



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA**

**EFFECTO DE UNA FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN  
VERBASCÓSIDO SOBRE UN MODELO *IN VITRO* DE  
EMBRIOPATÍA DIABÉTICA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LILIANA BERENICE RAMÍREZ DOMÍNGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. MARTÍN PALOMAR MORALES**

**Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2019.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

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

**La obtención y caracterización del extracto metanólico de *Buddleja cordata* se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la asesoría de la doctora Ana María García Bores.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por proporcionarme todo lo necesario para concluir esta hermosa carrera.

A mi director de tesis, el Dr. Martín Palomar Morales y a la Biól. Gladys Chirino Galindo por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y apoyarme en cada momento en todo sentido, siempre tuvieron la paciencia para enseñarme. También por haber revisado este trabajo y corregirlo.

A la Dra. Ana María García Bores, por permitirme dejar trabajar en el Laboratorio de Fitoquímica y todas las enseñanzas que me compartió durante ese tiempo, por su paciencia para enseñarme, su ayuda para la interpretación de resultados, así como por todas las correcciones que hizo a este trabajo.

Al Dr. Edgar Estrella Parra y al Laboratorio de Cromatografía de Líquidos y Espectrometría de Masas de la Escuela Médico Militar por el análisis por HPCL-MS del extracto metanólico de *B. cordata*.

Al Dr. José Guillermo Ávila Acevedo por siempre estar al pendiente de mi proyecto, su apoyo en el Laboratorio de Fitoquímica y sus correcciones al escrito.

A la M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez por las correcciones realizadas a este trabajo, por las preguntas que me hizo.

Al personal académico del bioterio por su apoyo y la plática de ética en el manejo de animales de laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio del Metabolismo de la Diabetes Mellitus, en especial a René, Fernando, Coral y Lucero, por estar siempre dispuestos a ayudarme y por todas las risas que hicieron el trabajo más ameno.

A mis profesores y compañeros del Laboratorio de Fitoquímica, por su apoyo durante mi breve estancia.

## **DEDICATORIAS**

A mis papás, por todo su esfuerzo, dedicación y sacrificio para que yo pudiera llegar hasta este momento. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Son los mejores papás. Los amo.

A mis amigos y compañeros de la carrera Héctor, Boni, Cris, Juan Pablo, Alex, Miros, Alejandro, Viri, Den y Carlos, por las aventuras, risas y ser súper compañeros de equipo.

A la Dra. Victoria Domínguez por haber hecho que me enamorara de la biología, todo su apoyo y por ser un modelo a seguir.

A toda mi familia por preocuparse por mí y por ser una familia tan bonita.

A Pippersito por la compañía, alegría y brinquitos.

A Pichito por siempre alentarme a ser mejor persona, por quererme tanto, apoyarme en todo y ser bonito como conejito.

## ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN .....	3
	2.1 Diabetes mellitus .....	3
	2.2 Estrés oxidativo .....	7
	2.3 Antioxidantes .....	11
	2.4 Verbascósido .....	14
	2.5 Cultivo de embriones postimplantacionales .....	16
3	ANTECEDENTES .....	16
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
5	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	20
6	HIPÓTESIS .....	21
7	OBJETIVOS .....	21
8	MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
	8.1 Separación del extracto metanólico de <i>B. cordata</i> por cromatografía en columna .....	22
	8.2 Caracterización de la fracción enriquecida en verbascósido .....	22
	8.3 Obtención y cultivo de embriones de rata.....	23
9	RESULTADOS .....	29
10	DISCUSIÓN .....	44
11	CONCLUSIONES .....	49
12	LITERATURA CITADA .....	50

## 1. RESUMEN

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas, causadas por deficiencia total o parcial de insulina, lo cual produce un estado crónico de hiperglucemia. La diabetes mellitus puede causar diversas complicaciones, entre ellas la embriopatía diabética, que se manifiesta por malformaciones congénitas y retraso en el desarrollo; debido, entre otros factores, al estrés oxidativo. Por otra parte, se ha sugerido que algunos agentes antioxidantes, como los compuestos fenólicos, tienen la capacidad de disminuir las alteraciones en el desarrollo, debido a que pueden reducir el daño por estrés oxidativo. El extracto metanólico de *Buddleja cordata* es rico en antioxidantes, entre los que destaca el verbascósido, el cual se ha demostrado en un modelo *in vivo*, que puede revertir las malformaciones provocadas por la diabetes mellitus. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto de *B. cordata* enriquecido en verbascósido sobre el desarrollo de embriones de rata cultivados en presencia de altas concentraciones de glucosa. Como primer paso, por medio de una cromatografía de columna se obtuvo una fracción enriquecida en verbascósido a partir del extracto metanólico de *B. cordata*, y se caracterizó por HPLC-MS. Una vez obtenido el extracto, embriones de 10.5 días de edad gestacional, de ratas sanas, se cultivaron por 24 horas en diferentes medios de cultivo: control, suplementado con glucosa, y suplementado con glucosa y extracto rico en verbascósido a concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Al finalizar la incubación, se valoraron los parámetros morfológicos externos. A continuación, algunos embriones se homogenizaron para medir en ellos la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasa (GST) y la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); otros embriones se fijaron y se sometieron a la técnica histológica de rutina. Se encontró, en concordancia con trabajos previos, que la hiperglucemia provoca retraso en el desarrollo y aparición de malformaciones; mientras que la adición del extracto rico en verbascósido

altera la frecuencia y severidad de éstas. Destaca que la adición de verbascósido disminuyó el principal marcador de daño por estrés oxidativo, el malonaldehído; ya que la cantidad de éste muestra diferencias significativas entre el grupo cultivado con altas concentraciones de glucosa, y los grupos a los que se les adicionó verbascósido, a todas las concentraciones. En contraste, las actividades enzimáticas de SOD, GPx y GST no presentan diferencias significativas en relación con el grupo tratado con altas concentraciones de glucosa. En conclusión, el verbascósido, presenta un efecto antioxidante y una actividad embrioprotectora parcial, en los que pudieran estar involucrados otros factores además del estrés oxidativo.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Diabetes mellitus

A nivel mundial, la diabetes mellitus (DM) se ha convertido en uno de los más grandes problemas de salud. Según la Federación Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, 2012), México es el quinto país con mayor número de casos en adultos (6.4 millones), de los cuales más de la mitad, 3.56 millones, son mujeres (Romero-Martínez *et al.*, 2013). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (2016), de 2006 a 2016, la prevalencia de diabetes en México ha pasado de 7.2% a 9.4%. Un 46.4% de los adultos con diabetes no realiza alguna medida preventiva para retrasar o evitar las complicaciones de la diabetes mellitus (ENSANUT MC, 2016).

Clínicamente, la DM se define por una concentración de glucosa en plasma en ayunas mayor o igual a 126 mg/dL, o una concentración sanguínea de hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayor o igual al 6.5% (Russell y Zilliox, 2014; International Diabetes Federation, 2017).

La DM es un desorden metabólico provocado por una deficiencia o alteración en la secreción de insulina, o en su efecto biológico; lo que causa que las concentraciones de glucosa en sangre se eleven y se altere el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Brogden y Heel, 1987), lo que provoca complicaciones como retinopatía, la cual produce ceguera en el 31.5% de los pacientes diabéticos (The Expert Committee, 2002); nefropatía diabética, que es la principal causa de trasplante de riñón (Kharroubi y Darwish, 2015); neuropatía diabética, que causa alteraciones nerviosas a largo plazo; así como daño a diferentes órganos, que sin las medidas adecuadas pueden provocar complicaciones como el coma diabético y la muerte (American Diabetes Association, 2010; Kharroubi y Darwish, 2015).

La DM se clasifica tradicionalmente en cuatro tipos:

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): Es una condición que se genera por el daño de las células  $\beta$  pancreáticas, provocado por una respuesta autoinmune, que a menudo conlleva a una deficiencia total de insulina, por lo que se requiere la administración de ésta de por vida (The Expert Committee, 2002; American Diabetes Association, 2018). Este tipo se presenta en aproximadamente 5 a 10% de los pacientes diabéticos, de los cuales la mayoría son niños y adolescentes, de ahí que anteriormente se le nombraba como diabetes juvenil; también era conocida como diabetes insulino dependiente (Kharroubi y Darwish, 2015; American Diabetes Association, 2018).

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): consiste en una resistencia periférica de los tejidos a la acción de la insulina, y una respuesta inadecuada en la secreción de esta hormona, pero a diferencia de los pacientes con diabetes tipo 1, no presentan autoanticuerpos para insulina o las proteínas relacionadas con la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas. A pesar de que sus etiologías son heterogéneas, existen diferentes factores de riesgo que se han determinado para esta enfermedad, como la obesidad, edad o falta de actividad física. Debido a que generalmente la enfermedad se desarrolla gradualmente, no suele ser diagnosticada en las primeras fases, y por lo general se presentaba en pacientes mayores de 40 años, por lo que era conocida como diabetes del adulto, o no-insulino dependiente (The Expert Committee, 2002; American Diabetes Association, 2018).

Diabetes mellitus gestacional (DMG): Se refiere a las situaciones en las que se diagnostica por primera vez diabetes mellitus en el segundo o tercer trimestre del embarazo, aunque no esté claro si esta condición ya existía previo al embarazo (American Diabetes Association, 2018). Se sabe que existe un riesgo mayor de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 después del embarazo (Kim *et al.*, 2002).

Otros tipos de diabetes. Tienen su causa en numerosos factores, como defectos genéticos de la función de las células  $\beta$  pancreáticas, endocrinopatías, inducidas química o farmacológicamente, por infecciones

virales, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exócrino, y diversas formas infrecuentes de diabetes autoinmune. También es llamada diabetes mellitus secundaria (The Expert Committee, 2002).

Se estima que la diabetes en el embarazo se debe en su mayoría a DMG (87.5%), la cual ha tenido un aumento en prevalencia de aproximadamente 30% (World Health Organization, 2013), seguida de la Diabetes Mellitus tipo 1 (7.5%) y la Diabetes Mellitus tipo 2 (5%) (NICE, 2015).

La hiperglicemia crónica producida por la diabetes mellitus provoca múltiples complicaciones renales, arteriales, del sistema nervioso periférico, entre otras. No obstante, uno de los daños que no se toma en cuenta por lo regular en la literatura son los defectos congénitos (Clapés, 2013). Durante el desarrollo embrionario, el sistema antioxidante es relativamente inmaduro (Zaken *et al.*, 2000), lo que puede causar cierta tendencia a daño celular por estrés oxidativo. Aunque se ha demostrado que el tratamiento con insulina aumenta la supervivencia fetal y materna, la probabilidad de que se produzcan defectos congénitos sigue siendo de 3 a 5 veces mayor que en embarazos de madres no diabéticas. Estos defectos congénitos se presentan únicamente en embarazos complicados con diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2, ya que los procesos que inducen las malformaciones suceden durante el periodo de organogénesis, la cual se produce hasta la séptima semana de embarazo. En este caso, se habla de embriopatía diabética. En cambio, la DMG, al presentarse a partir de la segunda mitad del embarazo, no produce este tipo de dismorfogénesis (Clapés *et al.*, 2013), sino alteraciones como macrosomía infantil, e hipoglucemia neonatal (Ríos-Martínez *et al.*, 2014).

Durante la organogénesis, el daño causado por la diabetes mellitus puede afectar casi cualquier órgano, sin embargo, los Defectos de Tubos Neural (DTN) y las cardiomiopatías son las malformaciones más frecuentes (Ríos-Martínez *et al.*, 2014).

En la especie humana, al final de la tercera semana de gestación comienza la formación del tubo neural por la fusión de los pliegues neurales (Valdés-Valdés *et al.*, 2010; Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2014). Cuando el tubo neural no se cierra en alguna zona, se producen enfermedades catalogadas como DTN, y dependiendo del punto de fallo se desarrollan diferentes tipos (Ríos-Martínez *et al.*, 2014). Los más frecuentes son:

Exencefalia. Es la condición que precede a la anencefalia. Los fetos que padecen exencefalia carecen de la bóveda craneal debido al cierre fallido del tubo neural. La posterior exposición del tejido nervioso con el líquido amniótico deriva en la degeneración de éste, y provoca la ausencia de cerebro, cerebelo e hipófisis, lo que se conoce como anencefalia (Stoll *et al.*, 2010; Coop *et al.*, 2013; Arteaga-Martínez y García-Peláez, 2014).

Raquisquisis. Es una alteración asociada a la anencefalia y otros defectos del tubo neural, que consiste en que la lesión se encuentra completamente abierta desde el cerebro hasta diferentes segmentos de la columna (Coop *et al.*, 2013).

Las malformaciones cardiovasculares más frecuentes en hijos de madres diabéticas son cardiopatía congénita, comunicación interventricular, atresia pulmonar, persistencia de conducto arterioso (Arteaga *et al.*, 2008). Mientras que las alteraciones craneofaciales más comunes en hijos de madres diabéticas son apéndice preauricular, labio y paladar hendido, microtia, entre otras (Arteaga *et al.*, 2008). De igual manera, el sistema músculo-esquelético presenta alteraciones como polidactilia, anomalías por reducción de miembros, ausencia de vértebras, entre otras (Arteaga *et al.*, 2008).

Se sabe que la incidencia de malformaciones congénitas es significativamente más alta en mujeres con DM1 que en mujeres con DM2, y en ambos casos es mayor que en la DMG (González-González *et al.*, 2008; Pettica *et al.*, 2009); en contraste, la DMG se asocia con macrosomía, síndrome de membrana hialina, y factores de riesgo neonatal (Vinik *et al.*, 2013).

## 2.2 Estrés oxidativo

El metabolismo anormal inducido por hiperglucemia asociada con la diabetes mellitus puede provocar una sobreproducción de radicales hidroxilo, superóxido, además de peróxido de hidrógeno, el oxígeno singulete, óxido nítrico y el ácido hipocloroso. Estos se conocen como especies reactivas (ER) (Halliwell y Gutteridge, 2015).

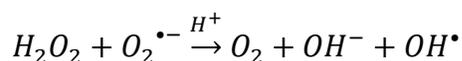
Normalmente, el metabolismo produce niveles basales de ER, que funcionan muchas veces como reguladores de factores de transcripción (Forsythe *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 2006; Dennery, 2007). De la misma manera, durante el desarrollo embrionario, las ER son indispensables como segundos mensajeros en la señalización celular para procesos como la proliferación y diferenciación celular y apoptosis (New y Coppola, 1970; Morris 1979; Castagne *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Schafer y Buettner, 2001). No obstante, en ciertas condiciones, como el consumo de alcohol, medicamentos durante el embarazo, o enfermedades como la diabetes, se incrementa la actividad de las ER (Dennery, 2007), lo cual produce estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El estrés oxidativo se refiere a la perturbación en el balance antioxidante y prooxidante en el metabolismo, y es capaz de provocar un daño potencial, derivado de la acción de las especies reactivas (Halliwell y Gutteridge, 2015).

El oxígeno diatómico es la clave de la respiración celular en organismos aerobios, sin embargo, por su naturaleza química, es por sí mismo un radical libre, ya que tiene dos electrones sin aparear, sin embargo, al tener el mismo número cuántico de spin, o restricción del spin o spin paralelo, impide que acepte electrones, por su característica paramagnética. Es por esto que reacciona más despacio que sus especies derivadas o especies reactivas (más reactivas que el oxígeno), por lo tanto se le considera el estado del oxígeno más estable o basal (Halliwell y Gutteridge, 2015). Las ERO más conocidas son:

Oxígeno singlete: Se forma cuando, al aplicar energía, los electrones del oxígeno cambian de orbital y regresan, pero uno de ellos con número cuántico spin contrario. Existen dos tipos de oxígeno singlete: el primer estado,  $^1\Delta_g$ , tiene dos electrones con spines opuestos en el mismo orbital  $\pi^*$ . El segundo estado,  $^1\Sigma_g$ , tiene un electron en cada orbital  $\pi^*$  con spines opuestos. Es más reactivo que el oxígeno diatómico, porque se elimina la restricción del spin (Martínez, 2005; Agnez-Lima *et al.*, 2012). El oxígeno singlete suele interactuar con el DNA, específicamente con la guanina, y de esta reacción se obtiene 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), molécula considerada como marcador de estrés oxidativo (Agnez-Lima *et al.*, 2012).

Radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ): Se forma cuando a una molécula diatómica de oxígeno obtiene un electrón más. Por sí mismo, el  $O_2^{\bullet-}$  no es muy reactivo ya que en el ambiente intracelular se protona rápidamente para formar radical hidroxiperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ). Principalmente, el  $O_2^{\bullet-}$  reacciona con el  $H_2O_2$  en presencia de Fe, a través de la reacción de Haber-Weiss:

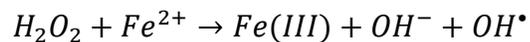


#### Reacción de Haber-Weiss

Como producto de estas reacciones se obtiene el radical hidroxilo. El  $O_2^{\bullet-}$  también tiene la capacidad de reaccionar con grupos tiol, lo que suele generar una disminución en la actividad de GSH, además de poder disponer de las reservas de ferritina para formar el radical perferrilo (Brent y Rumack, 1993; Irshad y Chaudhuri, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2015).

Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  catalizada por la SOD forma al peróxido de hidrógeno. Funciona como sustrato para la reacción Haber Weiss. Es mucho más reactivo frente a las biomoléculas, capaz de iniciar la peroxidación lipídica y ruptura de las cadenas de DNA y RNA (Aruoma *et al.*, 1996; Rojkind *et al.*, 2002).

Radical hidroxilo (OH•): Se forma a partir de O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por medio de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss con metales de transición como catalizadores, y es uno de los radicales más reactivos, además de que presenta una especial afinidad por la glucosa. Es el responsable del daño a fosfolípidos de membranas celulares, por desencadenar el proceso de peroxidación lipídica, que tiene como producto el malonaldehído (MDA) (Haber y Weiss, 1934; Beauchamp y Fridovich, 1970; Groutveld y Halliwell, 1988; Aruoma *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1999; Yogesh *et al.*, 2003). Este último, además, es capaz de reaccionar con el DNA para formar 8-oxodG, como se mencionó anteriormente (Agnéz-Lima *et al.*, 2012).



#### Reacción de Fenton

Radicales peroxilo y alcoxilo (RO•<sub>2</sub>, RO•) Se forman durante la reacción en cadena de la lipoperoxidación y actúan como propagadores de esta reacción, lo cual provoca frecuentemente alteraciones en la fluidez y permeabilidad de la membrana celular (Aruoma *et al.*, 1996; Halliwell y Gutteridge, 2015).

Óxido nítrico (NO•) Se forma por acción de la enzima óxido nítrico sintasa a partir de la arginina (Moncada *et al.*, 1991). Su presencia se encuentra constitutivamente en reacciones de nitrosilación, sin embargo, en concentraciones elevadas, tiene la capacidad de reaccionar con otras ERO, en especial O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, lo que provoca alteraciones bioquímicas como nitración de proteínas, hidroxilaciones o alteraciones de vías de señalización (Martínez, 2005; Guzmán *et al.*, 2006).

Ácido hipocloroso (HOCl) Lo forma la enzima mieloperoxidasa durante la degranulación de neutrófilos. Es capaz de reaccionar con grupos sulfhidrilos y aminos proteicos y puede clorinar bases púricas del DNA y RNA (Weiss, 1989; Aruoma *et al.*, 1996; Martínez, 2005).

Cuando se metaboliza glucosa en exceso, la cadena transportadora de electrones incrementa la producción de ión superóxido, el cual, si no es

captado, resultará en estrés oxidativo (Shum y Sadler, 1990). Además del incremento de la producción de superóxido por el aumento del metabolismo oxidativo, las vías responsables del estrés oxidativo son complejas, incluyen un decremento en la expresión de  $\gamma$ -glutamilcistein-sintetasa, lo cual podría reducir la producción del antioxidante glutatión (GSH), y un aumento en la actividad del flujo de hexosamina y la señalización de diacilglicerol/proteín-cinasa (Hanson *et al.*, 1990; Horal *et al.*, 2004). Estas dos vías podrían disminuir la producción de NADPH, la cual se requiere para producir GSH a partir del glutatión oxidado (GSSG) (Brownlee, 2001).

La acumulación de estas ER por lo general induce estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2015; Li *et al.*; 2017), el cual puede causar oxidación de las moléculas biológicas, en especial de los lípidos, evento que se conoce como peroxidación lipídica o lipoperoxidación, y producir alteraciones en la función metabólica y propiedades fisicoquímicas de la membrana como son la cohesión, la fluidez y la permeabilidad (Cruz *et al.*, 2011).

La importancia del daño celular en el caso de la peroxidación lipídica radica en que se genera una reacción en cadena, en la que el radical libre que oxida a los ácidos grasos insaturados queda con un electrón desapareado y con condición de radical, que tiene la capacidad de oxidar más ácidos grasos (Miller *et al.*, 1993; Yu, 1994; Cruz *et al.*, 2011).

La glicosilación de proteínas afecta las vías de señalización y diferenciación celular, además de que inhibe a las proteínas antioxidantes. De igual manera, las proteínas pueden ser oxidadas directamente, lo que activa el proceso de ubiquitinización y posterior proteólisis (Clapés, 2000; Cruz *et al.*, 2011).

Otro daño importante que provoca el estrés oxidativo es la formación de productos finales de glicosilación avanzada, los cuales son derivados de proteínas o ácidos nucleicos glicosilados, los cuales promueven la producción de radicales libres y disminuyen la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Cruz *et al.*, 2011; Halliwell y Gutteridge, 2015).

El daño en el DNA afecta tanto al DNA mitocondrial como al nuclear, lo que puede causar efectos perjudiciales como muerte celular o inducir mutaciones en las células germinales que posiblemente se hereden a futuras generaciones, además en células somáticas tiene la capacidad de provocar padecimientos como cáncer o inmunodeficiencias (Berra *et al.*, 2006; Lagerwerf *et al.*, 2011; Agnez-Lima *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2012; Iyama y Wilson, 2013; Brogin *et al.*, 2014). En la Figura 1 se ilustra el mecanismo de generación intracelular de algunas ER y la intervención de ciertas enzimas antioxidantes.

El estrés oxidativo que se da en la diabetes, junto con el propio del embarazo, puede provocar preeclamsia, alteraciones en la morfología y función de la placenta y malformaciones congénitas (Hubel *et al.*, 1996; Many *et al.*, 2000; Toescu *et al.*, 2002). De esta manera, se puede inferir que la reducción de la producción de ERO puede ayudar a tratar estas patologías.

### **2.3 Antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes a bajas concentraciones, en comparación con el sustrato oxidable, retrasan o evitan significativamente la oxidación de este sustrato (Halliwell y Gutteridge, 2015). El uso de antioxidantes contra el estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiado y se pueden clasificar en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros incluyen a la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa y peroxidasas, por mencionar algunos (Halliwell y Gutteridge, 2015). Los antioxidantes no enzimáticos comprenden grupos como las vitaminas del complejo B, vitamina C, vitamina E, compuestos fenólicos y el glutatión (Irshad y Chaudhuri, 2002; Venereo, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2015).

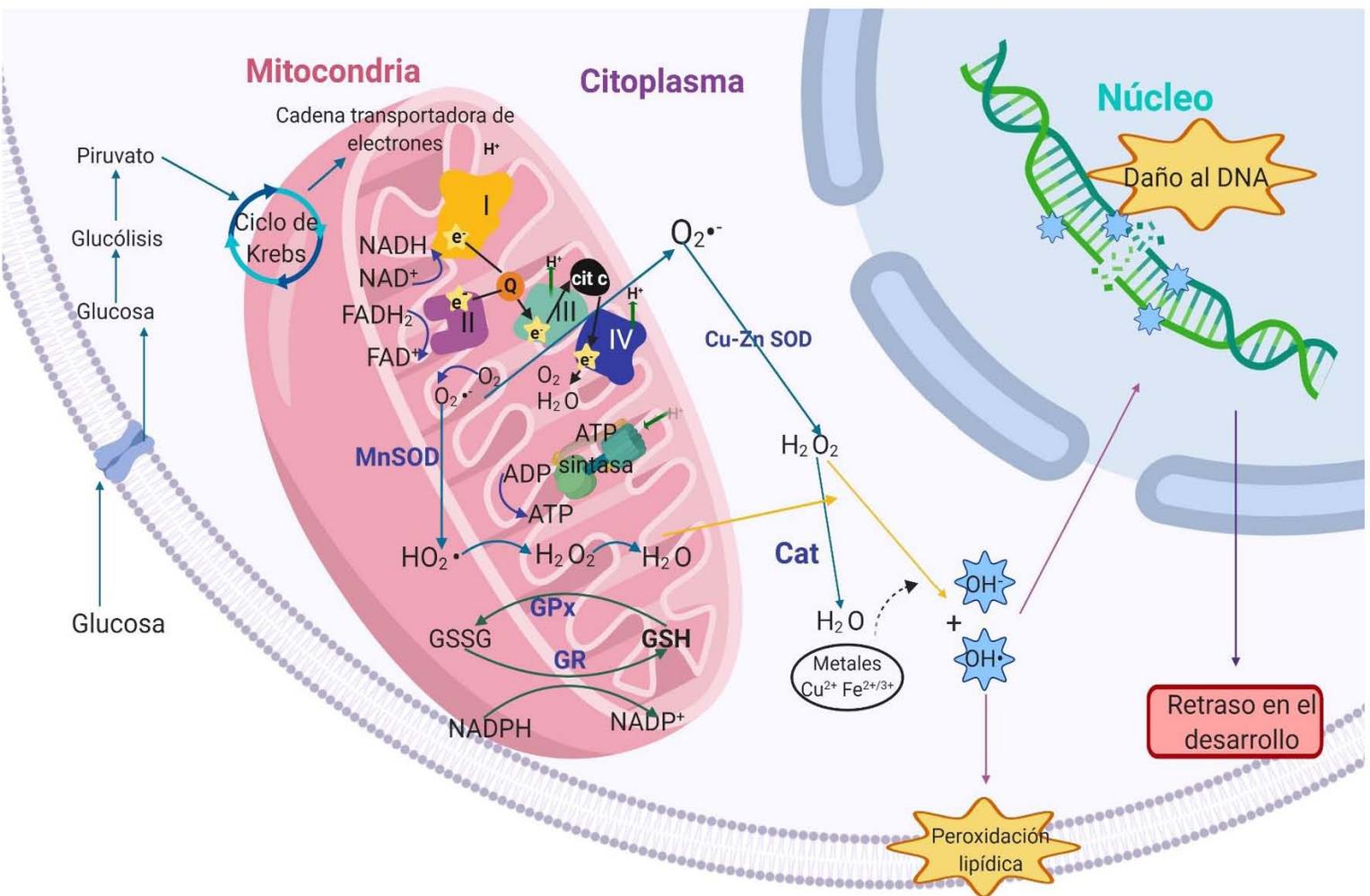
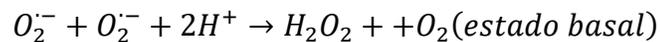


Figura 1. Procesos de generación y reducción de especies reactivas de oxígeno y su relación con el retraso en el desarrollo (Modificado de Horal, 2004; Takahashi, 2012).

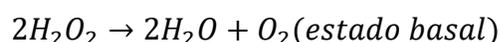
Las enzimas que funcionan como primer sistema de defensa antioxidante son la catalasa, el superóxido dismutasa y el sistema de glutatión (Halliwell y Gutteridge, 2015).

La familia de las enzimas superóxido dismutasa se encargan de catalizar la dismutación del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno de la siguiente manera:



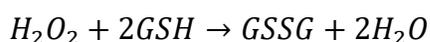
Los distintos tipos de enzimas superóxido dismutasa se distinguen principalmente por su localización y el tipo de iones que contienen en su sitio activo. La Cu/ZnSOD (SOD I), citosólica, es una proteína de dos subunidades, con un ion de cobre en su sitio activo, y un ion de Zn que interactúa con los residuos His61, His69, His78 y Asp81; además de poseer un puente disulfuro intramolecular. La MnSOD (SOD II), mitocondrial, tiene cuatro subunidades que, en humanos contienen 4 iones de manganeso en su centro catalítico. Por último, la EC-SOD (SOD III), que al igual que la SOD I tiene un ion de cobre y otro de zinc en su sitio activo pero se encuentra en el espacio extracelular (Halliwell y Gutteridge, 2015).

La enzima catalasa consiste en una proteína de cuatro subunidades, con Fe III en el sitio activo de cada una de ellas; se encarga de la descomposición directa de peróxido de hidrógeno a oxígeno en estado basal (Halliwell y Gutteridge, 2015), como se muestra a continuación.



Las enzimas del tipo glutatión S-transferasas catalizan la conjugación de la forma reducida de glutatión con compuestos xenobióticos, así como la reacción de peróxidos orgánicos (pero no de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con GSH para formar GSSG y alcoholes. También pueden actuar contra la peroxidación lipídica, al metabolizar productos finales de la lipoperoxidación (Tsuchida, 1999).

La enzima glutatión peroxidasa es una proteína de cuatro subunidades, cada una unida a una molécula de selenocisteína en su sitio activo. Se encuentra en el citosol, la mitocondria, el núcleo y peroxisomas. Reduce tanto el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como peróxidos orgánicos a H<sub>2</sub>O mediante la oxidación de GSH a GSSG (Halliwell y Gutteridge, 2015), según la reacción:



Por otro lado, también existen moléculas que funcionan como antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, las vitaminas y los metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos (Halliwell y Gutteridge, 2015), los cuales tienen un gran potencial para tratar diversas afecciones, como la embriopatía diabética (Venereo, 2002; Halliwell y Gutteridge, 2015).

El glutatión es un tripéptido que funciona como antioxidante y radioprotector, además de que es cofactor de algunas enzimas como la glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasas y glioxilasas (Cruz *et al.*, 2011).

Entre los compuestos fenólicos se encuentra el verbascósido, del cual se han hecho numerosos estudios y se ha comprobado su potencial antioxidante (Korkina, 2007; Zhou y Sadik, 2008; Lenoir *et al.*, 2011; Mestre-Alfaro *et al.*, 2011).

## **2.4 Verbascósido**

*Buddleja cordata* es un árbol originario de México, conocido vulgarmente como “tepozán”, pertenece a la familia Scrophulariaceae. Esta planta crece en diversos ecosistemas desde los 1700 hasta los 2800 msnm (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional mexicana debido a sus propiedades antioxidantes, cicatrizantes, diuréticas y antiinflamatorias (Mensaha *et al.*, 2001; Adedappo *et al.*, 2009; Gyurkovska *et al.*, 2011).

En las hojas de *B. cordata* se ha demostrado la presencia de diversos compuestos, entre los que se encuentran sesquiterpenos y compuestos fenólicos como flavonas, fenilpropanoides y feniletanoides, entre los cuales una cantidad considerable es verbascósido (Martínez-Vázquez *et al.*, 1996; Ávila *et al.*, 1999; Acevedo *et al.*, 2000).

El verbascósido o acteósido es un compuesto fenólico, conformado estructuralmente por un disacárido de L ramnosa y  $\beta$ -(D)-glucosa, al que se encuentran unidas una molécula de ácido caféico y una de hidroxitirosol, que ha sido ampliamente estudiado por su efecto analgésico, antipirético (Martínez-Vázquez *et al.*, 1996), antioxidante (Korkina, 2007; Zhou y Sadik, 2008; Lenoir *et al.*, 2011; Mestre-Alfaro *et al.*, 2011), bactericida (Ávila *et al.*, 1999), neuroprotector (Alipieva *et al.*, 2014), anticancerígeno (Ogbole *et al.*, 2017), antiinflamatorio (Hausmann *et al.*, 2007), citoprotector (Sgarbossa *et al.*, 2012) y fotoprotector (Sheng *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2010; Espinosa-González *et al.*, 2016).

De igual manera, se ha demostrado que protege a las blástulas y ovocitos de oveja contra los daños causados por estrés oxidativo (Martino *et al.*, 2016). En nuestro laboratorio, se reportó que la administración *in vivo* del extracto metanólico de *B. cordata* revierte la frecuencia y severidad de malformaciones en embriones de rata (López, 2017).

La identificación, caracterización y cuantificación del verbascósido, presente en diferentes plantas, se ha realizado mediante distintos métodos, entre los cuales se encuentran la espectrofotometría diferencial, la cromatografía en capa fina, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa, la resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS) (Sticher y Salama 1981a,b, 1983; Matlawska *et al.*, 1985, 1988; Blazics *et al.*, 2008; Adedappo *et al.*, 2009; Ávila *et al.*, 2014; Espinosa-González *et al.*, 2016; Ogbole *et al.*, 2017).

## 2.5 Cultivo de embriones postimplantacionales

La técnica de cultivo de embriones postimplantacionales de roedores ha sido ampliamente utilizada para el estudio del desarrollo embrionario y la organogénesis (New, 1978). Este método se ha convertido en el mejor modelo para estudiar el efecto de la hiperglucemia, de otros posibles teratógenos, y de moléculas con probable papel protector sobre el desarrollo embrionario; así como los mecanismos por los cuales los agentes teratogénicos o antiteratógenos (embrioprotectores) llevan a cabo sus efectos. El uso de éste sistema permite estudiar aisladamente un probable factor o mecanismo, lo cual no puede hacerse en condiciones *in vivo*. El modelo de cultivo permite el estudio del desarrollo embrionario y el metabolismo durante la organogénesis, y provee un sistema adecuado para la manipulación del desarrollo (Ellington, 1987).

## 3. ANTECEDENTES

Los primeros estudios sobre embriopatía diabética en modelos animales indicaron que la adición de glucosa al medio de cultivo, aumenta la frecuencia en el retraso del crecimiento, en embriones de rata de 9.5 días de edad gestacional (Freinkel *et al.*, 1986).

El-Bassiouni *et al.* (2005) realizaron un estudio transversal de embriones de rata de madres diabéticas, a los 9, 10, 11 y 15 días de gestación, en el que encontraron un aumento en los niveles de malondialdehído (MDA, indicador de lipoperoxidación) y glutatión (GSH), así como en la actividad de glutatión peroxidasas y glutatión S-transferasas. Por el contrario, indicaron una disminución de los niveles de vitamina C y selenio.

Existe una incidencia del 62-78% de malformaciones en embriones cultivados en medio con glucosa (Ornoy *et al.*, 2011). Se reportó que el saco vitelino fue más pequeño en los embriones malformados cultivados en medio con glucosa, pero no en los malformados cultivados en medio control. Los

embriones malformados tuvieron de 23 a 26 somitas, a diferencia de los que no presentaron malformaciones, con 29-32 somitas; además, los embriones malformados presentan menos arcos branquiales o tienen retraso en el desarrollo, con respecto al control. Tomando como referencia el parámetro de *score* morfológico propuesto por Klug *et al.* (1985), todos los embriones malformados obtuvieron un puntaje de 28 en promedio, en comparación con los embriones control normales, con un puntaje de 40 en promedio (Ornoy *et al.*, 2011).

Durante el cultivo de embriones de rata Cohen bajo diferentes condiciones diabéticas, se encontró una disminución de la actividad de SOD y un aumento en la frecuencia en DTN (Weksler-Zangen *et al.*, 2003).

Wentzel *et al.* (1997) demostraron en un modelo *in vitro* que la adición de superóxido dismutasa o uno de sus precursores, N-acetilcisteína, al medio de cultivo hiperglucémico, inhibe el efecto teratogénico de la glucosa.

Se han realizado diversos estudios sobre el efecto de compuestos antioxidantes sobre la embriopatía diabética. Fernández *et al.* (2012) evaluaron el efecto de 150 mg/kg/día de vitamina E sobre ratas preñadas con diabetes inducida con estreptozotocina, e indicaron que en embriones de día 11.5 de gestación se redujo la frecuencia y severidad de malformaciones, así como la lipoperoxidación; en cambio la concentración de proteínas y DNA no aumentó en los embriones de ratas diabéticas con respecto a los embriones control.

Cederberg *et al.* (2001) administraron una dieta suplementada con una combinación de 0.5% + 1%, ó 2% + 4% de vitamina E + vitamina C, respectivamente, en ratas preñadas con diabetes previamente inducida con estreptozotocina y reportaron que la dosis mayor fue la más efectiva para reducir la cantidad de dismorfogénesis, y a más baja para disminuir la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Cederberg y Eriksson (2005), mediante la administración de una dieta suplementada con 2, 5, 10 o 15% de vitamina E o 4, 10 o 15% de vitamina C a ratas preñadas, con diabetes previamente inducida con estreptozotocina, encontraron que el tratamiento con las dosis más altas dichas vitaminas disminuye la frecuencia de las malformaciones fetales y reduce la lipoperoxidación membranal.

La sobreexpresión de SOD 1 en embriones de ratón transgénico de día 8.5 de gestación, incrementa la actividad de esta enzima, y también aumenta la peroxidación lipídica, al inhibir la cascada activada por la protein cinasa C (PKC) inducida por hiperglicemia (Li *et al.*, 2011).

Chirino-Galindo *et al.* (2012) determinaron que no existe un cambio en la actividad de las enzimas SOD y GPx en embriones de rata cultivados en medio hiperglucémico suplementado con espermina 25  $\mu$ M, espermidina 25  $\mu$ M, putrescina 25  $\mu$ M y L-arginina 10 mM, a pesar de que presentan un efecto embrioprotector, pero que hay un aumento en la acumulación MDA. No obstante, no se detectó actividad de la enzima catalasa, con tres diferentes métodos reportados por otros autores.

En un estudio *in vivo*, se administró 0.5 mmol/kg/día de GSH a ratas diabéticas preñadas y se encontró que existe una reducción de la presencia de ER, así como en la GPx (Sakamaki *et al.*, 1999).

Trocino *et al.* (1995) establecieron que GSH protege contra el estrés oxidativo, además de que la disminución del sistema antioxidante dependiente de GSH es un factor importante en la aparición de embriopatía diabética en un modelo *in vitro*.

Etemad *et al.* (2016) determinaron que la administración intraperitoneal de 1 g/kg/día de verbascósido no induce toxicidad en ratonas madre ni teratogénesis en fetos.

Por otra parte, se ha reportado el uso del verbascósido sobre ovocitos porcinos inmaduros cultivados *in vitro*, y se encontró que este compuesto

mejora la competencia embrionaria partenogenética temprana (Kim *et al.*, 2016), así como la optimización del desarrollo embrionario, mediante la reducción de las especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación en ovocitos inmaduros de oveja cultivados *in vitro* con la adición de verbascósido en concentraciones nanomolares (Martino *et al.*, 2016).

Los estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado una reducción en la presencia y actividad de enzimas antioxidantes en embriones con defectos del tubo neural a consecuencia de la diabetes (Sivan *et al.*, 1997; Ornoy, 2007), así como el efecto embrioprotector registrado cuando se da un incremento de estas enzimas (Hagay *et al.*, 1995).

En nuestro laboratorio, recientemente, se reportó la reversión de las malformaciones producidas por diabetes mellitus *in vivo*, por administración de extracto metanólico de *B. cordata* en embriones de rata, en la dosis de 100 mg/kg (López, 2017), por lo cual es importante evaluar la actividad de este compuesto en un modelo de embriopatía diabética *in vitro*.

## **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La prevalencia de la diabetes sigue ascendiendo en todo el mundo. En 1985 se estimó que existían 30 millones de personas con diabetes; para 1995 esta cifra ascendió a 135 millones, y para el año 2025 se calcula será de 300 millones aproximadamente. De acuerdo con la Secretaría de Salud, la prevalencia en México para el año 2000 fue de 10.9% (Página web de la SSA), es decir, aproximadamente 11 millones de habitantes. Este padecimiento es uno de los más frecuentes en todo el mundo, de manera que el número de mujeres embarazadas con diabetes franca previa, ya sea de tipo 1 ó 2, también ha aumentado, tanto en países de primer mundo como en países en vías de desarrollo. De este modo, a nivel mundial, la frecuencia de neonatos de madres diabéticas ha aumentado de 3.1 por mil nacidos vivos en 1998 a 4.7 en 2004. Sin embargo, en nuestro país, aunque la Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes en el Embarazo (2009) publicada por la Secretaría de Salud, reconoce que la diabetes mellitus pregestacional es un factor de aparición de malformaciones neonatales, y propone como una de las metas reducir la aparición de dichas malformaciones, pero no aporta datos acerca de la incidencia de neonatos con malformaciones congénitas en nuestro país, a causa de la embriopatía diabética, por lo que es necesario plantear nuevas alternativas para esta condición.

## **5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el efecto del extracto enriquecido en verbascósido de *B. cordata* en el desarrollo de embriones de rata cultivados en presencia de altas concentraciones de glucosa?

## 6 HIPÓTESIS

Las malformaciones congénitas en embriones de rata expuestos a altas concentraciones de glucosa, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, se deben a que el aumento de glucosa produce que los niveles de estrés oxidativo incrementen, por lo que es posible que moléculas antioxidantes como el verbascósido tengan la capacidad de disminuir la presencia y severidad de estas malformaciones en embriones de rata cultivados con altas concentraciones de glucosa.

## 7 OBJETIVOS

Con este fin, el objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de una fracción enriquecida en verbascósido de *B. cordata* en el desarrollo de embriones de rata cultivados en presencia de altas concentraciones de glucosa.

Los objetivos particulares fueron:

- Describir los cambios morfológicos e histológicos en embriones de rata incubados con altas concentraciones de glucosa y extracto enriquecido en verbascósido.
- Determinar la actividad de las principales enzimas antioxidantes en embriones de rata incubados en medio con elevada glucosa y extracto enriquecido en verbascósido.
- Establecer el nivel de peroxidación lipídica en embriones de rata incubados en medio con elevada glucosa y extracto enriquecido en verbascósido.

## 8 MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Separación del extracto metanólico de *B. cordata* por cromatografía en columna

El extracto metanólico de *B. cordata* fue proporcionado por la Dra. Ana María García Bores, del Laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO de la FES Iztacala. Se tomaron 26.29 g del extracto y se sometieron a una cromatografía de columna, con una fase estacionaria de silica gel (Silica Gel for thin layer chromatography binder: CaSO<sub>4</sub>:½ H<sub>2</sub>O Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Alemania), en una fase móvil de diclorometano-metanol, con un aumento de la proporción de metanol 100:0, 95:5, 90:10, 85:15 y 80:20. Se tomaron alícuotas de 200 mL, las cuales se evaporaron hasta obtener una pasta amorfa; posteriormente, para agruparlas en fracciones, se realizaron cromatografías en placa fina de cada alícuota, las cuales se observaron con luz UV (254-366 nm). Las alícuotas con verbascósido se agruparon en la misma fracción, a la cual se le nombró “fracción enriquecida en verbascósido (FEV)”.

### 8.2 Caracterización de la fracción enriquecida en verbascósido

HPLC/DAD. Se utilizó un cromatógrafo de arreglo de diodos con detector UV-ESI-MS, con un sistema con detector PDA de 254 a 350 nm. La columna utilizada fue Allsphere ODS-1 de 150 mm de largo por 4.6 mm de diámetro, con una película de 5 µm. Las muestras se analizaron con una fase isocrática de eluyentes de agua:metanol:acetonitrilo (95:3:2) con 0.1% de ácido fórmico. El flujo inicial fue de 1.2 mL/min. La muestra se inyectó automáticamente, con un sistema de enfriamiento a 20°C, conectado a una bomba cuaternaria 600. La identificación de los picos de absorbancia se realizó con el software Dionex Chromeleon Chromatography Data System (ThermoFisher Scientific). El cromatograma y el espectro de absorción UV obtenidos se compararon con un patrón conocido de verbascósido.

Espectrometría de masas. Se utilizó un sistema Orbitrap Fusion Tri-Hybrid, con una fuente ESI controlada por el software Xcalibur (Thermo Scientific Xcalibur V. 4.1.5.0). La temperatura de transferencia de ion fue de 260°C, con una temperatura de vaporizador de 350°C, un detector de tipo *ion trap* con uso de aislamiento de cuadrupolo, un rango de escaneo (*m/z*) de 50 a 100, energía de colisión 35%, primera masa (*m/z*) 50, blanco AGC 5.0e4. Los gases de acarreo fueron nitrógeno y helio de ultra alta pureza. Con el espectro de masas obtenido, se propuso un patrón de fragmentación del verbascósido.

### **8.3 Obtención y cultivo de embriones de rata**

*Obtención del material biológico.* Se utilizaron 30 ratas hembra (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), sanas, de diez a 12 semanas de edad, de la cepa Wistar, con ciclos estrales definidos. Las ratas se mantuvieron en el bioterio de la FES Iztacala en las siguientes condiciones: 12 h de luz por 12 h de oscuridad iniciando a las 9:00 AM, temperatura de 22° C y 60% de humedad ambiental, con agua y alimentación *ad libitum* (Rodent Diet 2018S, Harlan, México). Todos los procedimientos en animales fueron autorizados por el personal del bioterio, de acuerdo a la legislación nacional (NOM-062-ZOO-1999) e internacional. Para el apareamiento de las ratas, se colocaron a cohabitar a razón de dos ratas hembra vírgenes por cada rata macho sano y fértil durante toda la noche. En la mañana del día siguiente, se realizó un lavado vaginal con solución salina al 0.9%. Las muestras se observaron al microscopio óptico (Leica, modelo DM500) y se asignó como día cero de gestación a partir de la detección de espermatozoides.

*Preparación de los medios de cultivo.* Se obtuvo suero de ratas sanas y se almacenó en congelamiento a -20°C. Posteriormente, se descongeló y se incubó a 56°C por 30 min (New, 1978). El medio de cultivo control se preparó con 4 mL de suero inactivado, 0.5 mL de una solución de antibióticos (para dar una concentración final de penicilina 1000 UI/mL y estreptomicina 100

µg/mL) y 0.5 mL de solución salina; la glucosa en este medio es cercana a 100 mg/dL (Chirino, 2007). Para el medio de cultivo suplementado con glucosa, se realizó una solución de glucosa concentrada para dar una concentración final de 500 mg/dL en el medio de cultivo (Chirino, 2007), y se preparó el medio de la siguiente manera: 4 mL de suero inactivado, 0.5 mL de solución de antibióticos, 0.25 mL de solución de glucosa concentrada, 0.25 mL de solución salina y 100 µL de PBS. Para preparar los medios suplementados con glucosa y verbascósido, se realizó una solución concentrada de verbascósido con una concentración de 1 mg/mL en PBS. Para ensayar las distintas concentraciones, se agregaron 4 mL de suero inactivado, 0.5 mL de solución de antibióticos, 0.25 mL de solución de glucosa concentrada, 0.25 mL de solución salina y 1, 10 o 100 µg/mL de la solución concentrada de verbascósido. Las características de los medios se muestran en la Tabla 1. Posteriormente cada medio de cultivo se filtró a través de una membrana Millipore® de 0.22 µm de malla en condiciones de esterilidad y se almacenó a -4°C hasta el momento de su uso.

**Tabla 1. Características de los medios de cultivo**

Medio/ Características	Suero de rata	Glucosa	Antibióticos	PBS	Verbascósido
Ctrl	80%	100 mg/dl	1000 µL/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomina	-	-
Glc		500 mg/dl		100 µL	-
Glc+1 µg/mL FEV				-	1 µg/mL
Glc+10 µg/mL FEV				-	10 µg/mL
Glc+100 µg/mL FEV				-	100 µg/mL

Ctrl: control; Glc:glucosa; Glc + 1 µg/mL FEV: glucosa con 1 µg/mL de FEV; Glc + 10 µg/mL FEV: glucosa con 10 µg/mL de FEV; Glc + 100 µg/mL FEV: glucosa con 100 µg/mL de FEV. FEV: Fracción enriquecida en verbascósido.

*Cultivo de embriones.* En el día diez de gestación, las ratas preñadas se anestesiaron con éter etílico, y antes de la muerte cardiaca, se les extrajo el

útero a través de una incisión ventral y enseguida, se dislocaron cervicalmente. El útero se colocó en una caja Petri con solución salina estéril para ser limpiado, recuperar el embrión y retirar la decidua y la membrana de Reichert. Los embriones fueron colocados individualmente en tubos tipo eppendorf de 2.0 mL, en 1.0 mL de medio de cultivo Ctrl, Glc, Glc+1, Glc+10 o Glc+100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FEV previamente gasificado por 3 a 5 minutos con una mezcla de  $\text{O}_2:\text{CO}_2:\text{N}_2$  (20:5:70). Los tubos se mantuvieron rotando a 30-40 rpm a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h, en un aparato construido en el taller de equipo de laboratorio de enseñanza de la FES Iztacala nombrado Rotocell®. Se incubaron al menos 15 embriones en cada condición.

*Evaluación morfométrica.* Una vez transcurridas las 24 h, los embriones se observaron bajo microscopio estereoscópico (Leica, modelo MZ6) para efectuar mediciones de longitud de la cabeza, y la cefalocaudal, diámetro del saco vitelino y realizar una evaluación morfométrica para obtener un *score* de acuerdo con lo descrito por Klug *et al.* (1985), modificado por Chirino (2007). En la Tabla 2 se muestran las características del embrión evaluadas para asignarle determinado puntaje, y la suma total de los puntos obtenidos por cada embrión conforma el *score* morfológico. Los embriones con alteraciones evidentes se clasificaron como malformados (Singh *et al.*, 2011).

**Tabla 2. Descripción del esquema de registro morfológico**

	Parámetro	Puntos	Significado
Forma	Embrión	5	Flexión completa, embrión en forma de "G"
		4	Flexión casi completa, embrión en forma de "C"
		3	Flexión incompleta, embrión en forma de "I"
		2	Flexión incompleta, embrión con "cola de ardilla"
	Cabeza	5	Telencéfalo separado del diencéfalo por una fisura externa y bolsa mesencefálica
		4	Telencéfalo separado del diencéfalo por una fisura externa y bolsa prosencefálica
		3	Telencéfalo separado del diencéfalo por una fisura interna
		2	No hay separación entre telencéfalo y diencéfalo
Desarrollo	Tubo neural	5	Completamente cerrado
		4	Neuroporo caudal abierto
		3	Neuroporos caudal y craneal abiertos
		2	Neuroporo craneal abierto
	Ojo	6	Párpado superior presente
		5	Bolsa del cristalino presente
		4	Vesícula óptica presente
		3	Sulcus óptico presente
		2	Primordio ocular ausente
	Oído	6	Saco endolinfático presente
		5	Receso dorsal presente
		4	Vesícula ótica presente
		3	Fosas óticas presentes
		2	Fosas óticas ausentes
	Miembros anteriores	6	Completo
		5	Primordio de extremidad (longitud más del doble de la base)
		4	Primordio de extremidad (longitud igual o mayor, pero menor que el doble de la base)
		3	Rudimento de extremidad (Longitud menor que la de la base)
		2	Ausencia de primordio
	Miembros posteriores	6	Completo
		5	Primordio de extremidad (longitud más del doble de la base)
		4	Primordio de extremidad (longitud igual o mayor, pero menor que el doble de la base)
		3	Rudimento de extremidad (Longitud menor que la de la base)
		2	Ausencia de primordio
Cola	5	Cola alargada y se pueden reconocer los somitas de la cola	
	4	Cola alargada, pero no se reconocen los somitas	
	3	Primordio de la cola	
	2	Ausencia de primordio de la cola	
Presencia	Sangre	4	Circulación sanguínea reconocible
		3	Islotes sanguíneos reconocibles
		2	No hay indicación de la formación de sangre
<b>TOTAL REGISTRO EMBRIONARIO</b>		<b>SUMA DE LOS DÍGITOS ASIGNADOS (MÁXIMO 48 PUNTOS)</b>	

Registro morfológico de los embriones, modificado desde Klug *et al.* (1985), por Chirino (2007).

#### **8.4 Técnica histológica**

Al menos a tres embriones postcultivo de cada tratamiento se les retiró el saco vitelino; y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS, pH 7.4, por 24 h. A continuación, se deshidrataron, aclararon y embebieron, para finalmente ser incluidas en parafina grado histológico. Los bloques se dejaron solidificar y se enfriaron a -4°C por una noche. Se realizaron cortes de 5 µm de grosor en un micrótopo de rotación marca Leica modelo RM2125 RTS. Las secciones obtenidas se rehidrataron, y tiñeron con hematoxilina y eosina por la técnica convencional, y se montaron. Por último, las laminillas fueron observadas y fotografiadas al microscopio óptico (Leica, modelo DM500) con cámara digital Leica EC3, y analizadas con el software Leica Las EZ.

#### **8.5 Pruebas bioquímicas**

Adicionalmente, el resto de los embriones se homogenizaron individualmente en solución salina para cuantificar actividad enzimática y lipoperoxidación, así como contenido de proteínas mediante las siguientes técnicas:

Glutación peroxidasa (GPx). La reacción se basa en la oxidación de NADPH gracias al consumo de glutación reducido, el cual igualmente se oxida. Con ayuda de la glutación reductasa, se regenera el cofactor, y la reacción se vuelve cíclica y se amplifica. Se registra la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Jenway 6305, entre los minutos 2 al 4, para obtener la actividad enzimática en unidades internacionales de GPx (micromoles de NADPH utilizados por miligramo de proteína por minuto) (Paglia y Valentine, 1967).

Superóxido dismutasa (SOD). La reacción se basa en la reducción de ión superóxido y del nitroazul de tetrazolio por medio de la oxidación enzimática de la xantina. La adición de la enzima SOD o un extracto que la contenga disminuye la reducción del superóxido y del nitroazul de tetrazolio, lo que se refleja en una disminución en la absorbancia en el intervalo de 500 a 600 nm,

la cual se analiza con un lector de placas de ELISA marca Tecan, modelo Sunrise, y se reporta como Unidades McCord-Fridovich (Beauchamp y Fridovich, 1971).

Glutación S-transferasa (GST). La reacción se basa en la aparición de conjugado glutación-dinitroclorobenceno (DNCB) por minuto, que se lee a 340 nm en un espectrofotómetro Jenway 6305 al inicio y minutos 1 y 2, para obtener las unidades internacionales de GST por miligramo de proteína (Tsuchida, 1999).

Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). La reacción se da a partir de la producción de malonaldehído a causa de la peroxidación lipídica. El MDA que reacciona con el ácido tiobarbitúrico forma un complejo que absorbe luz con un pico a 532 nm y se leyó en el lector de placas de ELISA marca Tecan, modelo Sunrise, y se reporta como mg/g de proteína (Ohkawa *et al.*, 1979).

Las actividades enzimáticas y la cantidad de MDA en el tejido se reportaron en relación con la concentración de proteínas, evaluada mediante el método de Lowry *et al.* (1951).

## **8.6 Análisis estadístico**

Los parámetros morfológicos de los embriones (longitud de la cabeza, longitud cefalocaudal, diámetro del saco vitelino y número de somitas), así como el *score* morfológico, se analizaron mediante una prueba de ANOVA en rangos (Kruskall-Wallis). Los datos de la actividad enzimática se analizaron mediante una prueba de ANOVA simple. Ambas pruebas se realizaron con el software PAST Statistics.

## **9 RESULTADOS**

### **9.1 Separación del extracto metanólico de *B. cordata* por cromatografía en columna**

A partir del extracto metanólico de *B. cordata*, se obtuvieron 92 alícuotas por cromatografía de columna, las cuales se analizaron por cromatografías de capa fina, posteriormente, se compararon con un patrón conocido de verbascósido y las alícuotas con un patrón cromatográfico similar se agruparon en un total de ocho fracciones distintas. La fracción número seis contuvo la mayor cantidad de verbascósido y se le nombró como fracción enriquecida en verbascósido (FEV).

A partir de 26.29 g de extracto metanólico de *B. cordata*, se obtuvieron 16.56 g de fracción enriquecida en verbascósido.

### **9.2 Caracterización de la FEV**

HPLC/DAD. Con el fin de corroborar la presencia de verbascósido en la FEV, ésta se analizó por medio de HPLC y se encontraron tres picos principales. El mayor de los cuales coincide con el cromatograma del patrón conocido de verbascósido, con 3.65 mUAbs (Figura 2).

El espectro de absorción UV de FEV presentó dos picos de absorbancia importantes, el mayor en 328 nm y el menor en 236 nm (Figura 3).

Para la cuantificación del verbascósido, se realizó una curva de calibración a partir del patrón conocido de verbascósido puro y la interpolación del valor obtenido para la muestra de FEV, el cual fue de 14.65 µg/mg de FEV (Figura 4).

Figura 2. Cromatograma (HPLC-DAD) de FEV.

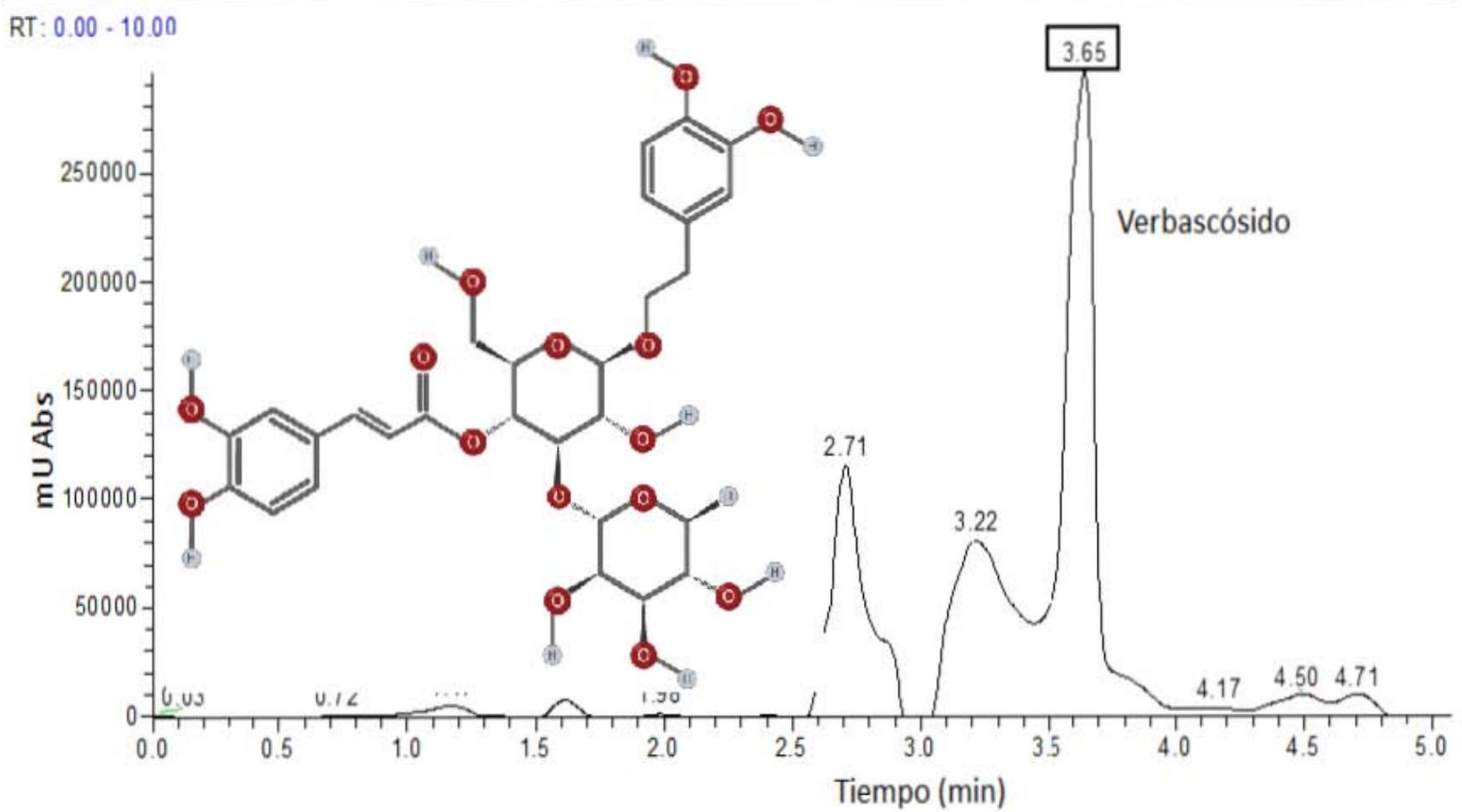
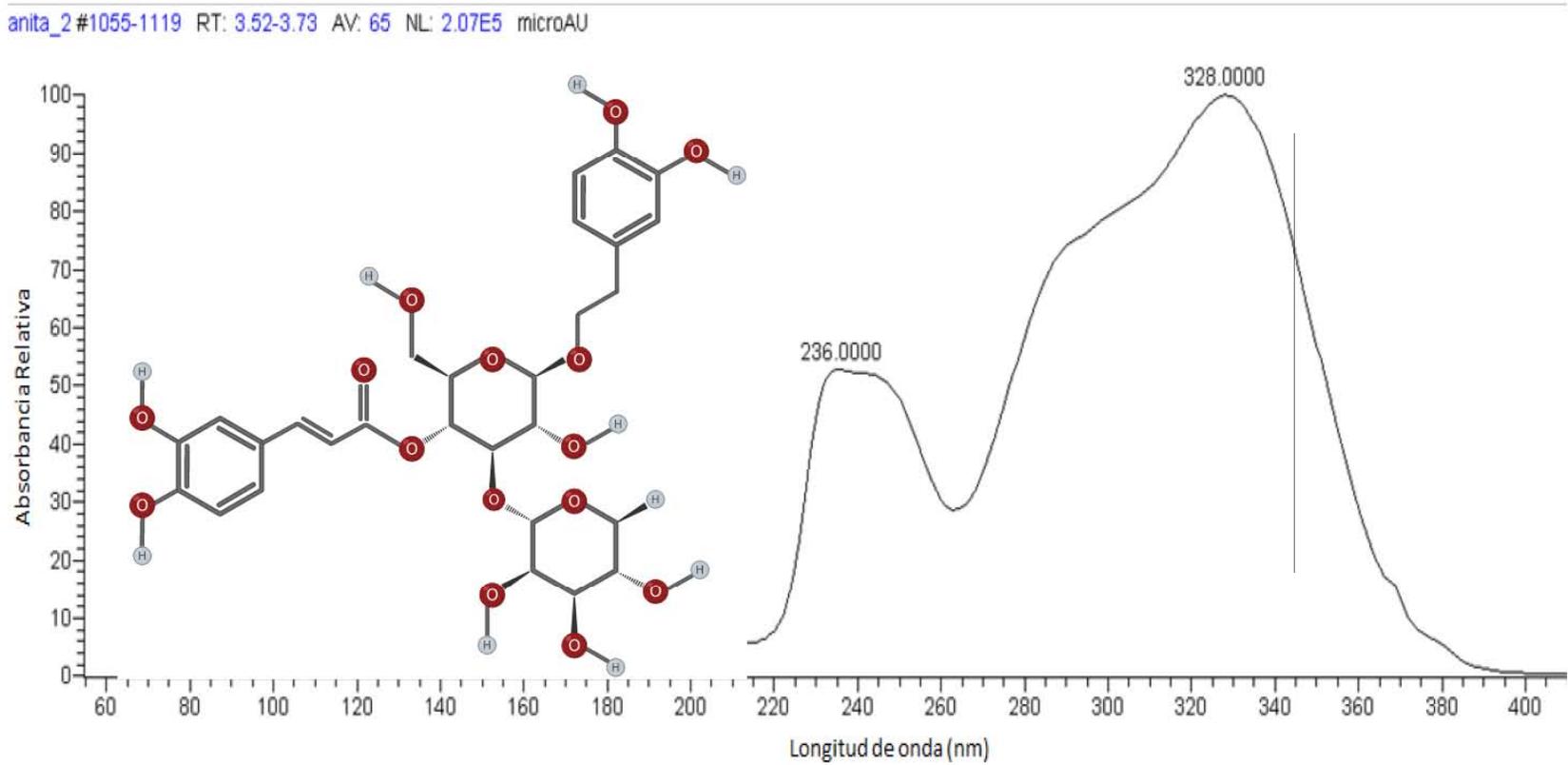


Figura 3. Espectro de absorción UV del pico con tiempo de retención 3.65 min.



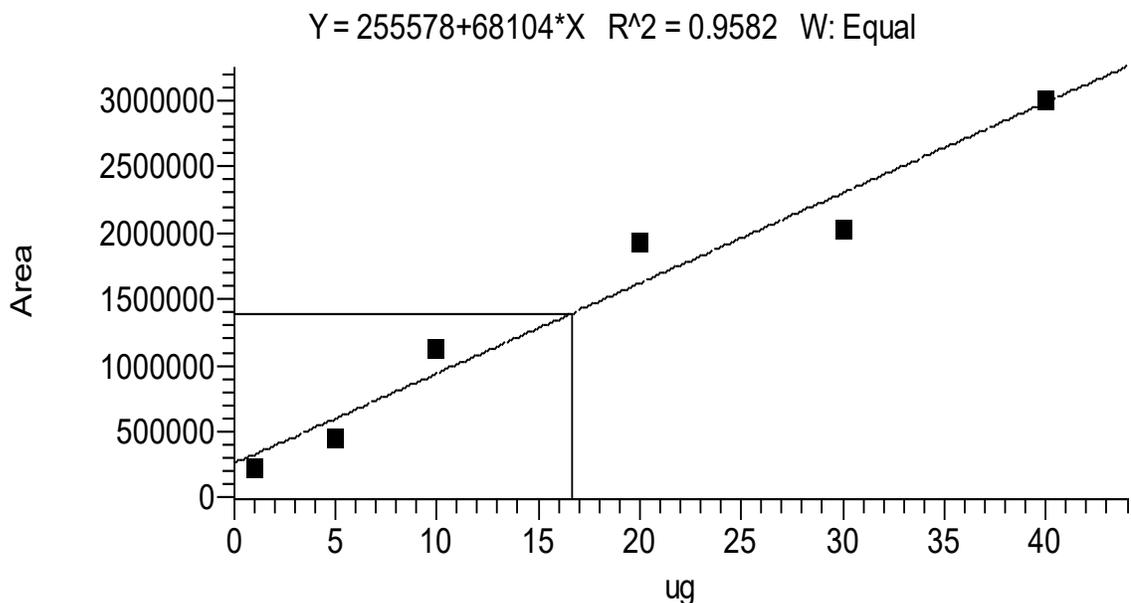


Figura 4. Curva de calibración HPLC-MS, donde la FEV tiene 14.65  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de verbascósido.

Espectrometría de masas. En la Figura 5 se observa el patrón de fragmentación de la molécula de verbascósido que se propone, de acuerdo con la  $m/z$  de los iones moleculares obtenidos en el espectro de masas. Los picos con mayor abundancia relativa (100%) fueron: 447.0667  $m/z$ , 87.1333  $m/z$  (100%), 147.1000  $m/z$  (94%), 175.0067  $m/z$  (80%), 141.1667  $m/z$  (18%), 171.0667  $m/z$  (16%) y 159.13333  $m/z$  (10%).

### 9.3 Cultivo de embriones

Una vez purificada y caracterizada la FEV del extracto de *B. cordata*, se procedió a realizar el cultivo de embriones con los tratamientos, con lo cual se obtuvo la siguiente información.

Las fotografías de los embriones sin el saco vitelino se muestran en la Figura 6 (A-F). En A se muestra la morfología normal de un embrión de rata de 10 días de gestación cultivado por 24 h; destacan el tubo neural cerrado, las cavidades cardiacas y los arcos branquiales. En B se observa un embrión de

día 11 de edad gestacional; destaca la fisura entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, así como una buena circulación sanguínea y que los somitas se reconocen fácilmente. En C se observa un embrión cultivado con altas concentraciones de glucosa. Es evidente el retraso en el desarrollo, indicado sobre todo por la degeneración del tejido, así como la posición dorsal del corazón, además de la apertura del tubo neural craneal. En D se muestra un embrión cultivado en Glc y Glc + 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FEV. En E se observa un embrión cultivado con Glc y Glc + 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FEV, la vista lateral indica una fisura entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, al igual que en el tratamiento de Glc + 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FEV (F).

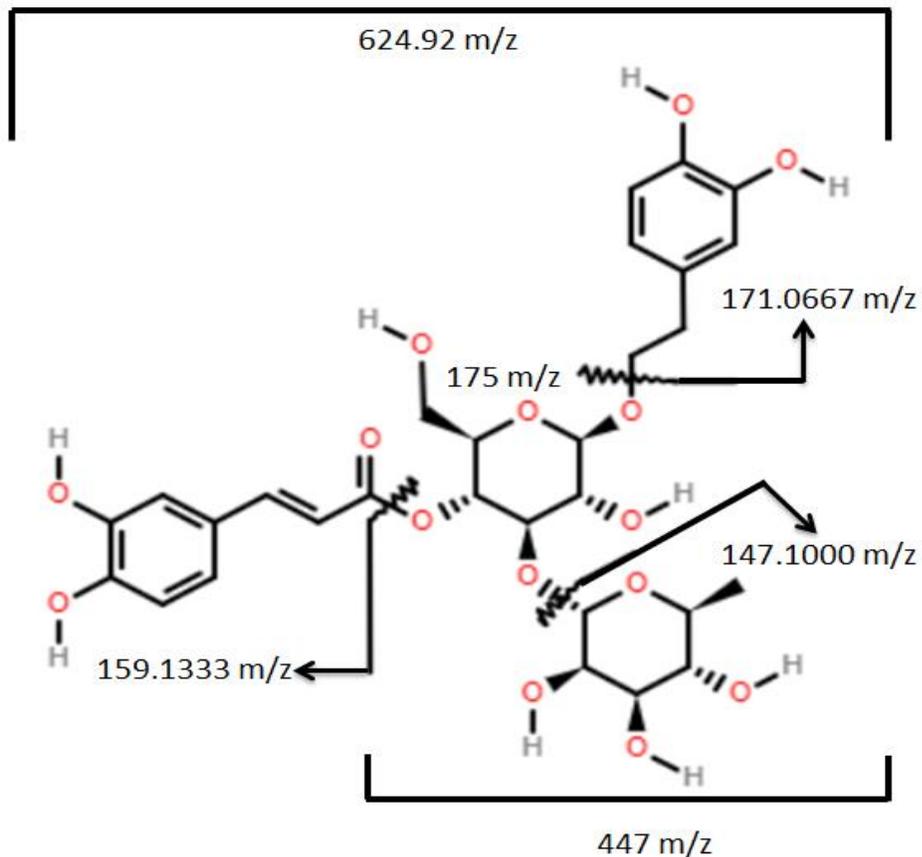


Figura 5. Patrón de fragmentación del verbascósido.

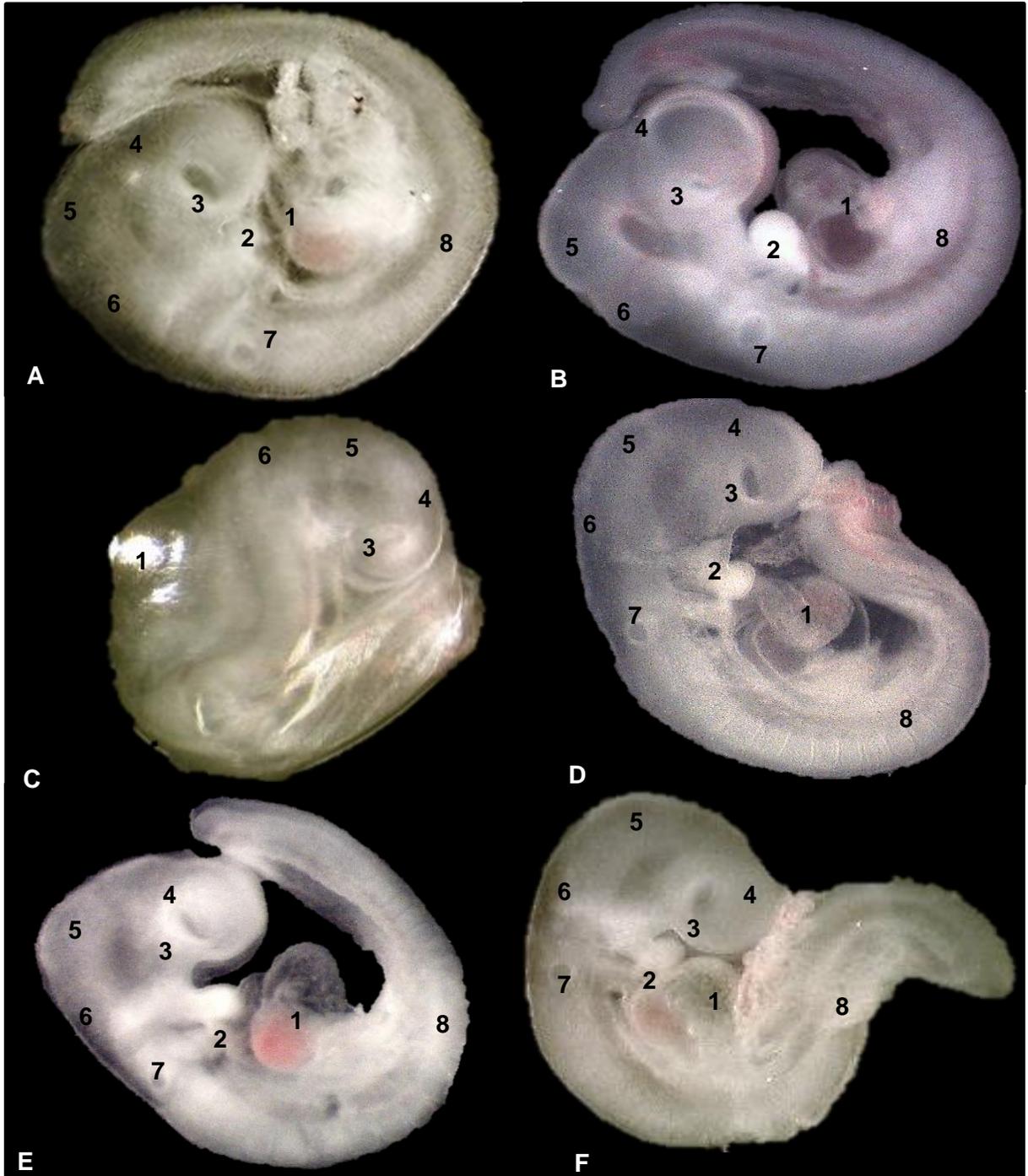


Figura 6. Embriones de 10 días de edad gestacional cultivado por 24 h. A: Control; B: Control externo (día 11 de gestación); C: Glucosa, D: Glucosa + 1 µg/mL de FEV; E: Glucosa + 10 µg/mL de FEV; F: Glucosa + 100 µg/mL de FEV. Vista lateral. 1: corazón; 2: arcos branquiales; 3: vesícula óptica; 4: prosencéfalo; 5: mesencéfalo; 6: rombencéfalo; 7: vesícula ótica; 8: somitas.

#### **9.4 Morfología e histología de los embriones postcultivo**

En la Figura 7 (A-C) se presentan los cortes histológicos sagitales de los embriones. En A se muestra un embrión, de día 10 de gestación cultivado por 24 h en medio control. Se distingue la vesícula óptica, corazón tricavitario, dos arcos branquiales completos y el primordio de un tercero, así como el neuroporo posterior cerrado. En B se muestra un embrión de día 11 de gestación. Se observa la vesícula óptica, el corazón tricavitario, el mesodermo diferenciado en somitas. En C se muestra un embrión de día 10 de gestación cultivado por 24 h en medio suplementado con glucosa. En este caso, las malformaciones son muy evidentes: los neuroporos craneal y caudal se están abiertos y se observa una alteración severa en el tejido cardiaco, que se encuentra en posición dorsal, además que todo el tejido embrionario se observa degenerado.

En D se muestra un embrión cultivado en medio suplementado con glucosa y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FEV, se observa una apertura en el neuroporo caudal, las vesículas óptica y ótica están bien definidas y se distinguen al menos dos arcos branquiales, así como el corazón tricavitario. En E se muestra un embrión cultivado en medio suplementado con glucosa y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FEV, en el cual se puede observar el corazón tricavitario, así como las vesículas óptica y ótica. En F se muestra un embrión cultivado en medio suplementado con glucosa y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FEV. Se observa que los neuroporos craneal y caudal están cerrados y las vesículas óptica y ótica están definidas. Se observan dos arcos branquiales y el corazón tricavitario.

Con respecto a los parámetros morfológicos medidos, el diámetro del saco vitelino fue mayor en el grupo control. En el tratamiento de Glc + 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de FEV, el diámetro fue mayor al del grupo tratado únicamente con glucosa, parecido al control, pero sin presentar diferencia significativa (Figura 8).

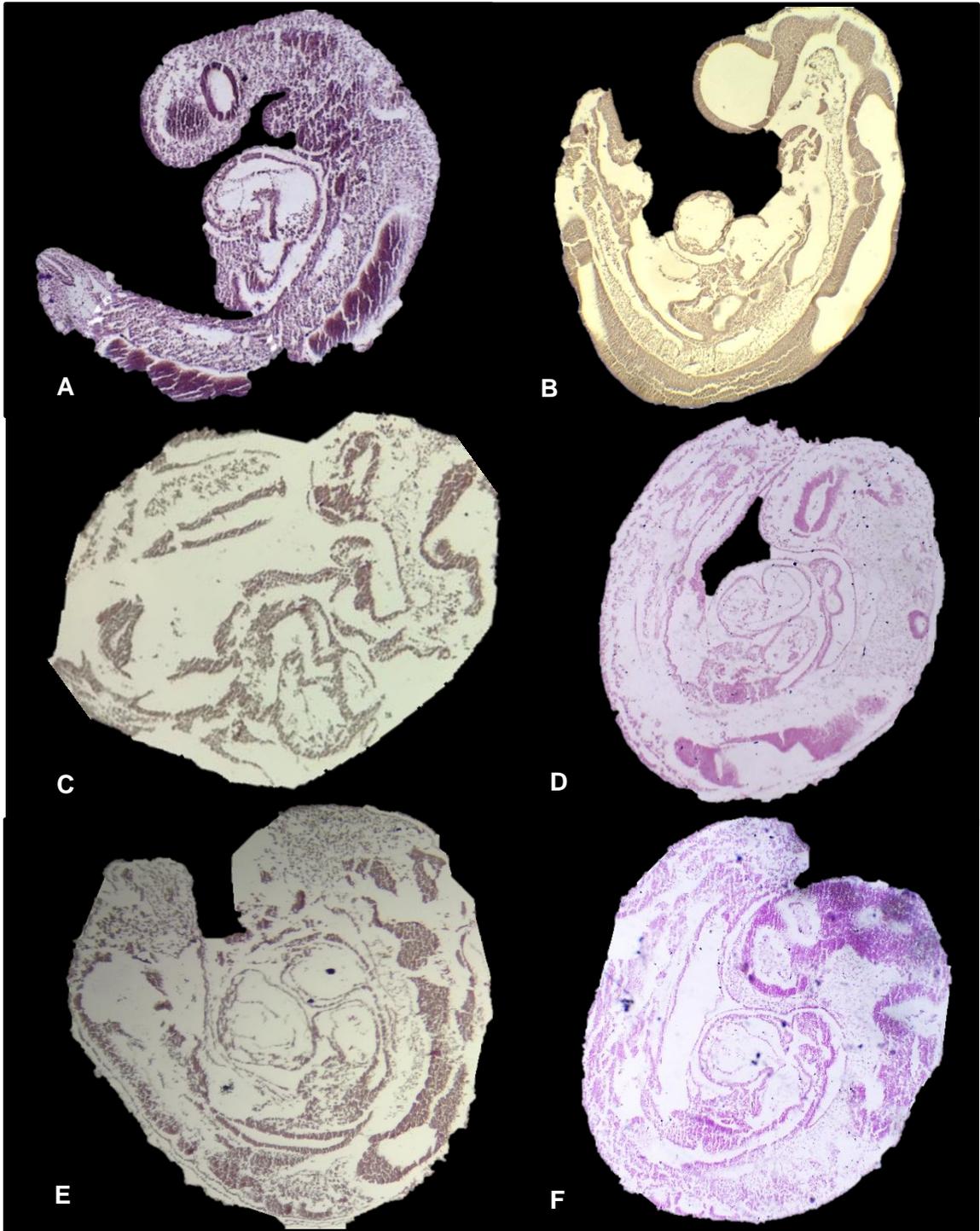


Figura 7 Corte sagital de embriones de día 10 de gestación cultivados por 24 h. A: Control; B: Control externo (día 11 de gestación); C: Glucosa, D: Glucosa + 1 µg /mL de FEV; E: Glucosa + 10 µg /mL de FEV; F: Glucosa + 100 µg /mL de FEV. Tinción H-E 40X.

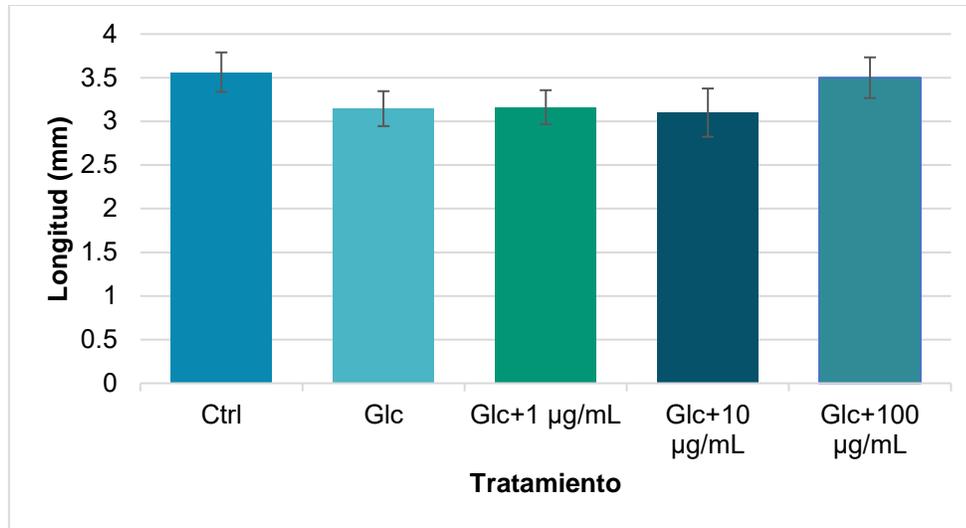


Figura 8 Diámetro del saco vitelino de embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL de FEV (Glc + 1 µg/mL), glucosa más 10 µg/mL de FEV (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL de FEV (Glc + 100 µg/mL). Promedio ± D.E. de 25 embriones.

La longitud cefalocaudal fue mayor en el grupo control, con 3.35 mm en promedio, y en los tratamientos con FEV fue muy similar al de la adición de glucosa, sin embargo, el tratamiento de Glc + 10 µg/ml presentó la mayor longitud, sin existir diferencia significativa (Figura 9).

La longitud de la cabeza fue mayor en los embriones del grupo control y los tratamientos con glucosa y glucosa con FEV fueron muy similares (Figura 10).

El número de somitas en el tratamiento con adición de glucosa y 100 µg/mL de FEV presentó diferencias significativas en cuanto al grupo tratado con glucosa, siendo similar al grupo control. Los tratamientos en los que se les agregó 1 y 10 µg/mL de FEV también presentaron un mayor número de somitas que el tratamiento con glucosa (Figura 11).

En cuanto al score morfológico, las tres dosis de tratamiento con FEV obtuvieron un puntaje significativamente mayor que el grupo de embriones cultivados con glucosa (Figura 12).

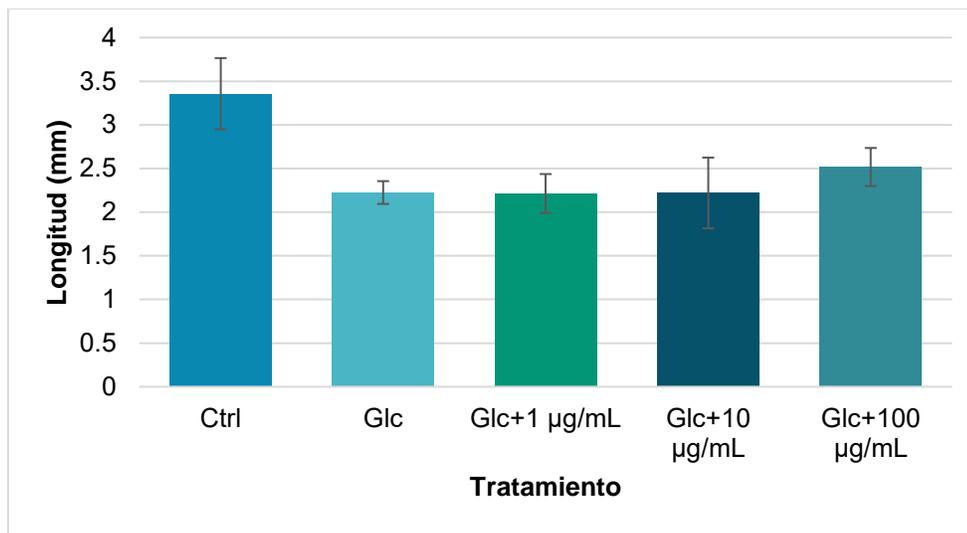


Figura 9 Longitud cefalocaudal de embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL (Glc +1 µg/mL) de FEV, glucosa más 10 µg/mL de FEV (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL de FEV (Glc + 100 µg/mL). Promedio ± D.E. de 25 embriones.

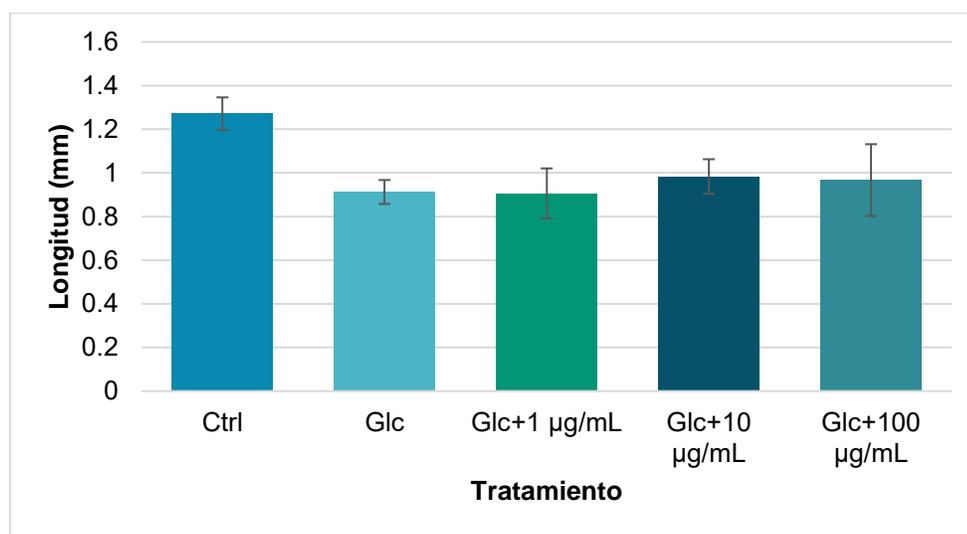


Figura 10. Longitud de la cabeza de embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL de FEV (Glc +1 µg/mL), glucosa más 10 µg/mL de FEV (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL de FEV (Glc +100 µg/mL). Promedio ± D.E. de 25 embriones.

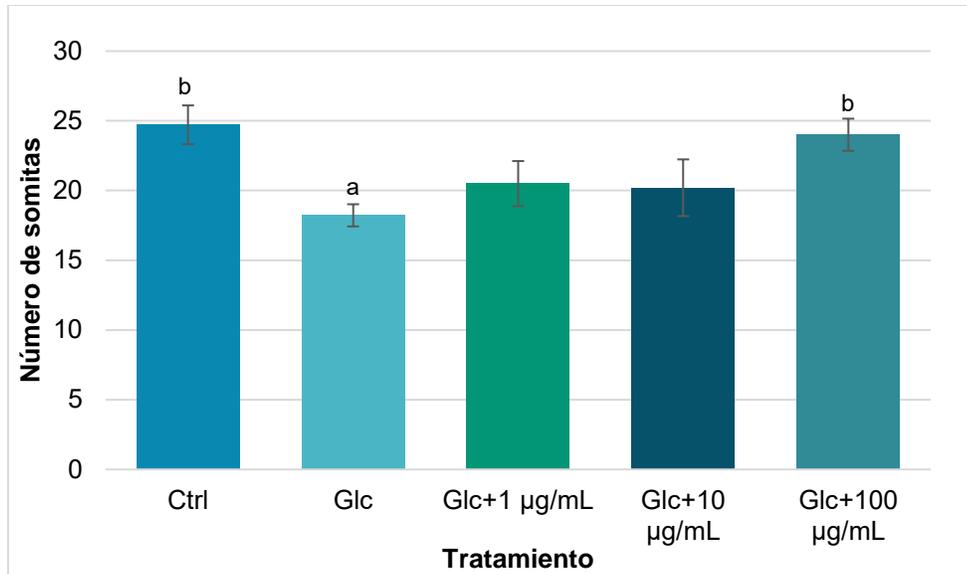


Figura 11. Número de somitas de embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL de FEV (Glc +1 µg/mL), glucosa más 10 µg/mL de FEV (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL de FEV (Glc +100 µg/mL). Promedio ± D.E. de 25 embriones. <sup>a</sup>P<0.01 con respecto a los embriones control, <sup>b</sup>P<0.01 con respecto a los embriones cultivados con altas concentraciones de glucosa.

Para comparar la proporción de embriones con malformaciones y sin malformaciones, se calculó el porcentaje de estos por cada tratamiento, y se observó que hubo más embriones malformados cultivados en medio con alta glucosa que en los cultivados en el medio control, con los valores del grupo Glc + 1 µg/mL de FEV más parecidos a los obtenidos en embriones cultivados en glucosa. En los embriones cultivados en medio con Glc + 100 µg/mL de FEV se presentó una tasa menor de malformaciones que en los anteriormente mencionados, sin embargo, solamente descendió hasta el 50% (Tabla 3).

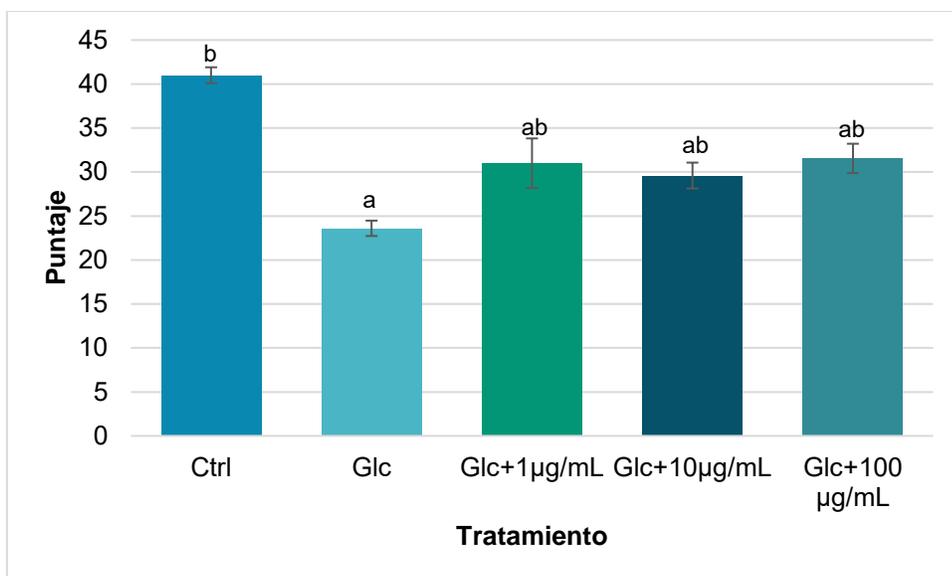


Figura 12. Score morfológico de embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL (Glc + 1 µg/mL) de FEV, glucosa más 10 µg/mL de FEV (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL de FEV (Glc + 100 µg/mL). Promedio ± D.E. de 25 embriones. <sup>a</sup>P<0.01 con respecto a los embriones control, <sup>b</sup>P<0.01 con respecto a los embriones cultivados con altas concentraciones de glucosa.

Tratamiento	Malformados(%)	No malformados(%)
Ctrl	29.16	70.83
Glc	73.91	26.08
Glc+1 µg/mL FEV	64	36
Glc+10 µg/mL FEV	56	44
Glc+100 µg/mL FEV	50	50

### 9.5 Pruebas bioquímicas

En cuanto a las determinaciones bioquímicas, podemos observar que la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa presenta una menor actividad en los embriones tratados con FEV en sus tres concentraciones, en

relación con el control, y los embriones con altas concentraciones de glucosa, los cuales tuvieron una mayor actividad que el control, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 13).

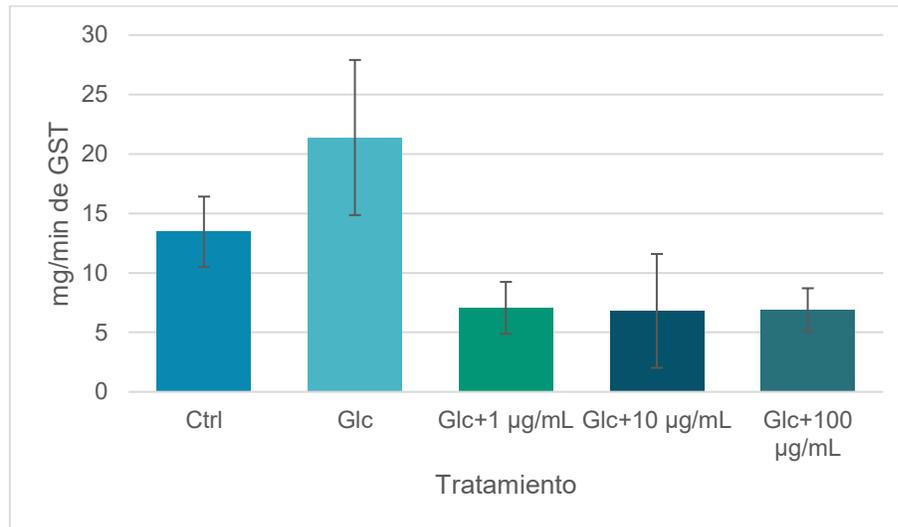


Figura 13. Actividad enzimática de GST de embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL (Glc + 1 µg/mL), glucosa más 10 µg/mL (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL (Glc + 100 µg/mL) de extracto rico en verbascósido. Promedio ± D.E. de 20 embriones.

La actividad de GPx en los embriones no se vio afectada por los tratamientos de las diferentes concentraciones de FEV, y no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 14).

La actividad de la enzima SOD no presentó diferencia entre el grupo control y el tratado con glucosa, sin embargo, el tratamiento con glucosa y 10 µg/mL de FEV mostró un aumento (Figura 15).

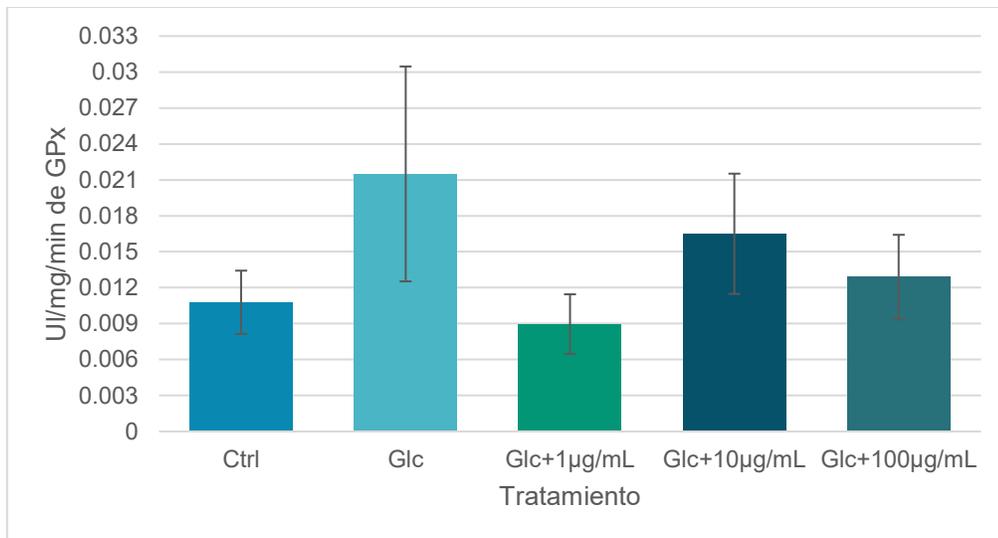


Figura 14. Actividad enzimática de GPx de embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL de FEV (Glc + 1 µg/mL), glucosa más 10 µg/mL de FEV (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL de FEV (Glc + 100 µg/mL). Promedio ± D.E. de 20 embriones.

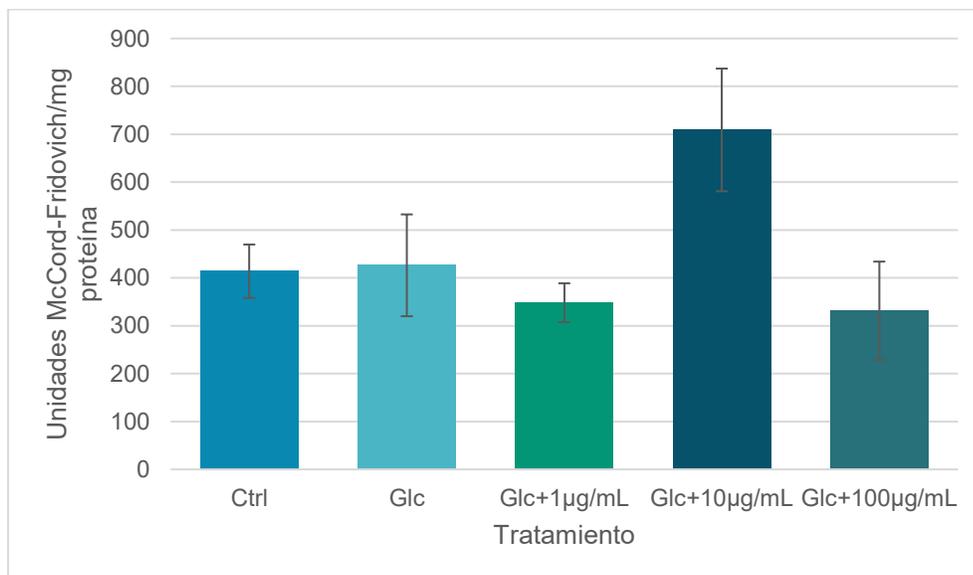


Figura 15. Actividad enzimática de SOD en embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL (Glc + 1 µg/mL) de FEV, glucosa más 10 µg/mL de FEV (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL de FEV (Glc + 100 µg/mL). Promedio ± D.E. de 20 embriones.

Las TBARS en embriones tratados con verbascósido en cualquiera de sus concentraciones sufrieron una drástica disminución con respecto al control y fueron menores a los tratados únicamente con glucosa. Además, se encontró diferencia significativa entre los tratamientos (Figura 16).

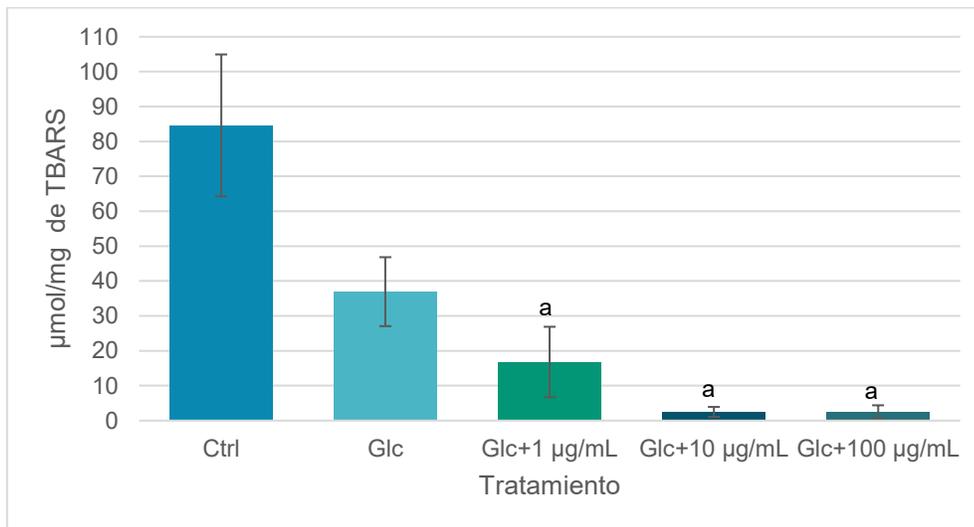


Figura 16. Concentración de TBARS en embriones cultivados en medio control (Ctrl), glucosa (Glc), glucosa más 1 µg/mL (Glc + 1 µg/mL) de FEV, glucosa más 10 µg/mL de FEV (Glc + 10 µg/mL) y glucosa más 100 µg/mL de FEV (Glc + 100 µg/mL). Promedio ± D.E. de 20 embriones. <sup>a</sup>P<0.01 con respecto a los embriones control.

## 10 DISCUSIÓN

### 10.1 Propiedades fisicoquímicas del verbascósido.

Por medio del LC-ESI-MS, se identificó el verbascósido gracias a su absorbancia en la región de 250 a 350 nm, como previamente lo reportaron Ávila-Acevedo *et al.* (2014).

El espectro de absorción UV de la FEV mostró dos picos máximos de absorción a  $\lambda_{\text{máx}} = 328$  nm y 236 nm, valores similares a los obtenidos para un extracto metanólico de *B. cordata* ( $\lambda_{\text{máx}} = 291$  y 332 nm) (Espinosa-González *et al.*, 2016), para otro extracto de *B. cordata* ( $\lambda_{\text{máx}} = 291$  y 334 nm) (Ávila-Acevedo *et al.*, 2014), para un extracto de *Clerodendrum petasites* y extracto metanólico de *Verbena officinalis* ( $\lambda_{\text{máx}} = 330$  nm) (Schönbichler *et al.*, 2013; Thitilertdecha *et al.*, 2014), es el característico de la molécula de verbascósido e idéntico al indicado en la literatura (Cardinalli *et al.*, 2011; Ávila-Acevedo *et al.*, 2014; Ogbole *et al.*, 2017), por lo cual se pudo comprobar la presencia y pureza del verbascósido en la FEV.

A diferencia de lo realizado por otros autores, en este trabajo se utilizó una mezcla de diclorometano:metanol en concentraciones desde 10:0 hasta 8:2 en la cromatografía de columna, por lo que el rendimiento de verbascósido encontrado en la fracción difiere de lo reportado por Espinosa-González *et al.* (2016) en un 60% aproximadamente; sin embargo, la concentración se encuentra dentro del rango de 5 a 60 mg/g reportado por otros autores en diversas especies de los géneros *Buddleja*, *Verbascum* y *Lippia* (Liao *et al.*, 1999; Mensah *et al.*, 2001; Mahlke *et al.*, 2009; Oyourou *et al.*, 2013; Attia *et al.*, 2018).

El verbascósido es un compuesto fenólico con varias estructuras principales provenientes de distintas rutas de biosíntesis. Tiene como base dos monosacáridos, L-ramnosa y  $\beta$ -glucosa, éste último unido a un feniletanoide en el carbono 1 y a un fenil propanoide por el carbono 4. El feniletanoide se trata de hidroxitirosol, sintetizado a partir de la tirosina; y el fenilpropanoide

es el ácido caféico, proveniente de la fenilalanina. Ambos son glicosilados después de que su precursor (ácido cumárico o tirosol) se reduce para formar un alcohol (Saimaru y Orihara, 2010).

En la Figura 5 se propone un patrón de fragmentación del verbascósido, planteado a partir del espectro de masas obtenido y relacionado con las características de las moléculas antes mencionadas y los enlaces que forman entre sí. El ion molecular del verbascósido (624 m/z) no fue detectado, sin embargo, el pico de 447.06667 m/z [M-H-H<sub>2</sub>O-H] podría indicar la ruptura del enlace glucosídico entre el ácido cafeico (159.1333 m/z) [ácido caféico-H<sub>2</sub>O-H] y β-glucosa, lo cual con lo indicado en la base de datos PubChem Database (National Center for Biotechnology Information, 2019). Del anterior pico de 447.06667 m/z-hidroxitirolo-glucosa-ramnosa, se desprenderían las moléculas de hidroxitirosol (171.06667 m/z) [hidroxitirosol-H-H<sub>2</sub>O-H] y ambos monosacáridos (343.06667 m/z) [glucosa-ramnosa-propanoide] con una aglicona de etanol o propanol [etanol-H<sub>2</sub>O] (73 m/z). El enlace glucosídico, a su vez se rompería y dejaría los fragmentos de β-glucosa (175.0333 m/z) [M-H] y ramnosa (147.1000 m/z) [ramnosa-H<sub>2</sub>O]. Es posible también que tanto del fenilpropanoide, como del feniletanoide, se generaran fragmentos de benceno (87.000 m/z). Al igual que lo reportado por Cardinalli *et al.* (2011), Schönlichler *et al.* (2013), Attia *et al.* (2018), se encontró que la molécula de verbascósido sería separada en sus distintos monómeros.

## **10.2 Efecto del verbascósido en la embriopatía diabética.**

A causa de la diabetes mellitus, existe una producción excesiva de ER, debido a los productos finales de la glicación avanzada (Halliwell y Gutteridge, 2015), lo cual genera un estado de estrés oxidativo que se generaliza en todo el cuerpo (Eriksson *et al.*, 2003). De acuerdo con El-Bassiouni *et al.* (2005), el potencial redox en embriones de madres diabéticas, se ve afectado por la sobreproducción de radicales libres,

derivado de la condición diabética. Esto fue comprobado también al determinar la concentración de MDA (Figura 16).

Como lo mencionan diversos autores, es probable que este estado de estrés oxidativo genere los daños dismorfogénicos sobre los embriones *in vivo* e *in vitro* (Eriksson y Borg, 1991; Wentzel y Eriksson, 1998; Ornoy *et al.*, 1999; Zaken *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 2003).

El cultivo de embriones es un modelo que permite evaluar efectos embriotóxicos, embrioprotectores, y teratogénicos, y que permite el control de un mayor número de variables que con el uso de modelos *in vivo*.

Con respecto a la incidencia de malformaciones en embriones cultivados, ésta fue mayor en aquellos cultivados con altas concentraciones de glucosa (73%), lo que concuerda con lo reportado por Ornoy *et al.* (2011), quienes encontraron que del 62 al 78% de los embriones cultivados con glucosa presentaron malformaciones.

En algunos parámetros morfológicos como número de somitas y *score*, se observó cierta tendencia del grupo con adición de glucosa + 100 µg/mL a ser similar a los datos obtenidos en el grupo control. La tendencia consistió en un incremento de los parámetros proporcional al aumento en la concentración de la FEV. Esta tendencia difiere con lo indicado por Martino *et al.* (2016), en donde se reportó un efecto embrioprotector del verbascósido puro a una concentración de 1 nM sobre blástulas de oveja, sin actividad a mayores concentraciones. En el mismo estudio, a concentraciones de 10 nM se presentó un efecto protector contra el estrés oxidativo en ovocitos de cabra, mejorando la calidad y viabilidad de estos.

En cuanto a las pruebas bioquímicas realizadas, en primer lugar, destaca que la presencia de MDA en embriones cultivados por 24 h fue mayor en el grupo control, a diferencia de lo reportado en la literatura (Li *et al.*, 2005; Chirino-Galindo *et al.*, 2012).

Al llegar el día 11 de gestación, se ha demostrado que existe un aumento en el metabolismo de la glucosa, gracias a la aparición de la circulación por medio del saco vitelino (Akazawa *et al.*, 1994). Cuando se exponen los embriones de rata a concentraciones altas de glucosa, se incrementa la producción de anión superóxido a través de la inducción de la fosforilación oxidativa (Chance y Hess, 1959, Conway *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 1997). Los radicales superóxido son reducidos por la SOD en peróxido de hidrógeno, sin embargo, la literatura indica que los tratamientos con glucosa y glucosa con poliaminas no afectan la actividad de SOD (Chirino-Galindo *et al.*, 2012), y en este trabajo, se comprobó el mismo comportamiento de la enzima, al no demostrarse diferencias significativas entre los tratamientos con glucosa o glucosa con verbascósido. Se ha demostrado que la expresión de SOD en mayor proporción en presencia de hiperglicemia e hiperoxia, comparado con la presencia de hiperglicemia únicamente (Ornoy *et al.*, 2011), por lo que posiblemente el grupo que mayor estrés oxidativo tuvo fue el cultivado con glucosa y adicionado con 10 µg/mL de verbascósido.

Una vez reducido el superóxido a peróxido de hidrógeno, éste se transforma en agua por acción de la catalasa y/o la GPx. En estudios anteriores, tanto en otros laboratorios como en el nuestro, se ha determinado que la actividad de la catalasa en embriones de día 10 de gestación es ínfima e indetectable (Ishibashi *et al.*, 1997, Chirino-Galindo *et al.*, 2012), por lo que se optó por no realizar esa prueba. En cuanto a la actividad enzimática de GPx, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, en concordancia con lo reportado por Chirino-Galindo *et al.* (2012), quienes indican que esta enzima no se altera por la acción de la glucosa ni los tratamientos con poliaminas.

En este trabajo, la actividad enzimática de SOD, GPx y GST evaluadas no presentó diferencias significativas, aunque sí se observó una disminución en

los grupos tratados con glucosa y verbascósido con respecto al grupo tratado únicamente con glucosa.

En un estudio *in vivo*, se demostró que el extracto de verbascósido en concentraciones de 50 y 100 mg/kg, previene las alteraciones morfológicas causadas por diabetes inducida por STZ (López, 2017), lo que podría indicar que el sistema feto-placentario y el metabolismo fetal de la glucosa son los responsables de que la actividad antioxidante del verbascósido se refleje en la disminución en la incidencia de malformaciones.

Se encontró una ligera tendencia del grupo cultivado en presencia de glucosa y 100 µg/mL de verbascósido a mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes y de igual manera, la presencia de MDA disminuyó drásticamente con la adición de verbascósido, por lo que se constata el efecto antioxidante del verbascósido sobre embriones cultivados en presencia de una concentración de glucosa en exceso.

## 11 CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron 16.56 g de una fracción enriquecida en verbascósido a partir del extracto metanólico de *B. cordata* y se comprobó su autenticidad por HPLC acoplado a espectrometría de masas.
2. La mayoría de los embriones cultivados en medio con altas concentraciones de glucosa presentó malformaciones, así como retraso en el desarrollo.
3. La FEV presenta un efecto embrioprotector significativo en embriones de día 10 de gestación cultivados por 24 h en altas concentraciones de glucosa en sólo dos de los parámetros morfológicos evaluados.
4. La FEV afecta la actividad de la enzima GST en embriones cultivados con glucosa.
5. La peroxidación lipídica es mayor en embriones del grupo control que en embriones cultivados con glucosa o con glucosa y verbascósido, y este último presenta menores niveles de MDA.

## 12 LITERATURA CITADA

- Acevedo L., Martínez E., Castañeda P., Franzblau S., Timmermann B.N., Linares E., Bye R., Mata R. 2000. New phenylethanoids from *Buddleja cordata* subsp. *cordata*. *Planta Med* 66: 257-261.
- Adedappo A.A., Jimoh F.O., Koduru S., Masika P.J., Afolayan A.J. 2009. Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complement Altern Med* 9: 21. doi: 10.1186/1472-6882-9-21.
- Agnez-Lima L.F., Melo J.T.A., Silva A. E. Oliveira A.H.S., Timoteo A.R.S., Lima-Bessa K.M., Martinez G.R., Madeiros M.H.G., Di-Mascio P., Galhardo R.S., Menck C.F.M. 2012. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Res* 751: 15-28.
- Akazawa S., Unterman T., Metzger B.E. 1994. Glucose metabolism during organogenesis in separated embryos and investing membranes in the rat. *Metabolism* 43: 830-835.
- Alipieva K., Korkina L., Orhan I.E., Georgiev M.I. 2014. Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv* 32: 1065-1076.
- American Diabetes Association. 2010. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 33(1): S62-S69.
- American Diabetes Association. 2018. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 41(1): S13-S27.
- Arteaga J., Luna L., Mutchinick O.M. 2008. Diabetes, embarazo y defectos al nacimiento. *Rev Invest Clin* 60(2): 107-114.
- Arteaga-Martínez S.B., García-Peláez M.I. 2014. Desarrollo embrionario presomítico, la tercera semana. En: *Embriología humana y biología del*

desarrollo. Eds.: Arteaga-Martínez SB, MI García-Peláez. Médica Panamericana. México, D.F. Pp 575.

Aruoma O.I., Halliwell B. Mahmood N., Burke A., Greenspan H.C. 1996. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Rad Biol Med* 20: 675-705.

Attia Y.M., El-Kersh D.M., Wagdy H.A., Elmazar M.M. 2018. Verbascoside: identification, quantification, and potential sensitization of colorectal cancer cells to 5-FU by targeting PI3K/AKT pathway. *Scient Rep* 8:16939: doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35083-2>

Ávila A.J.G., De Liverant J.G., Martínez A., Martínez G., Muñoz J.L., Arciniegas A., Romo de Vivar A. 1999. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 66: 75-78.

Ávila A.J.G., Espinosa G.A.M., Matamoros D.M.C.D., Benitez F.J.C., Hernández D.T., Flores M.S., Campos C.J., Muñoz L.J.L., García B.A.M. 2014. Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *BMC Comp Alt Med* 14:281. doi: <https://dx.doi.org/10.1186%2F1472-6882-14-281>.

Beauchamp C., Fridovich I. 1970. The generation of hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 245(18): 4641-4646.

Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochem* 44(1): 276-287.

Berra C.M., Menck C.F.M, Di Mascio P. 2006. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. *Quimica Nova* 29(7): 743-750.

- Blazics B., Ludanyi K., Szarka S.Z, Kery A. 2008. Investigation of *Euphrasia rostkoviana* Hayne Using GC-MS and LC-MS. *Chromatographia* 68(Suppl19):124. doi: <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0630-6>.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414: 813-820.
- Brent J.A., Rumack B.H. 1993. Role of free radicals in toxic hepatic injury I. *Free Radical Biochem* 31: 139-171.
- Brogden R.N., Heel R.C. 1987. Human Insulin: A review of its biological activity, pharmacokinetics and therapeutic use. *Drugs* 34(3): 350-371.
- Brogin M.J., Hertzog S.J., Ribeiro R.C., Damasceno D.C., MoIJCrceli G., Vieira R.M., Bevilacqua E., Paranhos C.I.M. 2014. DNA Damage and its cellular response in mother and fetus exposed to hyperglycemic environment. *Biomed Res Internat* 2014: 676758. doi: 10.1155/2014/676758.
- Cardinalli A., Linsalata V., Lattanzio V., Ferruzzi M.G. 2011. Verbascosides from Olive Mill waste water: Assessment of their bioaccessibility and intestinal uptake using an *in Vitro* digestion/Caco-2 model system. *J Food Sci* 76(2): H48-H54.
- Castagne V., Lefevre K., Natero R., Becker D.A., Clarke P.G.H. 1999. An optimal redox status for the survival of axotomized ganglion cells in the developing retina. *Neuroscience* 93: 313-320.
- Cederberg J. y Eriksson U.J. 2005. Antioxidative treatment of pregnant diabetic rats diminishes embryonic dysmorphogenesis. *Birth Defects Res (Part A)* 73: 498-505.
- Cederberg J., Simán C.M., Eriksson U.J. 2001. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Ped Res* 49(6): 755-762.

Chance B., Hess B. 1959. Metabolic - control mechanisms. The effect of glucose upon the steady state of respiratory enzymes in the ascites cell. J Biol Chem 234: 2421-2427.

Chen E.Y., Fujinaga M., Giaccia A.J. 1999. Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development. Teratology 60: 215-225.

Chirino G.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. México, 70 pp.

Chirino-Galindo G., Mejía-Zepeda 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 - Animal 48: 570-576.

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

Clapés S., Fernández T., Suárez G. 2013. Oxidative stress and birth defects in infants of women with pregestational diabetes. MEDICC Rev 15(1): 37-40.

Conway S.J., Henderson D.J., Copp A.J. 1997. Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the splotch (Sp2H) mutant. Development 124: 505-514.

Coop A.J., Stainer P., Greene N.D.E. 2013. Neural tube defects-recent advances, unsolved questions and controversies. Lancet Neurol 12(8): 799-210.

Cruz J.H., Licea M.E.P., Hernández P.G., Abraham E.A.M., Yanes M.Q. 2011. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. Rev Mex Patol Clin 58(1): 4-15.

Dennery P.A. 2007. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res Part C*. 81:155-162.

El-Bassiouni E.A., Helmy M.H., Abou N.R., El-Zoghby S.M., El-Nabi M.A.K., Abou A.N. R. 2005. Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of oxidative stress and antioxidant defence. *Brit J Biomed Sci* 62(2): 71-76.

Ellington S.K.L. 1987. Development of rat embryos cultured in glucose-deficient media. *Diabetes* 36(12): 1372-1378.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT MC). 2016. Informe final de resultados. Secretaría de Salud. 149 pp.

Eriksson U.J., Borg L.A. 1991. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. *Diabetologia* 34(5): 325-331.

Eriksson U.J., Cederberg J., Wentzel P. 2003. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers-animal and human studies. *Rev.Endocr Metab Disord* 4(1): 79-93.

Espinosa-González A.M., García-Bores A.M., Benítez-Flores J.C., Sandoval-Pérez C.E., González-Valle M.R., Céspedes C.L., Ávila-Acevedo J.G. 2016. Photoprotective effect of verbascoside from *Buddleja cordata* in SKH-1mice exposed to acute and chronic UV-B radiation. *Bol Latinoam Caribe*. 15(5): 288-300.

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

Etemad L., Zafari R., Adel S.M., Vahdati-Mashhadian N., Skouei Z.S., Hosseinzadeh H. 2016. Teratogenic effect of verbascoside, main

constituent of *Lippia citriodora* Leaves in mice. Iran J Pharm Res 15(2): 521-525.

Fernández R.T., Clapés S.H., Suárez R., Perera A.C., Rodríguez V.M.S., Purón C.A.G., Herrera M.A., Antiguas A.P., Castro T.M. 2012. Embriopatía diabética en ratas y efecto de un suplemento nutricional de vitamina E durante la gestación. Rev Hab Cienc Méd 12(2): 176-186.

Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G.L. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol 16: 4604-4613.

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

González-González N.L., Ramírez O., Mozas J., Melchor J. Armas H., García-Hernández J.A., Caballero A., Hernández M., Díaz-Gómez M.N., Jiménez A., Parache J., Bartha J.L. 2008. Factors influencing pregnancy outcome in type 2 versus type 1 diabetes mellitus. Acta Obstet Gynecol Scand. 87: 43-49.

Groutveld M. y Halliwell B. 1988. Aromatic Hydroxylation as a Potential Measure of OH Formation *in vivo*. Biochem J 237: 499-504.

Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes en el Embarazo. 2009. Secretaría de Salud: México. [Consultado junio 2019]. Disponible en: [www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.htm](http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.htm).

Guzmán A.M.G., Velázquez A.G. y Sierra M.P.V. 2006. Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. Rev Endocrinol Nutr. 14(48): 227-232.

Gyurkovska V., Alipieva K., Maciuk A., Dimitrova P., Ivanovska N., Hass C., Bley T., Georgiev M. 2011. Anti-inflammatory activity of Devil's claw *in vitro* systems and their active constituents. *Food Chem* 125: 171-178.

Haber F., Weiss J. 1934. The catalytic decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. *Proc R Soc Ser A*. 147: 332-352.

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

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press. Pp 851.

Hanson U., Persson B., Thunell S. 1990. Relationship between haemoglobin A1c in early type 1 (insulin-dependent) diabetic pregnancy and the occurrence of spontaneous abortion and fetal malformations in Sweden. *Diabetologia* 33: 100-104.

Hausmann M., Obermeier F., Paper D.H., Balan K., Dunger N., Menzel K. 2007. *In vivo* treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 148: 373–381.

Horal M., Zhang Z., Stanton R., Virkamäki A., Loeken M.R. 2004. Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: involvement in diabetic teratogenesis. *Birth Defects Res (Part A)* 70: 519-527.

Hubel C.A., Mclaughlin M.K., Evans R.W., Hauth B.A., Sims C.J., Roberts J.M. 1996. Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated,

and decrease within 48 hours post partum. *Am J Obstet Gynecol* 174(3): 975–982.

International Diabetes Federation. (2017). *Diabetes Atlas de la FID. Update 2017*. 8ª edición. [Consultado junio 2019]. Disponible en: [https://diabetesatlas.org/IDF\\_Diabetes\\_Atlas\\_8e\\_interactive\\_ES/](https://diabetesatlas.org/IDF_Diabetes_Atlas_8e_interactive_ES/).

International Diabetes Federation. (2012). *Diabetes Atlas de la FID. Update 2012*. 5a edición. [Consultado febrero 2018]. Disponible en: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012>.

Irshad M. y Chaudhuri P.S. 2002. Oxidant-antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian J Exp Biol*. 40: 1233-1239.

Ishibashi M., Akazawa S., Sakamaki H., Matsumoto K., Yamasaki H., Yamaguchi Y., Goto S., Urata Y., Kondo T., Nagataki S. 1997. Oxygen-induced embryopathy and the significance of glutathione-dependent antioxidant system in the rat embryo during early organogenesis. *Free Rad Biol Med* 22(3): 447-454.

Iyama T., Wilson III D.M. 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 12(8): 620-636.

Kharroubi A.T., Darwish H.M. 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes* 6(6): 850-867.

Kim C., Newton K.M., Knopp R.H. 2002. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 25(10): 1862-1868.

Kim K.J., Chun J.L., Lee K.B., Lee J.H., Park K.S., Han K.W., Lee B.M., Kim E.Y. Kim J.M., Kim M.K. 2016. Effect of acteoside on the re-localization and abnormal morphology of mitochondria in porcine oocytes during in vitro maturation. *J Assist Reprod Genet* 33: 939-948.

Klug S., Lewandowski C., Neubert D. 1985. Modification and standardization of the culture of early post implantation embryos for toxicological studies. Arch Toxicol 58: 84-88.

Korkina L.G. 2007. Phenylethanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. Cell Mol Biol 53: 15-25.

Lagerwerf S., Vrouwe M.G., Overmeer R.M., Fousteri M.I., Mullenders L.H.F. 2011. DNA damage response and transcription. DNA Repair 10(7): 743-750.

Lenoir L., Rossary A., Joubert-Zakeyh J., Vergnaud-Gauduchon J., Farges M.C., Fraisse D. 2011. Lemon verbena infusion consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. Dig Dis Sci 56: 3534-3545.

Li C., Miao X., Li F., Wang S., Liu Q., Wang Y., Sun J. 2017. Oxidative stress-related mechanisms and antioxidant therapy in diabetic retinopathy. Oxid Med Cell Long 2017: 9702820. doi: 10.1155/2017/9702820.

Li X., Weng H., Reece A., Yang P. 2011. SOD1 overexpression in vivo blocks hyperglycemia-induced specific PKC isoforms: substrate activation and consequent lipid peroxidation in diabetic embryopathy. Am J Obstet Gynec 205: 84.e1-84.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2011.02.071.

Liao Y., Houghton P.J., Hault J.R. 1999. Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. J Nat Prod 62(99): 1241-1245.

López Q.I.V. 2017. Efecto del extracto de *Buddleja cordata* en el desarrollo embrionario en ratas diabéticas. Tesis de Licenciatura, FES Iztacala, UNAM. México. 47 pp.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.

Mahlke J.D., Bolingnon A.A., Machado M.M., Spader T.B. Alves S.H., Canto-Dorow T., Athayde M.L. 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. *Quimica Nova* 32(2): 277-281.

Many A, Hubel C.A., Fisher S.J., Roberts J.M., Zhou Y. 2000. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol* 156(1): 321-331.

Martínez G.S. 2005. Especies reactivas de oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm.* 39(3). [Consultado febrero 2019]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152005000300009&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000300009&lng=es&nrm=iso).

Martínez-Vázquez M., Ramírez-Apan T.O., Aguilar H., Bye R. 1996. Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and the the flavone linarin of *Buddleia cordata*. *Planta Med.* 62: 137-140.

Martino M.A., Ariu F., Bebbere D., Uranio M.F., Chirico A., Marzano G., Sardanelli A.M., Cardinali A., Minervini F., Bogliolo L., Dell'Aquila M.E. 2016. Supplementation with nanomolar concentrations of verbascoside during *in vitro* maturation improves embryo development by protecting the oocyte against oxidative stress: a large animal model study. *Reprod Toxicol* 65: 204-211.

Matlawska I., Sikorska M., Kowalewski Z. 1985. Flavonoid compounds in *Eupharasia herb.* *Herba Pol* 31: 119-123.

Matlawska I., Sikorska M., Kowalewski Z. 1988. Flavonoid compounds in *Herba Eupharsia.* *Herba Pol* 34: 97-102.

Mensaha A.Y., Sampson J., Houghton P.J., Hylands P.J., Westbrook M.A., Dunnc M., Hughes M.A., Cherry M.W. 2001. Effects of *Buddleja globosa*

leaf and its constituents relevant to wound healing. *J Ethnopharmacol* 27(2-3): 219-226.

Mestre-Alfaro A., Ferrer M.D., Sureda A., Tauler P., Martinez E., Bibiloni M.M. 2011. Phytoestrogens enhance antioxidant enzymes after swimming exercise and modulate sex hormone plasma levels in female swimmers. *Eur J Appl Physiol* 111: 2281–2294.

Miller J.K., Brzezinska-Slebodzinska E., Madsen F.C. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci* 76(9): 2812-2823.

Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2): 109-142.

Moraes M.C.S., Neto J.B.C., Menck C.F.M. 2012. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Front Biosci* 17(4): 1362-1388.

Morris G. 1979. Growing embryos in vitro. *Nature* 278: 402.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Acteoside, CID=5281800. [Consultado enero 2019]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acteoside>.

National Institute for Health and Care Excellence (NICE). 2015. Diabetes in pregnancy: management from preconception to the postnatal period. [Consultado junio 2019]. Disponible en: <http://nice.org.uk/guidance/ng3>.

New D.A., Coppola PT. 1970. Effects of different oxygen concentrations on the development of rat embryos in culture. *J Reprod Fertil* 21: 109-118.

New, D.A.T. 1978. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol Rev* 53(1): 81-122.

Ogbole O.O., Segun P.A., Adeniji A.J. 2017. *In vitro* cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Comp Altern Med* 17(494): 1-10.

Ohkawa H, N Ohishi, I Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues for thiobarbituric acid reaction. *Analyt. Biochem* 95(2): 351-358.

Ornoy A. 2007. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod Toxicol* 24(1): 31-41.

Ornoy A., Livshitz A., Ergaz Z., Stodgell C.J., Miller R.K. 2011. Hyperglycemia, Hypoxia and Their Combination Exert Oxidative Stress and Changes in Antioxidant Gene Expression: Studies on Cultured Rat Embryos. *Birth Defect Res B*. 92: 231-239.

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* 40: 237-251.

Oyourou J.N., Combrinck S., Regnier T., Marston A. 2013. Purification stability and antifungal activity of verbascoside from *Lippia javanica* and *Lantana camara* leaf extracts. *Ind Crops Prod* 43: 820-826.

Paglia E.D., Valentine N.W. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-168.

Pettica P., Keely E.J., Walker M.C., Yang Q., Bottomley J. 2009. Pregnancy outcomes in diabetes subtypes: how do they compare? A province-based study of Ontario, 2005-2006. *J Obstet Gynaecol Can* 31: 487-496.

Pinter E., Reece E.A., Leranath C.S., Sanyal M.K., Hobbins J.C., Mahoney M.J. 1986. Yolk sac failure in embryopathy due to hyperglycaemia: ultrastructural analysis of yolk sac differentiation associated with embryopathy in rat conceptuses under hyperglycemic conditions. *Teratology* 33: 73-84.

Ríos-Martínez W., García-Salazar A.M., Ruano-Herrera L., Espinosa-Velasco M.D.J., Zárate A., Hernández-Valencia M. 2014. Complicaciones obstétricas de la diabetes gestacional: criterios de la IADPSG y HAPO. *Perinatol Reprod Hum* 28(1): 27-32.

Rojkind M., Domínguez-Rosale J.A., Nieto N., Greenwel P. 2002. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *CMLS Cell Mol Life Sci* 59: 1-20.

Romero-Martínez M., Shamah-Levy T., Franco-Núñez A., Villalpando S., Cuevas-Nasu L., Gutiérrez J.P. 2013. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *Salud Pub Mex* 55(2): S332-S340.

Russell J.M., Zilliox L.A. 2014. Diabetic Neuropathies. *Continuum* 20(5): 1226-1240.

Rzedowski GC y J Rzedowski, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Michoacán, México.

Singh C.K., Kumar A., Hitchcock D.B., Fan D., Goodwin R., LaVoie H.A., Nagarkatti P., DiPette D.J., Singh U.S. 2011. Resveratrol prevents embryonic oxidative stress and apoptosis associated with diabetic embryopathy and improves glucose and lipid profile of diabetic dam. *Mol Nutr Food Res* 55(8):1186-1196.

Saimaru H., Orihara Y. 2010. Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europea*. *J Nat Med* 64(2): 139-145.

Sakamaki H., Akazawa S., Ishibashi M., Izumino K., Takino H., Yamasaki H., Yamaguchi Y., Goto S., Urata Y., Kondo T., Nagataki S. 1999. Significance of glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes* 48: 1138-1144.

Schafer F.Q., Buettner G.R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30: 1191-1212.

Schönbichler, S.A., Bittner, L.K.H., Pallua, J.D., Popp, M., Abel, G., Bonn, G.K., Huck, C.W. 2013. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. *J Pharma Biomed Analysis* 84: 97-102.

Sgarbossa A., Dal Bosco M., Pressi G., Cuzzocrea S., Dal Toso R., Menegazzi M. 2012. Phenylethanoid glycosides from plant cell cultures induce heme oxygenase 1 gene expression in a human keratinocyte cell line by affecting the balance of NRF2 and BACH1 transcription factors. *Chem Biol Interact* 199: 87–95.

Sheng G.Q., Zhang J.R., Pu X.P., Ma J., Li C.L. 2002. Protective effect of verbascoside on 1-methyl- 4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 451: 119–124.

Shum L., Sadler T.W. 1990. Biochemical basis for D,L, $\beta$ -hydroxybutyrate-induced teratogenesis. *Teratology* 42: 553-556.

Sivan E., Lee Y.C., Wu Y.K., Reece E.A. 1997. Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology* 56(6): 343-349.

Sticher O., Salama O. 1981a. Euphroside, A New Iridoid Glucoside from *Euphrasia salisburgensis* HOPPE. *Helv Chim Acta* 64(1): 78-81.

Sticher O., Salama O. 1981b. Iridoid glucosides from *Euphrasia rostkoviana*. *Planta Med* 42(6): 122-123.

Sticher O., Salama O. 1983. Iridoid glucoside von *Euphrasia rostkoviana*. *Planta Med* 47(2): 90-94.

Stoll C, Dott B., Alembik Y., Roth M.P. 2010. Associated Malformations Among Infants With Neural Tube Malformations. *Am J Med Genet A* 155: 565-568.

Takahashi M. 2012. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev.* 58(1):1-9.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2002. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 25(1): S5-S20.

Thitilertdecha, P., Guy, R.H., Rowan, M.G. (2014). Characterisation of polyphenolic compounds in *Clerodendrum petasites* S. Moore and their potential for topical delivery through the skin. *J Ethnopharmacol* 154(2): 400–407.

Thomas M.M., Guy A.Z., Stephen M.P. 1999. Biologically Active Oxidized Phospholipids. *J Biol Chem* 274 (25): 189-192.

Toescu V., Nuttall S.L., Martin T., Kendall M.J., Dunne F. 2002. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol.* 57(5): 609-613.

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

Tsuchida, S. 1999. Glutathione transferase. En: Taniguchi N., Gutteridge J.M.C. (editores). *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University Press, Oxford, New York. Pp 83-85.

Valdés-Valdés A., Pérez-Núñez H.M., García-Rodríguez R.E., López-Gutiérrez A. 2010. *Embriología Humana. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba*. Pp 288.

Vinik A.I, Nevoret M.L., Casellini C., Parson H. 2013. Diabetic neuropathy. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 42: 747-787.

- Weiss S.J. 1989. Tissue Destruction by Neutrophils. *New Engl J Med* 320: 365-376.
- Weksler-Zangen S., Yaffe P., Ornoy A. 2003. Reduced SOD Activity and Increased Neural Tube Defects in Embryos of the Sensitive But Not of the Resistant Cohen Diabetic Rats Cultured Under Diabetic Conditions. *Birth Defects Res (Part A)* 67: 429-437.
- Wentzel P.L., Thunberg L., Eriksson U.J. 1997. Teratogenic effect of diabetic serum is prevented by supplementation of superoxide dismutase and N-acetylcysteine in rat embryo culture. *Diabetologia* 40: 7-14.
- World Health Organization. 2013. Guideline of Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy 13. Pp 62.
- Yang X., Borg L.A., Eriksson U.J. 1997. Altered metabolism and superoxide generation in neural tissue of rat embryos exposed to high glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272: E173-E180.
- Yogesh C.A., Rajendra S., Cheng J.Z., Yusong Y., Abha S., Sharad S.S. 2003. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med* 24: 219-230.
- Yoon D., Pastore Y.D., Divoky V., Liu E., Mlodnicka A.E., Rainey K., Ponka P., Semenza G.L., Schumacher A., Prchal J.T. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. *J Biol Chem* 281: 25703-25711.
- Yu B.P. 1994 Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74(1): 139-162.
- Zaken V., Kohen R., Ornoy A. 2000. The development of antioxidant defense mechanism in young rat embryos in vivo and in vitro. *Early Pregn.* 4: 110-123.

Zhou A., Sadik A.O. 2008. Comparative analysis of quercetin oxidation by electrochemical, enzymatic, autoxidation, and free radical generation techniques: a mechanistic study. *J Agric Food Chem* 56: 12081–12091.