



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Efecto de espermina y espermidina en la
expresión del gen p53 en un modelo *in vitro* de
embriopatía diabética**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

PRESENTA

Reyes Mateos Laura Coral

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Martín Palomar Morales



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio del Metabolismo de la Diabetes Mellitus (L-511), de la Unidad de Morfofisiología y Función en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección del Dr. Martín Palomar Morales y del Dr. Elías Piedra Ibarra (laboratorio de Fisiología Vegetal, UBIPRO).

Indice general

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	1
2.1. DIABETES MELLITUS: GENERALIDADES	1
2.1.1. Clasificación de la DM.....	2
2.1.2. Epidemiología.....	2
2.1.3. Embarazo y Diabetes mellitus	4
2.1.4. Embriopatía diabética	6
2.1.5. Modelos experimentales para estudiar la embriopatía diabética.....	8
2.2. POLIAMINAS	9
2.2.1. Importancia	10
2.2.2. Metabolismo de poliaminas	10
2.2.3. Poliaminas y regulación génica	11
2.3. LA RATA COMO MODELO BIOLÓGICO	12
2.4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	13
2.5. ESTRÉS OXIDATIVO	18
2.6. APOPTOSIS	20
2.6.1. Apoptosis y embarazo complicado con diabetes mellitus	21
2.7. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN P53.....	23
3. ANTECEDENTES	27
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
5. HIPOTESIS	29
6. OBJETIVOS	29
7. MATERIALES Y METODOS	30
7.1. MODELO BIOLÓGICO.....	30
7.2. MEDIOS DE CULTIVO	30
7.3. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	31
7.4. WESTERN BLOT PARA LA PROTEÍNA P53	32
I.-Homogenizado de embriones.....	32
II.-Determinación de proteínas	32
7.5. EXPRESIÓN DEL GEN P53	34
I. Diseño de primers	34
II.- Obtención de DNA	35
III.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final del gen Gamma-actina, y p53	35
IV.- Extracción de RNA total	36
V.- RT-PCR del gen p53	36
VI.- PCR Semicuantitativa del gen p53.....	36
7.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	37
8. RESULTADOS	38
8.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	38
8.2 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P53	42
8.3. EXPRESIÓN DEL GEN P53	43
I. Gradiente de temperatura.....	43
II. Secuencias	44

<i>III. PCR del gen p53</i>	45
<i>IV. Expresión del gen p53</i>	46
<i>V. Análisis cuantitativo de la expresión del gen p53</i>	47
<i>Normalización de las condiciones de amplificación.</i>	47
<i>Análisis densitométrico</i>	48
9. DISCUSIÓN	51
10. CONCLUSIONES	56
11. LITERATURA CITADA	57

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS.....	3
TABLA 2. GENES CUYA TRANSCRIPCIÓN ESTA REGULA POR LA PROTEÍNA P53.....	25
TABLA 3. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS.	30
TABLA 4. PARÁMETROS DEL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	31
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LOS <i>PRIMERS</i> DISEÑADOS POR EL PROGRAMA BLAST.	35
TABLA 6. SECUENCIAS DE LOS PRODUCTOS DE PCR.	44
TABLA 7. CONCENTRACIÓN DE RNA	47
TABLA 8. CANTIDAD RELATIVA DEL TRANSCRITO P53	50

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS POLIAMINAS	9
FIGURA 2. METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS.....	11
FIGURA 3. ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DEL OXÍGENO Y DE LAS DIFERENTES ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	15
FIGURA 4. REACCIONES DE FENTON Y HABER-WEISS	15
FIGURA 5. MODELO PROPUESTO PARA EXPLICAR LA PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA EN LA INDUCCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO	17
FIGURA 6. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA P53 EN PROCESOS APOTÓTICOS.....	22
FIGURA 7. FUNCIONES DE P53 EN RESPUESTA AL DAÑO DEL DNA.	25
FIGURA 8. ESTRUCTURA DE LA UNIÓN DE P53 AL DNA.....	26
FIGURA 9. COMPARACIÓN DIRECTA DE EMBRIONES.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 10. DIAMÉTRO DEL SACO VITELINO, LONGITUD CEFALO-CAUDAL, LONGITUD CEFÁLICA.....	40
FIGURA 11. NÚMERO DE SOMITAS, ÍNDICE MORFOLÓGICO.....	41
FIGURA 12. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ACTINA Y P53.....	42
FIGURA 13. PORCENTAJE DE EXPRESIÓN ENTRE LA RELACIÓN DE LA PROTEÍNA ACTINA Y P53.	42
FIGURA 14. GEL DE AGAROSA 1% CON LOS PRODUCTOS DE PCR.	43
FIGURA 15. GEL DE AGAROSA 1% CON LOS PRODUCTOS DE PCR	45
FIGURA 16. GEL DE AGAROSA 1% CON PRODUCTOS DE RT-PCR.....	46
FIGURAS 17. NORMALIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.....	48
FIGURA 18. AMPLICÓN DEL TRANSCRITO P53	49
FIGURA 19. CANTIDAD RELATIVA DEL TRANSCRITO P53.....	50

INDICE DE ABREVIATURAS

- AA: ácido araquidónico
- aa: Aminoácidos
- ADA: American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes)
- ADC: Arginina descarboxilasa
- AGEs: productos de glicosilación avanzada
- Arg: Arginina
- ATP: Adenosín Trifosfato
- cDNA: Ácido desoxiribonucleico complementario
- Ctrl: Grupo control
- DC: Defectos Congénitos
- DDR: Damage Response DNA (Respuesta al daño del DNA)
- DM: Diabetes Mellitus
- DM1: Diabetes Mellitus del tipo 1
- DM2: Diabetes Mellitus del tipo 2
- DMG: Diabetes Mellitus Gestacional
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DNase: desoxirribonucleasa
- DSBs: Ropimientos de doble cadena del DNA
- ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud
- FID: Federación Internacional de la Diabetes
- GADPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- Glc: Grupo Glucosa
- HL: Lipasa hepática
- HMMD: Hijos de madres con Diabetes Mellitus
- LDL: Lipoproteínas de Baja densidad
- LPL: Lipasa proteica
- MC: Malformaciones Congénitas
- mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
- NDDG: National Diabetes Data Group (Grupo Nacional de Datos de Diabetes)
- ODC: Ornitina descarboxilasa
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- Orn: Ornitina
- *p53*: Gen supresor de tumores p53
- p53: Proteína supresora de tumores 53
- PA: Poliaminas
- PCR: Reacción en Cadena de la polimerasa
- PG: Prostaglandinas
- PIB: Peso Interno Bruto
- PPAR: Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales
- Put: Putresina
- RNA: Ácido ribonucleico
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- RT-PCR: Reversa Transcriptasa con Reacción en Cadena de la polimerasa
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SOD: Superóxido dismutasa
- Spd: Grupo glucosa+ espermidina
- Spm: Grupo glucosa + espermina
- *Tp53*: Factor de transcripción p53

1. RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizadas por hiperglucemia, resultante de la alteración de la secreción de insulina, la acción de ésta, o ambas. Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la DM, desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la consecuente deficiencia de insulina, hasta las anomalías que provocan la resistencia a la acción de esta hormona. La asociación de DM franca con el embarazo se asocia con aumento del riesgo de trastornos del crecimiento y malformaciones congénitas en la descendencia. Al parecer, esto es debido a que aumenta el estrés oxidativo, hay disminución de la defensa antioxidante o ambas condiciones simultáneamente. Otros procesos que se alteran incluyen los patrones de muerte celular embrionaria (apoptosis) durante y antes de la organogénesis. Se ha encontrado que la DM materna y las altas concentraciones de glucosa causan daño al DNA *in vitro* por aumento de la fosforilación de H2A.X, y activan la vía de señalización de DDR (The DNA damage response) y su flujo descendente al efector gen *p53*. Para revertir estos daños causados por la DM materna, se han empleado en investigación poderosos antioxidantes entre los que se encuentran las poliaminas, que son moléculas alifáticas nitrogenadas de bajo peso molecular, las más estudiadas son putrescina, espermina y espermidina, las cuales están relacionadas con la proliferación, la diferenciación, el crecimiento y la función celular. Éstas pueden modular la conformación cuádruple de genes en la región promotora y afectar la expresión de genes como *c-myc*, *c-fos*, *p21*, y *p53*, también pueden regular la expresión genética, la transducción de señales y la función de canales iónicos, así como la síntesis de DNA y proteínas mediante la unión a DNA y RNA; son depuradores endógenos de ERO's, por lo cual pueden proteger al DNA, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de las poliaminas sobre la expresión del gen *p53* en embriones de rata cultivados a altas concentraciones de glucosa. Para estudiar la expresión del gen *p53*, se cultivaron embriones de rata de día 10.5 gestacional, en cuatro condiciones: medio normal (control), medio suplementado con glucosa, medio suplementado con glucosa y espermina y medio suplementado con glucosa y espermidina, a por 24 h a 37°, en un aparato rotatorio a 30 rpm. Además, se tuvo un control externo de 115 días (*in vivo*). Los embriones postcultivo se recuperaron, para obtener el registro morfológico como indicador de desarrollo, se obtuvieron proteínas, RNA y DNA para el análisis de la expresión de *p53*. Se encontró que el mayor porcentaje de malformaciones se encuentra en el grupo cultivo de glucosa, mientras que en los cultivos suplementados por poliaminas se revirtieron a un 95% las malformaciones. En cuanto a la expresión de la proteína, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos, pero se observa una ligera tendencia en la relación de la expresión de actina/*p53* en los grupos con

poliaminas, especialmente en los embriones que fueron cultivados en medios suplementados con espermidina. Así mismo, se encuentra que el gen *p53* se expresa en los embriones de día 10.5 así como en el control *in vivo* (día 11.5), en cuanto a los niveles de expresión se encontraron diferencias significativas entre los grupos, tomando en cuenta el grupo control como expresión basal, al compararlo con el grupo glucosa hubo una disminución significativa en el nivel de expresión del gen. Por otro lado, las poliaminas presentaron una expresión de casi el doble en comparación al grupo control, por lo que se concluye que las poliaminas intervienen directamente sobre la expresión del gen *p53*, y ayudan a revertir las malformaciones de los embriones de día 10.5 cultivados 24 h en altas concentraciones de glucosa.

2. INTRODUCCIÓN

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

2.1. Diabetes Mellitus: Generalidades

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de enfermedades metabólicas de índole multifactorial, que se caracteriza por alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, y es ocasionada por defectos en la secreción y/o acción de la insulina con grados variables de resistencia a esta hormona (ADA, 2012; Islas-Andrade y cols., 1993).

La DM es causa de diversas complicaciones, que pueden ser agudas (metabólicas o infecciosas) o crónicas (como nefropatías, retinopatías, neuropatía, entre otras). La DM ha sido reconocida como una enfermedad que incrementa el riesgo de aparición de defectos congénitos (DC), así como complicaciones a largo plazo que son causa importante de morbilidad, incapacidad y muerte (García y García, 2009; López, 2009).

La hiperglucemia crónica de la DM se asocia con daño a largo plazo de órganos, como ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la DM, desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la consecuente deficiencia de insulina, hasta las anomalías que provocan la resistencia a la acción de ésta hormona (ADA, 2012).

Los síntomas de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y visión borrosa. El deterioro de crecimiento y la susceptibilidad a ciertas infecciones también puede acompañar a la hiperglucemia crónica. Otras consecuencias de la diabetes no controlada son la hiperglucemia con cetoacidosis o síndrome hiperosmolar no cetónico. Todos los tipos de diabetes pueden provocar complicaciones en muchas partes del organismo e incrementar el riesgo general de muerte prematura, entre las posibles complicaciones se incluyen: ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, amputación de piernas, pérdida de visión y daños neurológicos. Durante el embarazo, si la diabetes no se controla de forma

adecuada aumenta el riesgo de muerte fetal y otras complicaciones como son la aparición de malformaciones (ADA, 2012; OMS, 2016).

2.1.1. CLASIFICACIÓN DE LA DM

La clasificación actual de la DM, aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) está basada en la propuesta por el National Diabetes Data Group (NDDG) en 1979. En ésta se utilizan números arábigos, de forma que la DM de tipo 1 es la que antes se conocía como dependiente de insulina, juvenil o tipo I y la DM de tipo 2 sustituye a la nombrada como no dependiente de insulina, del adulto o tipo II. Además de introducir por separado a otros tipos de diabetes (The Expert Committee, 2003).

La American Diabetes Association (ADA) redujo la clasificación a cuatro grupos, resumidos en la tabla 1.

2.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que el número de personas con diabetes en todo el mundo ha aumentado de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014, y tan solo en el año 2000 la frecuencia fue de 195 millones de personas. Además, la prevalencia mundial de la diabetes casi se ha duplicado, pues ha pasado del 4.7% en 1980 al 8.5% en 2014 en la población adulta; en los países en desarrollo el aumento se da con mayor rapidez (OMS 2016).

Tabla 1. Clasificación de la Diabetes mellitus (ADA, 2012).

Tipo	Características generales
DM tipo1	<p>Caracterizada por una destrucción de las células beta pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoacidosis y necesidad de tratamiento con insulina para vivir (insulinodependientes). Se distinguen dos sub-grupos:</p> <p><i>Diabetes autoinmune:</i> con marcadores positivos en un 85-95% de los casos, anticuerpos antiislotos (ICAs), antiGADs (decarboxilasa del ac. glutámico) y anti tirosina fosfatasa IA2 e IA2 β. Esta forma también se asocia a genes HLA.</p> <p><i>Diabetes idiopática:</i> Con igual comportamiento metabólico, pero sin asociación con marcadores de autoinmunidad ni de HLA, la cual es causada por una deficiencia absoluta de secreción de insulina.</p>
DM tipo 2	<p>Caracterizada por insulino-resistencia y deficiencia (no absoluta) de insulina. Es un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica). Con niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglicemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control, pero la hormona no es indispensable para preservar la vida (insulino-requiere).</p>
Tipos específicos de la DM	<p>Los signos y síntomas característicos de estos padecimientos se presentan de manera secundaria a enfermedades principales como: defectos genéticos de la función de la célula β o en la acción de la insulina, endocrinopatías inducidas, ya sea por fármacos o sustancias químicas, infecciones, enfermedades del páncreas exocrino, formas infrecuentes de diabetes autoinmunes.</p>
DM gestacional (DMG)	<p>Se caracteriza por hiperglicemia, que aparece en el curso del embarazo. Se asocia a mayor riesgo en el embarazo y parto y de presentar diabetes clínica (60% después de 15 años). La diabetes gestacional puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes clínica.</p>

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID), los países con mayor número de pacientes diabéticos son en este orden: China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México. Esta enfermedad es considerada como la epidemia del siglo XXI y se estima que la esperanza de vida de los individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años. Tan solo en México en el 2010 hubo una reducción de 10 años en la esperanza de vida en pacientes con diabetes; en 2012 la diabetes provocó 1.5 millones de muertes, y se estima que para el año 2025 habrá 300 millones de personas con DM, mientras en los países en desarrollo habrá 228 millones afectadas por esta enfermedad ese año (Danglot-Banck y Gómez-Gómez, 2004; Hernández-Ávila y cols., 2013; OMS, 2016).

Las pacientes embarazadas que tienen DM preexistente son del 0.2% a 0.3% de este grupo poblacional, y se ha demostrado que la prevalencia de defectos congénitos al nacimiento en madres diabéticas es de entre 8% y 10%, mientras que, en la población general esta cifra es alrededor del 3% (Nazer y cols., 2005).

2.1.3. EMBARAZO Y DIABETES MELLITUS

La DM es considerada como el síndrome metabólico más común durante la gestación; se presenta aproximadamente en el 5% de los embarazos. El 90% de estas pacientes presentan diabetes mellitus gestacional (DMG), es decir, son mujeres con predisposición genética o metabólica a la diabetes, incapaces de compensar adecuadamente los efectos diabetogénicos del embarazo. El 10% restante está conformado por mujeres con diabetes ya diagnosticada antes del embarazo (DM1, DM2 y otros tipos) y se denomina diabetes franca o pregestacional (Restrepo, 1992).

En la gestación complicada por diabetes previa en comparación con DMG, las alteraciones metabólicas del estado diabético influyen de manera diferente en el desarrollo. En cada gestación individual, las implicaciones pueden ser definidas por el control metabólico en estados específicos de la gestación, cuando el crecimiento embrionario, el desarrollo en función de las células beta y el crecimiento de tejidos sensibles a la insulina van a ser influenciados por el ambiente (Metzger, 1991).

La embriopatía diabética es la asociación de la DM con los defectos congénitos en el nacimiento y la mortalidad fetal en el embarazo (Fernández y cols., 2013). La mortalidad fetal y materna era casi del 70 % y 40% respectivamente, antes de la introducción de la insulina en la terapia médica; ya que la administración de esta controla la glicemia en mujeres embarazadas, por lo cual la mortalidad disminuyó dramáticamente casi al 12 % (Freinkel, 1980; Nazer y cols., 2005).

En el embarazo de mujeres diabéticas se presenta un aumento de los requerimientos de insulina, tanto para las que presentan DM tipo 1 (Steel y cols., 1994), como para las de tipo 2 (Moore y col, 1987) y las que presentan DMG (Langer y cols., 1987). En mujeres con DMG recientemente se encontró que el metabolismo de carbohidratos se altera profundamente durante el embarazo (Catalano y cols., 1993). En mujeres diabéticas tipo 1 se demostró que el tratamiento con insulina normaliza la glucemia, las concentraciones de los ácidos grasos y los lípidos circulantes (Reece y cols., 1997). Se ha reportado que en las mujeres diabéticas tipo 1 gestantes se reduce la necesidad de insulina en las etapas finales del embarazo, mientras que en las mujeres con DMG que requieren insulina, se incrementa la necesidad de la hormona (McManus y Ryan, 1992).

El antecedente de DM1 o DM2 resulta de suma importancia, debido a que el descontrol glucémico que a menudo se observa en estas mujeres juega un papel determinante en las complicaciones que se presentan desde el momento mismo de la concepción y durante todo el embarazo, a menudo se complica con aborto, preeclamsia, polihidramnios (aumento de la cantidad de líquido amniótico), defectos congénitos, nacimientos pretérmino e incluso muerte materna, que aún en los mejores centros de atención es diez veces más frecuente que en la población en general (The Expert Committee, 2003).

Las causas de las malformaciones y el retraso del desarrollo aún son desconocidos. Los estudios clínicos han demostrado que el riesgo de presentar malformaciones congénitas depende de la regulación de la glucosa en la sangre durante el primer trimestre, específicamente durante las primeras siete semanas de embarazo (Buchanan y Kitzmiller, 1994), aunque también hay reportes que sugieren que no todas las malformaciones congénitas pueden prevenirse con un buen control glucémico, por lo cual se piensa que existen otros factores que participan en el proceso teratogénico durante el embarazo diabético, entre los cuales se podrían encontrar los cuerpos cetónicos, los triglicéridos y los aminoácidos de cadena ramificada (Buchanan y cols., 1994; Eriksson y cols., 2003; Shubert y cols., 1996).

El embarazo diabetogénico es una condición metabólica de tipo oxidativa, en que la unidad feto-placentaria se forma a expensas de la madre (Acevedo y cols., 2007). El ambiente hipoglucémico e hiperlipémico que rodea al embrión genera sustancias con alta capacidad para dañar la estructura de las biomoléculas y alterar las funciones en que ellas participan. Dichas sustancias pueden provocar cambios en eventos de señalización cruciales durante determinados periodos del desarrollo, afectar la expresión de genes relacionados con morfogénesis y producir daño estructural del material genético, mecanismo que han sido implicados en la embriopatía diabética (Loeken, 2006).

La etiología del efecto teratogénico del estado diabético no se conoce. Sin embargo, tanto los factores ambientales (estado diabético materno y condiciones intrauterinas) como la predisposición genética parecen tener importancia en la embriopatía diabética, es decir, se trata de un caso de interacción entre el ambiente y el trasfondo genético del individuo.

2.1.4. EMBRIOPATÍA DIABÉTICA

Durante el desarrollo embrionario se dan múltiples señales celulares de división, migración, interacción, diferenciación, así como de muerte celular programada, que son reguladas genéticamente. Son tan complejas estas señales que cualquier desequilibrio o perturbación que exista en el entorno, interfiere con estos procesos genéticos, y trae como consecuencia alteraciones en el embrión que pueden ocasionar muerte embrionaria temprana o impedir la implantación. Aunque, en pocos casos el embrión se llega a implantar y no logra llevar a cabo un desarrollo normal, lo que resulta en un micro aborto (desprendimiento del *conceptus* al tiempo de la menstruación) o en un aborto temprano, tal es el caso que muchas veces las mujeres no se enteran de que estuvieron embarazadas. En otro caso, a pesar de las malformaciones relacionadas como respuesta a la alteración de su entorno, el embrión se implanta y logra llevar un desarrollo progresivo, al nacer o ser abortado en un lapso más avanzado del embarazo se pueden observar más claramente las respuestas a estas alteraciones genéticas, como anomalías físicas o malformaciones congénitas (Gilbert y Barresi, 2016).

Como ya se ha mencionado, los efectos que la diabetes mellitus causa sobre el desarrollo embrionario dependen del tipo de la diabetes y de la duración de la misma. Se ha reportado que la hiperglicemia materna es el principal factor en la producción de malformaciones congénitas (MC) (Allen y cols., 2005; Cao y cols., 2011; Fu y cols., 2006; Gäreskog y cols., 2006 y Gäreskog y Wentzel, 2007; Guleria y cols., 2006). Sin embargo, existen otros factores metabólicos adversos producidos por la DM, tales como cuerpos cetónicos, productos finales de glicación avanzada, aminoácidos de cadena ramificada y deficiencia de inositol (Hod y cols., 1986; Weigensberg y cols., 1990) los cuales pueden tener efectos sinérgicos con la glucosa en la interrupción del desarrollo embrionario normal (Eriksson y cols., 2000).

Se han propuesto otros trastornos celulares y metabólicos para desempeñar un papel en el desarrollo de defectos en la descendencia de un embarazo en las condiciones antes mencionadas, como alteraciones intracelulares en el metabolismo del *mio*-inositol y del sorbitol, aumento de la actividad de la proteína cinasa C, disminución de la absorción del ácido araquidónico, síntesis defectuosa de prostaglandinas, señalización por PPAR (Receptores

Activados por Proliferadores Peroxisomales), mutaciones aleatorias de DNA y estrés oxidativo (Baack y cols., 2014; Chappell y cols., 2009; Eriksson y Wentzel, 2016; Reece y cols., 1997).

Los riesgos que presentan los hijos de madres diabéticas (HMMD) al nacimiento son varios. La descompensación de la enfermedad alrededor del período de organogénesis ha sido relacionada con un espectro de alteraciones del desarrollo que incluye: alteraciones del crecimiento fetal intrauterino (40%), hipoglicemia (20%), prematurez (15%), asfixia (15%), enfermedad de membrana hialina (15%), malformaciones congénitas (MC) (5 a 12%), trastornos metabólicos como hipocalcemia, hipomagnesemia e hiperbilirrubinemia. anomalías del sistema nervioso, cardiovascular, renal, sistema esquelético y pérdida de gestación por aborto espontáneo (García y García, 2009; Nazer y cols., 2005).

Los DC más comunes incluyen espina bífida, anencefalia y microcefalia en el sistema nervioso central (SNC) y defectos del septo ventricular, defectos del tabique interauricular, transposición de las grandes arterias y tetralogía de Fallot en el caso del sistema circulatorio (Reece y Homko, 1994).

2.1.5. MODELOS EXPERIMENTALES PARA ESTUDIAR LA EMBRIOPATÍA DIABÉTICA

Los efectos que produce la diabetes mellitus sobre el desarrollo embrionario son totalmente perjudiciales, aunque estudiar esto en la especie humana no es posible por problemas técnicos e impedimentos éticos, se tiene como respuesta modelos animales que simulan los problemas que traen consigo la DM en nuestra especie. La metodología que se ha puesto en práctica es inducir el síndrome de la diabetes mellitus en animales de laboratorio antes o durante la gestación y al término observar las malformaciones fetales, así como las alteraciones del metabolismo materno fetal. El protocolo que se utiliza es emplear diferentes fármacos, los más comunes son el aloxan y la estreptozotocina. Aún no se conoce por completo el mecanismo por el cual estos fármacos inducen diabetes, lo que se conoce es que dañan la membrana de las células β pancreáticas interfieren dañando su integridad y obteniendo como respuesta muerte masiva de estas, lo que provoca un estado metabólico alterado, muy similar a la DM1 de humanos (Méndez y Ramos, 1994), a todo este proceso en animales inducidos con diabetes mellitus por alguno de estos fármacos se le denomina modelo *in vivo*.

Por otra parte, uno de los modelos más útiles para el estudio de la embriopatía diabética es el propuesto por New (1978), el cual consiste en la obtención de embriones postimplantacionales de roedores normales; que son cultivados por 24 ó 48 h, iniciando alrededor de los días 9.5 a 11.5, lapso en el que se produce el cierre del tubo neural (NT). El suero donde se cultivan los embriones proviene de la sangre de ratas sanas, lo cual hace que el cierre del NT sea muy similar al que se presenta en condiciones *in vivo*, lo que permite manipular las condiciones del suero del cultivo, de manera que se crean ambientes altos en glucosa y así inducir defectos en el cierre del NT y retardo en el crecimiento (Chappell y cols., 2009; Chirino-Galindo y cols., 2009; Eriksson y cols, 1991). El modelo de cultivo permite el estudio del desarrollo embrionario y el metabolismo a través de la organogénesis, y provee un sistema adecuado para la manipulación del desarrollo (Ellington, 1997).

2.2. Poliaminas

Las poliaminas (PA) son un grupo de aminas alifáticas de bajo peso molecular (figura 1), con grupos amino distribuidos de forma regular a lo largo de su estructura, las principales PA son putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm). Se presentan en las células de todos los seres vivos, son esenciales para el mantenimiento del crecimiento y función de las células, ya que son precursores de nucleótidos. Por su carácter policationico (cargadas positivamente) pueden unirse y formar complejos con moléculas polianiónicas (cargadas negativamente), tales como algunas proteínas, los fosfolípidos, las pectinas, el DNA y el RNA. La inhibición de su síntesis causa problemas durante el desarrollo embrionario de los mamíferos (Galston, 1983; Gómez-Gallego y cols., 2008; Kirchner y cols., 1999; Mendoza y Rocha, 2002; Ruiz-Cano y cols., 2012; Thomas y Thomas, 2001).

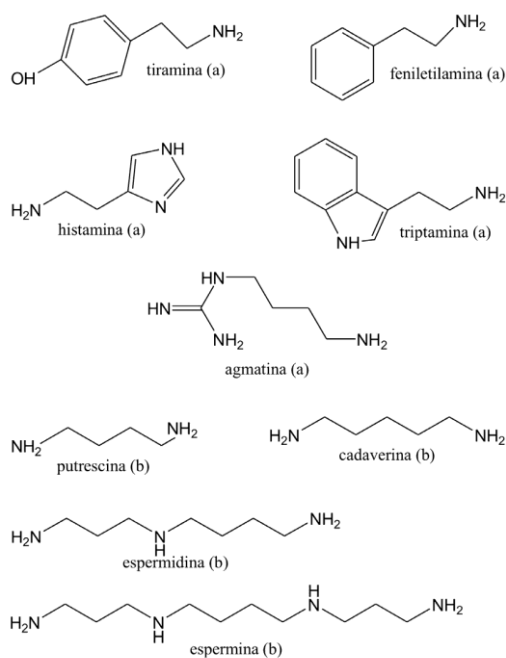


Figura 1. Estructura molecular de las poliaminas, tomado de Guasco-Herrera y cols. (2014).

2.2.1. IMPORTANCIA

Numerosos estudios han reportado la importancia de las poliaminas en la salud, ya que actúan como factores importantes en la protección de las células en los procesos de crecimiento, desarrollo, diferenciación y apoptosis, la maduración y mantenimiento del tracto gastrointestinal, en la estimulación del sistema inmunitario, en la modulación de diferentes actividades enzimáticas, en la carcinogénesis y en el crecimiento de tumores. Los niveles intracelulares de PA poseen efecto antioxidante y una función reguladora de la expresión génica por medio de diferentes mecanismos (Chattopadhyay y cols., 2003; Childs y cols., 2003; Igarashi y Kashiwagi, 2000).

Las poliaminas son buenos candidatos para inhibir la glucosilación, debido a su naturaleza policatiónica, su ubicuidad, su papel esencial en el crecimiento, su relativamente alta concentración en algunos tejidos (2 nM en la piel) y su alta concentración en el semen (10 mM), un fluido que contiene alrededor de 10 mM de fructosa (un agente glucosilante), además se ha podido comprobar que la espermina inhibe el avance de la glucosilación en histonas y en la ubiquitina, y que inhibe la glucosilación inducida experimentalmente por el metilglioxal. También se ha visto que la espermina y la espermidina actúan como inhibidores de la formación de productos de glicosilación avanzada (AGEs), que son los responsables de las retinopatías, neuropatías y nefropatías diabéticas, y están implicados también en patologías como la uremia y la aterosclerosis (Gómez-Gallego y cols., 2008; Gugliucci y Menini, 2003).

2.2.2. METABOLISMO DE POLIAMINAS

La biosíntesis de poliaminas en las células de mamíferos tiene lugar por la acción secuencial de cuatro enzimas clave, dos descarboxilasas y dos transferasas.

Se puede dividir en dos pasos principales mostrados en la figura 2:

1. Síntesis de la diamina putrescina (Put), la cual ocurre a partir de la descarboxilación de la L-ornitina (Orn) por la acción de la ornitina descarboxilasa (ODC). La Orn se forma a partir de la L-arginina (Arg) por acción de la arginasa (Mendoza y Rocha, 2002; Ruiz-Cano y cols., 2012).

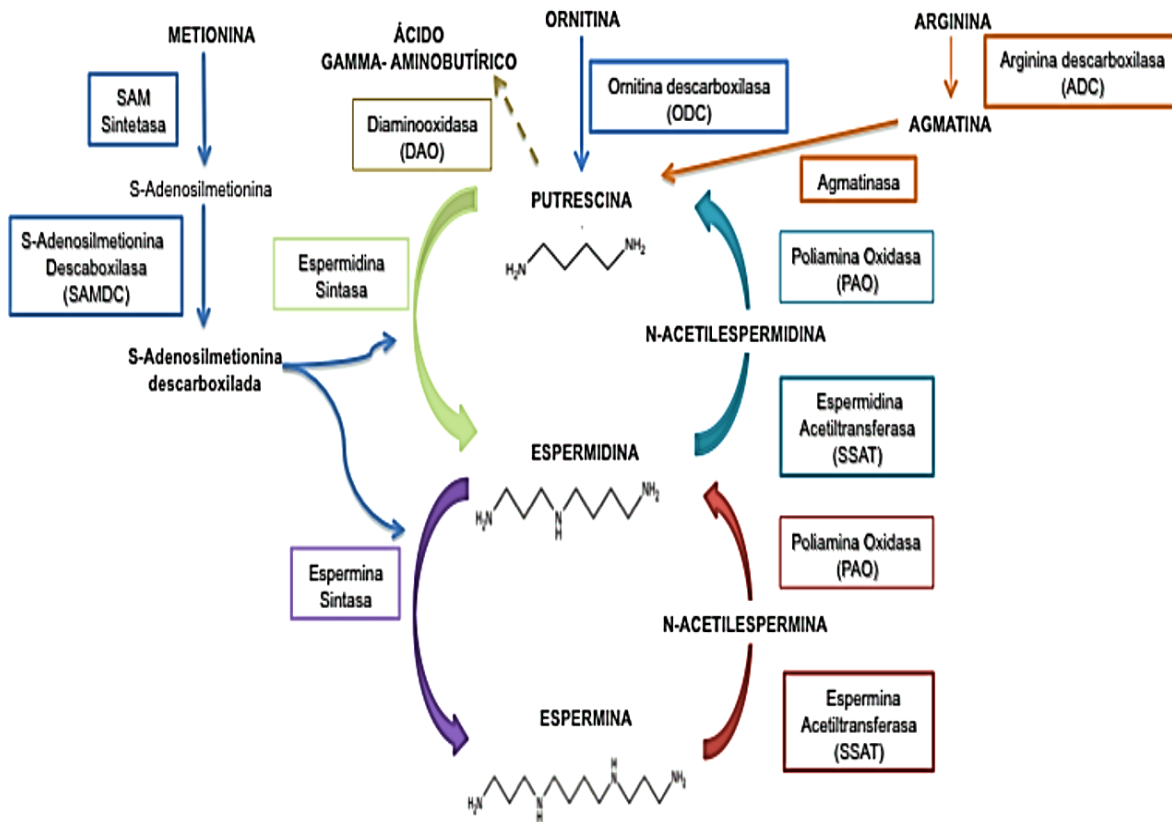


Figura 2. Metabolismo de las Poliaminas. Tomado de Guasco-Herrera y cols., (2014).

2. Síntesis de las poliaminas espermidina (Spd) y espermina (Spm) a partir de Put, que es convertida en Spd por acción de la espermidina sintasa y ésta a su vez es convertida en Spm por la espermina sintasa, ambas enzimas con actividad aminopropil-transferasa. La molécula donadora de estos grupos aminopropilo es la S-adenosil-metionina descarboxilada, surgida a partir de la L-metionina (Met), que es convertida primero en S-adenosilmetionina (SAM) y después descarboxilada por acción de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) (Mendoza y Rocha, 2002; Ruiz-Cano y cols., 2012).

La conversión de espermina en espermidina, y de ésta a su vez en putrescina tiene lugar por la acción de las espermina/espermidina N-acetil-transferasas, que catalizan la transferencia de un grupo acetilo procedente del acetil-CoA a un grupo aminopropilo de la espermina y espermidina, respectivamente, y por acción de la poliamina oxidasa (PAO) (Mendoza y Rocha, 2002; Ruiz-Cano y cols., 2012).

La homeostasis de las poliaminas está fuertemente regulada y depende del equilibrio entre la velocidad de su biosíntesis, catabolismo, excreción y absorción. El transporte a través de la

membrana está reconocido como un factor importante en la homeostasis de poliaminas (Mendoza y Rocha, 2002; Ruiz-Cano y cols. 2012).

2.2.3. POLIAMINAS Y REGULACIÓN GÉNICA

Las PA participan en la condensación y agregación del DNA, se ha visto que Spd y Spm se unen fuertemente a los surcos menores y mayores de la doble cadena favoreciendo su estabilización, así como un efecto protector de la desnaturalización y agentes ionizantes como la radiación y especies reactivas de oxígeno (ROS); también se ha reportado que modulan la conformación cuádruplex en la región promotora (Guasco-Herrera y cols., 2014; Wang y cols., 2012).

El incremento en la concentración intracelular de poliaminas puede causar la interrupción de la metilación celular, lo cual puede conducir a la expresión anormal de genes y a la interrupción de otros procesos celulares dependientes de la metilación, se ha reportado que las PA afectan la expresión de genes como *c-myc*, *c-fos*, *p21*, *p53* (Bhattacharya y cols., 2009; Landau y cols., 2012).

2.3. La rata como modelo biológico

La rata (*Rattus norvegicus*) como modelo biológico experimental, es una especie que tiene las cualidades necesarias para dar respuesta al cuestionamiento de cómo estudiar las enfermedades que afectan al hombre; la rata y el ratón están entre los mamíferos que responden más uniformemente a esos requerimientos, son de fácil manejo y poseen las características zootécnicas adecuadas (Suárez-García y cols., 2012).

La rata tiene un periodo gestacional de aproximadamente 21 días y su camada es de cerca de 10 individuos, su ciclo estral dura de 4 a 5 días y presenta una baja tasa de malformaciones espontáneas (Erb, 2006).

El método de apareamiento más utilizado es el del trío, que consiste en colocar dos hembras por macho al anochecer y por la mañana siguiente se efectúa un frotis vaginal entre las 8:00 y las 9:00 h, por lo general se define el tiempo cero de gestación como la media noche anterior, al día cuando se encuentran espermatozoides en el fluido vaginal; en algunos casos es posible observar un tapón vaginal (Erb, 2006).

La fertilización ocurre en el ampulla del oviducto, la primera segmentación (asincrónica) ocurre entre las 20 y 25 h posteriores a la cópula, en las próximas 74 h se dan divisiones mitóticas sin

aumento de masa citoplasmática, dando lugar a las blastómeras; a las 96 h se forma una mórula de 12 a 16 células, en las siguientes 12 h se forma el blastocisto mediante un reacomodo de las blastómeras conocido como cavitación y por acumulación de fluido en el interior. Una vez que el blastocisto se ha formado, el destino de cada célula queda comprometido, las que queden dentro formarán la masa celular interna (MCI) que darán origen al nuevo individuo y las exteriores se constituirán en el trofoblasto que se convertirá en los anexos embrionarios (Erb, 2006; Gilbert y Barresi, 2016).

La implantación comienza con la adhesión del blastocisto en la tarde del día cinco, en una zona especial del endometrio mediante el proceso de orientación, en él se da un proceso de decidualización, este proceso dura cerca de 48 h, una vez completada el embrión inicia la gastrulación y posteriormente la neurulación en los días 8 y 10.

El MCI se diferencia en tres capas germinales:

Ectodermo: (Del Gr. ektos: fuera y derma: piel). Del ectodermo derivan: el sistema nervioso, los sentidos, la piel y sus anexos: uñas, pelos, escamas, plumas, glándulas sudoríparas y sebáceas, entre otras (Curtis y cols., 2008).

Mesodermo: (Del Gr. mesos: medio y derma: piel). Del mesodermo derivan: el esqueleto, los músculos, el aparato urinario, el aparato genital, el aparato circulatorio, la sangre, entre otros (Curtis y cols., 2008).

Endodermo: (Del Gr. endon: dentro y derma: piel). Del endodermo derivan: el aparato digestivo y sus glándulas anexas: el hígado y el páncreas, el aparato respiratorio entre otros (Curtis y cols., 2008).

Posterior a la neurulación, se lleva a cabo la organogénesis, dura cerca de una semana (entre los días 10 y 17), donde aparecen los primordios de órganos, se diferencian y alcanzan la morfología adulta, excepto por el tamaño (Erb, 2006; Gilbert y Barres, 2016).

2.4. Especies Reactivas de Oxígeno

El oxígeno molecular (O_2) es uno de los gases más importantes de la Tierra, constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua de mar y al menos 47% de la corteza terrestre. Por lo mismo, la mayor parte de los seres vivos utiliza el oxígeno para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula se forman moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs), como el superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el peróxido de hidrógeno, así como los oxiradicales (O_2 singulete y doblete) (Fig. 3). Debido a su función primordial de producción de energía química, la mitocondria es considerada la mayor productora de EROs (Hansberg, 2002).

Las EROs regulan varios procesos celulares, en el caso de mamíferos son la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas (comunicación entre células), la unión de las proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, regulación de los transportadores y canales de iones, por citar algunos. Sin embargo, las EROs también resultan nocivas para los organismos cuando se producen en grandes cantidades, ya que dañan los constituyentes celulares e inducen la muerte celular. Así, el estrés oxidativo generado por la sobreproducción de EROs está asociado al envejecimiento y patologías como la obesidad y la DM tipo 2, entre otras (Macedo, 2012).

La molécula de oxígeno es un birradical libre (figura 3), es decir, posee dos electrones no apareados, cada uno localizado en un orbital π de antiunión (π^*) (Macedo, 2012).

En la molécula de oxígeno, los electrones no apareados poseen giros paralelos, de tal manera que para que el O_2 oxide otro átomo o molécula, éste tendría que aceptar un par de electrones con giro contrario o aceptar un solo electrón a la vez (limitación del giro o "spin"). Si un solo electrón se adiciona al O_2 , éste se localizará en uno de los orbitales π^* de antiunión y el producto será el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). De la adición de un electrón más, resultará el ión peróxido, el cual se protona rápidamente en el ambiente celular para producir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 , producto de la dismutación del superóxido, puede cruzar las membranas biológicas y aunque es relativamente poco reactivo, a partir de éste y en presencia de metales de transición reducidos, la reducción parcial del peróxido genera el radical hidroxilo ($\cdot OH$), uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza. Cuando el metal involucrado es el Fe^{2+} , la reacción es conocida como reacción de Fenton (Fig. 4). En los sistemas vivos la reacción que genera radicales hidroxilos además de la reacción de Fenton, es conocida como la reacción de Haber-Weiss (Fig. 4), en la cual en presencia de superóxido y peróxido de hidrógeno se generan más radicales hidroxilos (Czapski y Goldstein 1986).

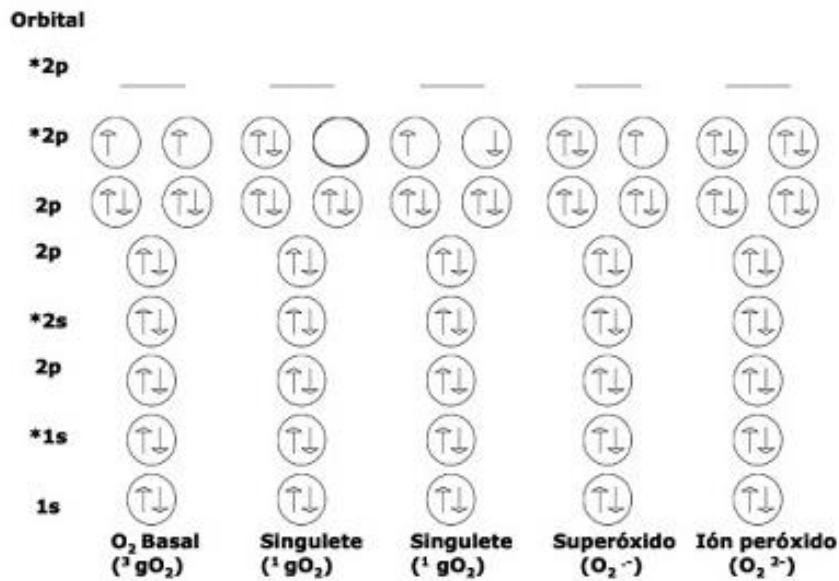


Figura 3. Estructura electrónica del Oxígeno y de las diferentes especies reactivas de oxígeno. Tomado de Macedo (2012).

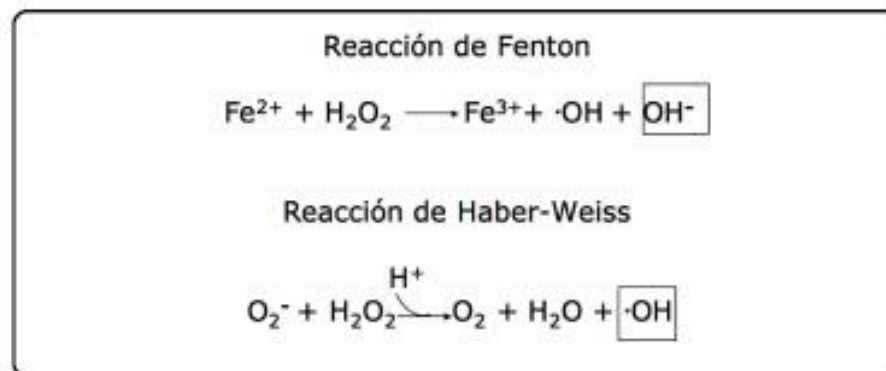


Figura 4. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en las cuales se produce el radical hidroxilo. Tomado de Macedo (2012).

Es importante notar que EROs es un término amplio usado para describir todos los intermediarios reactivos del oxígeno, que incluyen oxirradicales (singuletes y dobles) y no radicales (H₂O₂). Los oxirradicales son dañinos cuando se producen en grandes cantidades, porque indiscriminadamente pueden reaccionar con biomoléculas. Los principales objetivos para la oxidación por EROs son los dobles enlaces en los lípidos, los residuos de cisteína y metionina en las proteínas, y la posición C8 en la desoxiguanosina (existen muchos otros objetivos, pero estos parecen ser los más comunes) (Macedo, 2012).

El metabolismo oxidativo se da en la mitocondria (Fig. 5), el organelo con mayor importancia dentro de la producción de ATP, molécula indispensable para el organismo porque de ella es

liberada la energía necesaria para los diferentes procesos vitales, por esto considerada como la principal fuente de radicales libres, ya que al producirse el metabolismo oxidativo se da la reducción tetraelectrónica del oxígeno con un consumo del 95 al 98% de este elemento. El restante 2 a 5% de oxígeno tiene una tendencia de recibir un electrón por vez, reducción monoelectrónica, formando durante estas reacciones una serie de intermediarios tóxicos: las especies reactivas de oxígeno (Corrales y Muñoz, 2012).

La formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) es inherente al metabolismo aeróbico. Por medio del cual se obtiene energía de las diferentes moléculas en las células; y en este sentido la glucosa no es la excepción; aún más, la glucosa es la principal molécula que se oxida para dar energía, además de ser la más abundante en la célula y en el organismo para fines metabólicos (Calderó y cols., 2013).

Si bien es posible obtener las ERO en varias reacciones oxidativas del glucolisis y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sin duda la mayor probabilidad de generar estas especies está en la cadena transportadora de electrones, donde se tiene la energía libre y el potencial redox adecuado para poder reducir parcialmente al oxígeno y con ello generarlas. De manera especial se ha considerado la reacción oxidorreductora del paso de electrones del complejo I o II por la coenzima-Q hacia el complejo III, en donde se puede reducir parcialmente al oxígeno y generar el radical $O_2^{\cdot-}$. Esta reacción es sin duda la más frecuente e importante para generar $O_2^{\cdot-}$, sin embargo, otros elementos de la cadena respiratoria como son los complejos I, II y III también pueden producirlo (Green y cols., 2004) Otros sistemas de oxidación y la acción de la célula para eliminar al $O_2^{\cdot-}$ terminan por generar como productos de reducción parcial, otras ERO como el OH· y el H_2O_2 , mismos que si no son eliminados por el sistema amortiguador antioxidante terminan por causar daño oxidativo (Calderó y cols., 2013).

De forma secundaria a la acción fisiológica del metabolismo catabólico y como resultado de productos secundarios indeseables de la oxidación inherente para degradar, obtener y producir energía en el organismo, se genera una cantidad de las ERO, sin necesidad de utilizar nada patológico o externo (Calderó y cols., 2013).

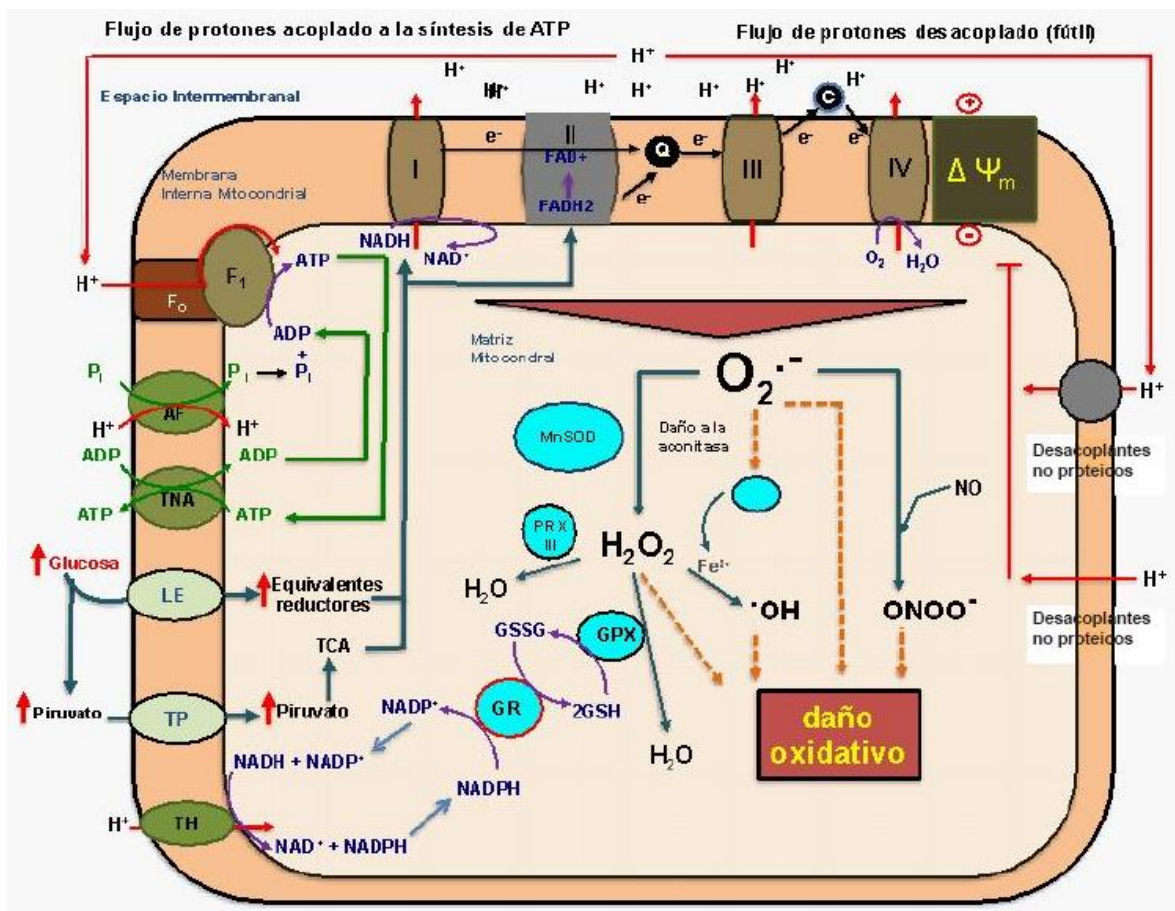


Figura 5. Modelo propuesto para explicar la participación de la mitocondria en la inducción del daño oxidativo. Tomada de Calderó y cols. (2013).

Las EROs se han encontrado en concentraciones elevadas en numerosas enfermedades, y se ha propuesto que intervienen en la teratogénesis causada por la diabetes en el embarazo (Hagay y cols., 1995; Ornoy y cols., 1999). Estas pueden ser perjudiciales para las principales funciones de la célula, ya que al reaccionar con los ácidos grasos insaturados en las membranas originan lipoperoxidación, lo que a su vez causa una disminución en la fluidez de la membrana y la formación de aldehídos reactivos, de esta manera se pueden difundir a otras partes de la célula y tener sinergia con macromoléculas. Así mismo las ERO pueden reaccionar directamente con las proteínas, dando como resultado, por ejemplo, entrecruzamientos del colágeno con el DNA, lo que causa daños tanto a las bases como a los azúcares, además de la oxidación directa de las bases y azúcares del DNA (Cederberg y cols., 2001).

Se han descrito evidencias que indican la participación del EROs en la embriopatía diabética (Cederberg y cols., 2001; Fernández y cols., 2013):

- La diabetes *in vivo* y la hiperglucemia *in vitro* causan daños en los tejidos por radicales libres, un aumento de lípidos peroxidados, un incremento en la frecuencia de DNA dañado y un acrecentamiento intracelular en radicales libres.
- Los problemas de desarrollo observados *in vivo* en ratas diabéticas preñadas, y en los embriones cultivados *in vitro* a altas concentraciones de glucosa, pueden ser inducidos por la producción enzimática de $O^{\cdot-}_2$ en los sistemas de cultivos de los embriones.
- Los antioxidantes de bajo peso molecular, al ser añadidos a la dieta, disminuyen la tasa de malformaciones en el embarazo de ratas diabéticas.

2.5. Estrés oxidativo

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

El concepto de equilibrio prooxidante-antioxidante es fundamental para comprender el estrés oxidativo por varias razones. En primer lugar, hace hincapié en que la perturbación puede ser causada por varias razones: por ejemplo, una generación anormalmente alta de ERO y deficiencias antioxidantes. En segundo lugar, destaca las concentraciones homeostáticas de ERO. Aunque se pensaba que las ERO solo tenían un efecto negativo en la salud, ahora se reconoce que desempeñan un papel fundamental como mensajeros secundarios en muchas vías de señalización (Burton y Jauniaux, 2011; Dröge, 2001).

La gestación es una situación que requiere de una adaptación metabólica especial. Durante la gestación la unidad feto-placentaria se desarrolla a expensas de la madre (Clapés, 2009). Se cree que es debido al incremento por parte de la placenta en cuanto a la actividad mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno. La producción de especies reactivas de oxígeno se da con el fin de producir señales de transducción o combatir patógenos. Durante estadios tempranos del embarazo, el ambiente intrauterino (feto y placenta) se considera hipóxico. La placenta depende de nutrición histotrófica (succión de nutrientes desde el medio exterior), por lo que recibe el oxígeno de la circulación materna, el cual presenta un gradiente de concentración entre la madre y el feto. A finales del primer trimestre, la tensión de oxígeno comienza a aumentar, por lo que las especies reactivas de oxígeno también se elevan. Este momento se relaciona con un incremento en la producción de RNA mensajero de enzimas antioxidantes para generar un balance. El cambio en la tensión de oxígeno que se menciona, es importante para la

implantación embrionaria y la angiogénesis placentaria, que más adelante determina el crecimiento fetal. El desarrollo de estrés oxidativo depende de qué tan severo sea el cambio tensional de oxígeno y de la efectividad de los antioxidantes placentarios por lo que se puede concluir que juega un papel fisiológico o patológico según sean las condiciones (Leal y cols., 2011, Myatt y Cui, 2004;).

Para la madre diabética, el embarazo puede generar serios trastornos que involucran a su descendencia. Esto se debe a que en las primeras etapas de la gestación, cuando aún no se evidencian cambios en la sensibilidad frente a la insulina, el páncreas de la mujer embarazada está produciendo mayor cantidad de ésta. La adaptación del tratamiento hipoglucemiante en la embarazada diabética será difícil e imprescindible durante todo el embarazo. En el último tercio de la gestación se produce una resistencia generalizada a la insulina. Estos cambios se acompañan de incremento en la actividad lipolítica del tejido adiposo, por lo que llega al hígado mayor cantidad de sustratos para la síntesis de triglicéridos, los que salen a la circulación asociados con las lipoproteínas de baja densidad (LDL). También se producen cambios en la lipasa lipoproteica (LPL), la cual disminuye su actividad y en la actividad de la lipasa hepática (HL), de cuya inactivación es responsable el incremento en la cantidad de estrógeno (Clapés, 2009).

Antes de la organogénesis el embrión avascular es fisiológicamente hipóxico (2%-5% O₂) comparado con la circulación materna (20% O₂). El incremento de la masa celular causa un estado fisiológico de hipoxia, que lleva a la activación de genes que inducen la formación del sistema circulatorio fetal (García-García, 2009), cuando hay un aporte mayor de glucosa desde la madre hacia el producto, se obliga a los tejidos embrionarios a consumir más O₂ y como consecuencia hay un aumento en el metabolismo oxidativo. Finalmente, se tiene una alta producción mitocondrial del radical superóxido, lo que genera así estrés oxidativo (Li y cols., 2007; Wentzel y cols., 2003). Varias vías explican el papel del radical superóxido en la disfunción del endotelio. La activación de las células endoteliales provoca que se liberen factores quimiotácticos y citocinas que incrementan aún más la liberación de esta especie reactiva, que se une al NO para dar peroxinitrito (NOO[·]) y hay menor disponibilidad de NO, por lo que se afecta la regulación del tono vascular además de producirse mayor daño, pues el producto de esa reacción es un radical aún más reactivo. Es importante considerar que la hiperglicemia intracelular genera un incremento del Ca²⁺, lo que activa la señal para el incremento de la cascada del ácido araquidónico (AA) y da lugar a la formación de tromboxanos vasoconstrictores como el TXA₂ (Davidge, 1998; Clapés, 2009).

Diversos estudios han aportado evidencias de que la glucosa puede mediar efectos embriotóxicos a través de la generación de EROs o a través de la liberación o catabolismo del

AA, prostaglandinas (PG) o *mio*-inositol (Clapés, 2009). Esto ha llevado a diversas investigaciones para la utilización de diferentes agentes antioxidantes, para intentar frenar los defectos congénitos a causa de la embriopatía diabética, con los que se han obtenido respuestas favorables, dentro de los cuales se encuentran: la N-acetilcisteína (Roest y cols., 2007), el resveratrol (Shing y cols., 2011; Trejo-González y cols., 2015), la vitamina E (Cederberg y cols., 2001; Gäreskog y cols., 2006), el ácido fólico (Gäreskog y cols., 2006, Wentzel y Eriksson y cols., 2005), la vitamina C (Cederberg y cols., 2001) el ácido alfa-linolénico (Chirino-Galindo y cols., 2017) y las poliaminas espermina y espermidina (Méndez y Palomar-Morales, 1999; Chirino-Galindo y cols., 2009, 2012).

2.6. Apoptosis

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

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

que su ambiente intracelular ha sido comprometido y, como consecuencia, desarrolla un proceso de suicidio usando una maquinaria molecular de muerte celular (Li y cols., 1997).

2. 6.1. APOPTOSIS Y EMBARAZO COMPLICADO CON DIABETES MELLITUS

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

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

Por otro lado, se ha encontrado que la diabetes materna y las altas concentraciones de glucosa experimental inducen daño en el DNA mediante el aumento de la fosforilación de *H2A.X*, lo que activa la vía de señalización de respuesta al daño del DNA (*DDR*) y su flujo descendente efector, el *p53* (fig. 6). Además, el estrés oxidativo es responsable del daño al DNA y la activación de *DDR*. Por lo tanto, esto pueden desempeñar funciones críticas en la apoptosis inducida por la glucosa elevada y embriopatía inducida por la diabetes materna (Dong y cols., 2015).

Sin embargo, el papel que juega la madre con diabetes en el daño a nivel DNA del embrión aún no está claro. Se plantea que el estrés oxidativo es la causa vital del daño al DNA. Para mantener la estabilidad genética en caso de daño a nivel DNA, se activa la respuesta al daño del DNA (*DDR* por sus siglas en inglés). Se activan vías para el reconocimiento de lesiones de daño, promoviendo así la reparación en DNA. La *DDR* se compone de dos vías principales: de Ataxia-telangiectasia mutated (*ATM*)-Checkpoint 2 (punto de verificación 2), *ATM-Chk2*, y ATR-Rad3-related (*ATR*)-Checkpoint 1 (punto de verificación 1), *ATR-Chk1*. El *DDR* dependiente de

ATM-Chk2 está activado principalmente en respuesta a rupturas de DNA de doble cadena (Double strand DNA breaks, DSBs). La ATM activada posee actividad quinasa, que fosforila múltiples sustratos, incluidos Chk2, p53 y la histona H2A.X. La vía ATR-Chk1 se activa por radiación UV, IR, metanosulfonato de metilo (MMS) y mitomicina (MMC), en respuesta a estancamiento las horquillas de replicación del DNA y el daño, causan la fosforilación de Chk1 en serina 345. La fosforilación de Chk1 potencia su actividad tipo cinasa y fosforila sus sustratos a la baja y facilita la detención del ciclo celular y la reparación de daños en el DNA. Aunque también, las vías ATM-Chk2 y ATR-Chk1 pueden ser activadas a causa del estrés oxidativo (Dong y cols., 2015).

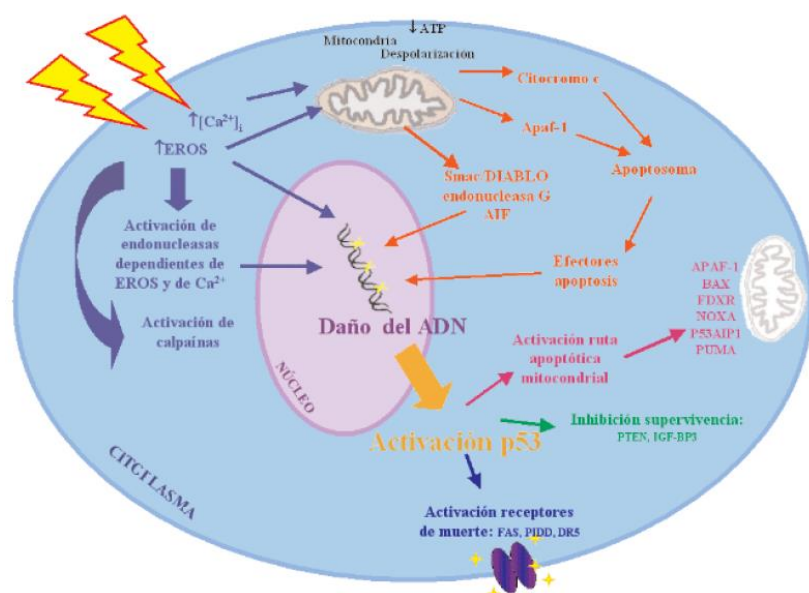


Figura 6. Ruta de señalización de la proteína p53 en procesos apoptóticos. Tomada de Gómez-Lázaro y cols. (2004).

2.7. El factor de transcripción p53

La familia de proteínas p53 es el grupo más estudiado, y el factor de transcripción p53 (oficialmente conocido como TP53) tiene el mayor número de publicaciones. Desde su descubrimiento en 1979 (Lane y Crawford, 1979; Linzer y Levine, 1979), el papel de p53 como supresor de tumores somáticos central ha sido bien documentado. Además, se han descubierto y estudiado sus funciones en la regulación de las redes metabólicas (Vousden y Ryan, 2009) y en la implantación embrionaria (Hu y cols., 2007). La investigación en estas funciones no supresoras se ha iniciado con el descubrimiento de sus duplicados, p63 y p73 (TP63 y PT73, respectivamente), en la década de 1990 (Gebel y cols., 2017).

El gen *p53*, es también conocido como el guardián del genoma; en humanos, el *locus* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p1.3) y de sus 11 exones, la secuencia del exón 1 no es codificante, mientras que el exón 2 presenta dos sitios probables de inicio de transcripción y el exón 11 contiene el codón de terminación y una gran secuencia no codificante. La traducción del mRNA de este gen da lugar a una proteína de 393 aminoácidos (aa) con tres dominios funcionales diferenciados: el amino terminal, el central y el carboxilo terminal. El dominio amino terminal (aa 1-70) se implica en la activación de la transcripción de los genes diana, donde se localiza una subregión (aa 20-97) rica en prolina (cinco copias de la secuencia PXXP). El dominio central (aa 100-300) contiene la región de unión a secuencia específica de DNA, y es la región más conservada de la proteína; este dominio presenta una estructura de dos hojas β , estabilizando la estructura un átomo de zinc. Por último, el dominio carboxiloterminar (aa 300-325) está constituido por: una región flexible que contiene una zona de tetramerización (aa 325-356) y un extremo básico (aa 363-393). En estado de latencia, la región carboxiloterminar de *p53* se pliega sobre el dominio central de la proteína y evita así su unión al ADN (Gómez-Lázaro y cols., 2004).

La proteína codificada por el gen supresor de tumor *p53*, es una fosfoproteína que se localiza en el núcleo celular. Esta proteína fue descubierta a finales de la década de los 70, e identificada como una fosfoproteína celular de 53 kD, capaz de enlazarse al antígeno transformante SV40 T, una propiedad que también es compartida por la proteína retinoblastoma, pRb. Inicialmente se sugirió que *p53* era un oncogén capaz de immortalizar las células por sí mismo, o capaz de transformarlas en conjunción con el oncogén *ras*. Más tarde se demostró que la forma mutante de este era responsable de los efectos descritos, mientras que la forma silvestre suprime la transformación. Una importante función de *p53* es efectuar el control del ciclo celular en el paso de G1 a S. Cuando se han producido lesiones en el DNA, *p53* detiene el ciclo celular en G1- S para dar tiempo a que actúen los sistemas de reparación del DNA y de esta forma asegura: la integridad genómica; la reparación y síntesis de DNA; la

diferenciación celular; la represión de la transcripción; la plasticidad genómica y la apoptosis. Mientras la forma silvestre de p53 actúa como un gen supresor de tumor recesivo, la forma mutante tiene las características de un oncogén dominante (López y cols., 2001).

La proteína silvestre p53 es un factor de transcripción capaz de activar y/o inhibir la transcripción de una amplia variedad de genes (Tabla 2). Cuando el DNA está dañado, p53 se activa para mantener la integridad de la secuencia de este; ya sea por detener la proliferación celular mientras el daño es reparado, o alternativamente, dirigiendo la célula hacia la apoptosis (Brown, 1997). La Figura 6 muestra algunas de las principales funciones de la proteína p53, tales como factores de transcripción, control del ciclo celular, inducción de la muerte celular programada y otras funciones relacionadas con la diferenciación neuronal, la supresión de la teratogénesis y el mantenimiento de la integridad genómica. La proteína mutante pierde su función supresora de tumor, etapa clave que resulta en la cascada neoplásica. Además, p53 es capaz de activar la vía apoptótica, por tanto, su inactivación podría incrementar el grupo de células proliferantes, así como su probabilidad de transformación neoplásica al inhibir la muerte celular programada. Por tanto, p53 es un factor de transcripción multifactorial, implicado en el control de la progresión del ciclo celular, integridad del ADN y supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan al ADN (Lane y Benchimol, 1990; Levine y cols., 1991; López y cols., 2001).

En un inicio, se postulaba que p53 no era fundamental para el funcionamiento correcto de la célula, quizá debido a que en condiciones fisiológicas la proteína se encuentra en estado latente y llega en algunos tejidos a presentar niveles indetectables por técnicas inmunocitoquímicas o por *Western Blot*, y a que los primeros estudios realizados en ratones con la proteína p53 mutada mostraron una embriogénesis normal. Sin embargo, en estudios posteriores se observó que una pequeña fracción de los embriones deficientes en p53 presentaban anomalías en el desarrollo, como defectos en el cierre del tubo neural (Gómez-Lázaro y cols., 2004).

Tabla 2. Genes cuya transcripción esta regula por la proteína p53. Tomada de López y cols. (2001).

Regulación positiva		Regulación negativa	
Gen	Función	Gen	Función
<i>waf1</i>	Progresión del ciclo celular	<i>PCNA</i>	Replicación del DNA
<i>Rb</i>	G1/S	<i>c-fos</i>	Regulación de la transcripción
<i>GADD45</i>	Reparación del DNA	<i>c-jun</i>	Regulación de la expresión génica
<i>mdm2</i>	Vía de autorregulación de p53	<i>mdm2</i>	Transducción
<i>Bax</i>	Apoptosis	<i>IL-2</i>	Regula el crecimiento
<i>Fas</i>		<i>Bcl</i>	Inhibición de la apoptosis
<i>Thromospondina</i>	Inhibidor de la angiogénesis	<i>Genes virales</i>	Diferentes funciones
<i>IGF-BP3</i>	Progresión del ciclo celular G1/M		

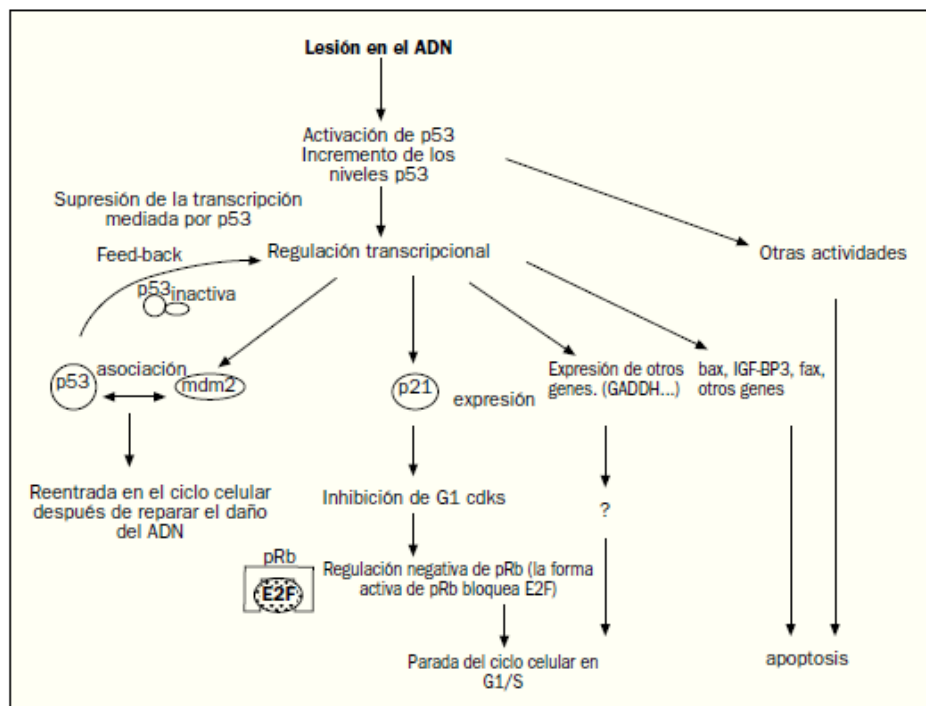


Figura 7. Funciones de p53 en respuesta al daño del DNA. Tomada de López y cols. (2001).

Existen evidencias de que el estrés oxidativo que se presenta durante un embarazo complicado con diabetes se genera un daño en el DNA, provocando que se active la vía de señalización DDR y por lo tanto la expresión del factor de transcripción p53 (Dong y cols., 2012; Gäreskog y cols., 2007).

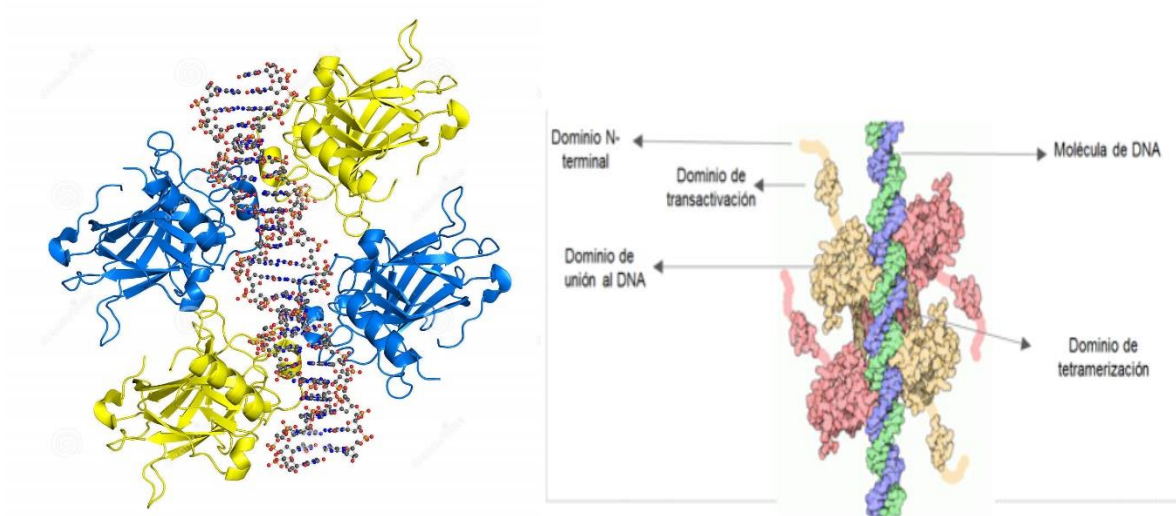


Figura 8. Estructura de la unión de p53 al DNA. Tomada de la página web del departamento de biología molecular de la Universidad de Salamanca.

3. ANTECEDENTES

Ha y cols. (1998) describieron que la espermidina es un potente captador de radicales libres, de manera que es capaz de proteger el DNA de los ataques de éstos. Por su parte, Méndez y Palomar-Morales (1999) demostraron que la embriotoxicidad causada por diabetes mellitus inducida por sustancias químicas en ratas, es revertida parcialmente por putrescina, espermina y espermidina, por lo que propusieron que los mecanismos de desarrollo normal y alterado podrían estar mediados por la acción de estas moléculas.

Fujisawa y Kadoma (2005) determinaron que las poliaminas espermidina, putrescina y sobre todo espermina, son eficientes en la erradicación de los radicales alquilo y peroxilo, y proponen a estas moléculas como candidatas para neutralizar los radicales libres que se generan, y de este modo evitar la lipoperoxidación. Chirino-Galindo y cols., en el 2009 describieron que las poliaminas protegen directamente al embrión del efecto tóxico de altas concentraciones de glucosa sobre el crecimiento y el desarrollo *in vitro*, mientras que la espermidina y la espermina previenen estos efectos casi por completo.

Gäreskog y cols. (2007) propusieron que la apoptosis puede estar implicada en la dismorfogénesis embrionaria inducida por la diabetes. Ellos estimaron la aparición de apoptosis en embriones de ratas a altas concentraciones de glucosa. En el día gestacional 10, encontraron que el nivel de p53 no fue distinto entre los grupos de ratas madres normales y diabéticas. Además, en el día 11 encontraron un aumento de la expresión génica en los embriones de las ratas diabéticas en comparación con los embriones de ratas sanas, por lo que concluyeron que la expresión de dicho gen tiene una relación directa con la actividad teratogénica de la DM.

Dong y cols. (2015) describen el daño del DNA y la respuesta de daño del DNA (DDR) en la etapa de neurulación de embriones bajo las condiciones de diabetes materna. En este estudio se muestra que cuando hay altas concentraciones de glucosa o DM inducida, el p53 se acumula en los embriones. Por lo que se concluye que el p53 es un factor de transcripción que induce la detención del crecimiento celular o Apoptosis.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM es síndrome que ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas, particularmente en las grandes ciudades. A pesar de que el uso de la insulina ha logrado dar una mejor calidad de vida a la población con esta enfermedad, siguen faltando estudios que ayuden a disminuir de forma considerable el problema que esta enfermedad genera (ENSANUT, 2016).

Se sabe que este síndrome metabólico es más común en el embarazo. Esto no es favorable para el embrión, ya que el ambiente hiperglucémico al que está sometido la unidad feto-placentaria puede producir altos niveles de EROs, generadas por el incremento en estrés oxidativo, lo que provoca así malformaciones congénitas y daños irreparables en el embrión, especialmente en el periodo de la organogénesis temprana, lo que puede causar daños multisistémicos, cambios en la morfología, la proliferación celular, la disminución en defensas antioxidantes y cambios en la expresión de genes reguladores del desarrollo y la apoptosis (García y García, 2009).

En estudios anteriores, se ha propuesto que el efecto embrioprotector de las poliaminas espermina y espermidina, puede ser mediado por la capacidad antioxidante de estas moléculas ante eventos de estrés oxidativo provocados por un estado hiperglucémico (Chattopadhyay y cols., 2003; Chirino-Galindo y cols., 2012; Méndez y Palomar-Morales, 1999).

Por esto, se han intentado dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales la DM induce defectos y malformaciones congénitas. Por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo contribuir al entendimiento del rol que juegan las proteínas de señalización apoptótica como lo es el factor de transcripción p53 en dicha enfermedad y así poder aportar avances a la prevención de las malformaciones provocadas por la glucosa en el embarazo diabetogénico, utilizando un modelo *in vitro* de embriopatía diabética en suplementado con las poliaminas espermina y espermidina.

5. HIPOTESIS

Se sabe que el incremento en el estrés oxidativo provoca daño al DNA y trae consigo la respuesta de daño del DNA (DDR) en la etapa de neurulación de embriones bajo las condiciones de diabetes materna, lo que aumenta la apoptosis. Se ha demostrado que la expresión del gen *p53* se ve afectada por los altos niveles de glucosa en ratas diabéticas preñadas (Dong y cols., 2015; Gäreskog y cols., 2007), lo cual está relacionado con MC desarrolladas en dichos embriones, especialmente durante la organogénesis temprana. Así mismo, se ha demostrado que las poliaminas tienen un efecto potente sobre los daños que causan estas elevadas concentraciones de glucosa, así como sobre la expresión de genes reguladores de la apoptosis, como es el caso del factor de transcripción p53 (Guasco-Herrera, y cols., 2014); por lo que se cree que la adición de poliaminas a medios de glucosa alta, en cultivos primarios de embriones de ratas Wistar, podrían reducir la frecuencia y severidad de malformaciones, además de influir en la expresión del gen p53.

6. OBJETIVOS

✓ General

- Evaluar el efecto de las poliaminas sobre la expresión del gen p53 en embriones de rata cultivados en presencia de altas concentraciones de glucosa.

✓ Particulares

- Demostrar que la glucosa afecta la expresión del gen y proteína p53 en embriones de rata cultivados *in vitro*.
- Comprobar que las poliaminas espermina o espermidina adicionadas al cultivo de embriones en presencia de altas concentraciones de glucosa previenen el efecto que esta causa sobre la expresión del gen y la proteína p53.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Modelo biológico

Se utilizaron 25 ratas hembras, sanas, adultas, de la cepa *Wistar*, que fueron cruzadas por el método de trío con machos sanos, de la misma cepa. Al día siguiente se tomó un frotis vaginal y se asignó como día 0 cuando se observaron espermatozoides. Las ratas se sacrificaron el día 10.5 de gestación, se obtuvieron los embriones que fueron incubados en medios de cultivo control, glucosa, espermina y espermidina durante 24 h a 37°C. Todos los procedimientos en animales de bioterio fueron llevados de la manera más humanitaria posible, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

Adicionalmente se tuvo un control externo, que consistió en embriones de 11.5 días de edad gestacional, obtenidas de 5 ratas gestantes sacrificadas el día indicado.

7.2. Medios de cultivo

Se prepararon los medios de cultivo de acuerdo a lo descrito por Chirino (2007); se utilizó un medio para control, un medio con elevada glucosa, un medio con elevada glucosa y suplementado con espermina, y un medio glucosa-espermidina, como se describe en la tabla 3, con al menos 20 embriones por grupo, que fueron utilizados para la técnica de Western Blot, PCR y RT-PCR y PCR Semicuantitativa.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivos. La glucosa, los antibióticos y las poliaminas se disolvieron en la cantidad necesaria de solución salina para dar una concentración indicada final en el medio de cultivo, se gasificaron de 3-5 minutos con una mezcla de CO₂, O₂ y N₂ al 5:20:90 antes de ser utilizados.

	Suero de rata	Glucosa	Antibióticos	Espermina/espermidina
Control	80%	100mg/dL	1000UI/mL penicilina	-----
Glucosa		500mg/dL		100µg/mL estreptomycinina
Espermina			25µM	
Espermidina				

7.3. Estudio morfológico

Posterior a la incubación, se realizó en los embriones un análisis morfológico completo, que incluye conteo del número de somitas, medición de longitud céfalo-caudal y porcentaje de malformaciones (Klug y cols., 1985), que se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros del análisis morfométrico. Modificado por Chirino (2007), desde Klug y cols. (1985).

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

	2	Ausencia de primordio
Desarrollo de la cola	5	Cola alargada y se pueden reconocer somitas de la cola
	4	Cola alargada, pero no se reconocen somitas
	3	Primordio de la cola
	2	Ausencia de primordio de la cola
Presencia de Sangre	4	Circulación sanguínea reconocible
	3	Islotes sanguíneos reconocibles
	2	No hay indicación en la formación de sangre
Total		Máximo 50

7.4. Western Blot para la proteína p53

I.-HOMOGENIZADO DE EMBRIONES

Se tomaron dos embriones postcultivo por grupo en un vial tipo eppendorf de 1.5 mL, al que se agregaron 100 μ L de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; ortovanadato de sodio 1 mM NaF 10 mM; Fenil-metil-sulfonil-fluoruro 1 mM; Tritón X-100 1% suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas 1 mg/mL) (Yang y cols., 2008), se homogenizó con un vástago de plástico estéril en frío. Posteriormente se sonicó a 20 W por 4 seg, y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante para posteriormente hacer la cuantificación de proteínas.

II.-DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

El contenido total de proteínas se estimó por el método de Lowry y cols. (1951) en cada muestra a partir de una alícuota de 10 μ L de lisado, previo a la electroforesis.

- Electroforesis PAGE-SDS. En esta electroforesis se utiliza el detergente dodecil-sulfato de sodio (SDS), en el cual las proteínas migran de acuerdo a su peso molecular, ya que en éste detergente se conjuntan las proteínas y causan que todas tengan carga eléctrica. Se ocuparon dos geles de 1.5 mm de espesor: el inferior es el gel separador o de resolución que está al 10% de poliacrilamida, pH 8.8, y el superior es el gel concentrador que está al 5% de poliacrilamida, pH 6.8 en una cámara de electroforesis (BioRad Mini-PROTEAN Tetra System). En uno de los carriles se cargaron 5 μ L de patrón molecular estándar (BioRad Precision Plus Protein™ All Blue Standards), con

ayuda de una microjeringa Hamilton. Se corrió a 80 V hasta que se concentraron las proteínas, para posteriormente correr a 120 V para resolver (Yábar, 2003).

- Electrotransferencia. Al terminar la electroforesis, se retiró la parte del gel concentrador, y con el resto del gel (gel de resolución) se hizo la transferencia semi-seca. Para la transferencia de las proteínas se sumergió la membrana (Amersham HybondTM-P GE Healthcare) de di-floruro de polivinilo (PVDF) en metanol absoluto por 5 minutos para quitar los residuos de pegamento, después por 5 minutos en agua deionizada para eliminar residuos de metanol. Terminado el tiempo se sumergió en una solución de buffer de transferencia 5X preparado de la siguiente manera: 40 mL del buffer de transferencia 5X, 120 mL de agua deionizada y 40 mL de metanol absoluto y se dejó enfriar a 4°C 15 minutos, posteriormente se sumergió el papel filtro junto con la membrana PVDF en la solución. Las membranas, el gel y el papel filtro se dispusieron en forma de sándwich (Papel filtro, gel, membrana PVDF y papel filtro) en la cámara de transferencia donde se usó un sistema semiseco (Trans-blot SD BioRad) durante 60 minutos a 19V. Terminado el proceso los geles fueron desechados y las membranas se pasaron a buffer TBST 1X hasta el bloqueo de proteínas.
- Bloqueo de proteínas. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en amortiguador TBST 1X durante 2 horas; posteriormente se incubó toda la noche con el anticuerpo primario (IgG monoclonal de ratón anti-p53) Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA) en dilución 1:1000 (1 µL de anticuerpo en 1.0 mL de leche descremada al 5%). Al día siguiente las membranas fueron lavadas 4 veces por 5 minutos con TBST 1X, una vez terminados los lavados, fueron incubadas por dos horas con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón elaborado en bovino) usando la misma dilución (1:1000). Terminado el tiempo nuevamente fueron enjuagadas con TBST 1X (las incubaciones y enjuagados se realizaron en un agitador (mini-orbital-GenieTM). Realizado el último lavado las membranas se colocaron en el mismo buffer hasta el revelado.
- Revelado. El revelado se realizó en un cuarto oscuro. Las membranas de PVDF fueron colocadas en una superficie plana de vidrio, con una solución de luminol (Immuno Cruz, Santa Cruz Biotechnology), posteriormente se colocaron en el hypercassette, cubriéndolas con un acetato y se colocó la película (Amrsham Hyperfilm TM-ECL GE Healthcare) sobre cada membrana, se cerró el hypercassette por 12 minutos, se sacó la película y se sumergió en solución reveladora por 3 minutos, se enjuagó con agua desionizada, se colocó en solución fijadora por otros 3 minutos y se enjuagó de nuevo

con el agua. Se dejó secar a temperatura ambiente, se guardó en una bolsa de plástico para evitar que se maltratara, hasta su interpretación.

- Se digitalizaron, para cada imagen fue seleccionada cada banda visible utilizando la herramienta de rectángulo del software GelQuantNET. Comenzando con la banda actina y luego las de la proteína p53, se obtuvo la intensidad (densidad) para cada una.

7.5. Expresión del gen p53

I. DISEÑO DE *PRIMERS*

Los *primers* fueron diseñados con el programa Primer-Blast a partir de la secuencia que codifica para el DNA complementario (cDNA) de los genes *p53* y *gamma-actina*, este último se utilizó como gen constitutivo, de *Rattus norvegicus* (Rata) que pueden ser consultados en la base de datos Gen Bank en la sección de nucleótidos. Se corrió una PCR punto final un gradiente de temperatura de DNA de hígado de Rata, para determinar la temperatura de alienación de los primers y secuenciar los productos. Estas secuencias se revisaron en la base de datos de BLAST para ver la identidad.

Tabla 5. Características de los *primers* diseñados por el programa BLAST.

Primer	Dirección	Sequence	Long.	Tm	Long. Prod.	% identidad
P53	Forward	CTGGCCACCAGAGCTTAGAC	20	58	200	99.8%
	Reverse	ACTGCCTGAAATGCCTCACT	20	58		98.9%
Gamma	Forward	TCCATCATGAAGTGTGACGT	20	58	150	95.80%
Actina	Reverse	GAGCAATGATCTTGATCTTCAT	22	58		95.76%

II.- OBTENCIÓN DE DNA

Se aisló DNA de los embriones con el uso del estuche Quick-DNA™ Microprep Plus Kit de Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la extracción del DNA se observó la integridad mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Fierro-Fierro, 2014).

III.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PUNTO FINAL DEL GEN GAMMA-ACTINA, Y P53

La reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) correspondiente al gen p53 y gamma-actina, se llevó a cabo con el fin de obtener amplicones con los *primers* antes mencionados en los embriones de cultivo, 11.5 DG y de hígado de rata adulta, esto último para secuenciar los productos obtenidos. Así mismo con las muestras de RNA de los tratamientos y de 11.5 DG, se realizó un PCR punto final, con el propósito de saber si había DNA en las muestras y así tratarlos con DNasa.

La PCR se realizó siguiendo los pasos del estuche comercial: KAPA Taq Ready Mix DNA Polymerase marca KAPA BIOSYSTEMS. Se utilizaron los *primers* diseñados para p53 y gamma-actina. Además de verificar la efectividad del kit y del proceso (control positivo). Se incluyó dentro de las reacciones de PCR un control negativo sin DNA. Al término de la reacción se realizó una electroforesis horizontal.

Los productos de PCR de hígado fueron secuenciados en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO, para confirmar la identidad de los genes. Una vez obtenidos los cromatogramas, se realizó una comparación de estos con las secuencias del gen reportado, el cual se denomina *blast*, este se realizó con ayuda del programa BLAST disponible en la página Web de la base de datos de NCBI. Posteriormente se hizo un alineamiento de las secuencias con el programa Clustal Omega para así obtener una secuencia consenso, del cual se verificó la identidad en el programa BLAST.

IV.- EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Para evaluar la expresión relativa del gen *p53*, se extrajo el RNA total de los embriones cultivados en los diferentes medios y de los embriones de 11.5 DG, por medio de la técnica de TRIZOL[®] (De Chomczynski y Sacchi, 1987; Vilches y cols., 2013), en el cual se forman complejos de guanidina y moléculas de agua con RNA, por lo que se eliminan las interacciones hidrofílicas con el DNA y proteínas, que son separadas en la fase acuosa donde se encuentran los complejos de RNA-guanidina, el cual se recupera de la fase acuosa por precipitación de isopropanol.

Posteriormente, se cuantificó el RNA total en una dilución 1:250 a 260 nm y 280 nm por espectrofotómetro, se registraron las lecturas de la densidad óptica y se hicieron los cálculos pertinentes. El RNA extraído se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones libres de RNAsas, para verificar que hay residuos de DNA genómico, por lo que se le aplicó 1.5 µL de DNasa I por 40 min a temperatura ambiente.

V.- RT-PCR DEL GEN P53

Se realizó una RT-PCR, para cerciorar que dicho gen se estuviera expresando en los embriones. Se siguieron los pasos del kit comercial: SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, California USA) y los *primers* antes mencionados (Vilches y cols., 2013). Posteriormente, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% para verificar la amplificación y la relación de cDNA del gen *p53* y el gen constitutivo *gamma-actina*.

VI.- PCR SEMICUANTITATIVA DEL GEN P53

Normalización de las condiciones de amplificación por RT-PCR. A partir de 2 µg de RNA total se sintetizó el cDNA por transcripción reversa empleando oligo dT-GAGA y la reverso transcriptasa SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, California USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Posteriormente, se estandarizaron las condiciones de amplificación mediante el método semicuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con *gamma-actina* a 26 ciclos para el grupo control y glucosa y 29 ciclos para los grupos glucosa + espermina, glucosa

+ espermidina y control externo (11.5 DG), se consideró el ciclo previo a la saturación de la reacción para cada tratamiento.

Análisis densitométrico: Una vez establecidos los ciclos de amplificación, se llevó a cabo una PCR punto final con el cDNA sintetizado y usando los *primers gamma-actina* y *p53*. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% y posteriormente digitalizados en fotodocumentador con luz UV.

En cada imagen se seleccionó una banda visible utilizando la herramienta de rectángulo del software GelQuantNET. Comenzando con las banda de *gamma-actina* y luego las de *p53*, se obtuvo la intensidad (píxeles). Por último, se normalizaron los datos tomando *gamma* como 1 y se realizaron los densitogramas.

7.6. Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos, no cuantitativos de los parámetros morfológicos de los embriones de cada grupo, excepto de los embriones de 11.5 DG se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis con un alfa de 0.05, para obtener la comparación estadística de las medias de los tratamientos, seguida por la prueba de la mediana. Se empleó el programa STATISTICA 10.0 enterprise.

Para los datos obtenidos del western blot y la PCR semicuantitativa se realizó ANOVA simple en el programa Microsoft Excel, 2010.

8. RESULTADOS

8.1. Estudio morfológico

Por medio de la observación directa de los embriones después de ser cultivados durante 24 horas en diferentes medios, se determinó que los individuos expuestos a altas concentraciones de glucosa presentaron como rasgos principales retraso en el crecimiento y una torsión antinatural. Además fallas en el cierre del tubo neural y en el desarrollo cardíaco en comparación con los embriones cultivados en presencia de poliaminas, los que mostraron un nivel de desarrollo similar a los embriones del grupo control, el tubo neural cerrado, presencia de primordios ópticos y óticos, así como una torsión de cola en "G" (figura 9). Los parámetros morfológicos que se tomaron en cuenta fueron diámetro del saco vitelino, longitud cefalo-caudal, longitud de la cabeza y número de somitas, podemos observar que el grupo de embriones cultivados en presencia de alta glucosa tiene diferencias significativas en contraste con los resultados de los embriones del grupo control. Por otro lado, los embriones de los grupos glucosa + espermina y glucosa + espermidina crecieron y se desarrollaron de manera muy parecida al grupo control, y mejor que los embriones tratados con glucosa (Figuras 10 y 11).

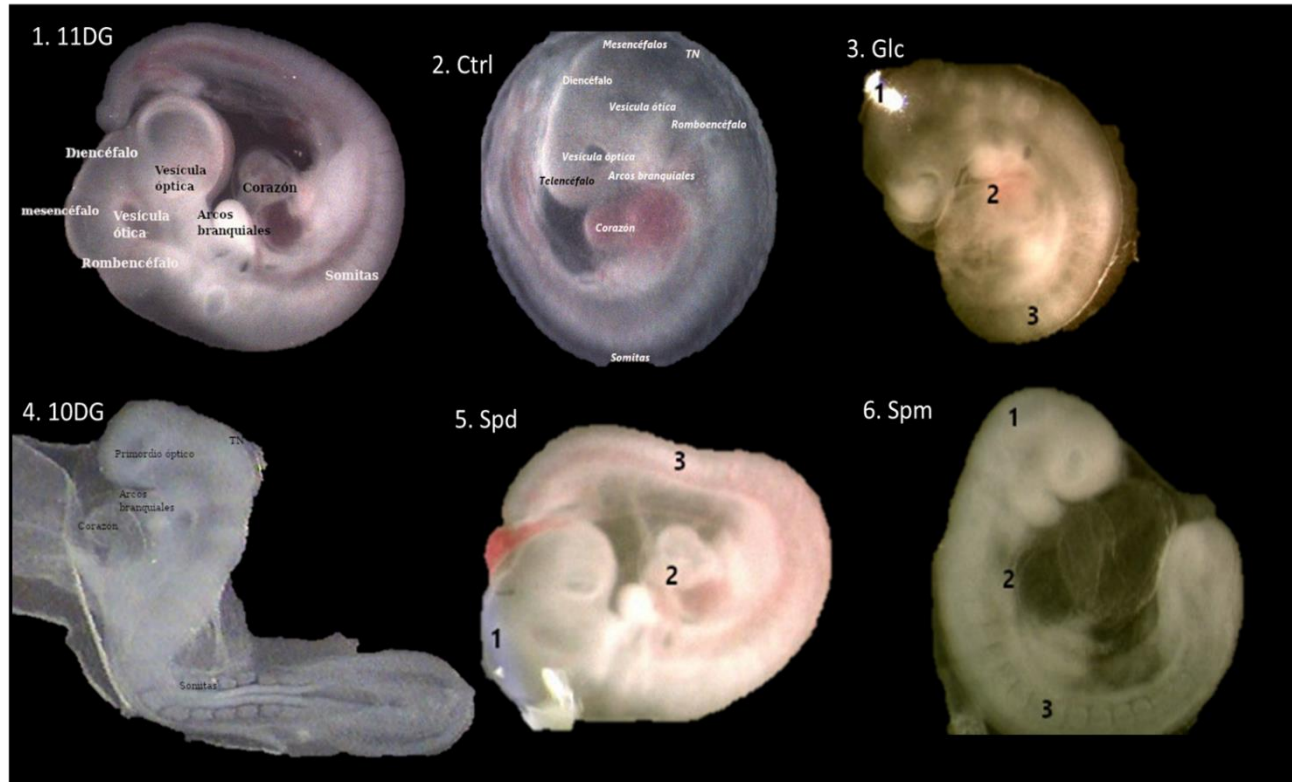


Figura 9. Comparación directa de embriones de día 10.5 gestacional, cultivados 24 horas *in vitro* en contraste con embriones *in vivo* de día 10.5 y 11.5 de gestación. Los embriones fueron observados en un microscopio estereoscópico con un aumento 4X. 1. Embrion de *in vivo* de día 11 de gestación (11DG), 2. embrión cultivado en el medio control (Ctrl), 3. Embrión cultivado en presencia de glucosa 500 mg/dL (Glc), 4. Embrión *in vivo* de día 10 gestacional (10DG). 5. Embrión cultivado en presencia de glucosa elevada 500 mg/dL y espermidina 25 μ M (Spd) y 6. Embrión cultivado en presencia elevada de glucosa 500 mg/dL y espermina 25 μ M (Spm). 1. Tubo neural (TN), 2. Corazón y 3. Somitas. Se pueden observar las diferencias morfológicas entre los tratamientos, respecto al embrión de día 11.5 gestacional, que se considera control externo con un desarrollo normal. Se observa el crecimiento de los embriones cultivados 24h en comparación del embrión 10DG.

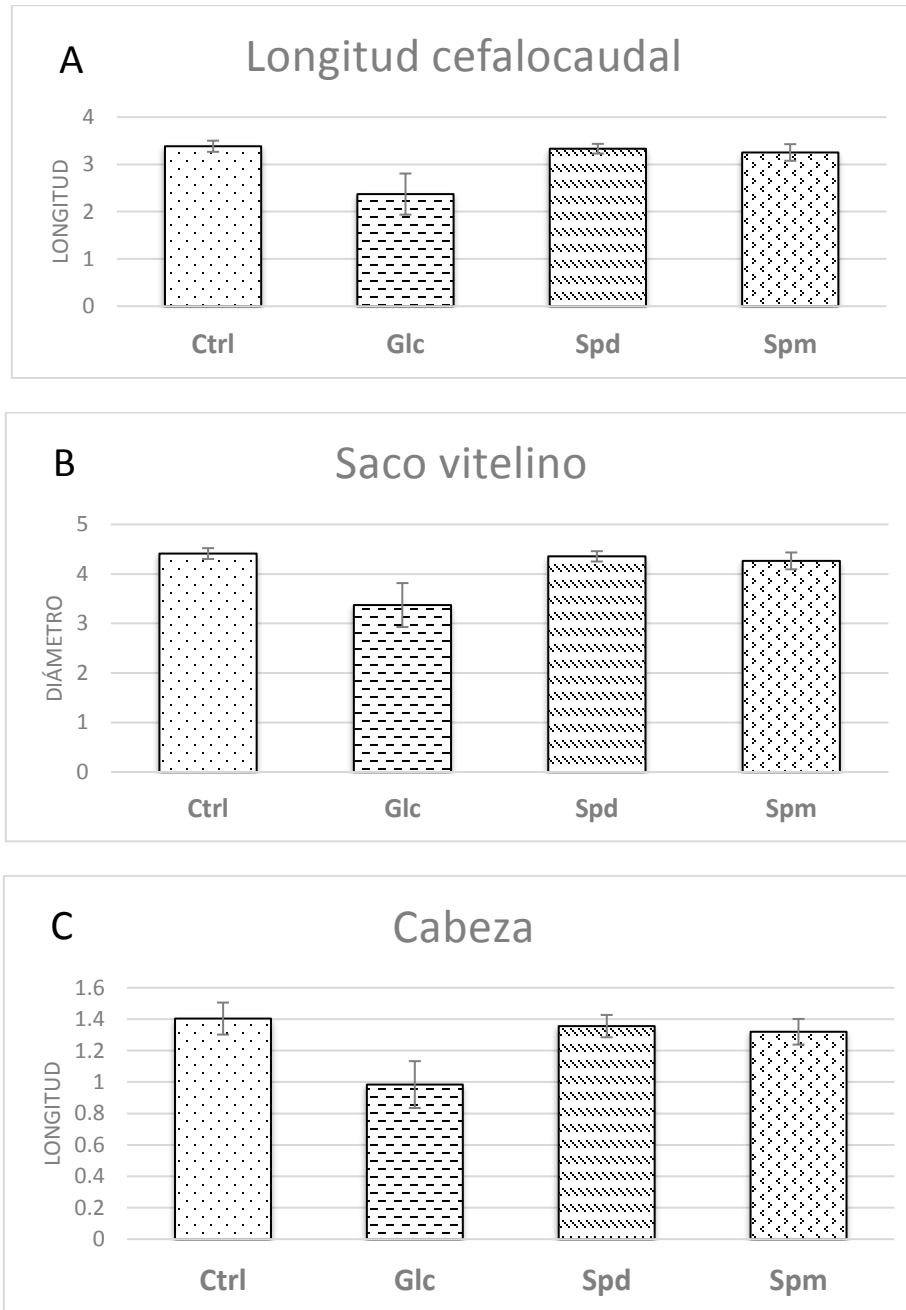


Figura 10. A. Diámetro del saco vitelino. B. Longitud céfalo-caudal. C. Longitud cefálica. Los embriones fueron cultivados a 37° C, por 24 h en rotación a 30 rpm, posteriormente se observaron en un microscopio estereoscópico con un aumento a 4x. Promedio \pm error estándar de 15 determinaciones. El grupo Glc es estadísticamente diferente al control, $p < 0.05$. Los grupos con poliaminas son estadísticamente diferentes al grupo Glc. Ctrl: grupo control; Glc: grupo glucosa; Spd: Grupo glucosa + espermidina y Spm: grupo glucosa + espermina.

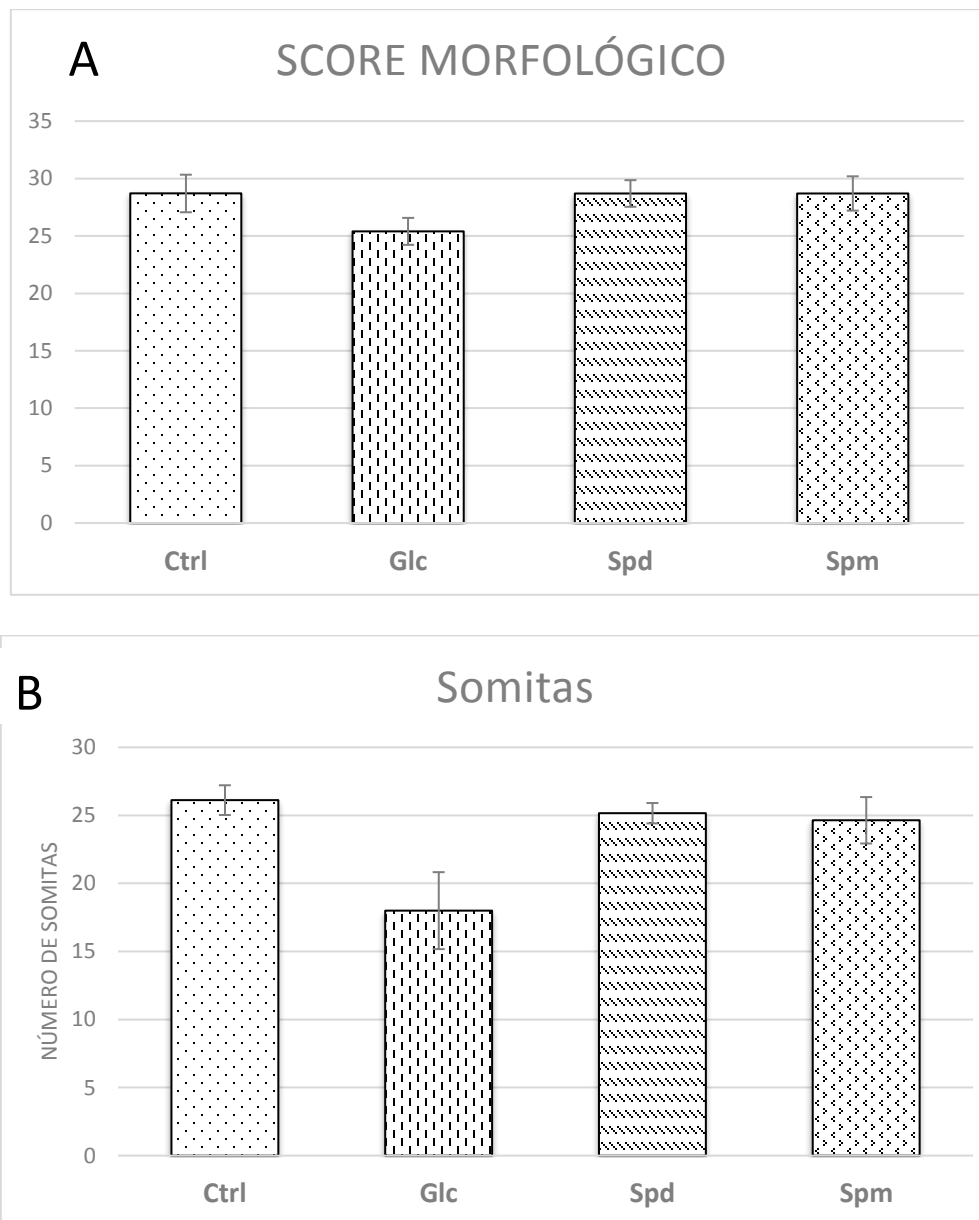


Figura 11. A. Número de somitas. B. índice morfológico. Los embriones fueron cultivados a 37° C, por 24 h en rotación a 30 rpm, posteriormente se observaron en un microscopio estereoscópico con un aumento 4X. Promedio ± error estándar de 15 determinaciones. El grupo Glc es estadísticamente diferente al control, $p < 0.05$. Los grupos con poliaminas son estadísticamente diferentes al grupo Glc. Ctrl: grupo control; Glc: grupo glucosa; Spd: Grupo glucosa + espermidina y Spm: grupo glucosa + espermina.

8.2 Expresión de la proteína p53

La expresión de la proteína p53 no se ve afectada por el ambiente hiperglucémico ni las poliaminas. En la relación p53/actina no se encontraron diferencias significativas entre los grupos como se muestra en las figuras 12 y 13, solo se observa una ligera tendencia hacia aumentar en el grupo espermina (Spm).

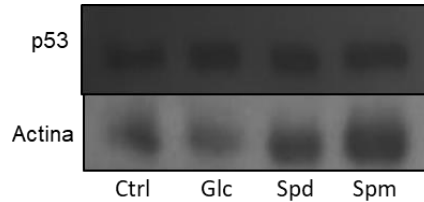


Figura 12. Expresión de la proteína actina y p53, realizado por la técnica Western Blot. Ctrl: grupo Control; Glc: grupo glucosa; Spd: grupo glucosa + espermidina y Spm: grupo glucosa + espermina.

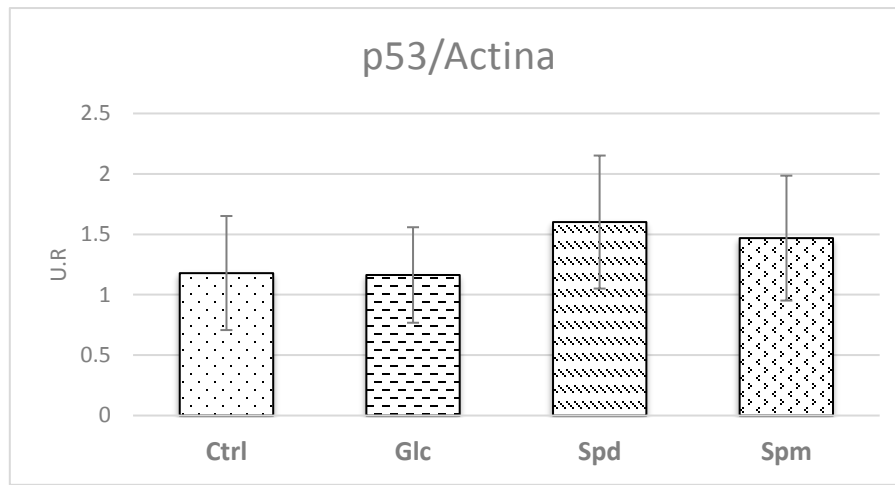


Figura 13. Gráfica del porcentaje de expresión entre la relación de la proteína actina y p53. Ctrl: grupo control; Glc: grupo glucosa; Spd: grupo glucosa + espermidina y Spm: grupo glucosa más espermina Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en la expresión de la proteína entre los distintos grupos.

8.3. Expresión del gen p53

I. GRADIENTE DE TEMPERATURA

Se realizó una PCR usando un gradiente de temperatura de 52°C a 62°C para obtener la temperatura de alineamiento de los *primers*, se determinó una temperatura óptima de 56° para ambos (Figura 14).

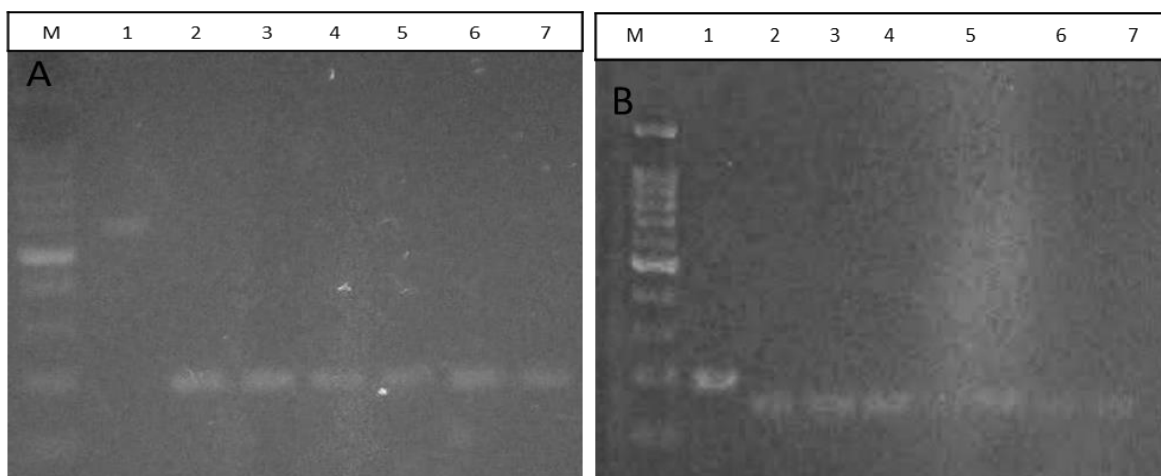


Figura 14. Gel de agarosa 1% con los productos de PCR. Usando un gradiente de temperatura para el alineamiento de los *primers* A) *p53*; B) *gamma-actina*; M) marcador de peso molecular (CSL-MDA-DNA Ladder RTU de 1000 pb); 1) Control positivo; 2) 52°C; 3) 54°C; 4) 56°C; 5) 58°C; 6) 60°C y 7) 62°C.

II. SECUENCIAS

Secuencias obtenidas a partir de la alineación que se realizó en el programa Clustal Omega. El porcentaje de identidad y el ID de la secuencia se obtuvo en el programa BLAST, donde se verifica en la base de datos que las secuencias pertenezcan al gen de interés.

Tabla 6. Secuencias de los productos de PCR.

Gen	Secuencia consenso	%Identidad	Sequence ID
<i>p53</i>	GTGAATGGGCCTCTCCTACGCAGAAGCGG CCTAGTGAGACTCACACCTCCGAAGCAGTT CAGATGTGCTTGGCATGGGTTCTCCGAAA AGAAAAGGTAGTTACCTATACCTGGCAGCT GTCAGCGTGTGTGGGTGTGTGAGAATGCA GCCGACACTTCTCAACAGTAGCCTGCTGTT CACATGGGCCTGGCTAGGGATGGAGGAGA GGGCGGACGGGGAGCTCCATCCGGGTTTG CACAGTGAGGCGCTTCAGGCAGTTTGAAGT GACAGGTGACATTGCTCGTGCGGGAAAGCT TCTGTGTGAATTTATCTCTGTACGTGTGGG AGGAGAAAGGCCTTCTGA	99%	NM_001014762.1
<i>Gamma-actina</i>	AAAGACCTGTATGCCAACACAGTGCTGTCT GGTGGTACCACCCATGTATCCAGGCATTGC TGACAGGCATGCAGAAGGAGATCACAGCCC TGGCTCC CAGCACAATGAAGATTAAGATCAT TGCTCCTCCTGAACG	99%	NM_001127449.T

III. PCR DEL GEN P53

Los amplicones obtenidos por PCR del gen *p53* de los embriones de cada tratamiento tuvieron una extensión de 200 pb, consistente en todos los grupos de trabajo como se muestra en la figura 14. El tamaño concuerda con la descripción realizada en la tabla 6, realizada gracias a la base de datos Gen Bank. En el caso del control positivo que fue el gen constitutivo *gamma-actina* es igual consistente a 150 pb como se menciona en la tabla 5. En el caso de la identidad de ambos genes en embriones de día 10.5 de gestación en los diferentes grupos, fue confirmada por medio de la secuenciación de Sanger, la cual proporcionó que tienen una identidad al 99% ambos genes como se muestra en la tabla 6.

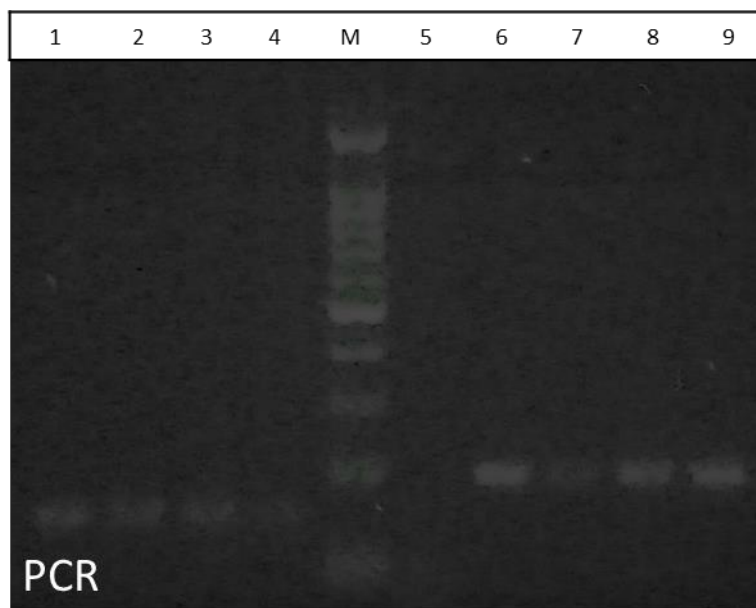


Figura 15. Gel de agarosa 1% con los productos de PCR del gen p53 y del gen constitutivo gamma-actina en embriones de rata. Productos de PCR gen *gamma actina*: 1) Ctrl; 2) Glc; 3) Spm; 4) Spd; M) marcador de peso molecular 5) vacío; productos de PCR del gen *p53*; 6) Ctrl; 7) Glc; 8) Spm y 9) Spd.

IV. EXPRESIÓN DEL GEN *P53*

En cuanto a la amplificación de cDNA para corroborar que el gen *p53* y el gen constitutivo, que en este caso fue *gamma-actina* se expresan en los embriones de día 10.5 postcultivo, se llevó a cabo la transcripción inversa. En la figura 15 podemos observar que dichos genes se expresan en los embriones, tomando en cuenta indirectamente la transcripción de a RNA a partir de DNA.

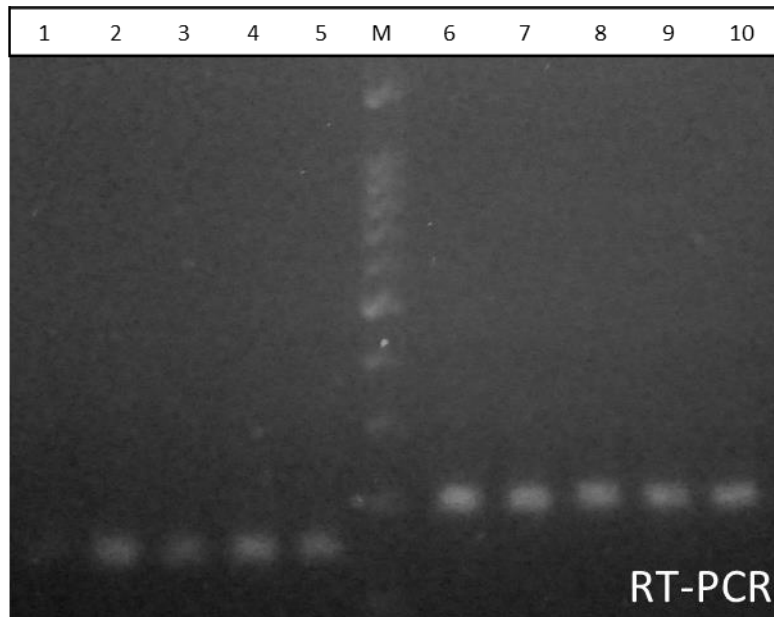


Figura 16. Gel de agarosa 1% con productos de RT-PCR. Productos de RT-PCR del gen constitutivo *gamma actina*: 1) 11DG: cDNA Control externo, embrión *in vivo* de rata de día 11 gestacional; 2) Ctrl: cDNA del grupo control; 3) Glc: cDNA del grupo glucosa (500 mg/dL); 4) Spd: cDNA del grupo glucosa (500 mg/dL) + espermidina (25 μ M) y 5) Spm: cDNA del grupo glucosa (500 mg/dL) + espermina (25 μ M); M) marcador de peso molecular; productos de RT-PCR del gen *p53*: 6) Ctrl; 7) Glc; 8) Spd; 9) Spm y 10) 11DG

V. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *P53*

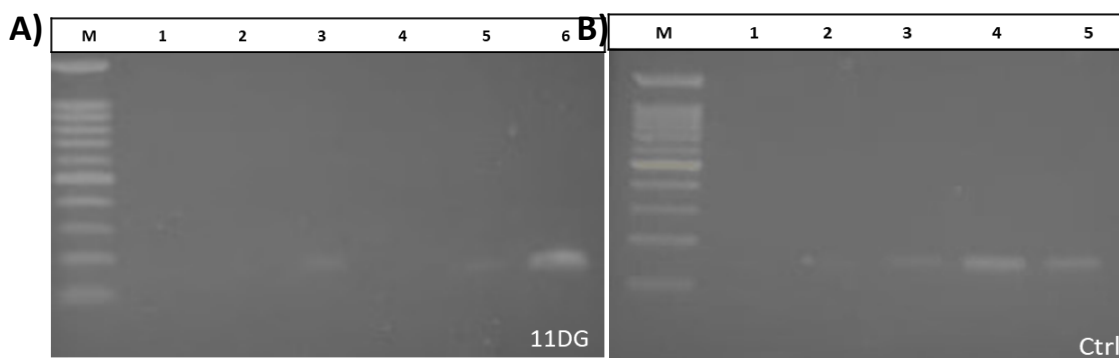
Para cuantificar la expresión del gen *p53* se llevó a cabo una PCR semicuantitativa, para lo que se utilizó RNA de los embriones de día 10.5 postcultivo. El RNA total extraído fue de buena calidad y pureza, teniendo coeficientes de extinción molar (A260/280) entre 1.6 y 2, lo cual nos indica que no está contaminado con proteínas y productos inespecíficos de la extracción (tabla 7).

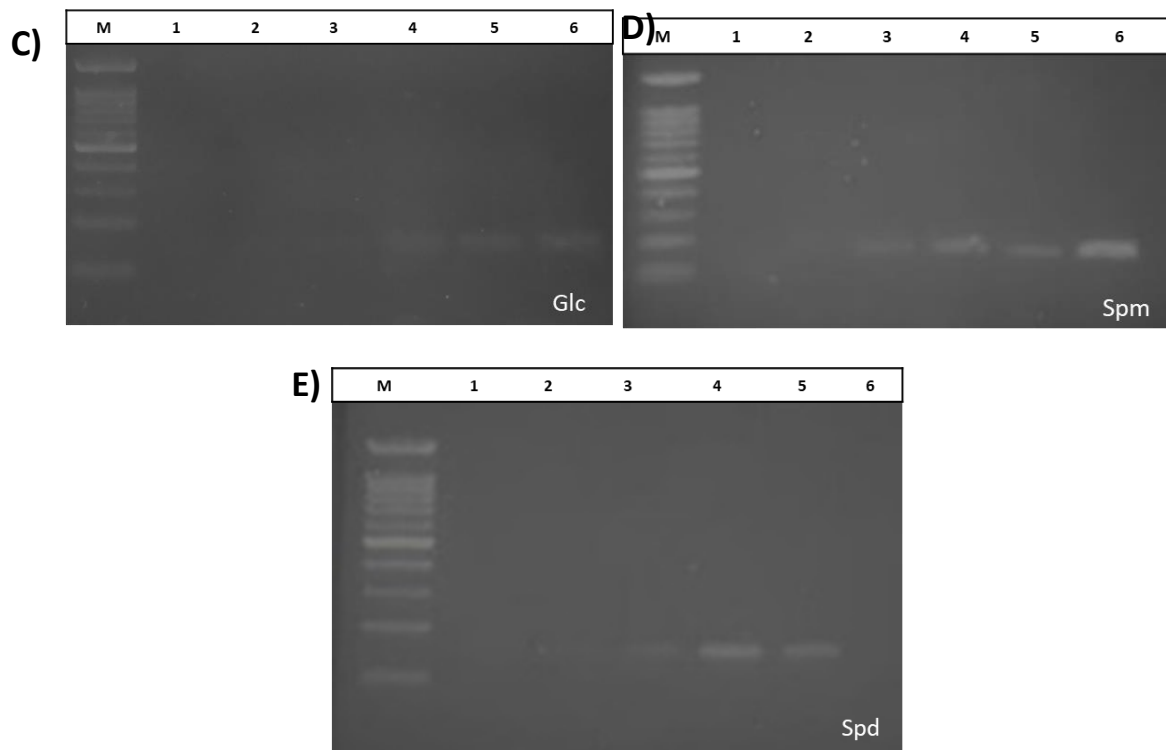
Tabla 7. Concentración de RNA. Relación A260/A280. Promedio \pm error estándar de 5 determinaciones.

Tratamiento	Pureza $\bar{X} \pm EE$	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $\bar{X} \pm EE$
Control	1.86	1.95
Glucosa	1.9	1.81
Espermidina	2.3	2.01
Espermina	2.0	1.98
11DG	2.2	2.15

NORMALIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Realizada la normalización de las condiciones de amplificación, se consideró el ciclo 26 para el grupo control y glucosa (Figuras B y C). Para los tratamientos glucosa + espermina (Spd), glucosa y espermina (Spm) y el control externo (11D.G), se consideró el ciclo 29 (Figuras A, D y E).





Figuras 17. Normalización de las condiciones de amplificación para PCR semicuantitativa (19- 31 ciclos) usando gen constitutivo *gamma-actina*. Embriones de día 10.5 de gestación cultivados 24 h en suero de rata. Ctrl: Control, Glc: Glucosa, Spm: espermina, Spd: espermidina y 11DG: embriones de día 11 gestacional. M) Marcador de peso molecular; 1) ciclo 19; 2) ciclo 21; 3) ciclo 25; 4) ciclo 27; 5) ciclo 29; y 6) ciclo 31.

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

Se obtuvieron las bandas correspondientes a 200pb en cada uno de los grupos, tamaño que corresponde al transcrito *p53*, y bandas a 150 pb que corresponden al gen constitutivo *gamma actina*.

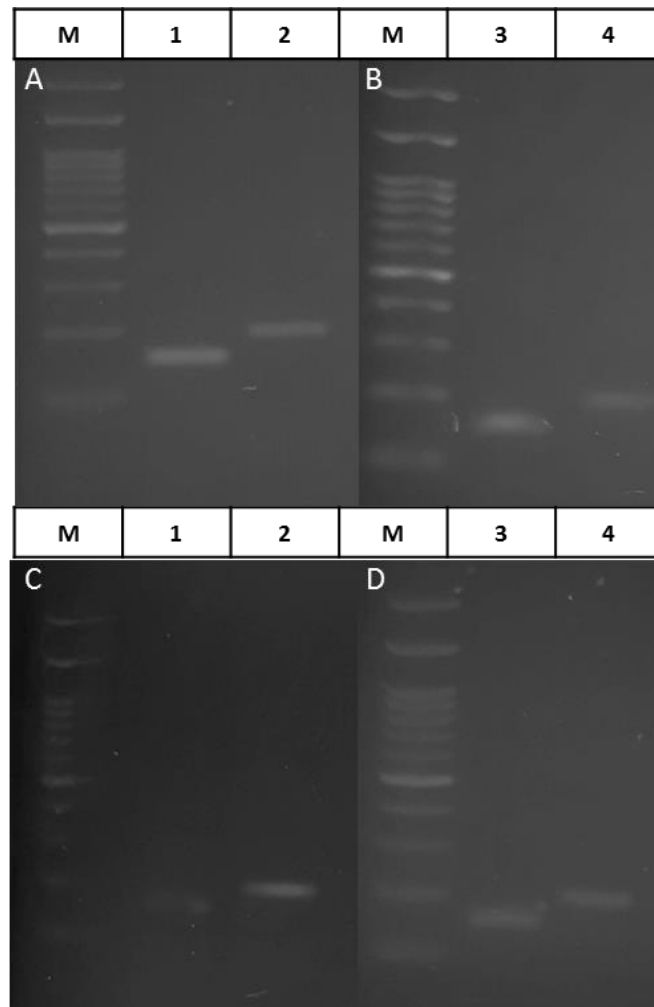


Figura 18. Amplicón del transcrito p53 en embriones de día 10.5 gestacional cultivados 24 h en los diferentes medios. A) Grupo control, B) Grupo glucosa, C) Grupo glucosa suplementado con espermidina y D) Grupo glucosa suplementado con espermina. M: marcador de peso molecular; 1 y 3: banda de *gamma actina*; 2 y 4: banda de *p53*.

Tomando la cantidad relativa del grupo control (Ctrl) como basal para comparar la expresión de los grupos, los embriones expuestos al tratamiento Glucosa (Glc) presentaron una disminución muy notable en la expresión del transcrito p53. En cuanto a los grupos con poliaminas espermina (Spm) y espermidina (Spd) presentaron un incremento de más del doble de la expresión basal del gen *p53*. Siendo el tratamiento Spd el que obtuvo la mayor expresión del transcrito (Figura 37). En cuanto al control externo (D11), la expresión de transcrito p53 es similar a la del grupo control.

Tabla 8. Cantidad relativa del transcrito p53 en embriones de día 10.5 gestacional cultivados 24, Ctrl: grupo control, Glc: grupo glucosa, Spd: grupo glucosa + espermidina, Spm: grupo glucosa + espermina y 11 DG: embrión *in vivo* de 11 días de gestación (control externo). Intensidades de los amplicones obtenidas mediante GelQuantNET.

Grupo	GEN	$\bar{I}x$	CR	Ctrl:
Ctrl	<i>gamma-actina</i>	0.6492325	1	Contr
	<i>p53</i>	0.3507675	0.54028025	
Glc	<i>gamma-actina</i>	0.7599225	1	Glc:
	<i>p53</i>	0.2400775	0.31592366	
Spd	<i>gamma-actina</i>	0.25497	1	sa;
	<i>p53</i>	0.71169667	2.79129571	
Spm	<i>gamma-actina</i>	0.2766425	1	esper
	<i>p53</i>	0.7233575	2.61477358	
11DG	<i>gamma-actina</i>	0.4817475	1	
	<i>p53</i>	0.35767	0.74244288	

Spd: espermidina; **11DG:** control externo; $\bar{I}x$: Intensidad promedio de las repeticiones **CR:** cantidad relativa.

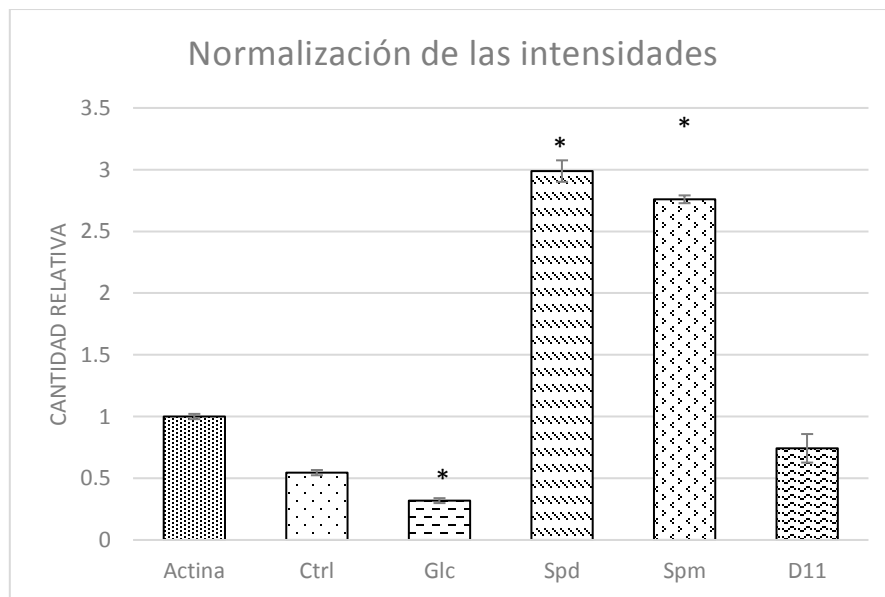


Figura 19. Cantidad relativa del transcrito p53 en embriones postcultivo de día 10.5 gestacional y embriones *in vivo* de día 11.5 gestacional.

9. DISCUSIÓN

La DM durante el embarazo es un problema reconocido a nivel mundial, que provoca efectos perjudiciales en el embrión o feto. Se le asocia con malformaciones congénitas y defectos en el nacimiento así como con muerte fetal/neonatal (Fernández y cols., 2013). Se denomina embriopatía diabética al resultado de la exposición del embrión en sus primeras etapas de formación a la diabetes materna (Chappell y cols., 2009). Aunque el proceso del efecto teratogénico del estado diabético materno no se dilucida por completo, existen varias propuestas en torno a éste. Sin embargo, tanto los factores ambientales (estado diabético materno y condiciones intrauterinas) como la predisposición genética parecen tener importancia en la embriopatía diabética, es decir, se trata de un caso de interacción entre el ambiente y el trasfondo genético (Trejo, 2018; Wentzel y cols., 2003).

El embarazo diabetogénico es una condición metabólica de tipo oxidativa, en que la unidad feto-placentaria se forma a expensas de la madre, el ambiente hiperglucémico e hiperlipémico que éste genera llega a provocar en el embrión sustancias con alta capacidad para dañar estructuras biomoleculares y alterar las funciones que en ellas participan (Acevedo y cols., 2007). Esto puede derivar en cambios en eventos de señalización cruciales durante determinados periodos del desarrollo, afectar la expresión de genes relacionados con la morfogénesis y producir daños estructurales en el material genético, mecanismos en que han sido implicados en la embriopatía diabética (Loeken, 2006).

El cultivo de embriones ha sido fundamental para identificar algunos agentes causantes de la teratogénesis en un ambiente controlado. Esto ha permitido establecer las vías de afectación y las cascadas de respuestas que esto conlleva. Gracias a esto, se han puesto a prueba diferentes compuestos con efectos embrioprotectores; ya sean enzimas o moléculas con efectos antioxidantes, en medios alterados, como en este caso por una alta concentración de glucosa, similar a la que existe en la DM y así tener una base para ayudar a prevenir los efectos de los agentes teratogénicos (Eriksson y cols., 2003; Wentzel y Eriksson, 2005).

Entre estas moléculas encontramos que las poliaminas espermina y espermidina tienen efecto reversible del 95% sobre los efectos dismorfogénicos causados por la acción de alta glucosa en embriones en cultivo (Chirino-Galindo y cols., 2009; Méndez y Palomar-Morales, 1999) y aunque no se han dilucidado por completo los mecanismos por el cual revierten los efectos de la exposición a una alta concentración de glucosa se ha propuesto que poseen la facultad de neutralizar los radicales libres que generan un aumento en el estrés oxidativo al que están sometidos los embriones. Además, regulan la expresión de varios genes involucrados en el

desarrollo embrionario entre otros mecanismos de acción (Childs y cols., 2003; Guasco-Herrera y cols., 2014).

Al respecto en este trabajo se encontró que en general el desarrollo y crecimiento de los embriones cultivados a una elevada concentración de glucosa, tienen un severo retraso en el desarrollo con respecto a los embriones con características normales (embriones cultivados en un medio control) y de forma interesante, los embriones cultivados a estas elevadas concentraciones pero suplementándolos con las poliaminas espermina y espermidina, se comportaron de manera similar a los embriones incubados en un medio control. Por lo que este comportamiento que genera la glucosa en los embriones son similares a lo reportado por Dong y cols., en el 2015, donde se le atribuye este efecto a que el hecho de que la glucosa en una concentración muy por arriba de las condiciones normales ocasiona los problemas en el desarrollo de los embriones. Por lo que en lo siguiente nos podemos basar en que las poliaminas tienen un efecto embrioprotector al ser añadidas al medio.

Empezando por la morfología de los embriones, podemos encontrar que los cultivados en un medio control son similares a los embriones de día 11.5 gestacional como se reportó en el trabajo de Chirino en el 2007, donde se realizó una comparación directa entre los parámetros morfológicos obtenidos y los reportados para los embriones cultivados y embriones *in vivo* (día 11.5 gestacional). En este análisis se tomaron medidas de la longitud céfalo-caudal, diámetro de saco vitelino, número de somitas, longitud de cabeza y registro morfológico, también se incluye un conteo de número de somitas. Los resultados obtenidos en los embriones cultivados en un medio control pueden ser atribuidos a que este medio tiene la cantidad necesaria de glucosa, como otros componentes vitales para un desarrollo adecuado, el cual puede ser similar al ambiente intrauterino normal. Esto se presenta de manera diferente con los embriones cultivados bajo condiciones de glucosa elevada, ya que se obtuvieron valores correspondientes a 25 puntos en promedio en el score morfológico, para este grupo. Además de presentar tubo neural abierto como lo mencionan Nazer y Ramírez (2000), que en cultivos con hiperglucemia se inducen malformaciones, aumentando las frecuencias de anomalías, se enumeran las más frecuentes que son: 1) alteraciones a nivel sistema nervioso central, 2) cardiopatías congénitas, 3) alteraciones musculo-esqueléticas y 4) malformaciones múltiples donde se incluyen síndromes y daños en órganos como riñones, hígado, ojos, entre otros (Gómez y Gómez, 2004; Novo-Villaverde, 2012).

Los resultados obtenidos en el grupo de glucosa elevada se atribuyen a una alta oxidación de esta molécula (Clapés y cols., 2013). En estudios previos de DM1 mal controlada, hiperglicemia experimental o cultivo de embriones con una elevada concentración de glucosa, se ha

demostrado una elevada frecuencia de alteraciones en el desarrollo (Chirino-Galindo y cols., 2009, 2012, Eriksson y cols., 2003; Méndez y Palomar, 1999).

Se sabe que una concentración intracelular de glucosa, al ser una molécula con una gran utilidad energética en el metabolismo genera una elevada producción de EROs, esto lleva a un estado de estrés oxidativo dando paso a alteración de los mecanismos antioxidantes del embrión provocándole daños a nivel molecular y morfológico (Calderó y cols, 2013; Quintanar y Calderó, 2009).

Se han encontrado evidencias de que los embriones cultivados en un medio alterado con glucosa en una alta concentración presentan un déficit en la actividad de proteínas relacionadas con la supervivencia celular en eventos de estrés oxidativo. En animales de experimentación donde se realizaron estudios de embriopatía diabética, se ha revelado un complejo proceso en el cual el estado diabético induce alteraciones en vías metabólicas interrelacionadas, lo que conduce a interferencia con la expresión de genes reguladores del desarrollo embrionario, para finalmente tener como consecuencia numerosas alteraciones metabólicas en el embrión y en su desarrollo (Goldman y cols., 1985).

Otras de las complicaciones es la glicosilación no enzimática de proteínas y ácidos nucleicos, la cual consta de dos etapas, la glicosilación no enzimática que forma productos de glicosilación de productos de Amadori o fructosaminas, mientras que en una segunda etapa se forman productos de glicación avanzada (AGEs) (Buts y cols., 1995).

En numerosos estudios se ha demostrado que las poliaminas inhiben la glicosilación avanzada, se ha podido comprobar que la espermina inhibe el avance de glicosilación en histonas. Además, se ha demostrado que tanto la espermina como la espermidina, actúan como inhibidores de AGEs, que son los responsables de las nefropatías, retinopatías y neuropatías diabéticas (Gómez y Gallego y cols., 2008, Gómez y Gómez, 2004, Novo-Villaverde, 2012). De igual manera se ha señalado a estas moléculas como fundamentales en los procesos de señalización, replicación, transcripción, traducción, crecimiento, desarrollo y diferenciación celular, así como la regulación de la apoptosis, de antioxidantes naturales por su capacidad de atrapar radicales libres (Guasco-Herrera y cols., 2014). En los embriones cultivados en medio con altas concentraciones de glucosa y suplementado con poliaminas, podemos observar que los daños se revierten por completo (95 %), lo que se cree tiene que ver con todas las propiedades descritas acerca de estas moléculas, su interacción con factores transcripcionales, así en su participación en la condensación y agregación del DNA, ayudando a dar una estabilidad a la doble cadena del DNA ante eventos de estrés oxidativo y promoviendo la inhibición de apoptosis (Guasco-Herrera y cols., 2014). Los resultados positivos de las

poliaminas concuerdan con lo reportado con Chirino-Galindo y cols. (2009), quienes concluyen que las poliaminas tienen un efecto embrioprotector en un medio con una alta concentración de glucosa.

En cuanto al gen *p53* las copias se obtuvieron exitosamente por la técnica de PCR, en todos los grupos experimentales y en los controles externos. Se tuvo un amplicón de 200pb aproximadamente. Esto concuerda con la extensión de replicación que se obtuvo de la ficha técnica de los *primers* construidos por IBTX y diseñados en el Gen Bank. Gracias a las secuencias obtenidas se verificó que los amplicones tienen la identidad del 99% al gen *p53*. Con la técnica RT-PCR se comprobó que los embriones están expresando el gen *p53* en el estadio donde se encuentran.

El gen *p53* se encuentra presente en los embriones de día 10.5 gestacional, así como en el control *in vivo* (embriones de día 11.5 gestacional). Además, se encontraron diferencias significativas en la expresión del transcrito entre los tratamientos, teniendo como resultado que el grupo glucosa presenta la menor expresión en comparación con el grupo control. Se sabe que la diabetes materna o las altas concentraciones de glucosa experimental inducen daño en el DNA mediante el aumento de la fosforilación de H2A.X, activando la vía de señalización de respuesta al daño del DNA (DDR) y su flujo descendente efector *p53*. Por otro lado, el estrés oxidativo es responsable de las lesiones al DNA y la activación de DDR, esto pueden desempeñar funciones críticas en la apoptosis inducida por la glucosa elevada y embriopatía inducida por la diabetes materna (Dong y cols., 2015). Sin embargo, cuando el daño del DNA supera la capacidad celular para reparar se suprimen las vías de reparación, por lo que la acumulación de esto abrumará a las células y resultará en la muerte celular o apoptosis (Moreli y cols., 2014), lo anterior explica porque la expresión del gen *p53* en embriones cultivados en presencia de alta glucosa disminuye, al ocasionar tanto deterioro directo en el DNA provocado por el estrés oxidativo, no hay manera de reparar, por lo que se suprimen las vías de reparación, lo que resulta en muerte celular, esto mismo lo reportaron Dong y cols. (2015) en su modelo de embriopatía diabética.

Con respecto a los resultados del cultivo con glucosa en exceso suplementado con poliaminas se encontró que hay una mayor expresión del gen *p53* comparado con los embriones del grupo control, los niveles de expresión son casi del doble, esto es similar a la tendencia que se encuentra en la expresión de la proteína, siendo el grupo con espermidina en el que se encuentra la mayor expresión tanto del gen como de la proteína *p53*, esto podría ser por que se ha reportado que es la poliamina con mayor actividad en el DNA, ya que facilita la compactación de dicha molécula, y actúa como un regulador de expresión génica, entre los que se encuentran genes apoptóticos como el gen *p53* (Gómez y Gallego, 2008; Guasco-Herrera y cols., 2014). La

espermina por su parte, se ha visto involucrada en procesos de regulación, transcripción y traducción, ya que afecta la capacidad de unión a las proteínas al RNA para promover su condensación y protegerlo de la desnaturalización, agentes ionizantes como la radiación, así como de las especies reactivas de oxígeno (Wang, 2012). Esto podría explicar la expresión del gen *p53* en los tratamientos con poliaminas, ya que cuando se produce un daño en el DNA, se activa o estabiliza se transloca al núcleo, y a su vez transcribe su proteína para comenzar los procesos de señalización para reparación del DNA.

Recientemente, se ha observado una migración de la proteína p53 a la mitocondria, que parece implicarse en la activación de los procesos de muerte celular. Los niveles proteicos de p53 registran un aumento rápido en respuesta a estímulos como: el daño directo en el DNA, la depleción de nucleótidos, la hipoxia, el golpe de calor, la exposición a monóxido de nitrógeno, la radiación y UV y la presencia de dímeros de ciclobutano piridina (Gómez-Lazaró y cols., 2004). Al combinarse con el efecto de las poliaminas, podrían generar una respuesta de daño, expresando así mayor muerte celular para evitar que cause malformaciones en el embrión.

En cuanto la expresión de la proteína p53 se encuentra activa, pero no encontramos diferencias entre la expresión en los embriones del grupo control con respecto a los embriones cultivados en glucosa elevada, como lo reportaron Dong y cols. (2015).

Por último, los niveles expresión del gen *p53* y la proteína p53 en embriones de día 11.5 *in vivo*, son muy similares, por lo que afirmamos que los embriones postcultivo tienen un desarrollo normal.

10. CONCLUSIONES

1.- La glucosa en altas concentraciones en el cultivo de embriones de rata de día 10.5 gestacional genera daños en el desarrollo de acuerdo al análisis morfológico.

2.- Las poliaminas espermina y espermidina revierten casi por completo los daños morfológicos causados por las altas concentraciones de glucosa, en embriones de rata de día 10.5 gestacional post-cultivo, de acuerdo al análisis morfológico.

4.- No se presentan diferencias significativas en la expresión de la proteína p53 en los embriones de rata de día 10.5 gestacional cultivados 24 h con altas concentraciones de glucosa suplementado con las poliaminas espermina y espermidina. Pero si se encuentra una ligera tendencia en la expresión siendo espermidina la más alta.

5. La expresión del gen *p53* en los embriones de día 10.5 cultivados 24 h en un medio con alta glucosa se ve directamente afectado, disminuyendo su actividad.

6. En embriones de día 10.5 gestacional cultivados 24 h en un medio con alta glucosa y suplementado con poliaminas espermina y espermidina, la expresión del gen *p53* se encuentran diferencias significativas en la expresión del gen, encontrando un incremento en la expresión, siendo espermidina el grupo que presenta la mayor expresión.

11. LITERATURA CITADA

- Acevedo, L.C., López, A.F., Sepúlveda, B.S., Espinoza, F.V. (2007). Actividad de glutatión reductasa en el embarazo diabético. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 72(2): 82-88.
- Allen, D.A., Yagoob, M.M., Harwood, S.M. (2005). Mechanism of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J. Nutr. Biochem.* 16(12): 705-713.
- American Diabetes Association (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33 (supp 1): s62-s69.
- Baack, M.L., Wang, C., Hu, S., Segar, J.L., Norris, A.W. (2014). Hyperglycemia induces embryopathy, even in the absence of systemic maternal diabetes: an in vivo test of the fuel mediated teratogenesis hypothesis. *Reprod. Toxicol.* 46: 129-136.
- Bhattacharya, S., Ray, R.M., Johnson, L.R. (2009). Role of polyamines in p53 dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Signal.* 21: 509–522.
- Brown M.A. (1997). Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv. in Genes.* 36: 45-135.
- Buchanan, T.A., Kitzmiller, J.L. (1994). Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annu. Rev. Med.* 45: 245-260.
- Buchanan, T.A., Denno, K.M., Sipos, G.F., Sadler, T.W. (1994). Diabetic teratogenesis: In vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose per se. *Diabetes* 43: 656-660.
- Burton, G., Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25(3): 287-299.
- Buts, J.P., De Keyser, N., De Raedemaeker, L., Collette, E., Sokal, E.M. (1995). Polyamine profiles in human milk, infant artificial formulas, and semi-elemental diets. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21(1): 44-49.
- Calderó, J.V., Muñoz, E.G., Quintanar, M.A. (2013). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev. Educ. Bioquím.* 32(2): 53-66.
- Cao, Y., Zhao, Z., Eckert, R.L., Reece, E.A., (2011). Protein kinase C β 2 inhibition reduces hyperglycemia-induced neural tube defects through suppression of a caspase 8-triggered apoptotic pathway. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 204(3): 226- e1. doi: 10.1016/j.ajog.2011.01.013.
- Catalano, P.M., Tyzbit, E.D., Wolfe, R.R., Calles, J., Roman, N., Amini, S.B. Sims, E.A.H. (1993). Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am. J. Physiol.* 264 (Endocrinol. Metab. 27): E60-E67.
- Cederberg, J., Simán, C.M., Eriksson, U. (2001). Combined treatment with vitamin E and Vitamin C, decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatric. Res.* 49: 755-762.
- Chappell, J.H., Dan, W., Loeken, M.R. (2009). Diabetes and apoptosis: neural crest and neural tube. *Apoptosis.* 14: 1472-1483.
- Chattopadhyay, M.K., Tabor, C.W., Tabor, H. (2003). Polyamines protect Escherichia coli cells from the toxic effect of oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 2261-2265.
- Childs, A.C., Metha, D.J., Gerner E.W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 60(7): 1394-1406.
- Chirino, G. G. (2007). Efecto de las poliaminas en el crecimiento de embriones de rata cultivados *in vitro*, en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. Tesis de Licenciatura, FES Iztacala UNAM. Pp. 18-58.
- Chirino-Galindo, G., Baiza-Gutman, L.A., Barrera-Escorcia, E., Palomar-Morales, M. (2009). Polyamines protect rat embryo in vitro from high glucose induced developmental delay and dysmorphogenesis. *Birth Def. Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 86(1): 58-64.

- 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. An.* 48(9): 570-576.
- Chirino-Galindo, G., Barrera-Argüelles, J.L., Trejo-González, N.L., Mejía-Zepeda, R., Palomar-Morales, M. (2017). Biphasic effect of alpha-linolenic acid in glucose-induced dysmorphogenesis and lipoperoxidation in whole rat embryo in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 484(4): 879-833.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* 162: 156-159.
- Clapés, H.S. (2000). Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo. *Rev. Cub. Inves. Biom.* 19(3): 191-195.
- Clapés, S., Fernández, T., Suárez, G. (2013). Oxidative stress and birth defects infants of women with pregestacional diabetes. *MEDICC Rev.* 15: 37-40.
- Corrales, C.L., Muñoz, A.M. (2012). Estrés oxidativo: Origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Cienc. Biomed.* 10: 135-250.
- Curtis, H., Barnes, N.S., Schnek, A., Massarini, A. (2008). Biología. Ed. Médica Panamericana, 7ª edición.
- Czapski, G., Goldstein, S. (1986). When do metal complexes protect the biological system from superoxide toxicity and when do they enhance it? *Free Rad. Res. Commun.* 1(3): 157-161
- Danglot-Banck, C. Gómez-Gómez, M (2004). Los hijos de las madres diabéticas. *Rev. Méx. Pediatr.* 71(5): 248-257.
- Davidge ST (1998). Oxidative stress and altered endothelial function in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16: 65-73.
- Díaz-Flores, M.; Baiza, L.A; Ibáñez, M.Á.; Pascoe, D.; Guzmán, A.M; Kumate, J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac. Med. Mex.* 140 (4): 437-447.
- Dong, D., Yu, J., Wu, Y., Fu, N., Arias, N., Yang, P. (2015). Maternal diabetes triggers DNA damage and DNA damage response in neurulation stage embryos through oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467(2): 407-412.
- Dröge W. (2001). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82(1): 47-95.
- Ellington, S.K.L. (1997). Effects of excess glucose on mammalian postimplantation embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 299-306.
- ENSANUT (2016) Encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino. INSP. México. 46-53.
- Erb, C. (2006). Embryology and teratology. En: Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. y Frankin, C.L. (editores). *The laboratory rat.* 2ª. Ed. Academic Press, Amsterdam, pp. 817-846.
- Eriksson, U.J., Borg, L.A.H. (1991). Protection by free oxygen radical enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* 34: 325-331.
- Eriksson, U.J., Borg, L.A., Cederberg, J., Nordstrand, H., Simán, C.M., Wentzel, C., Wentzel, P. (2000). Pathogenesis of diabetes-induced congenital malformations. *Ups. J Med. Sci.* 105: 53-58.
- Eriksson, U.J., Cederberg, J., Wentzel, P. (2003). Congenital malformations in offspring of diabetic mothers: Animal and human studies. *Rev. Endocr, Metab. Dis.* 4: 79-93.
- Eriksson, U., Wentzel, P. (2016). The status of diabetic embryopathy. *Ups. J. Med. Sci.* 121: 1-17.
- Fernández, T., Clapés, S., Suárez, G., Perera, A., Rodríguez, V., Purón, C., Herrera M, M., Antiguas, Á., Castro, T. (2013). Embriopatía diabética en ratas y efecto de un suplemento nutricional de vitamina E durante la gestación. *Rev. Haban. Cienc. Méd.* 12: 176-186.

- Frago, L.M., Arroba, A., Chowen, J.A. (2001). Fundamentos de la apoptosis celular: interés en la endocrinología. *Endocrinol. Nutr.* 48(9): 272-280.
- Freinkel N. (1980). The Banting lecture; of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29: 1023-1035.
- Fu, J., Tay, S.S.W., Ling E.A., Dheen, S.T. (2006). High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells. *Diabetologia*, 49(5), 1027-1038.
- Fujisawa, S., Kadoma, Y. (2005). Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res.* 25: 965-970.
- Galston, A.W. (1983). Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* 33: 382-388.
- García, D.; García R. (2009). Avances y patogénesis de la embriopatía diabética. *Rev. Med. Chil.* 137 (12): 1627-1635.
- Gäreskog, M., Cederberg, J., Eriksson, U.J., Wentzel, P. (2007). Maternal diabetes in vivo and high glucose concentration in vitro increases apoptosis in rat embryos. *Reprod. Toxicol.* 23: 63-74.
- Gäreskog, M., Eriksson, U.J., Wentzel, P. (2006). Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats. *Birth Defec. Res. A Clin. Mol. Teratol.* 76(6): 483-490.
- Gebel, J., Tuppi, M., Krauskopf, K., Coutandin, D., Pitzius, S., Kehrloesser, S., Osterburg, C., Dötsch, V. (2017). Control mechanisms in germ cells mediated by p53 family proteins. *J. Cell. Sci.* 130: 2663-2671.
- Gilbert, S. F., Barresi, M. J. (2016). *Developmental Biology*. USA: SINAUER, 11 edición, pp. 4-72.
- Goldman, A., Baker, L., Piddington, R., Marx, B., Herold, R., Egler, J. (1985). Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 8227-8231.
- Gómez-Gallego, C., Ros-Berrueto, G., Bernal-Cava, M.J., Pérez-Conesa, D., Periago-Castón, D. (2008). Papel de las poliaminas en la alimentación. Importancia de las poliaminas en la alimentación infantil. *Arch. Latin. Nutr.* 8(2): 117-125.
- Gómez-Lázaro, M., Fernández-Gómez, F.J., Jordán, J. (2004). La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. *Rev. Neurol.* 39: 243-50.
- Green, K., Brand, M.D., Murphy, M.P. (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 53(19): S110-S118.
- Guasco-Herrera, C., Chávez-Servín, J.L., Ferriz-Martínez, R.A., De la Torre-Carbot, K., Elton-Puente, E., García-Gasca, T. (2014). Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *Rev. Educ. Biochem.* 33(2): 51-57.
- Gugliucci, A., Menini, T. (2003). The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci.* 72(23): 2603-2616.
- Guleria, R.S., Pan, J., Di Pette, D., y Shing, U.S. (2006). Hyperglycemia inhibits retinoic acid-induced activation of Rac1, prevents differentiation of cortical neurons, and causes oxidative stress in a rat model of diabetic pregnancy. *Diabetes* 28(2): 3326-3334.
- Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweir, J. L., Woster, P. M., Casero, R.A. Jr. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11140-11145.
- Hagay, Z.J., Weiss, Y., Zusman, I., Peled, M., Reece, A., Eriksson, U.J., Groner, Y. (1995). Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173 (4): 1036-1041.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M (2015). Free radicals in biology and medicine. 5nd Edition, Oxford University Press, Oxford. Pp. 22-85.
- Hansberg, T.W. (2002). Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54: S47-S51.
- Hernández-Ávila M., Gutiérrez JP., Reynoso-Novéron N. (2013). Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1(15): 71-81.
- Herrera, E. (2000). Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur. J.Clin. Nutr.* 54: S47-S51.
- Hod, M., Star, S., Passonneau, J.V., Unterman, T.G., Freinkel, N. (1986). Effect of hyperglycemia on sorbitol and myo-inositol content of cultured rat conceptus: failure of aldose reductase inhibitors to modify myo-inositol depletion and dysmorphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140: 974-980.
- Hu, W., Feng, Z., Teresky, A. K., Levine, A. J. (2007). p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 450: 721-724.
- Igarashi K, Kashiwagi K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559-564.
- Islas-Andrade, S., Miranda, T.P. (1993). Diabetes mellitus: Concepto y clasificación. En: Islas-Andrade S., Lifshitz-Gyuznberg. A, editores. *Diabetes mellitus*. México: Interamericana Mc Graw-Hill: pp. 1-7.
- Kirchner, D.L., Mercieca, M.D., Crowell, J.A., Levine, B.S. (1999). Developmental toxicity studies of 2-(Difluoromethyl)-dl-Ornithine (DFMO) in rats and rabbits. *Toxicol. Sci.* 50: 127-135.
- Klug, S., Lewandoski, C., Neubert, D. (1985) Modification and standarization of culture of early postimplantation embryos for toxicological studies. *Arch. Toxicol*, 58: 84-88.
- Landau, G., Ran, A., Bercovich, Z., Feldmesser, E., Horn-Saban, S., Korkotian, E., Jacob-Hirsh, J., Rechavi, G., Ron, D., Kahana, C. (2012). Expression profiling and biochemical analysis suggest stress response as a potential mechanism inhibiting proliferation of polyamine-depleted Cells. *J. Biol. Chem.* 287: 35825-35837.
- Lane, D.P., Benchimol, S. (1990). p53 oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev.* 4(1):1-8.
- Lane, D. P., Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.
- Langer, O., Anyaegbunarn, A., Brustman, L., Guidetti, D., Mazze, R. (1987). Gestational diabetes: Insulin requirements in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157: 669-675.
- Leal, C., Schetinger, M., Leal, D., Morsch, V., da Silva, A., Rezer, J., de Barrios, A., Jaques, J. (2011). Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. *Redox Rep.* 16(6): 230-236.
- Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A. (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E. (1997). Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiating an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Linzer, D. I. H., Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton celular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
- Li, R., Thorens, B., Loeken MR. (2007). Expression of the gene encoding the high-K (m) glucose transporter 2 by the early postimplantation mouse embryo is essential for neural tube defects associated with diabetic embryopathy. *Diabetologia* 50: 682-689.

- Loeken, M.R. (2006). Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc. Gynecol. Investig.* 13(1): 1-10.
- López, G. (2009). Diabetes mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico. *Medwave* 9(12): e4315. doi: 10.5867/medwave.2009.12.4315.
- López, M., Anzola, M., Cuevas-Salazar, N., Aguirre, J.M., Martínez de Pancorbo, M. (2001). p53, un gen supresor de tumores. *Gac Med Bilbao.* 98: 21-27.
- Macedo, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 15(2): 97-103.
- McManus, R.M., Ryan, E.A. (1992). Insulin requirements in insulin-dependent and insulin-requiring GDM women during final months of pregnancy. *Diabetes Care* 15: 1323-1327.
- Méndez, J.D., Palomar-Morales, M. (1999). Embryotoxicity for diabetes induce in rat: prevention for L-arginine and polyamines. *Reprod Toxicol.* 13(6): 501-509.
- Méndez, J.D., Ramos, H.G. (1994). Animal models in diabetes research. *Arch. Med. Res.* 25: 367-375.
- Mendoza F.C., Rocha S.P. (2002). Poliaminas: reguladores del crecimiento con múltiples efectos en las plantas. *Palmas* 23(4): 39-46.
- Metzger, B.E. (1991). Biphasic effects of maternal metabolism on fetal growth. Quintessential expression of fuel-mediated teratogenesis. *Diabetes* 40 (Suppl 2): 99-105.
- Moore, T.R., Hollingsworth, D.R., Kolterman, O y Nager, C. (1987). Continuous subcutaneous insulin infusión in an obese insulin-resistant pregnant woman with type II diabetes: accelerated fetal growth and neonatal complications. *Obstet. Gynecol.* 70: 480-485.
- Moreli, J.B., Santos, J.H., Rocha, C.R., Damasceno, D.C., Morceli, G., Rudge, M.V., Bevilacqua, E., Calderon, I.M. (2014). DNA damage and its cellular response in mother and fetus exposed to hyperglycemic environment. *BioMed. Res. Int.* 2014: 676-758. doi: 10.1155/2014/676758.
- Myatt, L., Cui, X (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell. Biol.* 122 (4): 369-382.
- Nazer, J., García M., Cifuentes L. (2005). Malformaciones congénitas en hijos de madres con diabetes gestacional. *Rev. Méd. Chil.* 133: 547-554.
- Nazer, J., Ramírez, R. (2000). Malformaciones congénitas en los hijos de madres diabéticas. *Rev. Med. Chil.* 128 (9): 31-44.
- New, D.A.T. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.* 53: 81-122.
- Novo-Villaverde, F.J. (2012). Temas centrales de la genética del desarrollo. Madrid. Pearson Educación. Pp. 1-8.
- Organización Mundial de la Salud (2016). Informe Mundial sobre la diabetes. Disponible en: <http://who.int/diabetes/global-report/es/>, Consultado 23 de agosto de 2018.
- Ornoy, A., Zaken, V., Kohen, R. (1999) Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos *in vitro*: Reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology*, 60: 376-386.
- Quintanar, M., Calderó, V. (2009) La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Rev. Educ. Biochem*, 28: 89-101.
- Reece, E.A., Khandelwal, M., Wu, Y.-I.C. Borenstein, M. (1997). Dietary intake of myo-inositol and neural tube defects in offspring of diabetic rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176: 536-539.
- Reece, E.A., Homko C.J. (1994). Infant of the diabetic mother. *Semin Perinatol.* 18: 459-469.

- Restrepo, O.O. (1992). Enfoque y manejo de la embarazada diabética. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 43(2): 97-108.
- Roest, P., van Iperen, L., Vis, S., Wisse, L.J., Poelmann, R.E., Steegers-Theunissen, R.P., Adriana C. (2007). Exposure of neural crest cells to elevated glucose leads to congenital heart defects, an effect that can be prevented by N-acetylcysteine. *Birth. Def. Res. Part. A. Clin. Molec. Teratol.* 79(3): 231-235.
- Ruiz-Cano, D., Perez-Llamas, F., Zamora S. (2012). Implicaciones de las poliaminas en la salud infantil. *Arch. Argent. Ped.* 110(3): 244-250.
- Shing, C.K., Kumar, A., Hitchcock, D.B., Goodwin R., LaWoie, H.A, Nagarkatti, P., Shing, U.S. (2011). Resveratrol prevents embryonic oxidative stress and apoptosis associate with diabetic embryopathy and improves glucose and lipid profile of diabetic dam. *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (8): 1186-1196.
- Shubert, P. J., Gordon, M.C., Landon, M.B., Gabbe, S.G. Kniss, DA. (1996). Ketoacids attenuate glucose uptake in human trophoblasts isolated from first trimester chorionic villi. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 56-62.
- Steel, J.M., Johnstone, F.D., Hume, R. Mao, J-H. (1994). Insulin requirements during pregnancy in women with type I diabetes. *Obstet. Gynecol.* 83: 253-258.
- Suárez-García, L.M., Domínguez-Magallán, L.A. Giménez-Fúnez, M.A. (2012). La alimentación: un factor determinante en el aprendizaje de los niños. Memorias de la 26ª Feria Nacional de Clubes de Ciencia 2012. Chile.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 25: s5-s20.
- Thomas, T., Thomas, T.J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutical applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 244-248.
- Torres-Cuevas, I., Parra-Lorca, A., Sánchez-Illana, A., Nuñez-Ramiro, A., Kugowski, J., Chafer-Pericás, C., Cernada, M., Escobar, J., Vento, M. (2017). Oxygen and oxidative stress in albino ratas. *Biomed. Pharmacother.* 85: 202-208.
- Trejo-González, N.L., Chirino-Galindo, G., Palomar-Morales, M., Capacidad antiteratogénica del resveratrol en diabetes inducida por estreptozotocina. (2015). *Rev. Per. Med. Exp. Salud Pú. b.* 32 (3): 457-463.
- Trejo-González, N.L. (2018). Expresión del gen *Pax 3* en un modelo *in vitro* de embriopatía diabética y su prevención por poliaminas. Tesis de maestría en ciencias biológicas. UNAM.
- Vilches, A., García, A.I., Moreno, L. (2013). Expresión genética por RT-PCR en tiempo real. Guía práctica de estudio. 1ª edición, México, FES Iztacala.
- Vlassara, H., Palace, M.R. (2002). Diabetes and advanced glycation and products. *J. Intern. Med.* 251: 87-101.
- Vousden, K. H., Ryan, K. M. (2009). p53 and metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* 9: 691-700.
- Wang S-Y, Lee Y-L, Lai Y-H, Chen JJW, Wu W-L Yuann JMP, Su W-L, Chuang S-M, y Hou M-H. (2012). Spermine attenuates the action of the DNA intercalator actinomycin D, on DNA binding and the inhibition of transcription and DNA Replication. *PLoS ONE* 7: e47101.
- Weigensberg, M. J., Garcia-Palmer, F.J. Freinkel, N. (1990). Uptake of myo-inositol by early-somite rat conceptus: Transport kinetics and effects of hyperglycemia. *Diabetes.* 39: 575-582.
- Wentzel, P., Ejdesjő, A., Eriksson, U.J. (2003). Maternal diabetes *in vivo* and high glucose *in vitro* diminish GADPH activity in rat embryos. *Diabetes.* 52: 1222-1228.
- Wentzel, P., Eriksson U.J. (2005). A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E2 in rat embryos: Reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth. Def. Res. Part. A: Clin. Molec. Teratol.* 73(7): 506-511.

- Wu, W., Liu, P., Li, J. (2011). Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 82: 249-258.
- Yábar VCA. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú: Ministerio de Salud, 59 p.