa en la transcripción del gen, que las poliaminas no revierten.

## **2 INTRODUCCIÓN**

La diabetes mellitus (DM) plantea un grave problema mundial de salud pública y económica, debido a que ha aumentado su incidencia y prevalencia, en particular en los países en vías de desarrollo o de reciente industrialización (Díaz-Flores y cols., 2004). Tan solo en México, el registro realizado por la Encuesta Nacional de Salud en el 2016 (ENSANUT) estimó que existen alrededor de 6.4 millones (9.4% de la población adulta) de mexicanos que padecen DM mientras que la carga económica de la diabetes mellitus (9.2% de la población adulta) en México fue de 362,859.82 millones de pesos, es decir 2.25% del PIB de ese mismo año (ENSANUT, 2016).

### **2.1 DIABETES MELLITUS**

La DM se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por un cuadro de hiperglucemia crónica, resultante de defectos en la secreción de la insulina, la acción de la misma, y alteraciones del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. Es asociada con daño a largo plazo, disfunción y fallas de diferentes órganos especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Kahan, 1997; American Diabetes Association, 2011).

Hasta el momento se han clasificado en cuatro grandes tipos de DM que se diferencian de acuerdo a su etiología, y población a la que afecta (The Expert Committee, 2003):

1.- Diabetes tipo 1 (DM1). Esta forma de diabetes, previamente conocida como diabetes Insulino-dependiente, diabetes juvenil, o diabetes autoinmune, es caracterizada por la destrucción de células  $\beta$  del páncreas mediada por anticuerpos, de manera que la producción de insulina es nula o insignificante, ocurre comúnmente en la niñez y la adolescencia. En esta forma de diabetes, la tasa de destrucción de células beta es bastante variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente infantes y niños) y lenta en otros (principalmente adultos).

2.- Diabetes tipo 2 (DM2). Antes conocida como diabetes no insulino-dependiente, o diabetes del adulto, se caracteriza principalmente por la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, como resultado de alteraciones en los eventos bioquímicos posteriores a la unión de la hormona con su receptor. La DM2 es la más

frecuente en la población mexicana, al igual que en la población mundial. En muchos casos está asociada con obesidad que provoca cierto grado de resistencia a la insulina. Los riesgos de desarrollar esta forma de diabetes incrementan con la edad, obesidad y falta de actividad física. Este padecimiento ocurre frecuentemente en mujeres que tuvieron diabetes mellitus gestacional, individuos con hipertensión, dislipidemia y su frecuencia varía en diferentes subgrupos raciales y étnicos. Es a menudo asociado con una fuerte predisposición genética.

3.- Diabetes mellitus gestacional (DMG). Es definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa durante el embarazo, que no es diagnosticada como diabetes preexistente. Se presenta por lo general en el tercer trimestre del embarazo. La resistencia a la insulina es más acentuada, lo cual modifica el medio intrauterino y causa crecimiento acelerado del feto, con riesgo elevado de macrosomía. La definición se usa aun sí la insulina o sólo la modificación de la dieta se utilizan para el tratamiento o sí la condición persiste después del embarazo. No excluye la posibilidad de que la intolerancia a la glucosa no reconocida haya precedido o comenzado concomitantemente con el embarazo (García, 2008).

4.- Otros tipos específicos de diabetes. Un cuarto grupo está formado por alteraciones diversas como defectos genéticos de las células beta, defectos genéticos en la acción de la insulina, desordenes del páncreas exocrino, endocrinopatías, diabetes inducida por drogas o sustancias químicas, infecciones, formas poco frecuentes de diabetes mediada por el sistema inmunológico, otros síndromes genéticos asociados con diabetes, donde la enfermedad es un resultado secundario de la afección primaria.

## **2.2 EMBARAZO Y DM**

La DM durante el embarazo es un problema médico reconocido, ya que el trastorno metabólico materno tiene efectos perjudiciales en el desarrollo embrionario (Suhonen y cols., 2000). La asociación de DM con los defectos congénitos en el nacimiento y mortalidad fetal en el embarazo fue reconocida y se conoce como embriopatía diabética (Fernández y cols., 2013). Antes de la introducción de la insulina, la diabetes asociada a la mortalidad fetal y maternal era casi del 70% y 40%, respectivamente, ya que la administración de insulina controla la glicemia en mujeres embarazadas; la mortalidad disminuyó dramáticamente a casi 12% a partir de la introducción de la insulina en la

terapéutica médica (Freinkel, 1980; Nazer y cols., 2005). Además, el control de la glicemia con insulina, el cuidado perinatal y manejo neonatal contribuyeron a la disminución de la mortalidad maternal y fetal (Zhiyong y Reece, 2013).

La gran mayoría de mujeres con DM pregestacional, ya sea de tipo 1 ó 2, conocen la existencia de su padecimiento antes del embarazo, pero aproximadamente entre 4 y 14% de mujeres parece ignorar el hecho de padecer DM2; siendo detectado este padecimiento por primera vez durante el embarazo, lo cual por definición correspondería a una DMG (Buchanan y cols., 2007). El antecedente de DM1 o DM2, resulta de suma importancia, debido a que el descontrol glucémico que a menudo se observa en estas mujeres juega un papel determinante en las complicaciones que se presentan desde el momento mismo de la concepción y durante todo el embarazo, a menudo se complica con aborto, preeclamsia, polihidramnios (aumento de la cantidad de líquido amniótico), defectos congénitos, nacimiento pretérmino e incluso muerte materna, que aún en los mejores centros de atención es diez veces más frecuente que en la población general (The Expert Committee, 2003).

En México, la incidencia de embarazos complicados con DM preexistente o gestacional para el año 2010 fue de 13%, muy similar a la reportada por estudios a nivel nacional en el año 2013. El instituto Nacional de Perinatología (INPER) reportó una prevalencia del 8.4%, mientras el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del 17.7% (Hinojosa y cols., 2010). Tan solo en el año 2016 se reportaron 522 mil individuos del sexo femenino, que comprenden un rango de edad de los 20 a los 39 años (edad preferentemente fértil), que fueron diagnosticadas con DM. Mientras, que en a principios del año 2017 se habían reportado 3,624 casos de embarazo complicados con DM (ENSANUT, 2016). Los estudios clínicos han estimado que el riesgo de malformaciones congénitas (MC) en un embrión de una madre que presenta DM está en el rango de 5 a 10%, lo que sigue siendo superior a la de la población general (3%) y va en aumento (Penney y cols., 2003).

Las MC en infantes de madres diabéticas han sido asociadas con la descompensación de este síndrome al inicio del período de organogénesis, por lo tanto, la embriopatía diabética solo ocurre en embarazadas con DM1 o DM2, que está presente en el inicio de la gestación, e incluyen anomalías de cierre de tubo neural, de los sistemas nervioso, cardiovascular, renal, y esquelético, así como retardo en el crecimiento y aborto. Mientras que la DMG, se asocia a la resistencia a la insulina que se produce en la segunda mitad

del embarazo, y no induce malformaciones estructurales, ya que se produce después del período de organogénesis (Calciu y cols., 2002; Chappel y cols., 2009; Freinkel, 1980).

Los estudios clínicos han demostrado que el riesgo de presentar MC depende de la regulación del metabolismo de la glucosa en la sangre durante el primer trimestre, específicamente, durante las primeras siete semanas de embarazo (Buchanan y Kitzimiller, 1994). Por otro lado, hay reportes que sugieren que no todas las MC pueden prevenirse con buen control glucémico, por lo cual se ha propuesto que existen otros factores que participan en el proceso teratógeno durante el embarazo diabético, entre los cuales se podrían encontrar los cuerpos cetónicos, las especies reactivas de oxígeno (ERO), alteración del metabolismo del ácido araquidónico, los triglicéridos y productos de glicación avanzada (AGE) entre otros (Buchanan y cols., 1994; Dennery, 2007; Eriksson y Wentzel, 2016; Shubert y cols., 1996).

Existen varios trastornos celulares y metabólicos que se han propuesto para desempeñar un papel en el desarrollo de defectos en la descendencia de una paciente con DM, como alteraciones intracelulares en el metabolismo del mio-inositol y del sorbitol, aumento de la actividad de la proteína cinasa C, disminución de la absorción de ácido araquidónico, síntesis defectuosa de prostaglandinas, señalización por PPAR (Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales), mutaciones aleatorias del DNA y estrés oxidativo (Baack y cols., 2014; Chappel y cols., 2009; Eriksson y Wentzel, 2016; Reece y cols., 1997).

Uno de los modelos más útiles para el estudio de la embriopatía diabética fue el que usó New (1978), y que consiste en la obtención de embriones postimplantacionales de ratas normales. Los embriones son cultivados durante 24 a 48 h, lapso en el que se produce el cierre de tubo neural. Cuando el suero en que se cultivan estos embriones proviene de ratas sanas, el cierre se produce igual que en condiciones *in vivo*, pero cuando el suero que se usa para el cultivo es de ratas en las que se ha provocado una diabetes, los embriones de algunas cepas de ratas presentan una tasa alta de defectos del tubo neural. En general, estos modelos resultan en la malformación de las estructuras craneofaciales, tubo neural y el retardo del crecimiento (Chappel y cols., 2009; Eriksson y cols., 1991; Nazer y Ramírez, 2000). Varios grupos de investigadores, usando modelos similares en ratas, han encontrado que agregando grandes concentraciones de glucosa al suero de cultivo, se inducen defectos en el cierre del tubo neural (Calciu y cols., 2002; Chirino-Galindo y cols., 2009).

Un segundo hecho constatado en estos modelos experimentales, fue que en algunas cepas de ratas con diabetes experimental y que presentaban mayor cantidad de anomalías esqueléticas y muertes embrionarias *in vivo*, había evidencias de que las ERO estarían involucradas en la aparición de esas malformaciones y abortos espontáneos. Demostraron que la administración de antioxidantes a estas ratas, reducen la cantidad de malformaciones en los embriones que han sido expuestos a grandes concentraciones de glucosa y de otros elementos oxidativos *in vitro* (Nazer y Ramírez, 2000). Estos hallazgos se han considerado potencialmente aplicables en humanos, ya que hay varias sustancias con propiedades antioxidantes como las poliaminas, que podrían llegar a ser útiles en la prevención de los defectos congénitos, pues reducen la toxicidad de los radicales libres, (Eriksson y cols., 1991; Nazer y Ramírez, 2000). A pesar de numerosas mejoras en el manejo de la DM, la incidencia de MC incrementa y sigue siendo una complicación importante en bebés de madres diabéticas (El-Bassiouni y cols., 2005).

### **2.3 POLIAMINAS**

Las poliaminas son moléculas alifáticas nitrogenadas, de bajo peso molecular, con grupos amino distribuidos de forma regular a lo largo de su estructura. Se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina) (Fernández y Álvarez, 2008).

En los seres humanos las poliaminas provienen de dos fuentes, por un lado, a) un origen endógeno por la biosíntesis de *novo* e interconversiones entre ellas mismas, así como de las secreciones digestivas (especialmente intestinal y pancreática), las descamaciones y los productos del catabolismo de las propias células intestinales; y, b) un origen exógeno a partir del consumo dietético y mediante la producción de poliaminas por los microorganismos intestinales (Minois y cols., 2011).

La L-arginina es un amino ácido precursor de muchas moléculas importantes en la fisiología celular, incluyendo las poliaminas (Figura 1). En microorganismos y plantas, las poliaminas se generan a través de la conversión de L-arginina a ornitina a través de la arginasa o arginina descarboxilasa (ADC) y posteriormente a agmatina y a putrescina. La mayoría de las células de mamíferos tienen la capacidad de producir las poliaminas que necesitan a partir de ornitina por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC) que produce

putrescina, la cual origina espermidina y espermina a través de la acción de la espermidina sintasa y espermina sintasa, respectivamente. La cadaverina se produce a partir de lisina; la ruta depende de la especie y del momento del desarrollo en que se producen (Herrera y cols., 2014).

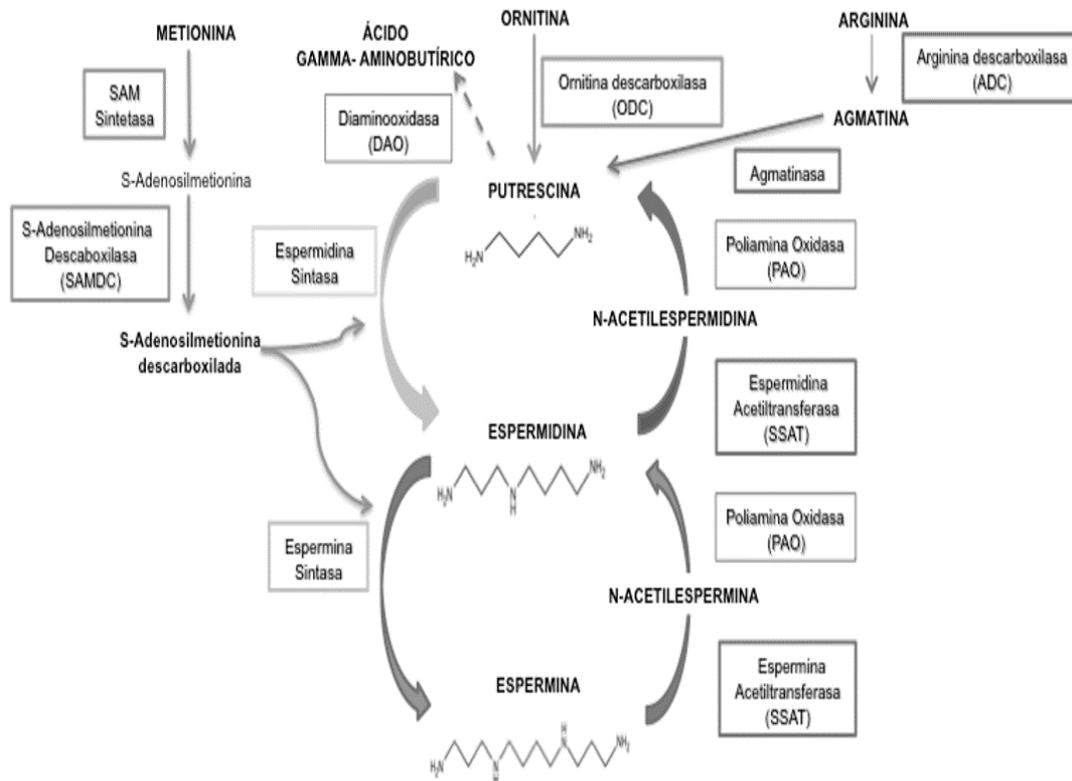


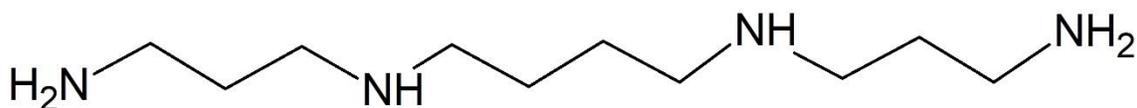
Figura 1. Metabolismo de poliaminas (Herrera y cols., 2014).

Numerosos estudios realizados en seres humanos y en animales de experimentación han evidenciado la importancia de las poliaminas en los estados de salud y enfermedad. Son fundamentales en el hombre en los procesos de señalización, replicación, transcripción, traducción, crecimiento, desarrollo, diferenciación y apoptosis celular. Sin embargo, sólo se ha estudiado el efecto de tres de las poliaminas mencionadas anteriormente (putrescina, espermidina y espermina) en el estudio y prevención de la embriopatía diabética (Figura 2), observándose una mayor prevención por parte de las poliaminas espermidina y espermina (Chirino-Galindo y cols., 2009; Méndez y Palomar-Morales,

1999). Las poliaminas están involucradas en múltiples funciones biológicas, así como en procesos patológicos. Su naturaleza catiónica les permite interactuar con ácidos nucleicos y proteínas, por lo que se consideran elementos estructurales básicos y promueven la homeostasis. Su desregulación afecta procesos epigenéticos, de proliferación celular y apoptosis por lo que se ven relacionadas con el cáncer y otros padecimientos. En modelos animales, se ha demostrado que las poliaminas son necesarias para el desarrollo embrionario normal, y que cuando su síntesis es específicamente inhibida, se detiene (Fozard y cols., 1980; Herrera y cols., 2014; Hussain, y cols., 2017).



espermidina



espermina

Figura 2. Estructura molecular de las poliaminas (Herrera y cols., 2014).

## 2.4 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

El oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) 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, El O<sub>2</sub> atmosférico es producto de la oxidación del agua que lleva a cabo el fotosistema II de las plantas, algas y cianobacterias con la luz solar. La mayoría de los organismos, utilizan el O<sub>2</sub> para respirar. Reducen el O<sub>2</sub> en agua y la energía de esta reacción la utilizan para formar adenosín trifosfato (ATP) y para transportar iones y

metabolitos a través de las membranas celulares. Aproximadamente el 80% del ATP que utilizamos se forma en las mitocondrias en donde se consume entre el 85 y el 90% del O<sub>2</sub> (Hansberg, 2002).

El reconocimiento de los efectos tóxicos del O<sub>2</sub> sobre los seres vivos se remonta al último tercio del siglo XVIII, en 1777 Carl Wilhem Sheel los describe por primera vez. Mientras que los primeros experimentos controlados que demostraron el efecto tóxico del O<sub>2</sub> sobre los animales fueron realizados por Paul Bert a finales del siglo XIX. Esto ocurrió a solo dos años después de que Scheele y Joseph Priestle descubrieran a la vez e independientemente esta molécula. Desde el siglo XIX y durante los primeros seis decenios del siglo XX, se han acumulado datos sobre la letalidad y las consecuencias patológicas de la exposición a altas concentraciones de O<sub>2</sub>. Así se ha descrito que la toxicidad del O<sub>2</sub> es mayor cuanto más alta sea la tasa metabólica de la especie considerada (Priestley, 1923; Scheele, 1971).

El O<sub>2</sub> molecular es un biradical, ya que tiene dos electrones desapareados en su último orbital. Sin embargo, tienen el mismo spin, lo que impide que el O<sub>2</sub> reaccione directamente con otros compuestos. La reducción directa por otros 2e<sup>-</sup> (a la vez) del O<sub>2</sub> molecular está impedida por el hecho de que los 2e<sup>-</sup> no pueden ocupar un mismo orbital con el mismo spin (Figura 3) (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El principio de exclusión de Pauli establece que un orbital atómico no puede ser ocupado por más de 2e<sup>-</sup> y para que estos 2e<sup>-</sup> lo ocupen deben tener spines contrarios (+½ y -½). La restricción de spin puede evadirse de tres formas (lo que permite que el O<sub>2</sub> pueda ser utilizado para la generación de energía (Halliwell y Gutteridge, 2015):

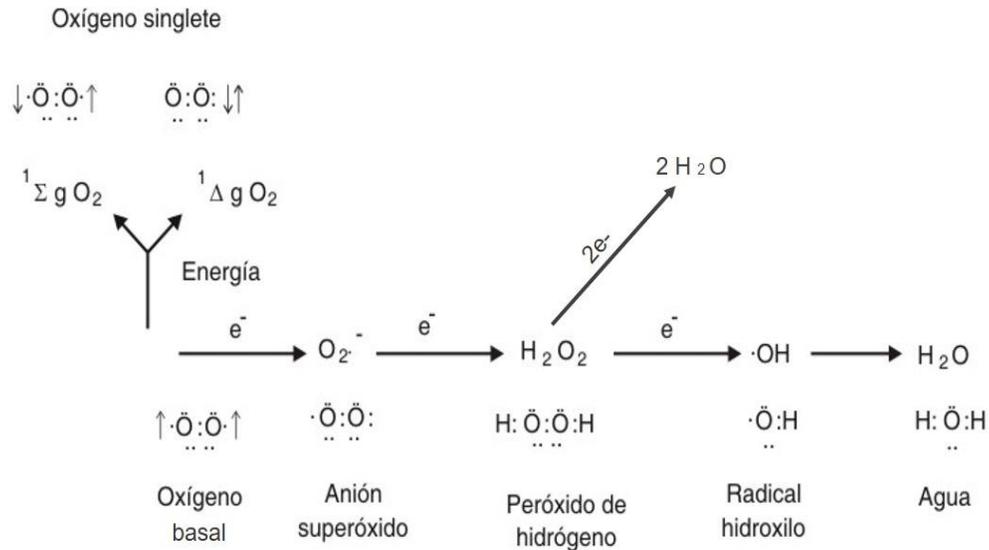


Figura 3. Reducción del oxígeno molecular mediante la adición sucesiva de electrones, imagen modificada de Halliwell y Gutteridge, 2015

1. Al excitarse el  $O_2$ , uno de los  $e^-$  desapareados puede pasar a otro orbital de más energía y así invertir su spin. De esta forma se genera el oxígeno singlete (altamente reactivo).

2. La unión del  $O_2$  a un metal de transición que contiene  $e^-$  desapareados forma complejos que pueden aceptar un par de  $e^-$  de otros substratos sin violar el principio de exclusión de Pauli.

3. La restricción de spin puede violarse mediante la adición de un  $e^-$  al  $O_2$  paso a paso. La reducción univalente del  $O_2$  involucra la producción de especies parcialmente reducidas de  $O_2$  (Figura 3).

A estas formas moleculares del oxígeno se les conoce como especies reactivas de oxígeno (ERO), como son el superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peróxido de hidrógeno, así como los oxiradicales ( $O_2$  singlete) (Figura 4). Debido a su función primordial de producción de energía química, la mitocondria es considerada la mayor productora de ERO (Halliwell y Gutteridge, 2015; Martínez, 2005).

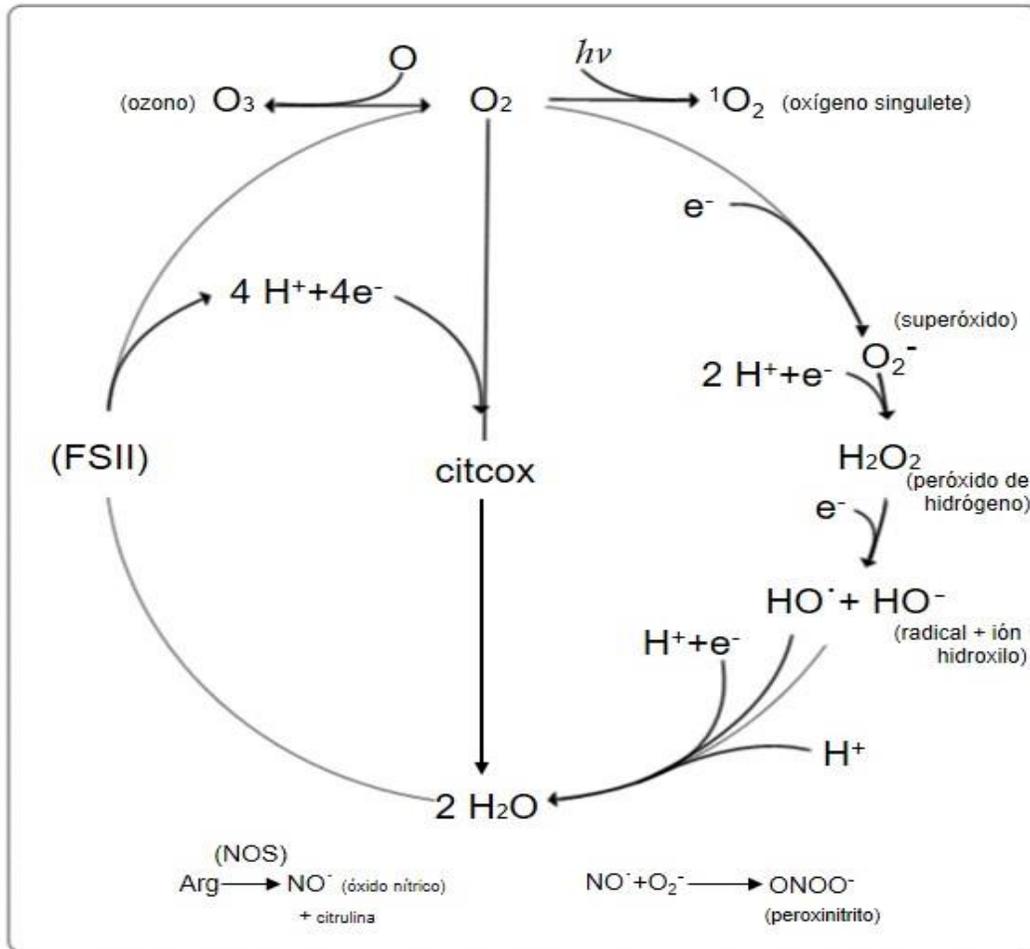


Figura 4. Principales especies reactivas de oxígeno. Las ERO se generan por la ruptura o la excitación del dióxígeno ( $O_2$ ,  $O_3$ ,  $^1O_2$ ) o por la reducción parcial del mismo ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ). El fotosistema II (FSII) lleva a cabo la oxidación completa del agua en dióxígeno (fotosíntesis) mientras que el citocromo c oxidasa (citcox) efectúa la reducción completa del dióxígeno en agua (respiración). El óxido nítrico ( $NO$ ) se produce por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), en cambio, el peroxinitrito se produce de manera espontánea.  $h\nu$  = energía de radiación (Imagen modificada desde Hansberg, 1999).

Las ERO regulan varios procesos celulares, en mamíferos 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, por citar algunos. 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 (Macedo, 2012).

La formación de las ERO es inherente al metabolismo aeróbico por medio del cual se obtiene energía de las diferentes moléculas en las células, y en este sentido la glucosa no es la excepción ya que es la principal molécula que se oxida para dar energía y la más abundante en la célula y en el organismo para fines metabólicos. Si bien es posible obtener las ERO en varias reacciones oxidativas de la glucólisis y del ciclo de los ácidos tricarbónicos, sin duda la mayor probabilidad de generar estas especies está en la cadena transportadora de electrones, donde se tiene la energía libre y el potencial Redox adecuado para reducir parcialmente al oxígeno y con ello generarlas. Es claro que de manera alterna a la acción fisiológica del metabolismo catabólico y como resultado de productos secundarios indeseables de la oxidación inherente para degradar, obtener y producir energía en el organismo, se genera una gran cantidad de las ERO, sin necesidad de un estado patológico o un estímulo externo (Calderón y cols., 2013).

El incremento de la actividad metabólica a cualquier escala, aumenta proporcionalmente la cantidad de ERO formadas de manera secundaria. Sin embargo, cuando se intensifica por arriba de las condiciones fisiológicas (estrés metabólico) la formación de ERO no se suma sino que se potencia, dado que en condiciones de un aumento notable del potencial de la membrana interna mitocondrial, debido a una acumulación excesiva de protones en el espacio intermembranal, se incrementa la permanencia, tiempo y posibilidad de reducir parcialmente el oxígeno en los diferentes puntos de la cadena respiratoria para formar agua ante la reducción total de oxígeno con la consecuente aparición de concentraciones exponencialmente mayores de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  como subproducto indeseable y que podrá inducir daño oxidativo (Calderón y cols., 2013; Hansberg, 2002).

Las ERO se han encontrado en concentraciones elevadas en numerosas enfermedades, y se ha propuesto que intervienen en la teratogénesis causada por la diabetes en el embarazo (Hagay y cols., 1995; Ornoy y cols., 1999). Las ERO pueden ser perjudiciales para las principales funciones de la célula, ya que al reaccionar con los ácidos grasos insaturados en las membranas, originan peroxidación de lípidos, lo que causa disminución en la fluidez de la membrana y la formación de aldehídos reactivos, que a su vez pueden difundir a otras partes de la célula y tener sinergia con macromoléculas. Las ERO pueden reaccionar directamente con las proteínas, dando como resultado, por ejemplo, entrecruzamiento del colágeno con el DNA, que causa daños tanto a las bases como a los

azúcares, además de la oxidación directa de las bases y azúcares del DNA (Cederberg y cols., 2000).

Hay tres tipos de evidencias que indican participación en exceso de ERO en la embriopatía diabética (Cederberg y cols., 2001; Fernández y cols., 2013):

Primero, la diabetes *in vivo* y la hiperglucemia *in vitro* causan daños en tejidos por radicales libres, un aumento de lípidos peroxidados, un incremento en la frecuencia de DNA dañado y un acrecentamiento intracelular de radicales libres.

Segundo, los problemas de desarrollo observados *in vivo* en ratas diabéticas preñadas y en los embriones cultivados *in vitro* a altas concentraciones de glucosa, pueden ser inducidos por la producción enzimática de  $O_2^-$  en los sistemas de cultivo de embriones.

Tercero, los antioxidantes de bajo peso molecular, al ser añadidos a la dieta, disminuyen la tasa de malformaciones en el embarazo de ratas diabéticas

## 2.5 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante en favor de los primeros, lo que conduce a daño potencial. Ahora se reconoce que el estrés oxidativo juega un papel central en la fisiopatología de muchos trastornos diferentes, incluyendo las complicaciones del embarazo (Halliwell y Gutteridge, 2015; Torres-Cuevas y cols., 2017).

El concepto de equilibrio pro-oxidante-antioxidante es fundamental para comprender el estrés oxidativo por varias razones. En primer lugar, hace hincapié en que la perturbación puede ser causada por cambios en ambos lados del equilibrio; por ejemplo, una generación anormalmente alta de ERO o deficiencias en las defensas antioxidantes. En segundo lugar, destaca las concentraciones homeostáticas de ERO. Aunque se pensaba que las ERO solo tenían efectos adversos a la salud, ahora se reconoce que desempeñan un papel importante como mensajeros secundarios en muchas vías de señalización intracelulares. Finalmente, el concepto de equilibrio llama la atención sobre el hecho de que habrá una respuesta gradual al estrés oxidativo. Por lo tanto, perturbaciones menores son propensas a dar lugar a adaptaciones homeostáticas en respuesta a los cambios en el entorno inmediato, mientras que las perturbaciones mayores pueden conducir a daños

irreparables como la muerte celular. Así, el límite entre los cambios fisiológicos normales y los patológicos es inevitablemente indistinto (Dröge, 2002; Burton y Jauniaux, 2011).

La generación de radicales libres está presente en la placenta y el feto desde el comienzo del embarazo, contribuyendo al desarrollo fetal normal. Al final del primer trimestre, el estrés oxidativo provoca la regresión de las vellosidades que se formaron sobre toda la superficie del saco coriónico para dejar la placenta discoidal definitiva. La actividad de desintoxicación placentaria protege al embrión en desarrollo de la teratogénesis mediada por radicales libres. Sin embargo, al final del primer trimestre un aumento de tres veces en la concentración de oxígeno inducido por la maduración placentaria provoca un aumento exponencial de la generación de ERO. Posteriormente, las vías apoptóticas activadas en las vellosidades periféricas contribuirán a su regresión. Sin embargo, bajo condiciones de desregulación homeostática, el estrés oxidativo será un factor determinante que conduzca a complicaciones tales como aborto involuntario, preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), ruptura prematura de membranas con el consiguiente riesgo de parto prematuro y generación de MC (Torres-Cuevas y cols., 2017).

Varios eventos en el embarazo alteran el estado Redox. Una de las condiciones más asociadas con la embriotoxicidad es la presencia de DM. Los embriones en desarrollo parecen ser muy sensibles a altos niveles de ERO, especialmente durante la organogénesis temprana. Altos niveles de oxígeno son tóxicos para el embrión, aparentemente debido al hecho de que los radicales superóxido formados en tal condición están en exceso en relación con la capacidad antioxidante del embrión en desarrollo. Por lo tanto, no es de extrañar que cualquier agente ambiental, o enfermedad materna que producen mayores niveles de radicales libres puede afectar al embrión en desarrollo al aumentar la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, DNA y RNA (Clapés y cols., 2013; Ornoy, 2007).

Esto representa un modelo de estrés oxidativo para el embrión debido a alteraciones bioquímicas dentro de los fetos como resultado de altas concentraciones de glucosa. Eliminar los radicales de oxígeno, ya sea aumentando la superóxido dismutasa (SOD) o suministrando N-acetilcisteína para aumentar la disponibilidad de glutatión reducido (GSH), bloquea las malformaciones embrionarias (Wentzel y Eriksson, 1998). Además, las ratas diabéticas preñadas alimentadas con una dieta enriquecida con el antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) aumentan el peso fetal en comparación con las ratas diabéticas

alimentadas con una dieta normal. Esto corrobora aún más el papel de los ERO en la embriopatía diabética (Dennerly, 2007; Eriksson y Siman, 1996).

## 2.6 APOPTOSIS

Se han descrito dos vías principales de muerte celular: un proceso pasivo que conduce a la necrosis y un programa activo, denominado apoptosis. La muerte celular que ocurre naturalmente como parte del funcionamiento normal de un tejido u órgano fue definida por Lockshin y Williams en 1965 como “muerte celular programada”, para distinguirla de la muerte accidental debida a daño o toxicidad. En general, la muerte celular programada ocurre vía apoptosis. La necrosis acontece por anomalías no fisiológicas en el ambiente celular, como pueden ser altas dosis de compuestos tóxicos, hipertermia, hipoxia o infecciones virales. Se caracteriza, un aumento del volumen celular, la alteración de la membrana plasmática y la pérdida de contenido intracelular, hay daño de los orgánulos citoplasmáticos, incluyendo la mitocondria, dilatación del retículo endoplasmático y formación de vacuolas. Como consecuencia la inflamación de los tejidos circundantes. (Frago, y cols., 2001; Wu y cols., 2011).

La apoptosis es activada por la aparición/desaparición de señales de otras células y por estímulos externos y se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y modificaciones bioquímicas. Al final del proceso, la célula apoptótica o sus fragmentos son fagocitados por células vecinas o macrófagos sin inducir la respuesta inflamatoria como parte de un proceso natural destinado a eliminar células. En este período, la apoptosis está implicada en procesos tales como la separación de los dígitos, la especialización del sistema inmune, la diferenciación sexual, el recambio de tejidos, la metamorfosis y la atrofia (Frago y cols., 2001). Desde entonces, se hizo evidente que la muerte que ocurre en las células posnatalmente, en respuesta a agentes fisiológicos, patológicos o farmacológicos, es similar a las muertes que tienen lugar durante la ontogenia. Actualmente se reconoce que la función de la apoptosis se ha extendido a morfogénesis, homeostasis de tejidos, regulación inmunológica y eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas. En todos estos casos una célula afectada detecta que su ambiente intracelular ha sido comprometido y, como consecuencia, desarrolla un proceso de suicidio usando una maquinaria molecular de muerte celular (Figura 5) (Li y cols., 1997).

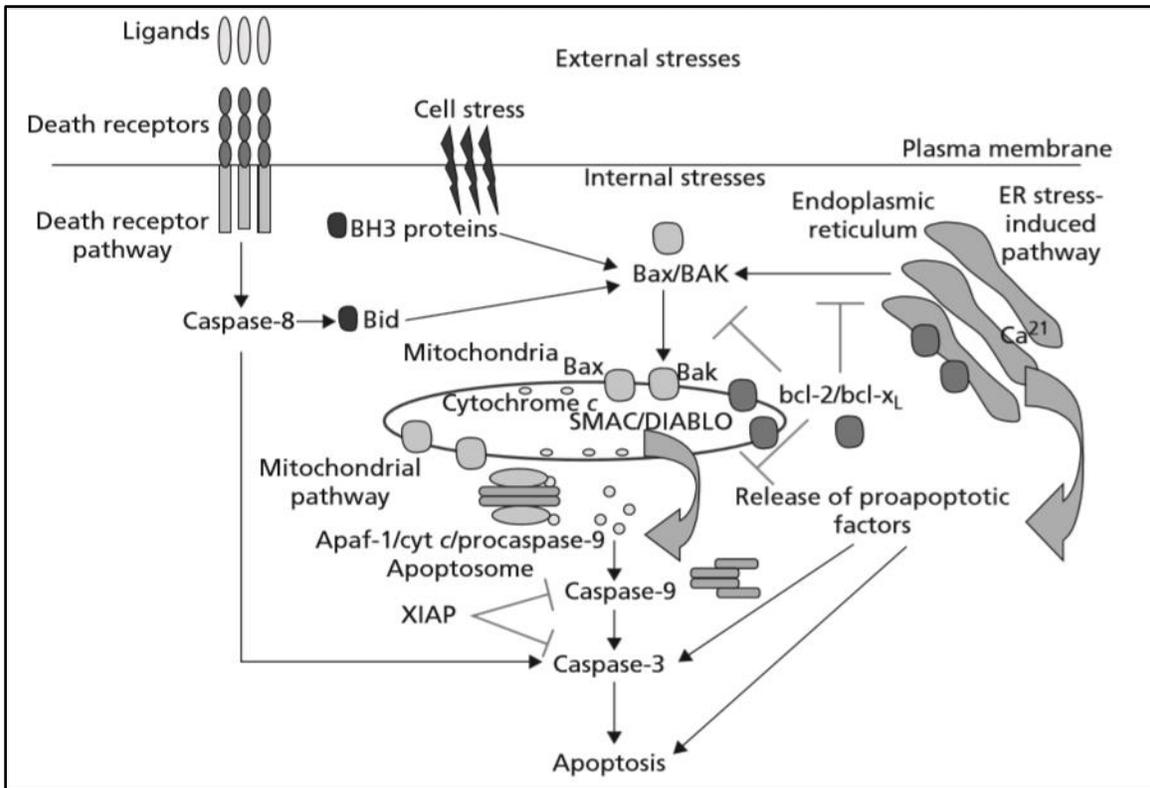


Figura 5. Vías moleculares que conducen a la apoptosis. Se reconocen tres rutas. La mediada por la superficie celular o el receptor de muerte que implica la unión de un ligando a un receptores de la familia TNF. La apoptosis mitocondrial inducida por estrés que activa a Bax y Bak. Estas proteínas se translocan a la membrana mitocondrial y conducen a la liberación de proteínas apoptóticas. La vía del retículo endoplásmico (RE) es inducida por proteínas plegadas erróneamente en el RE que conducen a la liberación de  $Ca^{2+}$  y a la activación de la vía de apoptosis mitocondrial y las caspasas asociadas a RE (Halliwell y Gutteridge, 2015).

## 2.7 APOPTOSIS Y EMBARAZO COMPLICADO CON DM

La muerte programada de las células regula procesos normales en la embriogénesis como se mencionó anteriormente, organiza el patrón dorsoventral del tubo neural, la formación de hueso, la fusión del paladar oral, el tubo neural y el desarrollo craneofacial. La muerte celular inapropiada, por otra parte, tiene el potencial de conducir al desarrollo de malformaciones. De hecho, la apoptosis se ha asociado con teratógenos como el etanol, ácido retinoico, la hipoxia, la radiación ionizante, la hipertermia y la DM (Vlassara y Palace, 2002).

En una madre con DM el ambiente hiperglucémico que rodea al embrión puede generar un incremento de las ERO, este aumento producido durante las reacciones de la cadena respiratoria mitocondrial y la fosforilación oxidativa llevan a la inhibición del gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que actúa como coactivador transcripcional del ciclo celular y puede ser necesario para la inducción de la transcripción del gen PAX3. La inhibición de la expresión de PAX3 permite la desregulación del gen p53 y por lo tanto la activación sin control de la apoptosis en el neuroepitelio, lo que conduce a los defectos del tubo neural. Este factor de transcripción puede regular además a los factores cdc46, Hill, AL, y el gen Dep1. Ambos genes tienen importantes funciones en el cierre del tubo neural (García y García, 2009; Herrera, 2000; Loeken, 2006; Wentzel y Eriksson, 2005).

## 2.8 BCL-2

El gen *BCL-2* (B-cell leukemia/ lymphoma-2) se localiza en el cromosoma 18 en humanos y en el cromosoma 13 en ratas (*Rattus norvegicus*), y posee 711 pb. El producto final es una proteína antiapoptótica de 26 kDa que se encuentra anclada a la envoltura nuclear del retículo endoplásmico y a la externa mitocondrial (Hockenbery y cols., 1993; Pellegrini y Strasser, 2000).

La familia de proteínas Bcl-2 en mamíferos comprende al menos 24 miembros codificados por 20 genes. Es dividida en dos grupos, los que regulan positiva y negativamente la apoptosis. De los cuales *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-w*, *Boo*, *A1*, *Mcl-172* y *Bcl-B* pueden inhibir. Todos los miembros antiapoptóticos comparten 3 o 4 dominios de homología llamados regiones BH (Dominios Homólogos de Bcl-2), que se localizan en la membrana mitocondrial externa y la cara citoplásmica del retículo endoplasmático. Por otro lado se han reconocido diecisiete miembros de la familia Bcl-2 que promueven la apoptosis. Estos miembros incluyen *Bax*, *Bcl-xs* (una variante de empalme del gen *bcl-x*), *Bak*, *Bok/Mtd*, *Bad*, *Bik*, *Bid/Nbk*, *Hrk/DP5*, *Bcl-GL* (largo), *Bcl-Gs* (corto) y *Bmf*. Estos miembros proapoptóticos se pueden dividir en dos subgrupos dependiendo del número de dominios de homología Bcl-2 que poseen. *Bax*, *Bok*, *Bak*, *Bcl-GL* y *Bcl-X* tienen múltiples dominios BH mientras que *Bik*, *Blk*, *Hrk*, *Bim*, *Bad Bid*, *Bcl-Gs*, *Puma*, *Noxa* y *Bmf* poseen solamente la región BH3 corta (9 a 16 residuos) Y por lo tanto son a veces llamados proteínas BH3 (Pellegrini y Strasser, 2000; Zong y cols., 2001).

Se ha visto la participación de la proteína Bcl-2 inhibiendo la apoptosis de dos formas conocidas: a) impidiendo la salida del citocromo C de la mitocondria e b) inhibiendo el ensamblaje del apoptosoma uniéndose a Apaf-1 (Luna y cols., 2008). Dentro de las funciones menos conocidas de Bcl-2, se encuentra la protección contra el estrés oxidativo. Se ha demostrado que esta proteína tiene la capacidad de activar mecanismos antioxidantes que contrarrestan los niveles de ERO y disminuyen la lipoperoxidación (Hockenbery y cols., 1993).

Los primeros estudios sobre Bcl-2 y el estrés oxidativo llevaron inicialmente a proponer que dicha proteína podía evitar el daño oxidativo al contender directamente con las ERO, sin embargo, se encontró que Bcl-2 no tiene una habilidad significativa en reducir los niveles de superóxido ni de peróxido de hidrógeno (Lee y cols., 2001).

Además de los trabajos donde se observa la actividad antioxidante de Bcl-2, existen otros estudios que apoyan el papel pro-oxidante de dicha proteína, cuya función al parecer es la de preparar a la célula a enfrentar un estrés oxidativo severo (Steinman, 1993). La sobreexpresión de Bcl-2 aumenta la actividad del proteosoma, los niveles de GSH y de la enzima SOD dependiente de CuZn. No está definido si el papel de Bcl-2 es antioxidante o prooxidante ni el mecanismo de acción de Bcl-2 en respuesta al estrés oxidativo. De manera interesante, también se ha reportado que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 puede promover la presencia de las enzimas de reparación del DNA, tales como la endonucleasa apurínica/apirimidínica. Esto implica que las células que sobreexpresan Bcl-2 podrían sobrevivir más tiempo con un incremento en la capacidad de reparación del daño en el DNA (Lee y cols., 2001; Luna y cols., 2008).

## **2.9 ANTECEDENTES**

Ha y cols. (1988) utilizando un modelo de generación de ERO dependiente de Cu (II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observaron que la presencia de una concentración fisiológica de la poliamina espermina es suficiente para reducir los niveles de ERO.

Méndez y Palomar-Morales (1999), demostraron que las poliaminas putrescina, espermina y espermidina administradas parenteralmente a partir del día 5 de gestación en ratas, previenen las reabsorciones y los efectos embriotóxicos causados por la DM inducida por aloxana.

Fujisawa y Kadoma (2005) determinaron que las poliaminas espermidina, putrescina y sobre todo espermina, son eficientes en la erradicación de los radicales alquilo y peroxilo, y proponen a estas moléculas como candidatas para neutralizar los radicales libres que se generan, y de este modo evitar la lipoperoxidación.

Chirino-Galindo y cols. (2012) reportaron que la adición de glucosa en cultivo por 24 h, causa un aumento en la lipoperoxidación total en embriones de rata de 10.5 GD, y que la suplementación del medio con espermina o espermidina revierte la lipoperoxidación a niveles cercanos a los normales. Esto podría indicar embrioprotección mediada por actividad antioxidante.

Por otro lado, se han estudiado una amplia gama de genes relacionados con la desregulación de la apoptosis en eventos de estrés oxidativo, así como genes que promueven la sobrevivencia celular ante eventos de muerte celular programada, como es el caso del gen *BCL-2* (Luna y cols., 2008).

Sun y cols. (2002), Estudiaron la relación entre la apoptosis y la expresión de *Bax* y *BCL-2*, además de sus proteínas durante el período de organogénesis temprana de embriones de rata, demostraron eliminación de células apoptóticas, la cual se asoció con una fuerte expresión de *BCL-2*.

Metcalfe y cols. (2004) Estudiaron la expresión de 11 miembros de la familia de proteínas Bcl-2, en embriones humanos desarrollados *in vitro*, lo que corrobora los resultados demostrados en embriones de rata y ratón; además observaron la expresión continua de la proteína antiapoptotica Bcl-2 en todas las etapas de desarrollo, mientras que las células que expresaron altos niveles de la proteína Bax fueron más susceptibles a la apoptosis.

Kruger (2006) en un modelo *in vivo* en rata con hiperglucemia, registró un aumento de actividad de Hemooxigenasa 1 (HO1), asociada con un aumento significativo en la señalización apoptótica de moléculas Bcl-XL; sin embargo no hay aumentos significativos en la proteína Bcl-2.

Gäreskog y cols. (2007) estudiaron la relación de la apoptosis, y los defectos congénitos en embriones de ratas diabetes ocasionados en la etapa de la organogénesis, observaron un incremento en la inmunoexpresión de las proteínas p53, Caspasa 3 y células apoptóticas, mientras la actividad de la proteína antiapoptotica Bcl-2 se inhibe o disminuye en los embriones expuestos a un ambiente hiperglucémico.

Wentzel y Eriksson, (2011), en un modelo *in vitro* de embriopatía diabética en rata, determinaron una disminución de los mRNA de enzimas antioxidantes en células de la cresta neural, así como del factor de respuesta Nrf2, y del mRNA del factor Pax3, Pax6 y la proteína Bcl-2 como resultado del aumento de la concentración de glucosa en el ambiente, lo cual se relacionó con MC en los embriones tratados.

## **2.10 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA**

Se sabe que la DM es una de las principales causas de muerte en México, y el estado metabólico más común durante el embarazo; sin embargo esto no es favorable para el embrión ya que se ha reconocido que el ambiente hiperglucémico al que se somete la unidad feto-placentaria durante el embarazo puede producir MC mediadas por un incremento en el estado de estrés oxidativo, puesto que los embriones en desarrollo parecen ser muy sensibles a altos niveles de ERO, especialmente durante la organogénesis temprana, provocando daños multisistémicos, cambios en la morfología, la proliferación celular, la disminución de defensas antioxidantes y cambios en la expresión de genes reguladores del desarrollo y la apoptosis (Baack, y cols., 2014; ENSANUT, 2016; Forsberg y cols., 1998; Garcia y García, 2009).

Por otra parte, se ha propuesto que las poliaminas espermidina y espermina tienen un efecto embrioprotector mediado por actividad antioxidante ante eventos de estrés oxidativo desarrollados por un estado hiperglucémico (Chattopadhyay y cols., 2003; Chirino-Galindo y cols., 2012).

Por las razones anteriores, es necesario estudiar si la prevención de las malformaciones provocadas por la glucosa en embriones de rata, cultivados en presencia de las poliaminas espermidina y espermina es mediada por la acción de proteínas que inhiben la muerte celular programada, como es el caso de la proteína Bcl-2.

## 2.11 HIPÓTESIS

Se ha reconocido que el estado hiperglucémico en el embarazo complicado con DM pregestacional causa alteraciones metabólicas en la unidad feto-placentaria, desarrolladas por un estado de estrés oxidativo, en la cual se ha observado un desbalance entre la producción de ERO y defensas antioxidantes, lo cual, se ha visto relacionado con MC desarrolladas en embriones de rata, cultivados bajo condiciones de alta glucosa, especialmente durante la organogénesis temprana. Sin embargo, se ha atribuido a las poliaminas una respuesta embrioprotectora por medio de su actividad antioxidante, así como promotor de la expresión de genes reguladores de la apoptosis, como es el caso de la proteína antiapoptótica codificada por el gen *BCL-2* (García y García, 2009). La adición de la espermidina y espermina en los medios de cultivo con glucosa alta (500 mg/dL) en cultivos primarios de embriones de ratas Wistar, podrían reducir la frecuencia y severidad de malformaciones, además de incrementar la actividad de la proteína Bcl-2.

## 3 OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la expresión del gen *BCL-2* en un modelo *in vitro* de embriopatía diabética bajo el tratamiento con dos poliaminas.

### Objetivos particulares

Describir el registro morfológico en embriones de ratas Wistar de 11 días de desarrollo tratados *in vitro* en un medio con alta glucosa, espermidina y espermina.

Determinar la expresión del gen *BCL-2* a partir del DNA y RNA obtenido de un modelo *in vitro* de embriopatía diabética.

Analizar la presencia de la proteína Bcl-2 en cortes histológicos de embriones cultivados en medio alto en glucosa en un modelo de embriopatía diabética.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

**4.1 Material biológico.** Se utilizaron 20 ratas hembras, preñadas, sanas, de la cepa Wistar, de 2 ½ a 3 meses de edad, con ciclos estrales definidos, las cuales se mantuvieron en condiciones de luz, humedad y temperatura controladas (12 h luz por 12 h oscuridad; 22°C, 60% de humedad ambiental) con agua y alimentación *ad libitum* (Rodent Diet 2018S, Harlan, México), en el bioterio de FES Iztacala. Para el apareamiento de las ratas, se colocó un macho de la misma cepa, de fertilidad comprobada por cada dos hembras toda la noche; a la mañana siguiente se realizó un frotis vaginal, utilizando solución salina al 0.9%, las muestras se observaron con ayuda de un microscopio óptico marca Leica, modelo DM500. El criterio para seleccionar a las hembras preñadas se basó en la presencia de una alta cantidad de espermatozoides en la muestra vaginal, contando como día 0 a partir de la confirmación positiva de preñez.

**4.2 Preparación de medio de cultivo.** El medio de cultivo se preparó con suero de ratas sanas y se inactivó por calentamiento a 56°C durante 30 min (New, 1978). El medio de cultivo control se preparó con 4 mL de suero inactivado sin diluir, 0.5 mL de solución concentrada de antibióticos (para dar una concentración final de penicilina 1000 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL), y 0.5 mL de solución salina (NaCl al 0.9%). En estas condiciones, se ha determinado que la concentración de glucosa es cercana a 100 mg/dL (Chirino, 2007). Se prepararon 5 ml de medio “hiperglucémico” de la siguiente forma; 4 mL de suero, 0.5 mL de solución de antibióticos, 0.25 mL de solución salina y 0.25 mL de glucosa concentrada, dando como resultado una concentración final de 5 mg/mL de glucosa, lo cual es equivalente a 500 mg/dL. Para los medios con glucosa y poliaminas (25 µM), se agregaron 4 mL de suero, 0.5 mL de solución de antibióticos, 0.25 mL de glucosa concentrada y 0.25 mL de solución concentrada (0.5 mM) de cada poliamina, en lugar de la solución salina. Cada medio preparado se filtró a través de una membrana millipore de 0.22 µm de malla en condiciones de esterilidad, y finalmente se volvió a almacenar a -20° C hasta el momento de su uso (New, 1978).

**4.3 Cultivo de embriones.** El día 10 de gestación, cerca de mediodía, las ratas preñadas fueron anestesiadas con éter etílico para anestesarlas; bajo anestesia, se dislocaron cervicalmente. Acto seguido se les hizo una incisión ventral (laparotomía) para obtener el útero. Posteriormente, se separó la decidua del útero, se retiró la membrana de Reichert y se extrajo al embrión. Los embriones se incubaron de manera individual en tubos eppendorf de 2.0 mL de capacidad con 1.0 mL de medio control (CC), glucosa

elevada (GLC), glucosa elevada más espermidina 25  $\mu$ M (GLC+SPD), glucosa elevada más espermina 25  $\mu$ M (GLC+SPM), y se mantuvieron a 37°C rotando a 30 rpm en un aparato diseñado para este fin en el Taller de Equipo para Laboratorio de Enseñanza de la FES Iztacala, denominado Rotocell®, durante 24 h. Se incubaron por lo menos 15 embriones en cada una de las condiciones (New, 1978).

Se utilizó un segundo grupo de ratas preñadas, sanas. A los 11 días de gestación fueron anestesiadas con éter etílico y se les realizó el mismo procedimiento de extracción de embriones. A los embriones obtenidos se les denominó embriones de 11 días de desarrollo gestacional (DG), los cuales fueron sometidos directamente a las técnicas.

**4.4 Análisis morfológico.** Al término de la incubación, los embriones se examinaron en microscopio estereoscópico marca Leica. Excepto los embriones DG, se tomaron los datos reportados por Chirino-Galindo 2009. El análisis morfológico completo incluyó medición del diámetro del saco vitelino, longitud cefalo-caudal, longitud de la cabeza, conteo del número de somitas y anomalías en la morfología (Klug y cols., 1985)

**4.5 Extracción de DNA.** Una vez observados los embriones al microscopio, se sumergieron en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron en ultracongelación a -70 °C, hasta su uso. Para extraer los ácidos nucleicos (Anexo 1) se retiraron completamente de los tubos eppendorf y se siguieron los pasos del kit comercial: UltraClean Tissue & Cells DNA Isolation Kit marca Mo Bio, catálogo 12334-50. Una vez extraído el DNA genómico, se comprobó su integridad mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Anexo 2).

**4.6 PCR de punto final de gen *BCL-2*.** La reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) correspondiente al gen *BCL-2*, específicamente de la sección que codifica para la región BH4 en la proteína, se llevó a cabo con el fin de confirmar la identidad del gen en los embriones de cultivo, 11 DG y los reportados por Thangarajan y cols., 2016, y Venkatesan y Sadiq, 2017. Los *primers* fueron diseñados con ayuda del programa Primer-Blast (Anexo 3). La PCR se realizó siguiendo los pasos del Kit comercial: MyTaq™ DNA Polymerase marca Bioline y se utilizaron dos tipos de *primer*, uno del gen de interés (*BCL-2*) y uno de un gen constitutivo (*GAPDH*), para relacionar la actividad de este gen y el de interés, además de verificar la efectividad del Kit y del proceso (Control positivo). Se incluyó dentro de las reacciones de PCR un control

negativo sin DNA (Anexo 4). Al término de la PCR se realizó una electroforesis horizontal (Anexo 2).

Posteriormente los productos de PCR fueron secuenciados en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO, para confirmar la identidad del gen. Una vez obtenidos los cromatogramas, se realizó una comparación de estos con la secuencia del gen reportado, el cual se denomina *blast*, este se realizó con ayuda del programa BLASTn disponible en la página Web de la base de datos NCBI.

**4.7 Extracción de RNA total.** Para evaluar la expresión del gen *BCL-2*, específicamente de la sección que codifica para la región BH4 de la proteína, se extrajo el RNA total de los embriones cultivados en los diferentes medios y de los embriones DG, por medio de la técnica de TRIZOL (Anexo 5) (Vilches y cols., 2013). Se cuantificó el RNA total en una dilución 1:250 a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro, se registraron las lecturas de la densidad óptica y se hicieron los cálculos pertinentes (Anexo 6) (Farrell, 2008; Vilches y cols., 2013).

**4.8 RT-PCR gen *BCL-2*.** Al término de la cuantificación total de RNA, se realizó una RT-PCR, siguiendo los pasos del kit comercial: SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase de la marca Invitrogen y los *primers* antes mencionados (Anexo 7) (Farrell, 2008; Vilches y cols., 2013). Posteriormente, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa para verificar la amplificación y la relación del cDNA del gen *BCL-2* y de *GAPDH* expresando el resultado en porcentaje de disminución (Anexo 2).

**4.9 Inmunohistoquímica de la proteína Bcl-2.** Los embriones obtenidos del cultivo (uno de cada grupo) fueron tratados por medio de la técnica de histología convencional (Anexo 8) (Chirino, 2007), se realizaron los cortes histológicos a un grosor de 8 µm con ayuda del micrótopo marca Leica modelo RM2125 RTS, y se procedió con los lavados pertinentes para teñirlos por medio de la técnica de Inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido a la proteína Bcl-2 y conjugado con isotiocianato de fluoresceína, a una dilución 1:200; posteriormente se observaron las áreas donde se encontró mayor concentración de la proteína Bcl-2 con ayuda de un microscopio de epifluorescencia marca Leica, Modelo DMLB con filtros para FICT y filtro A para DAPI. Se compararon los embriones sometidos a ambos tipos de incubación, y se tomaron

microfotografías pertinentes de las zonas con fluorescencia localizada (Anexo 9) (Mendoza y cols., 2003).

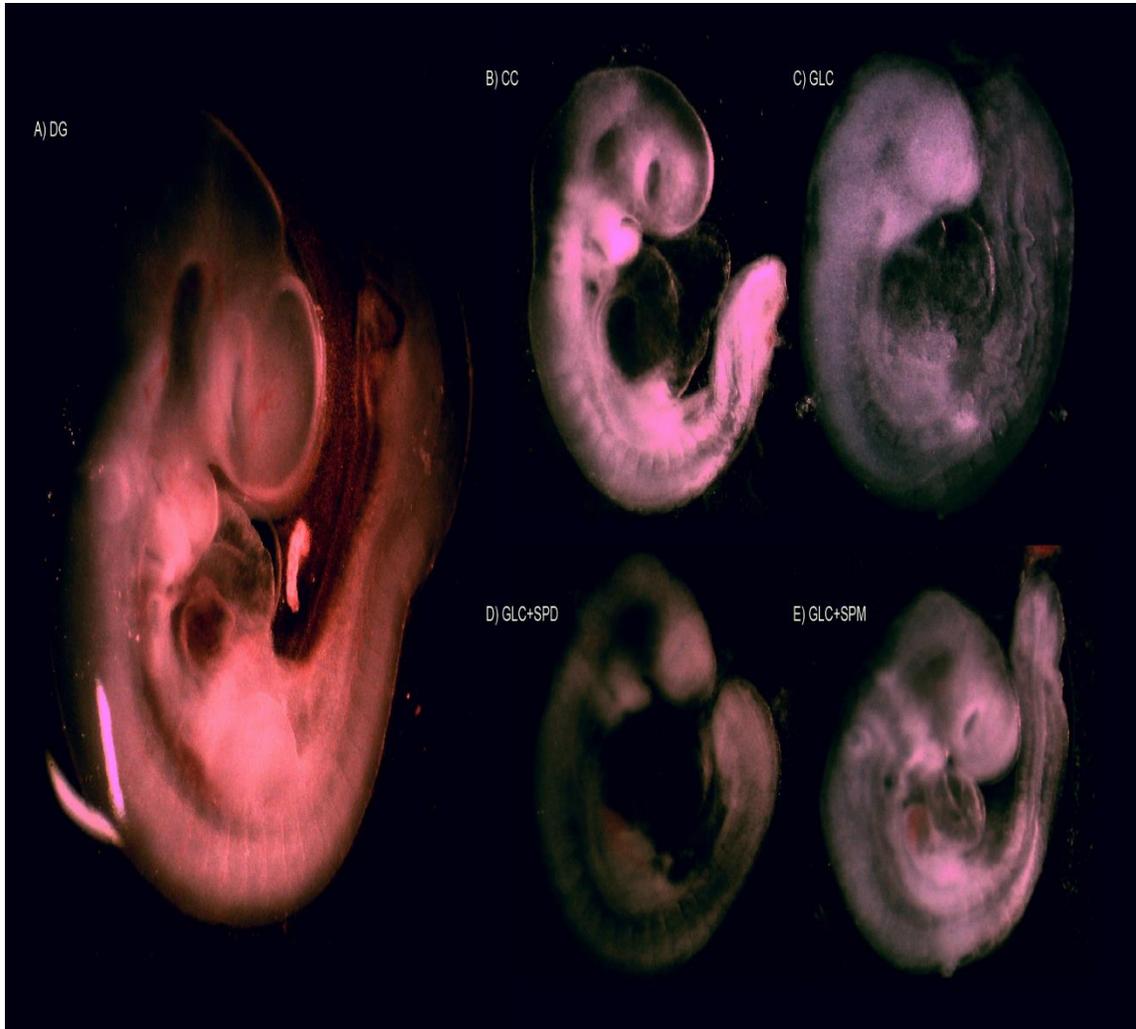
**4.10 Tratamiento estadístico.** Los datos obtenidos de los parámetros morfológicos de 15 embriones de cada grupo, excepto de los embriones DG se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis con un alfa de 0.05, para obtener la comparación estadística de las medias de los tratamientos, seguida por la prueba de la mediana. Se empleó el programa IBM SPSS STATISTICS para Windows versión 23.

## **5 RESULTADOS**

Por lo menos 30 embriones se cultivaron bajo cada una de las condiciones descritas anteriormente en el apartado de materiales y métodos; sin embargo, en los procesos de extracción de ácidos nucleicos, deshidratación, inclusión e inmunohistoquímica algunos se perdieron, o dejaron de ser confiables para la realización de las técnicas; por lo cual se describen los resultados obtenidos de 18 embriones de cada grupo.

### **5.1 Morfología y morfometría**

Los embriones de 10 días de desarrollo gestacional cultivados en medio control por 24 horas mostraron una morfología similar a los embriones de 11 días de gestación reportados por Chirino-Galindo 2009 (Figura 6A, 6B), aunque tuvieron valores relativamente menores de diámetro de saco vitelino (Figura 7) longitud cefalocaudal (Figura 8), longitud de cabeza (Figura 9), número de somitas (Figura 10) y registro morfológico (Figura 11), no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (cuadro 6). En los embriones cultivados en medio alto en glucosa se observó un desarrollo anómalo (Figura 6C), caracterizado por una disminución en los valores de los parámetros antes mencionados, presentando diferencias significativas en comparación con los embriones control de 10 días de edad cultivados por 24 h y los embriones de 11 DG (Cuadro 6). Además de presentar una morfología anormal mostrando un retraso en el crecimiento y desarrollo. Por otro lado, los embriones GLC+SPD Y GLC+SPM mostraron una reversión en la morfología (Figura 6D, 6E), y en los valores morfométricos normales, similares a los embriones CC y 11 DG.

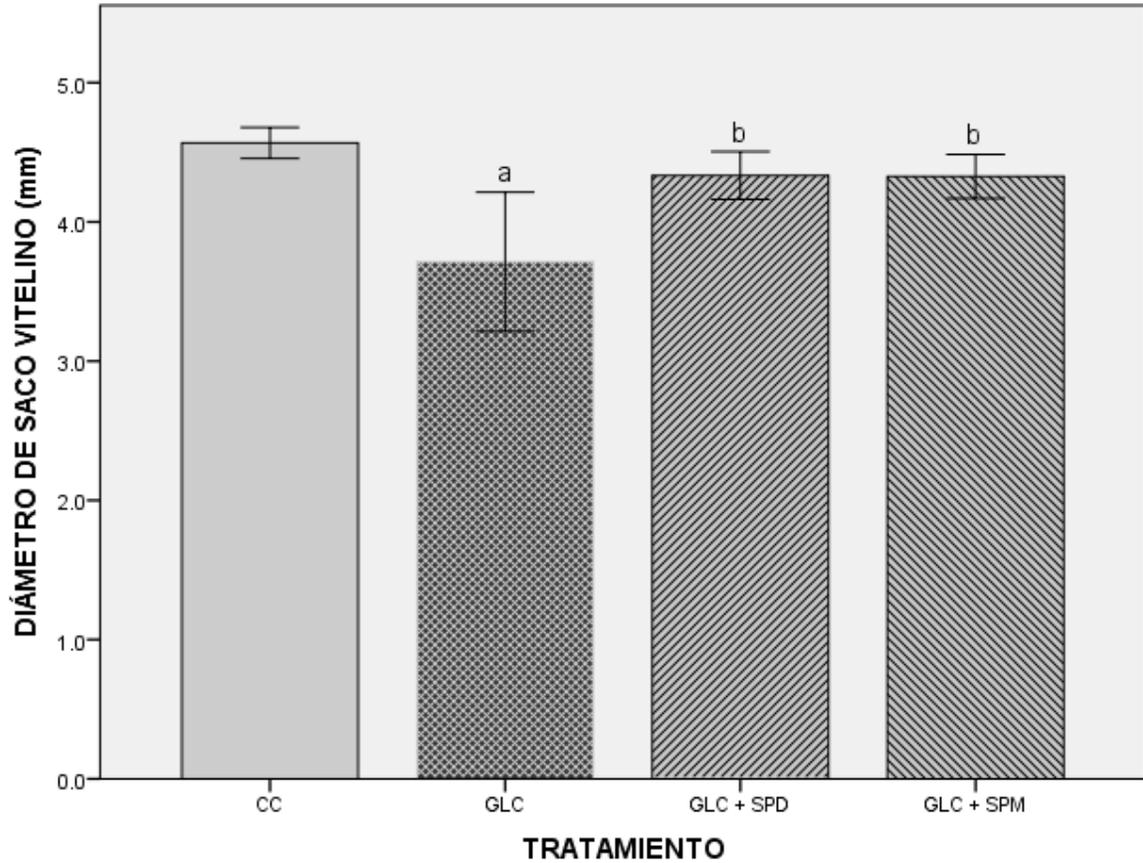


**Figura 6.** Comparación directa entre un embrión representativo, de cada grupo. A: embrión de 11 días de desarrollo gestacional (11 DG); B: embrión cultivado en medio control (CC); C: embrión cultivado en presencia de glucosa 500 mg/dL (GLC); D: embrión cultivado en presencia de elevada glucosa 500 mg/dL y espermidina 25  $\mu$ M (GLC+SPD); E: embrión cultivado en presencia de elevada glucosa 500 mg/dL y espermina 25  $\mu$ M (GLC+SPM).

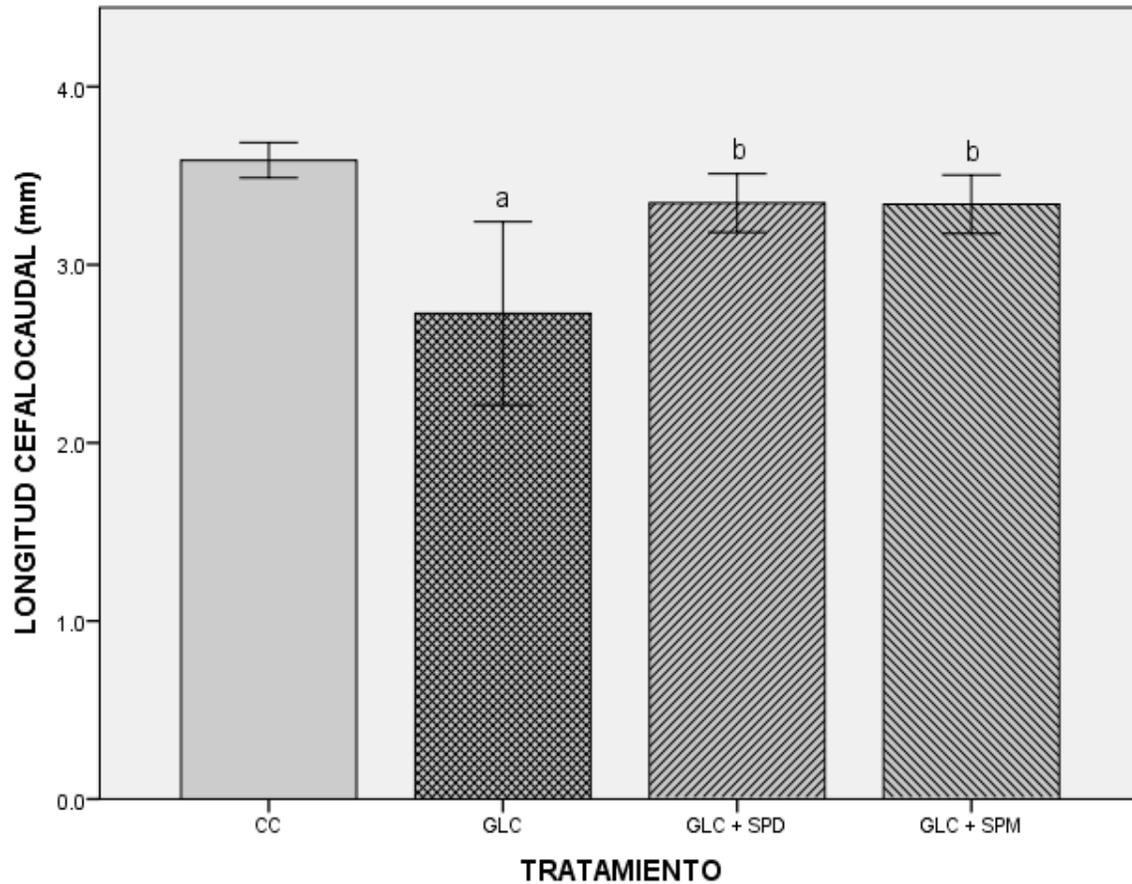
**CUADRO 6.** Efecto de la glucosa y las poliaminas sobre el crecimiento de los embriones de rata de diez días de desarrollo gestacional, cultivados por 24 h.

	Diámetro saco vitelino (mm)	Longitud Cefalocaudal (mm)	Longitud de la cabeza (mm)	Numero de somitas	Registro morfológico
CC	4.56±0.028	3.58± 0.025	1.54±0.029	26.2±0.242	37.9±0.206
GLC	3.71±0.129*	2.72±0.132*	1.17±0.051*	18.06± 1.088*	18.06±1.088*
GLC+SPD	4.33±0.044	3.34±0.042	1.33±0.043	24.2±0.441	36.2±0.404
GLC+SPM	4.32±0.040	3.34±0.042	1.32±0.042	24±0.425	36.0 ±0.425

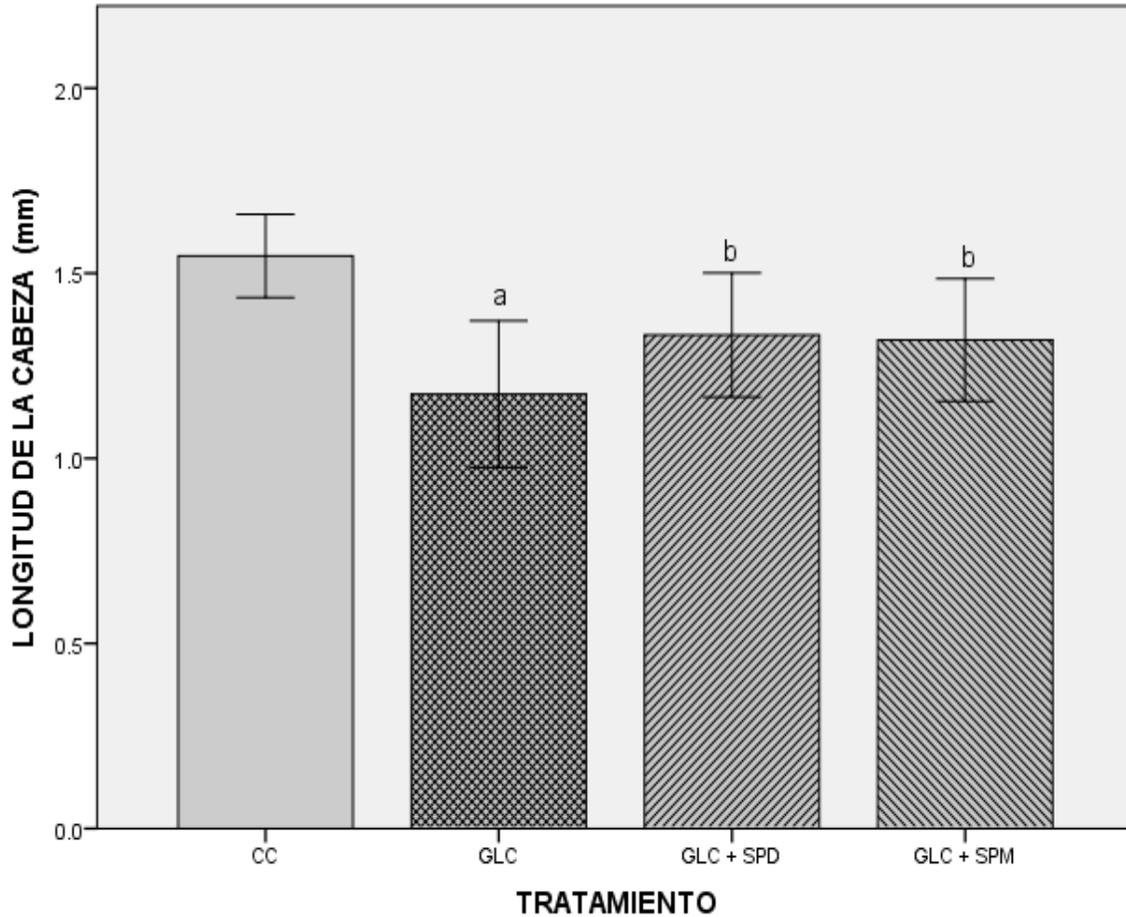
Datos expresados en Media ± D.E., n=15. \*significa\*P<0.05 con respecto al control (CC); GLC: grupo con elevada glucosa; GLC+SPD: grupo con elevada glucosa más espermidina 25 µM; GLC+SPM: grupo con elevada glucosa más espermina.



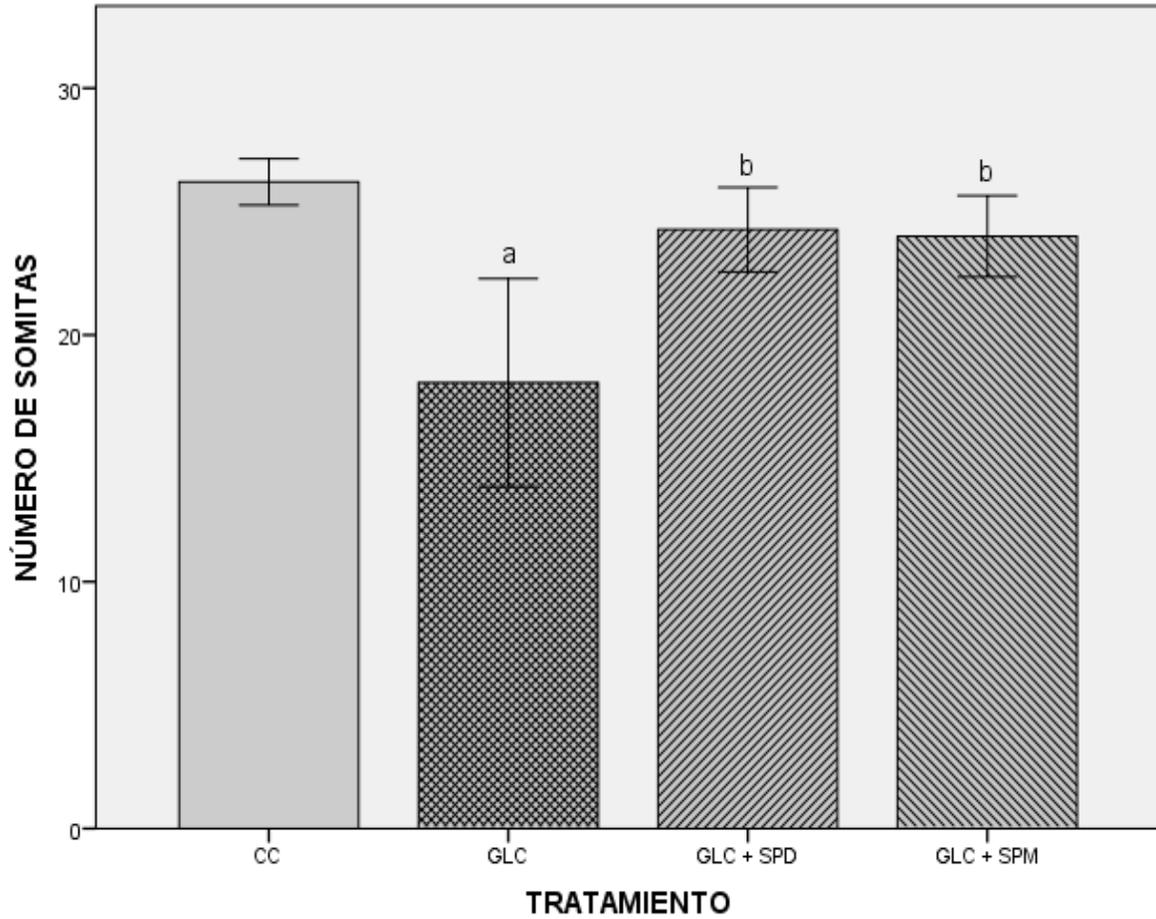
**Figura 7.** Diámetro del saco vitelino de embriones cultivados en medio control (CC), alta glucosa (GLC), elevada glucosa más espermidina 25  $\mu$ M (GLC+SPD); elevada glucosa más espermina 25  $\mu$ M (GLC+SPM). Promedio  $\pm$  D.E. de 15 embriones. <sup>a</sup>P < 0.05 en relación a control; <sup>b</sup>P < 0.05 en relación al grupo con glucosa. Diferencias estadísticamente significativas (Kruskall-Wallis).



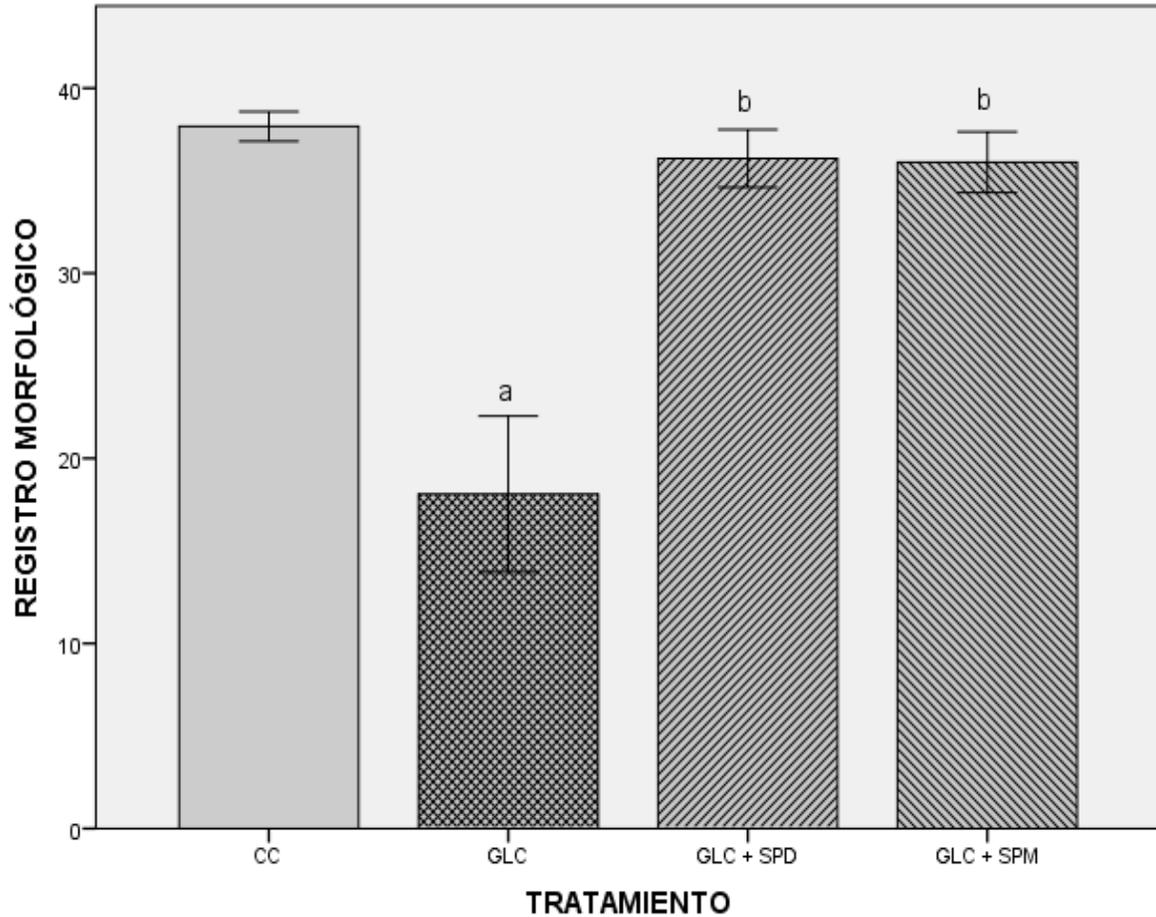
**Figura 8.** Longitud cefalocaudal de embriones cultivados en medio control (CC), alta glucosa (GLC), elevada glucosa y espermidina 25  $\mu$ M (GLC+SPD); elevada glucosa 500 mg/dL y espermina 25  $\mu$ M (GLC+SPM). Promedio  $\pm$  D.E. de 15 embriones. <sup>a</sup>P < 0.05 en relación a control; <sup>b</sup>P < 0.05 en relación al grupo con glucosa. Diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis).



**Figura 9.** Longitud de la cabeza de embriones cultivados en medio control (CC), alta glucosa (GLC), elevada glucosa y espermidina 25  $\mu$ M (GLC+SPD); elevada glucosa y espermina 25  $\mu$ M (GLC+SPM). Promedio  $\pm$  D.E. de 15 embriones. <sup>a</sup>P < 0.05 en relación a control; <sup>b</sup>P < 0.05 en relación al grupo con glucosa. Diferencias estadísticamente significativas (Kruskall-Wallis).



**Figura 10.** Número de somitas embriones cultivados en medio control (CC), alta glucosa (GLC), elevada glucosa y espermidina 25  $\mu$ M (GLC+SPD); elevada glucosa y espermina 25  $\mu$ M (GLC+SPM). Promedio  $\pm$  D.E. de 15 embriones. <sup>a</sup>P < 0.05 en relación a control; <sup>b</sup>P < 0.05 en relación al grupo con glucosa. Diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis).



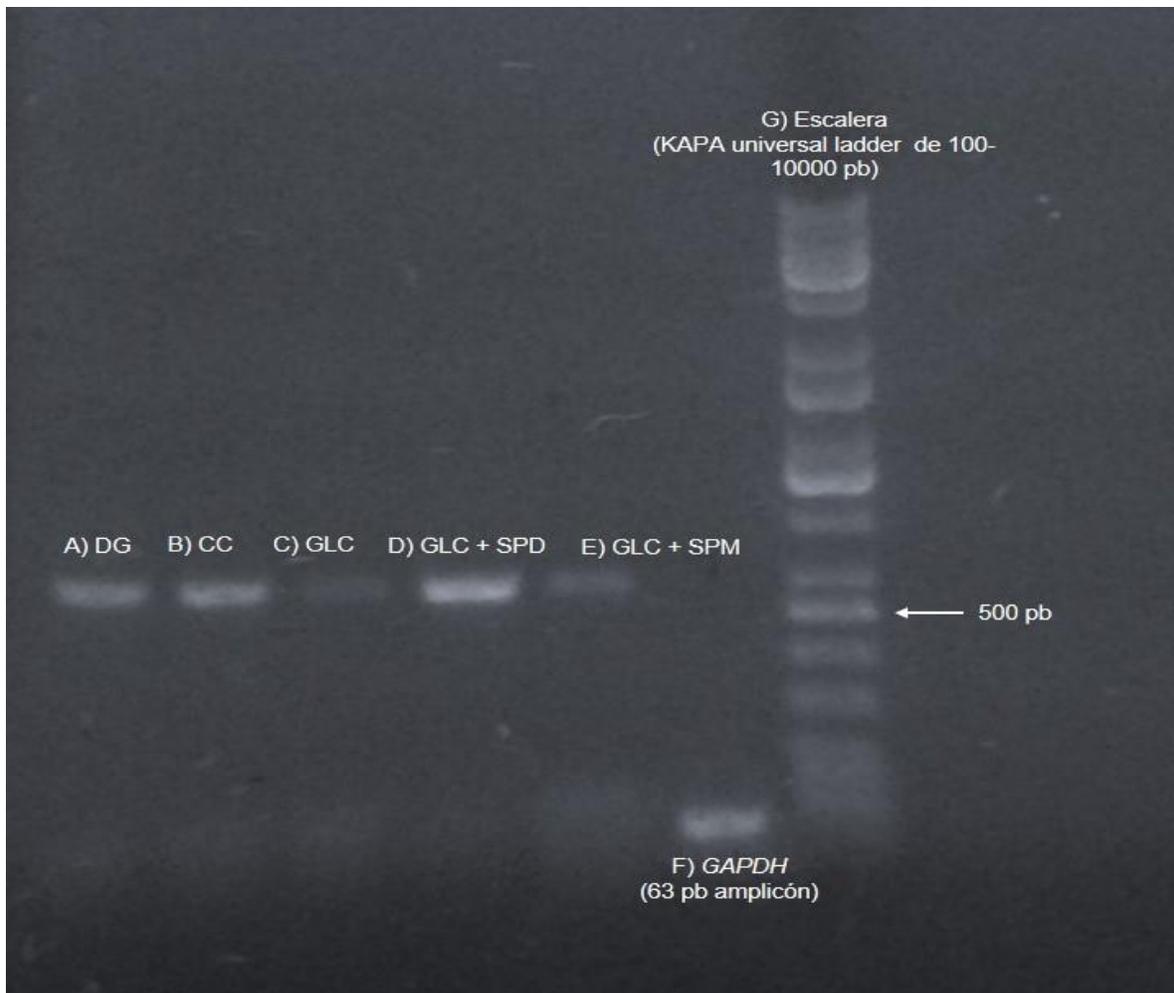
**Figura 11.** Registro morfológico de embriones cultivados en medio control (CC), alta glucosa 500 mg/dL (GLC), elevada glucosa 500 mg/dL y espermidina 25 Mm (GLC+SPD); elevada glucosa 500 mg/dL y espermina 25 Mm (GLC+SPM). Promedio ± D.E. de 15 embriones. <sup>a</sup>P < 0.05 en relación a control; <sup>b</sup>P < 0.05 en relación al grupo con glucosa. Diferencias estadísticamente significativas (Kruskall-Wallis).

## 5.2 PCR gen *BCL-2*

Las amplificaciones realizadas por PCR del gen *BCL-2* de los embriones de cada tratamiento tuvieron una extensión de 567 pb consistente en todos los grupos (Figura 12). El tamaño concuerda con la descripción realizada en la base de datos Gen Bank. En el caso de la identidad del gen *BCL-2* en embriones de 10 días de desarrollo cultivados en condiciones CC, GLC, GLC+SPD, GLC+SPM, fue confirmada por medio de la secuenciación de Sanger. La cual proporcionó la secuencia de nucleótidos obtenidos por PCR, esta fue comparada con la reportada en la base de datos Gen Bank, corroborando que son estructuralmente similares en un 99% (Figura 13). Las secuencias obtenidas a partir del DNA extraído de embriones cultivados bajo condiciones GLC, GLC+SPD, GLC+SPM no fueron distintas a la de los embriones CC (Figura 13).

## 5.3 RT-PCR *BCL-2*

En cuanto a la amplificación del cDNA obtenido por transcripción inversa, se observó que la cantidad de cDNA proveniente del RNAm disponible, era suficiente para visualizar bandas de éste, en el gel de agarosa. Por otro lado se observa la disminución de cDNA de *BCL-2* en relación a *GAPDH*, registrándose una menor porcentaje de disminución en embriones DG (28%), seguido por embriones CC (34%), mientras que en los embriones GLC (77%), GLC+SPD (45%) y GLC+SPD (51%) el porcentaje de disminución aumentó (Figura 14). Por lo cual, se observó indirectamente que el DNA correspondiente al gen *BCL-2* se encontraba activo en transcripción a RNA en todos los embriones de 10 días de desarrollo cultivados en los cuatro medios y en los embriones DG.



**Figura 12.** Gel de agarosa, con los productos de PCR del gen *BCL-2* en embriones de rata. Se observa el tamaño (567 pb) del peso molecular del amplicón. A) DNA de embrión 11 DG (control *in vivo*); B) DNA de embrión CC (control *in vitro*); C) DNA de embrión GLC 500 mg/dL; D) DNA de embrión GLC 500 mg/dL + SPD 25  $\mu$ M; E) DNA de embrión GLC 500 mg/dL + SPM 25  $\mu$ M; F) DNA del gen *GAPDH* (control positivo) de embrión CC; G) escalera Kapa universal.

Rattus norvegicus BCL2, apoptosis regulator (Bcl2), mRNA

Sequence ID: [NM\\_016993.1](#) Length: 1179 Number of Matches: 1

[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 207 to 729 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
928 bits(1028)	0.0	521/524(99%)	1/524(0%)	Plus/Plus
Query 27	GGTACCTGCAGCTTCTTTCCCGGAAGGATGGCGCAAGCCGGGAGAACAGGGTATGATAA	86		
Sbjct 207	GGTACCTGCAGCTTCTTTCCCGGAAGGATGGCGCAAGCCGGGAGAACAGGGTATGATAA	266		
Query 87	CCGGGAGATCGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGTACAGAGGGGCTACGAGTGGGA	146		
Sbjct 267	CCGGGAGATCGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGTACAGAGGGGCTACGAGTGGGA	326		
Query 147	TACTGGAGATGAAGACTCCGCGCCCTGAGGGCTGCCCCACCCCTGGCATCTTCTCCTT	206		
Sbjct 327	TACTGGAGATGAAGACTCCGCGCCCTGAGGGCTGCCCCACCCCTGGCATCTTCTCCTT	386		
Query 207	CCAGCCTGAGAGCAACCGGACGCCCGCTGTGCACCGAGACACGGCTGCCAGGACGTCGCC	266		
Sbjct 387	CCAGCCTGAGAGCAACCGAACGCCCGCTGTGCACCGAGACACGGCTGCCAGGACGTCGCC	446		
Query 267	TCTACGGCCCTTGTGCGCAACGCTGGGCCTGCGCTCAGCCCTGTGCCACCTGTGGTCCA	326		
Sbjct 447	TCTACGGCCCTTGTGCGCAACGCTGGGCCTGCGCTCAGCCCTGTGCCACCTGTGGTCCA	506		
Query 327	CCTGACCCTCCGCCGGGCTGGGGATGACTTCTCTCGTACCGTCCGCGACTTTGCAGA	386		
Sbjct 507	CCTGACCCTCCGCCGGGCTGGGGATGACTTCTCTCGTACCGTCCGCGACTTTGCAGA	566		
Query 387	GATGTCCAGTCAGCTGCACCTGACGCCCTTACC GCGAGGGGACGCTTTGCCACGGTGGT	446		
Sbjct 567	GATGTCCAGTCAGCTGCACCTGACGCCCTTACC GCGAGGGGACGCTTTGCCACGGTGGT	626		
Query 447	GGAGGAACTCTTCAGGGATGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGTTCG	506		
Sbjct 627	GGAGGAACTCTTCAGGGATGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGTTCG	686		
Query 507	GTGGGGTCATGTGTGTGGGAGCGTCAACAGGGAGATGTCACCC	550		
Sbjct 686	GTGGGGTCATGTGTGTGGGAGCGTCAACAGGGAGATGTCACCC	729		

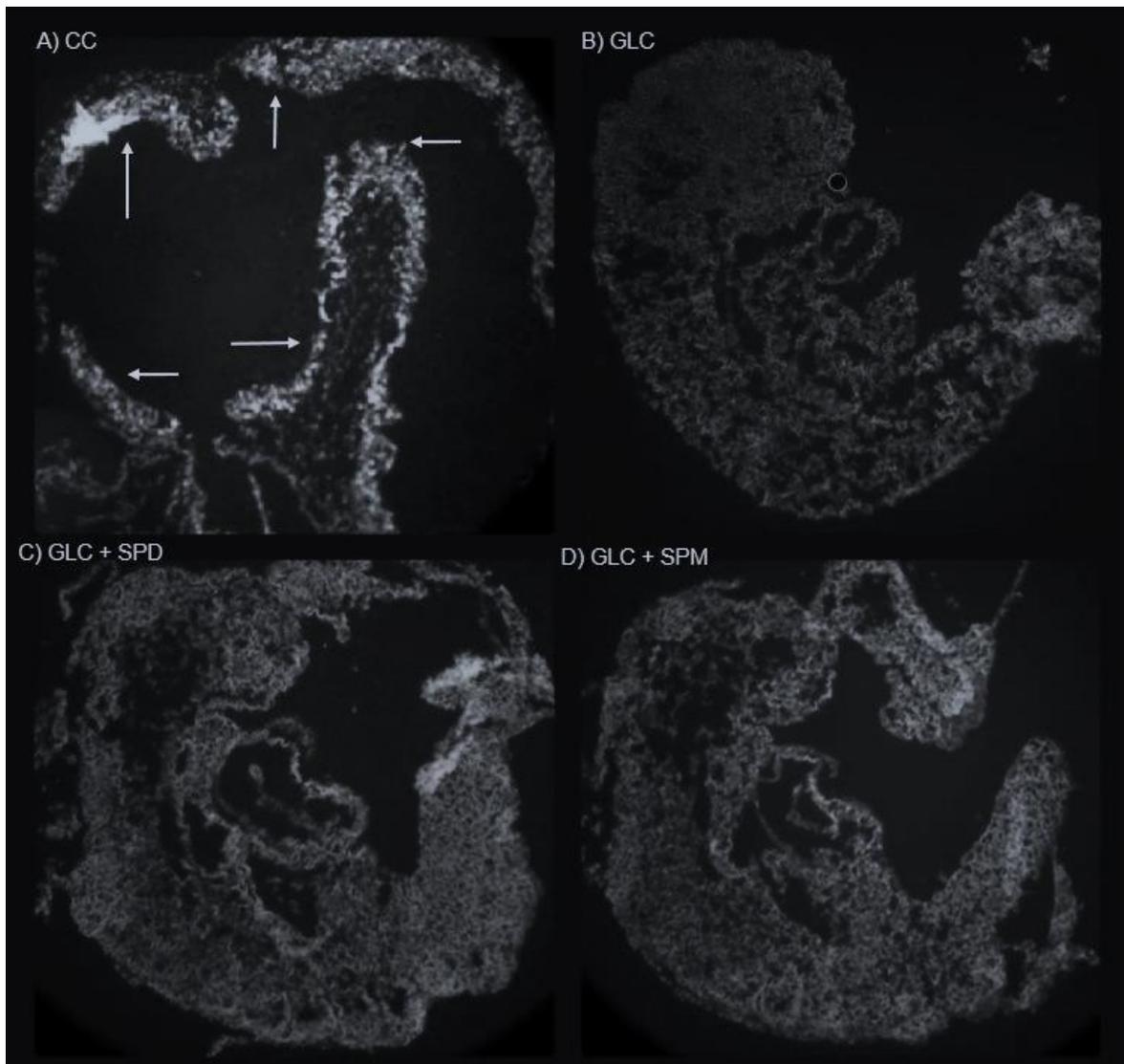
**Figura 13.** Blast de la secuencia obtenida por secuenciación de los productos de PCR obtenidos de los embriones cultivados. Gen Bank.



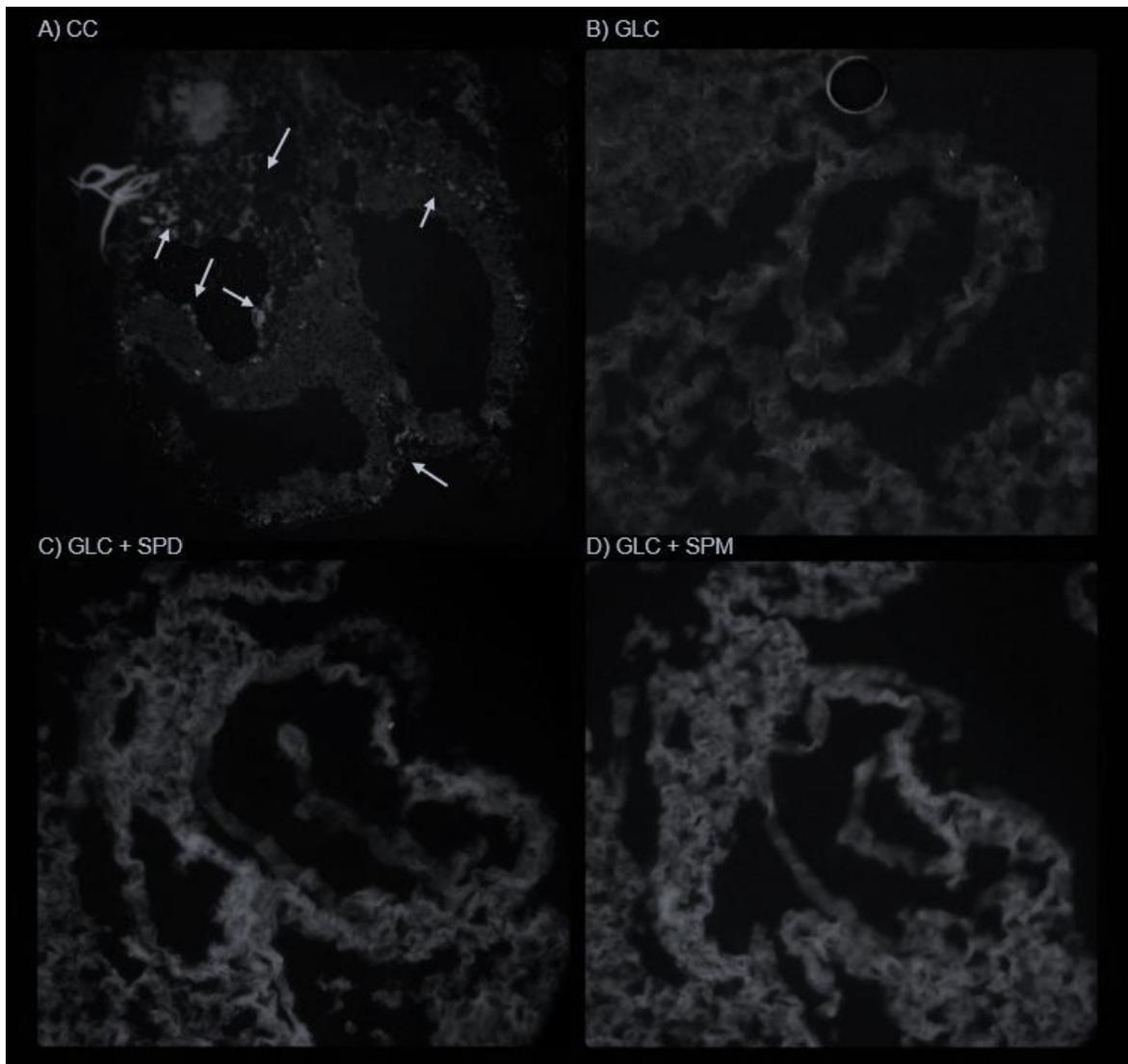
**Figura 14.** cDNA, productos de la RT-PCR de mRNA codificados por el gen *BCL-2* en embriones de rata. A) cDNA de embrión DG (control *in vivo*); B) cDNA de embrión CC (control *in vitro*); C) cDNA de embrión GLC; D) cDNA de embrión GLC+SPD 25  $\mu$ M; E) cDNA de embrión GLC+SPM 25  $\mu$ M; F) cDNA de mRNA GAPDH de embrión CC (control positivo); G) escalera Kappa universal.

#### 5.4 Inmunohistoquímica de la proteína Bcl-2

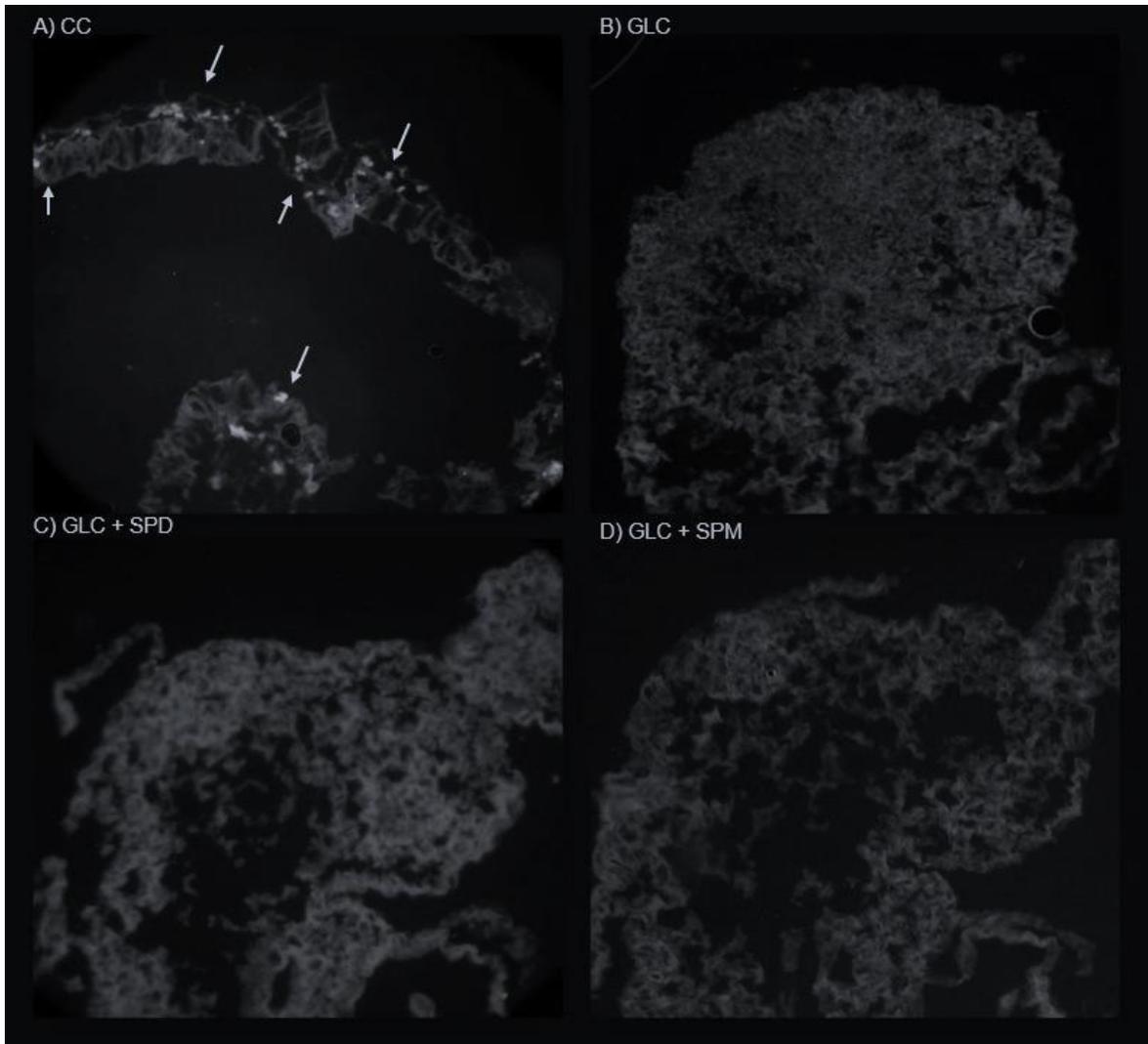
La intensidad de la fluorescencia que señala la presencia de la proteína Bcl-2 detectada por inmunohistoquímica no se observó en embriones GCL, GLC+SPD y GLC+SPM en comparación con los embriones CC y DG (figura 20). La inmunotinción de Bcl-2 en embriones CC y DG, tiende a ser más prominente en los tejidos cardiacos y del tubo neural en comparación con los otros tejidos (Figura 15-17).



**Figura 15.** Inmunohistoquímica de la proteína Bcl-2, la fluorescencia muestra su presencia, marcada con flechas, aumento 10x. A) embrión CC (aumento a 40x para mejor apreciación). B) embrión GLC. C) embrión GLC 500 mg/dL + SPD 25  $\mu$ M. D) embrión GLC 500 mg/dL + SPM 25  $\mu$ M.



**Figura 16.** Inmunohistoquímica. De regiones del tejido cardíaco donde se localizó la proteína Bcl-2, la fluorescencia muestra su presencia, marcada con flechas, aumento 40x. A) embrión CC. B) embrión GLC; C) embrión GLC+SPD 25  $\mu$ M; D) GLC+SPM 25  $\mu$ M.



**Figura 17.** Inmunohistoquímica. De regiones del tejido de tubo neural donde se localizó la proteína Bcl-2 la fluorescencia muestra su presencia, marcada con flechas, aumento 40x. A) embrión CC; B) embrión GLC; C) embrión GLC + SPD 25  $\mu$ M; D) embrión GLC+SPM 25  $\mu$ M.

## 6 DISCUSIÓN

El cultivo de embriones es fundamental para identificar agentes causantes de la teratogénesis en un ambiente restringido por elementos básicos. Estos permiten establecer las vías de afectación. Sin embargo, se han probado las mismas técnicas para determinar los efectos de los agentes embrioprotectores; enzimas y moléculas con efecto antioxidante en un medio alterado por una alta concentración de glucosa, como la DM (Eriksson y cols., 2003; Wentzel y Eriksson, 2005).

El estrés oxidativo, el incremento de apoptosis, las alteraciones de genes reguladores del desarrollo embrionario al igual que de proteínas encargadas de supervivencia celular pueden estar relacionados con la aparición de malformaciones, en embriones de rata desarrollados en cultivo y en embriones de ratas preñadas *in vivo*, además de alteraciones en la morfometría (Kruger, 2006; Gäreskog y cols., 2007; Wentzel y Eriksson, 2011). Sin embargo, se ha demostrado que las poliaminas espermidina y espermina revierten casi en su totalidad los efectos dismorfogénicos, causados por la acción de la alta glucosa en los embriones (Chirino-Galindo y cols., 2009), aunque no se ha dilucidado por completo el mecanismo por el cual las poliaminas espermidina y espermina revierten los efectos de la alta concentración de glucosa, se ha propuesto que éstas moléculas poseen la facultad de neutralizar radicales libres que se generan, e inducen a estrés oxidativo y apoptosis, además de ser reguladoras de la expresión de varios genes involucrados en el desarrollo y protección del embrión por medio de diferentes mecanismos (Childs y cols., 2003).

Los embriones CC mostraron medidas de longitud cefalo-caudal, diámetro de saco vitelino, número de somitas, longitud de cabeza y registro morfológico similares a los embriones DG, Estos datos morfométricos concuerdan con lo reportado por Chirino-Galindo y cols. (2009). Se puede atribuir a que el medio control presenta cantidades adecuadas de glucosa en suero, y otros componentes necesarios, lo que permite un ambiente adecuado y balanceado para el desarrollo del embrión en un medio de cultivo, el cual es similar al ambiente intrauterino normal. Sin embargo, la morfología anormal presentada por los embriones cultivados en alta glucosa se atribuye a una alta oxidación de dicha molécula (Clapés y cols., 2013; Ornoy, 2007). La DM1 mal controlada, la hiperglicemia experimental o el cultivo de embriones en medio con alta glucosa, tienden a producir alteraciones en el desarrollo (MC, dismorfogénesis en cultivo) y en el crecimiento, tales como fetos con un retraso en el desarrollo, bajo peso al nacer (Eriksson y cols.,

2003; Forsberg y cols., 1996; Ornoy, 2007). Esto se debe al incremento de los niveles de glucosa en el medio de cultivo. Al ser una de las moléculas con mayor utilidad energética en el metabolismo, la oxidación de dicha molécula incrementa, dando paso a la producción de ERO, lo cual altera la generación o eficiencia de los mecanismos antioxidantes del embrión, y da paso a un estado oxidante, el cual genera daños a nivel molecular y morfológico en el embrión (Calderón y cols., 2013; Quintanar y Calderón, 2009).

La generación de  $O_2^{\cdot-}$  por el aumento de la concentración de la glucosa se origina principalmente en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, aunque bien se podrían generar en otras vías como en las reacciones oxidativas de la glucólisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. De manera especial se ha considerado la reacción oxidorreductora del paso de electrones del complejo I o II por la coenzima-Q hacia el complejo III, en donde se puede reducir parcialmente al oxígeno y generar el radical  $O_2^{\cdot-}$ . Otros mecanismos de generación de especies reactivas son la autooxidación de la glucosa, productos oxidativos de la glucólisis como los oxoaldehídos y la vía de los polioles (Brownlee, 2002; Calderón y cols., 2013). La relación de las ERO con las malformaciones producidas por la DM en los embriones fue sugerida por primera vez por Eriksson y col. en 1991. Los embriones en desarrollo parecen ser muy sensibles a altos niveles de ERO, especialmente durante la organogénesis temprana (Ornoy, 2007).

Por otra parte, se ha encontrado que los embriones cultivados en alta concentración de glucosa presentan un déficit en la actividad de proteínas encargadas de la supervivencia celular en eventos de estrés oxidativo. El estudio de la embriopatía diabética, realizado 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 la expresión de importantes genes del desarrollo embrionario. Datos clínicos y experimentales indican que existe más de una alteración en el ambiente del embrión de madre diabética capaz de inducir un desarrollo anómalo, y probablemente la alteración más importante es el incremento de la concentración de glucosa que tiene numerosas consecuencias metabólicas en el embrión (Goldman y cols., 1985).

Por otro lado, se observó que los embriones GLC+SPD y GLC+SPM presentaron reversión de la alteración, presentando medidas morfométricas similares a las de los embriones CC. Numerosos estudios realizados en seres humanos y en animales de

experimentación han evidenciado la importancia de las poliaminas en los estados de salud y enfermedad fundamental en los procesos de señalización, replicación, transcripción, traducción, crecimiento, desarrollo y diferenciación celulares, así como la apoptosis, de antioxidantes naturales por su capacidad de atrapar radicales libres. Los efectos positivos de las poliaminas en los embriones de cultivo se pueden atribuir a la característica de participar en la condensación y agregación del DNA, dando estabilidad a la doble cadena de DNA ante eventos de estrés oxidativo y promoviendo la inhibición de apoptosis (Herrera y cols., 2014). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Chirino-Galindo y cols. (2009) donde observaron a los embriones cultivados en alta glucosa y suplementado con poliaminas similares a los embriones cultivados en medio control.

En cuanto al gen *BCL-2*, las copias se obtuvieron exitosamente por medio de la técnica de PCR, en todos los grupos experimentales y controles se obtuvo un amplicón de 567 pb aproximadamente. Esto concuerda con la extensión de replicación indicada en la ficha técnica de los *primers* construidos por IBTX y diseñados en el Gen Bank. No se observan cambios en el peso molecular del gen replicado en ninguno de los grupos. Este resultado indica que dicho gen en los embriones expuestos a alta concentración de glucosa no fue modificado, a pesar de que las ERO pueden reaccionar directamente con las proteínas, dando como resultado, por ejemplo, entrecruzamiento del colágeno con el DNA, que causa daños tanto a las bases como a los azúcares, además de la oxidación directa de las bases y azúcares del DNA como lo describe Cederberg y cols. (2000). Por otro lado la identidad del gen por medio de la técnica de secuenciación de Sanger indica una similitud estructural del 99% en el caso de los embriones de grupo control y los embriones del grupo tratados con alta glucosa con lo ya reportado en la base de datos Gen bank. Esto concuerda con lo reportado por Gäreskog y cols. (2007), que determinan que el gen *BCL-2* se encuentra presente en los embriones de rata.

Por otro lado, se observó indirectamente que el mRNA derivado del gen *BCL-2* se encuentra en todos los embriones de cultivo al igual que en los embriones DG en diferentes concentraciones en relación con el gen *GAPDH*, Teniendo un mayor porcentaje de disminución de mRNA en relación a *GAPDH* el grupo DG (28%) y CC (34%). Esto se puede atribuir a que un estado hiperglucémico no afecta a todos los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo, en este caso la transcripción, aunque se observa

una disminución de cDNA en los embriones expuesto a alta glucosa, indicando una baja actividad en la transcripción causada posiblemente por la hiperglucemia.

En los cortes histológicos de los embriones control y los embriones cultivados en alta glucosa se observa una importante diferencia en cuanto a la presencia de la proteína Bcl-2, ya que la intensidad de la fluorescencia fue mayor en los embriones control, mientras que no se registró fluorescencia en los embriones tratados con alta glucosa y con poliaminas (Fig. 15); Se registra fluorescencia en el tejido cardíaco, y en el tejido que rodea al tubo neural en embriones control (Fig. 16,17) lo que indica la localización de la proteína Bcl-2, Este resultado concuerda con lo reportado por Gäreskog y cols. (2007) que registran en embriones cultivados de ratas hembras sanas, la localización de la proteína en el tejido cardíaco, mientras que en embriones cultivados en condiciones de alta glucosa la proteína disminuye sus niveles. Varios estudios sugieren que un ambiente diabético puede incrementar la ocurrencia de apoptosis en embriones asociado con la presencia de malformaciones y retraso en el desarrollo, estos hechos se pueden atribuir a la disminución en la actividad de la proteína Bcl-2, que actúa como supresor de la apoptosis, previniendo la salida del citocromo C de la mitocondria y el ensamblaje del apoptosoma, lo cual es un evento esencial en la muerte celular. En células embrionarias que presentan apoptosis se ha observado un decremento en la actividad de la proteína Bcl-2, y un incremento en la actividad de proteínas pro-apoptóticas como es el caso de Bax, p53 y citocromo C, en tejidos de tubo neural y cardíaco como lo reportan Sun y cols. (2002) y García y García (2009). Estos resultados pueden sugerir que la exposición de embriones a un entorno diabético podría dar lugar a un cambio de la relación de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas para promover un estado apoptótico, además de cambios en la transcripción y traducción que implican una posible modificación en la expresión de genes reguladores de Bcl-2 impidiendo la traducción de dicha proteína, como es el caso de p53 que regula negativamente a Bcl-2 en eventos de estrés oxidativo (Bredow y cols. 2007; Gäreskog y cols., 2007).

## 7 CONCLUSIONES

1. Las poliaminas espermina y espermidina revierten los daños morfológicos causados por una alta concentración de glucosa, en embriones de rata de 10 días de desarrollo embrionario de acuerdo al análisis morfológico.
2. El gen *BCL-2* se encuentra presente en los embriones de 10 días de desarrollo cultivados por 24 h.
3. El mRNA de *BCL-2* se encuentra presente en los embriones de 10 días de desarrollo cultivados por 24 h.
4. La proteína Bcl-2 se encuentra presente en los embriones cultivados en medio control en tejido cardíaco y en tejido de tubo neural principalmente.
5. La proteína Bcl-2 tiende a estar ausente en embriones cultivados en condiciones de alta glucosa incluso en adición con espermidina y espermina.
6. No se presenta un aumento en la actividad de la proteína Bcl-2 con la suplementación de las poliaminas.
7. El mecanismo de embrioprotección de las poliaminas no se relaciona con la actividad de la proteína Bcl-2.

## 8 LITERATURA CITADA

American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33 (supp 1): s62-s69.

Baack, M.L.; Wang, C.; Hu, S.; Segar, J. L.; Norris, A. W. (2014). Hyperglycemia induces embryopathy, even in the absence of systemic maternal diabetes: an in vivo test of the fuel mediated teratogenesis hypothesis. *Reprod. Toxicol.*, 46: 129-136.

Bredow, S.; Juri, D.; Cardin, K.; Tesfaigzi, Y. (2007) Identification of a novel Bcl-2 promoter region that counteracts in a p53-dependent manner the inhibitory P2 region. *Gene* 404:110-116

Brownlee, M. (2002). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-820.

Buchanan, T. A.; Xiang, A.; Kjos, S.L.; Watanabe, R. (2007). What is gestational Diabetes? *Diabetes*, 30: S105-S111.

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 Care*, 43: 656-660.

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

Burton, G.J.; Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25(3): 287-299.

Calciu, C.; Kubow, S.; Chan, H. (2002). Interactive dysmorphogenic effects of toxaphene or toxaphene congeners and hyperglycemia on cultured whole rat embryos during organogenesis. *Toxicology*, 175: 153-165.

Calderón, J.V.; Muñoz, E.G.; Quintanar, M.A. (2013). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB*, 32(2): 53-66.

Cederberg, J.; Galli, J.; Luthman, H.; Eriksson, U. (2000). Increased mRNA levels of Mn-SOD and catalase in embryos of diabetic rats from a malformation resistant strain. *Diabetes*, 49. 101-107.

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

Chappel, J.H.; Wang, X.D.; Loeken, M.R. (2009). Diabetes and apoptosis: neural crest cells and neural tube. *Apoptosis*, 14:1472-1483.

Chattopadhyay, M.K.; Tabor, C.W.; Tabor, H. (2003). Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 100: 2261-2265.

Childs, A.C.; Mehta, D.J.; Gerner, E.W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60: 1394–1406.

Chirino, G. (2007). Efecto de las poliaminas sobre el crecimiento de embriones de rata cultivados *in vitro*, en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. Tesis de licenciatura en Biología. FES Iztacala, UNAM. 70p

Chirino-Galindo, G.; Baiza-Gutman, L. A.; Barrera-Escorcia, E.; Palomar-Morales, M. (2009), Polyamines protect rat embryo *in vitro* from high glucose-induced developmental delay and dysmorphogenesis. *Birth Def. Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, 86: 58–64.

Chirino-Galindo, G.; Mejía, R.; Palomar-Morales, M. (2012). *Change in lipoperoxidation but not in scavenging enzymes activity during polyamine embryoprotection in rat embryo cultured in hyperglycemic media. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 48: 570.

Clapés, S.; Fernández, T.; Suárez, G. (2013). Oxidative stress and birth defects in infants of women with pregestational diabetes. *MEDICC Rev.* 15: 37-40.

Dennery, P. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Def. Res. C Embryo Today*, 81:155-62.

Díaz-Flores, M.; Baiza, L.A.; Ibáñez, M. Á.; Pascoe, D.; Guzmán, A.M.; Kumate, J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac. Med. Mex.*, 140(4): 437-447.

Dong, D.; Yu, J.; Wu, Y.; Fu, N.; Arias, N.; Yang, P. (2015) Maternal diabetes triggers DNA damage and DNA damage response in neurulation stage embryos through oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467 (2): 407-412.

Dong, D.; E. Reece, A.; Lin, X.; Wu, Y.; Arias, N.; Yang, P. (2016). New development of the yolk sac theory in diabetic embryopathy: molecular mechanism and link to structural birth defects. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 214 (2): 192-202.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.

El-Bassiouni, E.A.; Helmy, M.H.; Rawash, N.A.; Zoghby, S.M.; Kamel, M.A.E.; Rayah, A.N.A. (2005). Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of oxidative stress and antioxidant defence. *Br. J. Biomed. Sci.*, 62: 71-76.

ENSANUT (2016) Encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino. *INSP*. México. 46-53.

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

Eriksson, U.; Hakan, B.; Forsberg, H.; Styrud, J. (1991). Diabetic embryopathy: studies with animal and in vitro models. *Diabetes*, 40(2):94–98.

Eriksson, U.; Simán, C.M. (1996). Pregnant diabetic rats fed the antioxidant butylated hydroxytoluene show decreased occurrence of malformations in offspring. *Diabetes*, 45:1497-502.

Eriksson, U.; Wentzel, P. (2016). The status of diabetic embryopathy. *Ups. J. Med. Sci.*, 121. 1-17.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 25: s5-s20.

Farrell, R. E. Jr. (2010). RNA Methodologies. Laboratory guide for isolation and characterization (4th Edition). United States of America: Academic Press.

Fernández, M.; Alvarez, M. (2008). Las aminas biógenas en los alimentos. *Agroscic*. 2-8.

Fernández, T.; Clapés, S.; Suárez, G.; Perera, Alfredo.; Rodríguez, V.; Purón, C.; Herrera, M.; Antiguas Á.; Castro, T. (2013). Embriopatía diabética en ratas y efecto de un suplemento nutricional de vitamina e durante la gestación. *Rev. Haban.. Cienc. Méd.*, 12:176-186.

Forsberg, H.; Borg, L.; Cagliero, E.; Eriksson, U. (1996). Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. *Free Radic. Res.*, 24: 451-9.

Forsberg, H.; Eriksson, J.; Welsh, N. (1998). Apoptosis in embryos of diabetic rats. *Pharmacol. Toxicol*, 83: 104–111.

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

Frago, L .M.; Arroba, A.; Chowen, J.A. (2001). Fundamentos de la apoptosis celular: interés en endocrinología, *Endocrinol. Nutr*, 48(9): 272-280,

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

Fujisawa, S.; Kadoma, Y. (2005). Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res.*, 25: 965-970.

García, C. (2008). Diabetes mellitus gestacional. *Med. Int. Mex.*, 24(2):148-56.

García, D.; García, R. (2009). Avances en la patogénesis de la embriopatía diabética. *Rev Med. Chil.*, 137(12): 1627-1635.

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

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

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

Hagay, Z.J.; Weiss, Y.; Zusman, I.; Peled, M.; Reece, A.; Eriksson, U.J.; Groner, Y. (1995). Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 173 (4): 1036-1041.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. (2015). Free radicals in biology and medicine. 5nd Edition, Oxford University Press, Oxford. 22-85.

Hansberg, T.W. (1999). La biología del dioxígeno en singulete. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol*, FES Zaragoza, UNAM 2:47-55.

Hansberg, T.W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, 26: 19-54.

Herrera, E. (2000). Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetos. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 54: S47-S51.

Herrera, C.; Chávez, J.; Ferriz, Roberto.; de la Torre, K.; Elton, E.; García, T. (2014). Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *REB*, 33(2); 51-57.

Hinojosa, M.; Hernández, F.; Barrera, E.; Gayosso, M. (2010). Prevalencia de Diabetes mellitus gestacional en el Hospital Juárez de México. *Rev. Hosp. Jua. Méx*, 77(2): 123-128.

Hockenbery, D.; Oltvai, Z.; Xiao, Yin.; Curt, M.; Stanley, K. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75: 241-51.

Hussain, T.; Tan, B.; Ren, W.; Rahu, N.; Kalhor, D.; Yin, Y. (2017). Exploring polyamines: functions in embryo/fetal development. *Anim. Nutr*, 3: 7-10.

Kahan, R. (1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 20: 1183-1193.

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

Kruger, A.; Peterson, S.; Schwartzman, M.; Fusco, H.; McClung, J.; Weiss, M.; Shenouda, S.; Goodman, A.; Goligorsky, M.; Kappas, A.; Nader, A. (2006). Up-regulation of heme oxygenase provides vascular protection in an animal model of Diabetes through its antioxidant and antiapoptotic effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 319(3): 1144-1152.

Lee, M.; Hyun, D.; Marshall, K.; Ellerby, L.; Bredesen, D.; Jenner, P.; Halliwell, B. (2001). Effect of overexpression of Bcl-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radic Biol. Med.*, 31(12): 1550-1559.

Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91: 479-489.

Loeken, M.R. (2006). Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc. Gynecol. Investig.*, 13: 2-10.

Luna-López, A.; López, N.E.; González, V.Y.; Triana, F.; Königsberg, M. (2008) El fantástico mundo de la proteína bcl-2. *REB*, 27(3): 93-102.

- Macedo, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol*, 15(2), 97-103.
- Martínez, G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm*, 39(3).
- Méndez, J.D.; Palomar-Morales, M. (1999). Prevention by l-arginine and polyamines of delayed development and embryotoxicity caused by chemically-induced diabetes in rats. *Reprod. Toxicol*, 13(6): 501-509.
- Mendoza, A.; Monroy, G.; Morimoto, S.; Cerbón, M. (2003). Pro-apoptotic signals of the Bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol*, 208: 31-9.
- Metcalf, A.D.; Hunter, H.R.; Bloor, D. (2004) Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation. *Mol. Reprod. Dev*, 68: 35-50.
- Minois, N.; Carmona, D.; Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and disease. *AGING*, 3: 716-732.
- Nazer, J.; Ramírez, R. (2000). Malformaciones congénitas en los hijos de madres diabéticas. *Rev. Méd. Chil*, 128(9): 1045-1052.
- Nazer, J.; García, M.; Cifuentes, L. (2005). Malformaciones congénitas en hijos de madres con diabetes gestacional. *Rev Méd. Chil*, 133(5): 547-554.
- New, D.A.T. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 53: 81-122.
- Ornoy, A. (2007). Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy, *Reprod. Toxicol*. 24: 31-41.
- 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: 376-86.
- Pellegrini, M.; Strasser, A. (2000) Caspases, Bcl-2 family proteins and other components of the death machinery: Their role in the regulation of the Immune response. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience.
- Penney, G.; Mair, G.; Pearson, D. (2003). Outcomes of pregnancies in women with type 1 diabetes in Scotland: a national population-based study. *BJOG*, 110: 315-318.
- Priestley, J.; (1923) Experiments and observations on different kinds of air. Vol. II. Sections III-V. En: Priestley J, The discovery of oxygen. Part I. Edinburgh: The Alembic/club. 29-103.
- Quintanar, M.; Calderon, V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB*, 28: 89-101.

- Reece, E.A.; Khandelwal, M.; Wu, Y.; Borenstein, M.; (1997). Dietary intake of mio-inositol and neural tube defects in offspring of diabetic *rats*. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 176: 536-539.
- Scheele, CW. (1971). *Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer*. Uppsala and Leipzig. Section 2. En: Schelle CW. The collected papers of Carl Wilhelm Scheele, Bell and Sons, London y Kraus Reprint Co. New York: 85-178.
- 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.
- Steinman, H. (1993). The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J. Biol. Chem*, 270: 3487-3490.
- Suhonen, L.; Hiilesmaa, V.; Teramo, Kari. (2000). Glycaemic control during early pregnancy and fetal malformations in women with type I Diabetes mellitus. *Obstet Gynecol Surv*, 55: 474-476.
- Sun, F.; Akazawa, S.; Kazuyuki, S.; Kamihira, S.; Kawasaki, E.; Eguchi, K.; Koji, T. (2002). Apoptosis is normal rat embryo tissues during early organogenesis: The possible Involvement of Bax and Bcl-2. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 65(2): 145-157.
- Thangarajan, S.; Ramachandran, S.; Krishnamurthy, P. (2016). Chrysin exerts neuroprotective effects against 3-Nitropropionic acid induced behavioral despair-Mitochondrial dysfunction and striatal apoptosis via upregulating Bcl-2 gene and downregulating Bax—Bad genes in male wistar rats, *Biomed. Pharmacother.*, 84: 514-525.
- 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.
- Torres-Cuevas, I.; Parra-Lorca, A.; Sánchez-Illana, A.; Nuñez-Ramiro, A.; Kuligowski, J.; Chafer-Pericás, C.; Cernada, M.; Escobar, J.; Vento, M. (2017). Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.*, 12: 674-681.
- Venkatesan, R.; Sadiq, A. (2017). Effect of morin-5'-sulfonic acid sodium salt on the expression of apoptosis related proteins caspase 3, Bax and Bcl 2 due to the mercury induced oxidative stress in albino rats, *Biomed. Pharmacother.*, 85: 202-208.
- Vilches, A.; García, A. I.; Moreno, L. (2013). Expresión genética por Rt-PCR en tiempo real. Guía práctica de estudio. 1ª edición, México, FES Iztacala.
- Vlassara, H.; Palace, M.R. (2002). Diabetes and advanced glycation end products. *J. Intern. Med.*, 251: 87–101.
- Wentzel, P.; Eriksson, U. (1998). Antioxidants diminish developmental damage induced by high glucose and cyclooxygenase inhibitors in rat embryos in vitro. *Diabetes*, 4: 677-84.
- Wentzel, P.; Eriksson, U. (2002). 8-Iso-PGF (2alpha) administration generates dysmorphogenesis and increased lipid peroxidation in rat embryos in vitro. *Teratology*, 66: 164–168.

Wentzel, P.; Eriksson, U. (2005). A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E2 in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Def. Res. Part A Clin. Mol. Teratol.*, 73: 506-511.

Wentzel, P.; Eriksson, U. (2011). Altered gene expression in rat cranial neural crest cells exposed to a teratogenic glucose concentration in vitro-paradoxical downregulation of antioxidative defense genes. *Birth Def. Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.*, 92: 487-97.

Wu, W.; Liu, P.; Li, J. (2011). Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, 82: 249-58.

Zhiyong, Z.; Reece, E. (2013). New Concepts in Diabetic embryopathy. *Clin. Lab. Med.*, 33: 207-233.

Zong, W.X.; Lindsten, T.; Ross, A.J.; MacGregor, G.; Thompson, C.B. (2001). CBBH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of BAX and BAK. *Genes Dev.*, 15: 1481-1486.

## 9 ANEXOS

### Anexo 9.1 Extracción de ADN (12334-S. MOBIO laboratories).

Los embriones se extraen del Rotocell® individualmente después de las 24 h. de incubación.

Se les retira el medio de cultivo, se sumergen en nitrógeno líquido, y se almacenan en ultra congelación a -70 °C, hasta su uso.

Los embriones se retiran completamente de los tubos eppendorf se someten al UltraClean Tissue & Cells DNA isolation Kit (Mo Bio laboratorios).

A los tubos con perlas Adicionar 700 µl de la Solución TD1, luego agregar 1-25 mg de tejido.

Los tubos con perlas se aseguran horizontalmente al vórtex usando un adaptador o adherir a una almohadilla plana con cinta adhesiva, encender el vórtex a velocidad máxima durante 10 minutos.

Centrifugue los tubos con perlas a 11,000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente.

Trasferir el sobrenadante a los tubos Spin filter y centrifugar a 11,000 RPM por 30 segundos a temperatura ambiente (retirar el filtrado).

Adicionar 400 µL de solución TD2 a cada tubo y Centrifugar a 11,000 RPM por 30 segundos (retirar el filtrado).

Centrifugar a 11,000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente para remover residuos de solución TD2.

Pasar por filtro con la muestra a un tubo de 2 mL "collection tube" y adicionar 50 µL de solución TD3 al centro del filtro y dejar reposar 2 minutos.

Centrifugar a 11,000 RPM por 30 segundos a temperatura ambiente.

Repetir paso 10 y 11 para un mayor rendimiento del DNA.

El DNA es almacenado a -20° C hasta su uso.

## **Anexo 9.2 Electroforesis horizontal (1704467. Bio-Rad).**

Pesar en una balanza analítica lo correspondiente de agarosa para obtener un gel al 0.8 y 1.5% y diluir en 50 mL de buffer TBE 0.5 X.

Calentar la mezcla en microondas hasta su dilución (no permitir la evaporación del TBE).

Dejar reposar por 5 min a temperatura ambiente.

Agregar 0.3  $\mu$ L del reactivo Midori Green para marcar el DNA y visualizar en cámara de fluorescencia.

Ensamblar cubeta de electroforesis horizontal marca Bio Rad.

Transferir 20 a 25 mL de agarosa diluida en TBE al porta gel incluido en la cubeta.

El gel se deja reposar a temperatura ambiente en con el peine de 8 pozos, hasta polimerizar.

Una vez que polimeriza el gel, se desmonta el peine y compuertas incluidas en la cubeta.

Agregar buffer TBE 0.5 X a la cubeta hasta cubrir el gel.

Agregar en cada pozo del gel, 5  $\mu$ L del DNA genómico aislado mezclado con 1  $\mu$ L de Buffer Dye 6X.

Agregar 5  $\mu$ L de marcadores de peso molecular KAPA universal ladder.

Cerrar la cubeta y conectar los electrodos a la fuente de poder.

Programar la fuente de poder a 80 volts por 45 min.

Al finalizar el tiempo establecido, visualizar gel en cámara de fluorescencia UV.

Fotografiar gel para análisis posterior.

### Anexo 9.3 Diseño de *primers* (Gen. Bank-pick primers)

Los primers son diseñados por el programa Primer-Blast apartir de la estructura del gen *BCL-2*, correspondiente a la región BH4 de la proteína, de *Rattus norvegicus* (Rata) que pueden ser consultados en la base de datos Gen bank en la sección de nucleótidos, (Cuadro 2.)

	Sequense (5'->3')	Length	start	stop	Tm
Forward primer	TTTCTCTCTTTCGGCCGTGG	20	159	178	56°C
Reverse primer	GACATCTCCCTGTTGACGCT	20	725	706	56°C
Product length	567				

#### Anexo 9.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (BIO-21105. Bioline).

El DNA extraído es sometido a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la ayuda del Kit MyTaq™ DNA Polymerase, que se basa en la actividad de la polimerasa de *Thermus aquaticus*, a diferentes temperaturas.

Se preparan los *primers* liofilizados a una concentración de 20 µM (en este caso se realizó una alícuota con 10 µM de concentración) y se almacenan a -20 °C hasta su uso.

Se descongelan los reactivos a usar, previo a la realización de la técnica y se mantienen en frío.

En tubos eppendorf de 1.5 ml realizar mezcla de 100 µL agregando:

20 µL de 5x MyTaq Reaction Buffer.

4 µL de cada primer forward y reverse (8 µL en total).

1 µL de MyTaq DNA Polymerase.

Agua (ddH<sub>2</sub>O) hasta completar los 95 µL (66 µL).

En 5 tubos eppendorf de 0.2 mL especiales para termociclador, agregar 19 µL de la mezcla realizada en el paso anterior y 1 µL de DNA templado por cada tubo. Mantener en frío hasta su uso.

Realizar los cálculos pertinentes para dos reacción de 20 µL, un control negativo y un positivo.

Introducir los tubos con las mezclas en un termociclador de punto final modelo T100™, marca Bio-Rad.

Programar según la ficha técnica del Kit MyTaq™ DNA Polymerase (Cuadro 3).

Al término de la PCR realizar una electroforesis horizontal de DNA en gel de agarosa al 1.5%.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	4 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	35
Alineamiento	56	15 seg	
Extensión	72°	45 seg	
Terminación	72	5 min	1

Observar gel en cámara de fluorescencia UV.

## **Anexo 9.5 Extracción total de RNA total (Vilches y cols., 2013).**

Agregar 1 mL de TRIzol a los tubos con los embriones recuperados de cultivo y homogenizar completamente.

Almacenar los tubos en congelación a -70 °C durante, al menos, 20 minutos y hasta su procesamiento.

Descongelar los tubos rápidamente a temperatura ambiente y agregar 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol.

Homogenizar en un agitador vórtex a temperatura ambiente.

Centrifugar las muestras a 4 °C a 10 000 RPM durante 15 minutos.

**Nota:** La centrifugación origina la formación de dos fases: una superior acuosa que contiene el RNA y una inferior rosada con lípidos y proteínas. En la interface se observa un anillo delgado de DNA genómico.

Agregar 400 µL de la fase acuosa y transportar a un tubo nuevo.

Agregar la misma cantidad de alcohol isopropílico.

Reposar fase acuosa por 16 horas a una temperatura de -20°C.

Centrifugar a 12 000 RPM durante 11 minutos a 4°C.

Identificar la pastilla y decantar el alcohol isopropílico.

Agregar 600 µL de etanol al 70% con agua DEPC, en frío.

Centrifugar a 10 000 RPM durante 6 minutos a 4°C, para precipitar el RNA.

Decantar el etanol.

Resuspender la pastilla de RNA en 20 µL de agua DEPC.

Refrigerar a -20°C, hasta su uso.

## **Anexo 9.6 Cuantificación de RNA total (Vilches y cols., 2013).**

Para realizar la RT-PCR se cuantifica el RNA total, por lo cual se lleva a cabo una lectura de RNA a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro, con una dilución 1:250 de RNA en agua DEPC, se registran las lecturas de la densidad óptica y se hacen los cálculos pertinentes.

Encender el espectrofotómetro y ajustarlo a 260 nm.

Mantener muestras en hielo.

En una celda de cuarzo, colocar 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC y calibrar a 260 y 280 nm.

Diluir en un tubo nuevo 2  $\mu\text{L}$  del RNA total en 498  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC; dilución 1:250.

Registrar lectura de la densidad óptica (DO) de la muestra a 260 y 280 nm.

Limpiar celdas con  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC al terminar la lectura de cada muestra.

Realizar cálculos.

**Concentración de RNA: lectura a 260x factor de 10=  $\mu\text{g}$  RNA total/ $\mu\text{L}$ .** El factor 10 es el resultado de  $(40 \times 250)/1000$ , es decir:

El coeficiente de extinción de RNA a 260 nm = 40  $\mu\text{g}$  por unidad de absorbancia.

Dilución empleada 1:250.

Conversión de 1 mL = 1000  $\mu\text{L}$ .

**Cantidad de RNA total:** concentración de  $\mu\text{g}$  de RNA total/ $\mu\text{L}$  x volumen total en el que fue diluida la muestra.

**Calidad de la muestra:** relación de los valores de densidad óptica en dos longitudes de onda (DO 260 nm/DO 280 nm).

- Si la relación da un valor entre 1.5 y 2 la calidad y pureza del RNA es buena.
- Si la relación da un valor entre 1.5 y 1.2 la calidad y pureza es regular.
- Si la relación da un valor menor a 1.2, la calidad y pureza del RNA es mala.

## **Anexo 9.7 RT-PCR (Vilches y cols., 2013).**

La RT-PCR se realiza empleando un kit comercial en este caso SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (INVITROGEN) que se basa en la retrotranscripción realizada por la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina, a partir de una molécula de RNA molde para formar una cadena sencilla de DNA, denominada cDNA.

Se descongelan los reactivos a usar, previo a la realización de la técnica y se mantienen en frío.

En tubos eppendorf de 1.5 mL, realizar mezcla de 100 µL agregando:

50 µL de 2X Reaction Mix.

2 µL de cada *primer forward* y *reverse* (4 µL en total).

2 µL de SuperScript™ III RT/Platinum™.

Agua (ddH<sub>2</sub>O) hasta completar los 100 µL (según la concentración de RNA en 1 µL).

En 5 tubos eppendorf de 0.2 mL especiales para termociclador, agregar 11.6 µL de la mezcla realizada en el paso anterior y de 1 a 5 µL de RNA templado por cada tubo. Mantener en frío hasta su uso.

Realizar los cálculos pertinentes para dos reacciones de 20 µL, un control negativo y un positivo.

Introducir los tubos con las mezclas en un termociclador de punto final modelo T100™, marca Bio-Rad.

Programar según la ficha técnica del SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Cuadro 4).

Al término de la PCR realizar una electroforesis horizontal de DNA en gel de agarosa al 1.5%.

Observar gel en cámara de fluorescencia UV.

Y calcular porcentaje de concentración relacionado a *GAPDH*.

<b>CUADRO 4. CONDICIONES DE TERMOCICLADOR PARA TÉCNICA RT-PCR</b>			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Síntesis de cDNA y pre-desnaturalización	55	30	1
	94	2 min.	
Desnaturalización	94	15 seg.	40
Alineamiento	56	30 seg.	
Extensión	68	45 seg.	
Terminación	68	5 min.	1

### **Anexo 9.8 Técnica histológica (Chirino-Galindo, 2007).**

Los embriones obtenidos del cultivo se fijan en formaldehído al 4% en frío.

Deshidratar progresivamente en alcohol en lapsos de 10 minutos:

30 %

40%

50%

60%

70%

80%

90%

96%

Absoluto

Amílico-absoluto 50-50%

Aclara en alcohol amílico por 15 minutos.

Embeber en amílico-paraplast (50-50%) por 15 minutos.

Paraplast Plus dos cambios de 30 min mínimo.

Incluir en Paraplast Plus marca Leica.

Dejar en reposo a -20°C hasta solidificar.

Realizar cortes histológicos con un grosor de 8  $\mu\text{m}$  con micrótomo marca Leica modelo RM2125 RTS.

## **Anexo 9.9 Inmunohistoquímica (Mendoza y cols., 2003).**

Las laminillas se desparafinan por 30 min por 58°C

Xilol de 5-10 min

Rehidratar

Alcohol absoluto 3 min

Alcohol 96° 3 min

Alcohol 90° 3 min

Alcohol 80° 3 min

Alcohol 70° 3 min

Alcohol 60° 3 min

PBS 5 min

Calentar laminillas en Citrato de sodio al 0.01 M pH 6 (4 ciclos de 5 min).

Enfriar a temperatura ambiente.

Incubar con Triton x-100 0.5% por 30 min a temperatura ambiente.

PBS 2 X 5 min c/u.

Bloquear con BSA 5% ,30 minutos A Temperatura ambiente (este paso se hace sobre laminilla).

Anticuerpo primario 1:250 disuelto en Triton x-100 3%, toda la noche.

PBS 3 x 5 MIN.

Montar en medio de montaje UltraCruz.