



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EXPRESIÓN DEL GEN SOX2 EN EMBRIONES DE RATA
EN UN MODELO DE EMBRIOPATÍA DIABÉTICA, PRO
EFECTO ESPERMIDINA O ESPERMINA**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA

LIERA CARRANZA RENÉ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Martín Palomar Morales



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice General

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Clasificación de la diabetes.....	4
1.2. Datos Epidemiológicos	5
1.3. Diabetes en el embarazo.....	6
1.4. Embriopatía Diabética.....	8
1.5. Desarrollo embrionario.....	9
1.5.1. Tubo Neural.....	12
1.5.2. Tubo Cardíaco.....	14
1.6. Principales genes involucrados en el desarrollo embrionario.....	15
1.7. Estrés oxidativo.....	17
1.7.1. Antioxidantes.....	18
1.7.2. Poliaminas.....	19
1.7.3. Regulación Genética de las Poliaminas.....	22
1.8. Rata Wistar como modelo biológico.....	23
2. Antecedentes.....	24
3. Planteamiento del problema.....	25
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos.....	27
5.1. General.....	27
5.2. Particulares.....	27
6. Materiales y Métodos.....	28
6.1. Modelo Biológico.....	28
6.2. Medios de Cultivo.....	28
6.3. Diseño de <i>Primers</i>	28
6.4. Cultivo de Embriones.....	29
6.5. Estudio Morfológico.....	29
6.6. PCR Convencional.....	29
6.7. Preparación de RNA total.....	31
6.8. Histología.....	31
6.9. Inmunohistoquímica.....	31
7. Resultados	32
8. Discusión.....	39
9. Conclusiones.....	43
10. Literatura Citada.....	44

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INDICE DE TABLAS

FIGURA 1. PRINCIPALES RIEZGOS EN EL EMBARAZO CON DM.....	10
FIGURA 2. PREPARACIÓN DE LOS MEDIO DE CULTIVO.....	28
FIGURA 3. ESPECIFICACIONES DE LOS PRIMERS.....	29
FIGURA 4. PARAMETROS DEL SCORE MORFOLOGICO.....	30

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE LA FISIOLOGIA DE LA DIABETES MELLITUS.....	3
FIGURA 2. DERARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO EN MAMÍFEROS.....	11
FIGURA 3. DESARROLLO NEURAL.....	13
FIGURA 4. . ILUSTRACIÓN DE EMBRIÓN DE RATA	14
FIGURA 5. PARTES HISTOLÓGICAS DEL TUBO CARDIACO.....	14
FIGURA 6. ETAPAS DE DESARROLLO DE UN CORAZÓN	15
FIGURA 7. ESQUEMA DE LA FAMILIA SOXB1	17
FIGURA 8. ESTRUCTURA DE LAS PRINCIPALES POLIAMINAS	21
FIGURA 9. METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS	22
FIGURA 10. EMBRIONES POSTCULTIVO CON TRATAMIENTOS.....	32
FIGURA 11. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS.....	34
FIGURA 12. PROMEDIOS SCORE MORFOLOGICO.....	35

INDICE DE ABREVIATURAS

- **ADA** American Diabetes Asociation
- **AGE´s** Productos de Glicosilación Avanzada
- **ARG** L-arginina
- **DM** Diabetes Mellitus
- **DM1** Diabetes Mellitus Tipo 1
- **DM2** Diabetes Mellitus Tipo 2
- **DNA** Ácido Desoxirribonucleico
- **ERO´s** Especies Reacitvas de Oxigeno
- **GC** Grupo Control
- **GDM** Diabetes Mellitus Gestacional
- **GLC** Glucosa
- **HAPO** Hiperglucemia y Resultados Adversos del Embarazo
- **IDF** Federación Internacional de la Diabetes
- **MCI** Masa Celular Interna
- **MET** L-metionina
- **ODC** Ornitina Descarboxilasa
- **ORN** L-ornitina
- **PAO** Poliamina Oxidasa
- **PCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PUT** Putrescina
- **SAM** S-adenosilmetionina
- **SAMDC** S-adenosilmetionina descarboxilasa
- **SNC** Sistema Nervioso Central
- **SPD** Espermidina
- **SPM** Espermina
- **ZGA** Activación del Genoma del Cigoto

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM), es una patología caracterizada por hiperglucemia, resultante de la disminución de la secreción de insulina, la pérdida de la acción de ésta, o ambas; por lo cual a menudo se define como un síndrome. En el desarrollo de la DM, están involucrados muchos procesos patológicos, que van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas y la posterior deficiencia de insulina, hasta anomalías tisulares y subcelulares que provocan la resistencia a la acción de esta hormona. La asociación de DM franca o pregestacional con el embarazo se asocia con aumento del riesgo de trastornos del crecimiento y malformaciones congénitas en la descendencia, con una prevalencia de entre el 8% y 10%. 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. 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. Éstas pueden modular la conformación de diversos genes, y regular su expresión, la transducción de señales y la función de canales iónicos, así como la síntesis de Ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas mediante la unión a DNA y RNA; son depuradores endógenos de Especies Reactivas de Oxígeno (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 SOX 2 en embriones de rata cultivados a altas concentraciones de glucosa. Para estudiar la expresión del gen SOX 2, 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. Los embriones postcultivo se recuperaron, para obtener el registro morfológico como indicador de desarrollo, se obtuvieron DNA y RNA para el análisis de la presencia de SOX2 y se realizó PCR convencional. 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 presencia del gen, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratamiento, pero se observa una gran diferencia contra el grupo glucosa disminución significativa en el nivel de expresión del gen.

1. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de alteraciones metabólicas que, como síntoma principal, presentan hiperglucemia y que, la gran mayoría de los casos, presentan, una serie de complicaciones tanto micro como macro vasculares y sistémicas (Ayala *et al.*, 2002). La DM es una enfermedad crónica y compleja en la cual se requiere medicación continua y diversas estrategias provistas por varios especialistas para reducir el riesgo, además de un estricto control glicémico. La DM se entiende como una alteración del metabolismo en el que participan muchos sistemas fisiológicos, además del encargado del metabolismo de la glucosa; se caracteriza por ser una anomalía en la cual el cuerpo no puede regular la cantidad de este carbohidrato en la sangre (American Diabetes Association, 2010; International Diabetes Federation, 2021, Organización Mundial de la Salud, 2016).

Los principales síntomas de la diabetes mellitus incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia, visión borrosa, y bajo un mayor deterioro, cetoacidosis; la susceptibilidad a algunas infecciones también suele presentarse en pacientes con DM (American Diabetes Association, 2010; International Diabetes Federation, 2021, Organización Mundial de la Salud, 2016).

Las consecuencias fisiopatológicas de la DM son resultantes de una serie de alteraciones producidas en los mecanismos de regulación en sangre. Por un lado, la resistencia a la insulina causa un incremento en la producción de glucosa en el hígado y disminuye la capacidad de almacenamiento en forma de glucógeno, así como su utilización en el tejido muscular; por otra parte la disfunción de las células beta reduce la producción de insulina y una consecuente desregulación de los mecanismos regulatorios de la glucosa (Maida *et al.*, 2022).

La DM en adultos puede ser un proceso llevado a cabo durante años, muchos de los pacientes muestran también un aumento en las concentraciones séricas de colesterol, triglicéridos y ácido úrico; y posteriormente puede aparecer también hipertensión arterial. Cuando se presentan en conjunto estas alteraciones (diabetes, obesidad e hipertensión), se le conoce a esta asociación como “síndrome metabólico”, que puede provocar diversas complicaciones (Shamah-Levy *et al.*, 2020). La fisiopatología de la DM se esquematiza en la fig. 1.

Si no se sigue algún tratamiento, la diabetes o hiperglicemia puede causar complicaciones microvasculares como nefropatía, retinopatía, neuropatía, entre otras; además de macrovasculares como enfermedades cardíacas, enfermedades arteriales periféricas, y enfermedades cerebrovasculares; el riesgo de aparición de estas complicaciones aumentan conforme el desarrollo de la enfermedad, así como el tiempo que se padece esta enfermedad (Golden y Sapir, 2012; Shamah-Levy *et al.*, 2020)

En México, la DM está considerada como un problema de salud pública, puesto que tiene una alta prevalencia e incidencia en la población. Tan solo en la población adulta mayor a los 20 años se presenta en el 14.4% de la población, y posterior a los 50 años, el 30% de este sector poblacional presenta este padecimiento a nivel nacional (Shamah-Levy *et al.*, 2020). Esto es un grave problema de salud pública, puesto que conlleva un enorme gasto económico y humano. Se tiene registro que en Estados Unidos los costos atribuibles a esta enfermedad (tratamientos, atención hospitalaria, gasto de personal, etc.) ascendía a los 245 mil millones de dólares tan solo en el 2012 (González-Villalpando *et al.*, 2014).

ESQUEMA RESUMEN DE LA FISIOPATOLOGIA DE LA DIABETES MELLITUS

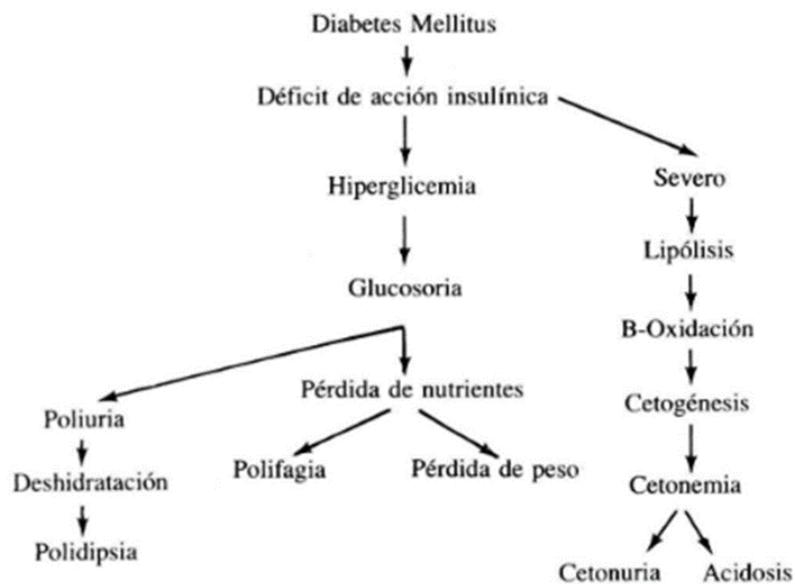


Figura 1. Esquema de la fisiología de la diabetes mellitus. Tomado de Restrepo (1992).

1.1 Clasificación de la Diabetes

La American Diabetes Association (ADA) en el año 2010 reformuló la clasificación de diabetes de la siguiente manera, que aún continúa vigente (American Diabetes Association, 2023):

Diabetes mellitus tipo 1. Esta forma, anteriormente llamada “diabetes dependiente de insulina” o “diabetes de inicio juvenil”, representa 5 a 10% de la diabetes a nivel mundial, en la mayoría de los casos se debe a la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. La diabetes tipo 1 se caracteriza por la presencia de 2 o más marcadores autoinmunes; la velocidad de degradación de células beta pancreáticas varía de persona a persona, siendo la degradación más rápida en niños y adolescentes y la más lenta en adultos. Una de las primeras manifestaciones de este tipo de diabetes en niños es la cetoacidosis, al principio se presenta en ayunas, y con la evolución de la enfermedad o con factores externos como el estrés, puede aumentar y presentarse en otros estados que no sea en ayunas; en cambio en adultos, la cetoacidosis puede no estar presente puesto que al acumular gran cantidad de células beta pancreáticas, esta condición puede pasar desapercibida a lo largo de la vida. Por lo general, los pacientes con esta forma de diabetes son delgados

Diabetes mellitus de tipo 2. Esta forma de diabetes también se le conoció como no insulino dependiente o diabetes adulta. Presenta una ocurrencia del 90 al 95% de los casos de diabetes a nivel mundial, este tipo engloba a los casos que presentan una relativa resistencia a la insulina en lugar de una resistencia absoluta, y muy seguido este tipo de pacientes puede no necesitar de un tratamiento a lo largo de su vida. Existen diversas causas para la aparición de este tipo de diabetes, aunque la destrucción de las células beta pancreáticas no es una de ellas. Por lo general los pacientes de este grupo tienden a la obesidad o sobrepeso. Estos pacientes pueden tener niveles de insulina normales o ligeramente elevados; sin embargo, la secreción de la insulina es defectuosa e insuficiente para regular los niveles anormales para la resistencia a la insulina, cabe destacar que se ha visto una notable mejora en pacientes con dieta y ejercicio. A nivel celular e intracelular puede haber incapacidad para reconocer a la insulina por parte del receptor, o incapacidad de éste para evocar los mecanismos moleculares de respuesta.

Diabetes mellitus gestacional (GDM, por sus siglas en inglés) Anteriormente se diagnosticaba dentro de éste grupo a toda mujer gestante que presentaba síndrome metabólico o intolerancia a la glucosa de cualquier tipo. Sin embargo actualmente se ha hecho una reestructuración para la clasificación, puesto que por la dificultad de diagnóstico, las mujeres gestantes con diabetes tipo 2 previa, no mostraban síntomas hasta bien entrada la gestación, siendo que además, por ser un estado de alta volemia, la mujer gestante puede presentar síntomas de diabetes o resistencia a la insulina durante el embarazo sin haber tenido la enfermedad previamente, por lo que la ADA (American Diabetes Association), ha clasificado como GDM el padecimiento de cualquier mujer gestante entre 24 y 28 semanas de gestación, que previamente no haya sido detectada con alguna resistencia a la insulina o DM. Al igual que la DM tipo 1, este tipo de DM es indicativo de destrucción de células beta pancreáticas subyacentes, por lo que la madre gestante tiene altas probabilidades de desarrollar DM de cualquier tipo posterior al embarazo, generalmente (pero no siempre) DM tipo 2.

Tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (como diabetes neonatal y diabetes de inicio en la madurez [MODY]), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por sustancias químicas (como con el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos).

Cuando una mujer con diabetes mellitus de tipo 1 o 2 en edad reproductiva se embaraza, la coexistencia de la diabetes mellitus pregestacional o franca, con el embarazo, es causa de muchos defectos del desarrollo, lo que se conoce desde hace cerca de 30 años como “embriopatía diabética” (Baker y Piddington, 1993). Una de las complicaciones más notoria es la aparición de malformaciones congénitas en los fetos o neonatos (Chappell *et al.*, 2009). Esta condición aumenta significativamente el riesgo de anomalías estructurales, siendo los defectos de tubo neural y los defectos cardiovasculares las más importantes (Correa *et al.*, 2008) pues llegan a ser incompatibles con la vida.

1.2 Datos epidemiológicos

La Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) estima que el año 2021 había 537 millones de personas con este padecimiento a nivel mundial, y

para el año 2045, la población mundial afectada con diabetes ascenderá a 783 millones de personas. En nuestro país, de acuerdo con este mismo organismo, en 2021 había 14.1 millones de personas y en 2045 serán 21.2 millones (International Diabetes Federation, 2021). Esta cifra aumenta considerablemente año tras año, lo que trae consigo un incremento en los factores de riesgo asociados como el sobrepeso, obesidad entre otros, siendo los más afectados las poblaciones vulnerables como adultos mayores como mujeres embarazadas.

La diabetes es un problema que va en aumento, por lo que de manera proporcional, aumenta también el número de mujeres en edad reproductiva (18-44 años) con diagnóstico de diabetes (Xu *et al.*, 2019). En 2015, se estimaban en el mundo cerca de 60 de mujeres con diabetes mellitus, y es posible que este número aumente de manera exponencial entre 2025-2030 (Gabbay-Benziv *et al.*, 2015). Pese a los esfuerzos clínicos de mejorar el control glicémico durante el embarazo diabético, la frecuencia de alteraciones del desarrollo es muy elevado en estudios de gestación diabética, tanto de tipo 1 como de tipo 2 con respecto a la población abierta (Dunne *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2012; Vinceti *et al.*, 2014).

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF), los países con mayor número de pacientes diabéticos son en este orden: China, India, Pakistán, Estados Unidos, Indonesia, Brasil y México (International Diabetes Federation, 2021). 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. En México, las estadísticas más recientes indican un aumento en mortalidad por este padecimiento del 77% durante las últimas tres décadas, y que durante la contingencia sanitaria por COVID-19, hubo un aumento de 41.6% con respecto a años anteriores (Bello-Chavolla *et al.*, 2022).

1.3 Diabetes en el embarazo

Uno de los grupos poblacionales más vulnerable es la población de mujeres gestantes, en este grupo la DM es considerada como la patología metabólica más común durante la gestación; se presenta aproximadamente en el 5% de los embarazos. De estas pacientes, el 90% 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, en las cuales se presenta hiperglicemia y otras manifestaciones en el último trimestre. 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, 2000).

El antecedente de DM1 ó 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, ya que por lo general desemboca en 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 todavía diez veces más frecuente que en la población abierta (Danglot-Banck & Gómez-Gómez, 2004). A estas situaciones se les ha agrupado con el término “embriopatía diabética” (Baker & Piddington, 1993), y se considera una complicación de la diabetes mellitus junto con la neuropatía, cardiopatía, nefropatía y otras, y no una complicación del embarazo.

Desde los inicios del siglo pasado se ha conocido el potencial teratógeno de la DM en humanos; y la disponibilidad clínica de la insulina hace aproximadamente cien años, ha ayudado a que el desarrollo de los fetos progresivamente haya mejorado al punto de casi igualar a los fetos con un desarrollo sin complicación por la DM. Este ha sido un tratamiento adecuado, no obstante, con la expansión epidémica de la diabetes tanto en países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo, aunado al incremento de la edad gestacional a la concepción debido a la constante industrialización del mundo, se ha disparado el impacto de las consecuencias teratógenas de la DM durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, aunque se tienen estrategias para la atención médica de mujeres diabéticas embarazadas, cerca de dos terceras partes de los embarazos en madres con DM franca, no son planeados y muchos de ellos son detectados después de las primeras semanas de ida, una situación que pone a prueba cualquier aproximación basada en la información (Castori, 2013) y que ciertamente evita una acción temprana sobre estos casos.

En el 2009 un estudio sobre Hiperglucemia y Resultados Adversos del Embarazo (o HAPO por sus siglas en inglés) reunió una cohorte multinacional a gran escala, y aclaró los varios riesgos y los resultados adversos asociados a la hiperglucemia, encontrando que la hiperglucemia materna incrementa significativamente de partos pretérmino (prematuros), necesidad de parto por cesárea, infantes con edad gestacional avanzada (mayor a las 42 semanas de gestación), necesidad de cuidados

intensivos (para el neonato), hipoglucemia neonatal e hiperbilirrubinemia; de igual manera algunos riesgos obstétricos asociados a la DM fueron hipertensión inducida en el embarazo, macrosomía y malformaciones congénitas (HAPO Cooperative Research Group, 2009).

El espectro de malformaciones atribuidas al embarazo con DM es amplio, diversos problemas están asociados con el desenvolvimiento de la mayoría de las partes del cuerpo, incluyendo el tracto cardíaco y circulatorio, las estructuras cráneo cefálicas, el sistema nervioso central, así como también los sistemas gastrointestinales, musculoesqueléticos, y urogenital (Castori, 2013).

Pese a que los mecanismos que generan una organogénesis alterada siguen siendo descritos hasta el día de hoy, los tipos y gravedad de los fenómenos observados, así como otras complicaciones como la hiperglucemia materna, el desarrollo embrionario, entre otros, sugieren que la DM actúa durante el desarrollo temprano, una propuesta formulada desde hace más de 40 años (Freinkel, 1980). El metabolismo embrionario alterado por la diabetes materna juega un papel importante en la aparición de las malformaciones (Wentzel *et al.*, 2001).

Los estudios epidemiológicos de la última década han medido los factores de riesgo en el embarazo que pueden aparecer típicamente durante ésta situación, lo que aunado a un mal diagnóstico de diabetes mellitus, o su nulo diagnóstico, llegan a acarrear diferentes problemáticas. Los factores más comunes evaluados en los trabajos epidemiológicos son sobrepeso u obesidad, excesiva ganancia de peso, dieta, etnia, polimorfismos genéticos, edad materna avanzada, ambiente intrauterino (bajo o alto peso al nacimiento), historial familiar y personal con la DM, y otras enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina, como puede ser el síndrome de ovario poliquístico (Plows *et al.*, 2018).

Todos estos factores anteriormente descritos, están directa o indirectamente relacionados al mal funcionamiento de las células beta pancreática y/o sensibilidad a la insulina.

1.4 Embriopatía Diabética

Pese a que los mecanismos celulares causantes de la embriopatía diabética son poco claros, se han hecho varias sugerencias acerca de estos procesos, destacando los factores ambientales (diabetes materna y condiciones intrauterinas) y la predisposición

genética como de importancia (Eriksson & Wentzel, 2016); además del aumento en el estrés oxidativo, una baja en la defensa antioxidante, o que ambas condiciones existan simultáneamente (Ornoy, 2007).

Dentro de las condiciones ambientales, uno de los factores teratogénicos sugeridos con mayor impacto es el suero materno, frecuentemente desde la experiencia clínica y posteriormente corroborados en varios sistemas experimentales, siendo relacionados con la hiperglicemia y la hiperketonemia típicas de la diabetes mellitus descontrolada, y presentes en la madre diabética (Eriksson & Wentzel, 2016). La hiperglicemia parece ser el estímulo intrauterino más importante, pues favorece la producción de radicales libres y otras condiciones adversas para la implantación y el desarrollo embrionario y fetal (Mattos y Ochoa, 2015).

La exposición fetal a la diabetes durante las primeras etapas del embarazo puede conducir a una mayor probabilidad de que el producto desarrolle obesidad y diabetes en su etapa adulta, perfiles cardiometabólicos adversos, mayor riesgo de hospitalización, uso de medicamento, y en general una mayor tasa de mortalidad; de igual manera, la evidencia sugiere una asociación en el mal desarrollo neuronal, lo que se puede observar en una disminución en la función cognitiva a largo plazo, lo que se traduce como un bajo desempeño escolar, mayor probabilidad de padecer autismo, déficit de atención e hiperactividad (Alexopoulos *et al.*, 2019).

Los distintos riesgos presentes por DM existente previa al embarazo se pueden agrupar en la tabla 1. La diabetes preexistente en el embarazo es compleja y está asociada con riesgos neonatales y maternos importantes, los riesgos más comunes enlistados demuestran los muchos riesgos que pueden salirse de un control médico, por eso diferentes artículos señalan la importancia de un diagnóstico previo al embarazo.

1.5 Desarrollo embrionario

En los mamíferos, el desarrollo embrionario inicia con la unión de los gametos, el óvulo (u ovocito), el espermatozoide. A este proceso se le denomina fertilización, y en este grupo de vertebrados, es interna, ocurre muy cerca del ámpula del oviducto (en humanos el oviducto es llamado trompa de Falopio). El desarrollo embrionario ha sido descrito ampliamente en varios textos académicos (Arteaga y García, 2021; Barresi y Gilbert, 2020; López, 2015; López-Sánchez *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2016), por lo que en este espacio solamente daremos algunas generalidades:

Tabla 1. Riesgos más comunes que se presentan durante un embarazo complicado con DM

RIESGO	DETALLE
Complicaciones maternas	
Retinopatía Diabética	Riesgo del progreso de la enfermedad existente durante y hasta un año después del embarazo
Nefropatía diabética	Riesgo de proteinuria progresiva durante el embarazo, en adición a un trabajo de parto prematuro
Hipertensión	Aumenta el riesgo de preclamsia, separación de la placenta e infarto
Complicaciones fetales	
Aborto	
Defectos al nacimiento	Aumento del riesgo de defectos al nacimiento de 4 a 8 veces más que en un embarazo sin complicación por DM
Restricción del crecimiento intrauterino	Hipertensión materna, enfermedades vasculares, complicaciones renales y de retina
Macrosomía	Definida como un peso al nacimiento mayor a 4 kg, es decir, un feto con un tamaño corporal mayor al normal
Morbilidad perinatal	Se incluye ictericia neonatal, hipoglucemia, afecciones respiratorias e incluso taquipnea
Salud adulta	Los infantes cuyas madres tuvieron diabetes durante el embarazo tienen una alta probabilidad de desarrollar obesidad, síndrome metabólico, dislipidemia y diabetes

Elaboración propia a partir de información consultada en Arizmendi *et al.*, 2012; Patiño, 2008; y Varillas *et al.*, 2005.

Una vez llevada a cabo la fertilización, el huevo inicia la segmentación mientras avanza por el oviducto hacia el útero, impulsado por el movimiento de los cilios del

epitelio uterino. La segmentación en mamíferos es de las más lentas en el reino animal. Además, es asincrónica, lo que quiere decir que el cigoto se divide en dos, y cada una de las dos células restantes se divide a diferente tiempo. Una tercera característica de la segmentación en mamíferos es que es rotacional, es decir, que para pasar de embrión bicelular a tetracelular, un blastómero (célula) se divide de manera longitudinal y otra transversal.

Para especies como ratón y rata de laboratorio, así como para humanos, se sabe el tiempo en que aparecen el embrión bicelular, tetracelular, la mórula, la blástula y la gástrula. Si bien el proceso en general es conocido desde hace varios años, el intercambio de señales que ocurre entre el embrión y el sistema reproductor femenino, así como los eventos regulatorios que suceden, son todavía objeto de estudio.

La segmentación del cigoto varias veces da lugar a la mórula, llamada así por semejar una mora. La fase siguiente a la mórula es conocida como blástula; durante la blastulación, se forman dos grupos celulares distintos, el trofoblasto, externo, y el macizo celular interno o masa celular interna (MCI); el primero de los cuales originará los anexos embrionarios, mientras que el segundo dará lugar al embrión propiamente dicho. Además de los dos tipos de células, se forma un espacio libre de ellas dentro del embrión, que es llamado blastocele; no es una estructura hueca, en cambio, está lleno de un fluido que es importante para el desarrollo posterior. En la figura 2 se esquematiza el desarrollo temprano desde la fertilización hasta la blástula.



Figura 2. Desarrollo embrionario temprano en mamíferos. Tomado de <https://www.reproduccionasistida.org/embarazo-anembrionado/desarrollo-embriionario-normal/>.

Posteriormente, en el embrión suceden eventos de migración y reacomodo celulares, un fenómeno complejo, que origina a la fase embrionaria conocida como gástrula. Durante la gastrulación, aparecen las tres capas embrionarias, que darán lugar a estructuras adultas distintas: Ectodermo, mesodermo y endodermo.

Del ectodermo (en griego *ektos*: fuera, y *derma*: piel) derivan el sistema nervioso, los órganos de los sentidos, la piel y sus anexos: uñas, pelos, escamas, glándulas sudoríparas, sebáceas, y mamas, la córnea, entre otras.

El mesodermo (*mesos*: medio, y *derma*: piel) origina el esqueleto, los músculos, el aparato urinario, algunas partes del aparato genital, el aparato circulatorio, la sangre, entre otros.

Por último, del endodermo (*endon*: dentro, y *derma*: piel) derivan: el aparato digestivo y sus glándulas anexas: el hígado, el páncreas, vesícula urinaria, el aparato respiratorio, los bronquios, y otros órganos.

1.5.1 Tubo neural

Durante la gástrula tardía, en el ectodermo se forma un engrosamiento que se conoce como placa neural, la cual se hunde en el centro, formando un surco neural, y dos elevaciones laterales, los pliegues neurales, que se elevan, acercan y fusionan, para originar el tubo neural, que queda abierto en sus extremos anterior y posterior, por los neuroporos cefálico (anterior) y caudal (posterior). A este proceso se le denomina neurulación o tubulación, y es muy importante ya que cualquier daño que suceda en esta región durante este periodo, será reflejado como una malformación mayor del sistema nervioso central. En la figura 3 se esquematiza a grandes rasgos la neurulación.

En vertebrados, la interacción tisular entre la notocorda y ectodermo es una de las más importantes interacciones de todo el desarrollo, por la notocorda se dirige al ectodermo, haciendo que la placa neural eleve sus bordes, los cuales confluyen y se fusionen en la línea media formando el tubo neural, el cual se diferencia en el cerebro y la espina dorsal (Sadler, 2019). La acción por la que la notocorda instruye al ectodermo para convertirse en tubo neural se llama inducción primaria embrionaria, y es la respuesta celular por la cual la placa de las células ectodérmicas se transforma en un tubo hueco y es llamado neurulación. La regionalización del tubo neural también ocurre como resultado de cambios en la forma del tubo. En el extremo cefálico (donde

se formará el cerebro) la pared del tubo se encuentra engrosada, aquí una serie de depresiones y constricciones define los diversos compartimientos cefálicos.

En la región caudal de la cabeza, el tubo neural permanece como un tubo simple que disminuye hacia la cola. Las dos aberturas en los extremos del tubo neural se llaman neuroporo anterior y neuroporo posterior. En los mamíferos estas aberturas permiten que el líquido amniótico fluya a través del tubo neural por un tiempo. El defecto en el cierre del neuroporo posterior en humanos al día 27 (o su posterior ruptura poco después de ello) resulta en espina bífida, la severidad de esta depende en cuanto queda de médula espinal abierta. De cualquier modo, el fallo en el cierre del neuroporo anterior resulta en una condición letal llamada anencefalia, aquí el cerebro anterior permanece en contacto con el líquido amniótico y subsecuentemente degenera, el desarrollo embrionario del cerebro anterior cesa y la bóveda craneal no llega a formarse (Barresi y Gilbert, 2020).

Posterior a la neurulación, los diferentes grupos de células migrarán, se diferenciarán, etc., proceso conocido como organogénesis, y que es sujeto a muchos procesos regulatorios. En la figura 4 se esquematiza un embrión de 10-11 días de rata, que ya ha terminado la neurulación y ha comenzado la organogénesis.

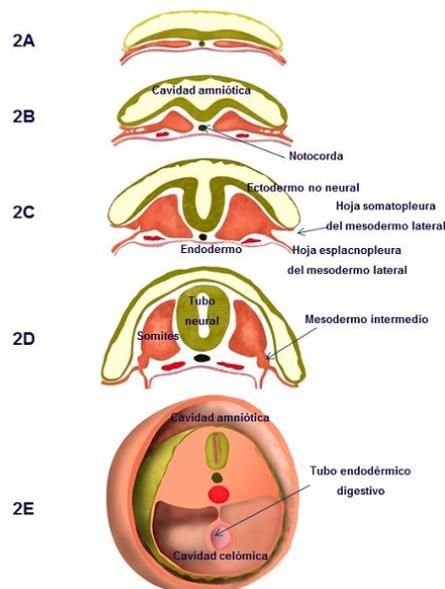


Figura 3. Desarrollo neural, desde la placa neural hasta el cierre de tubo neural. Tomado de Lopez-Sanchez *et al.* (2013).

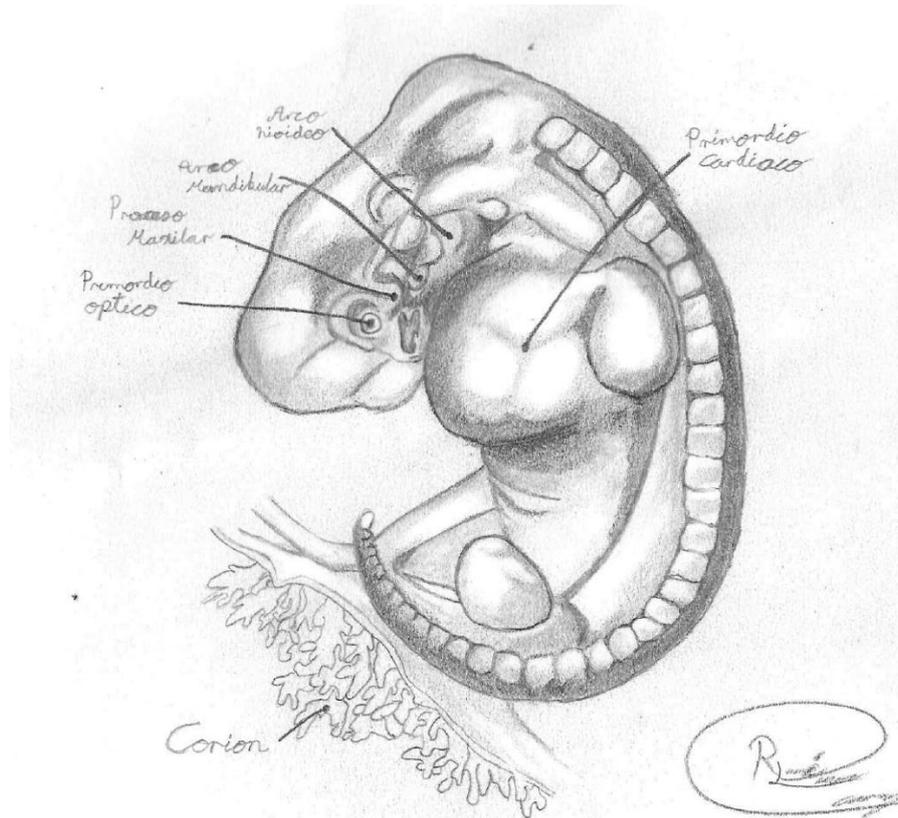


Figura 4. Ilustración de embrión de rata. Elaboración propia.

1.5.2 Tubo cardiaco

El corazón es el órgano principal del sistema circulatorio, su función principal es el de bombear la sangre a todo el cuerpo a través de los vasos sanguíneos. Es un músculo hueco con acción de bomba, su estructura consta de tres partes: el endocardio, que es la capa interna que está en contacto con la sangre; el miocardio, que es la capa intermedia la cual realiza la función de contracción; y el pericardio, que es la capa externa (fig. 5).

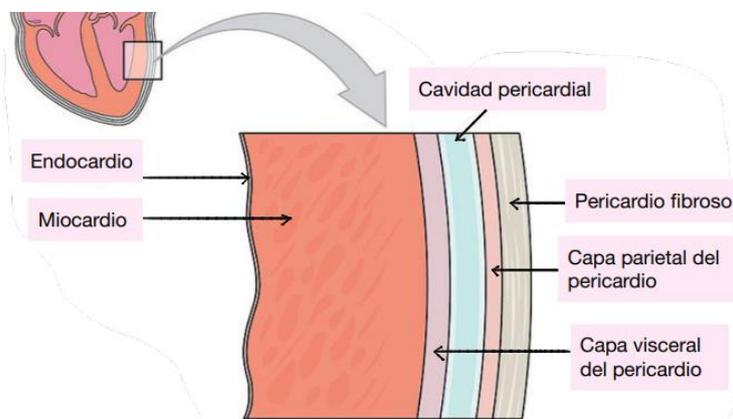


Figura 5. Partes histológicas del tubo cardiaco. Tomado de Soria *et al.* (2020).

Durante la primera etapa de formación de lo que será conocido como el corazón, tenemos la etapa precardiogénica, en esta etapa inicial se forman las áreas cardíacas, las cuales se fusionan y forman una herradura cardíaca. En estas áreas cardíacas y posterior herradura, se comienza la regulación molecular para la diferenciación de los cardiomiocitos. Durante la cuarta semana de gestación el corazón embrionario comienza su formación al fusionar los primordios cardíacos constituyendo un tubo cardíaco primitivo; en esta etapa se le puede llamar corazón en tubo recto o en etapa pre-asa. Conforme el desarrollo avanza, el tubo cardíaco primitivo sufre un proceso de torsión y rotación para formar el asa bulboventricular. En el desarrollo cardíaco posterior el tubo cardíaco sufre cambios importantes en su morfología externa e interna, en este periodo (días 26 a 28) las cavidades atriales y ventriculares se ubican espacialmente en su posición definitiva y se inicia la segmentación y desarrollo de los tabiques y las válvulas que separarán y controlarán el paso de la sangre respectivamente. El asa bulbo ventricular toma una forma característica de “S” (Arteaga y García, 2021). En la figura 6 se esquematiza a grandes rasgos el desarrollo cardíaco.

1.6 Principales genes involucrados en el desarrollo embrionario

Durante la embriogénesis, una apropiada regulación de genes es necesaria para poder lograr la correcta formación del organismo. Tras varias rondas de división de blastómeros, comienza la transcripción del genoma embrionario.

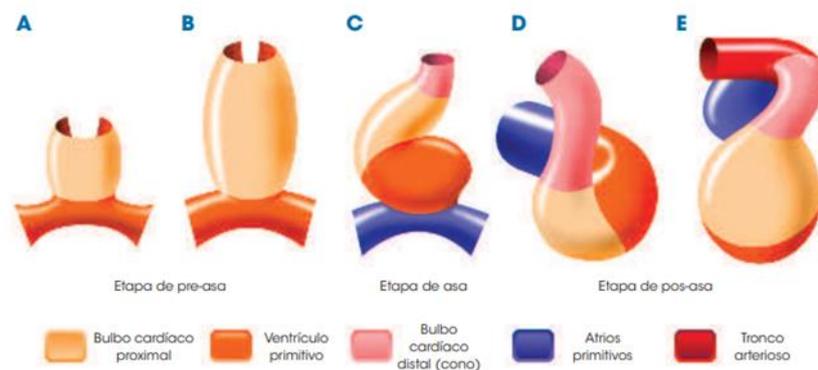


Figura 6. Etapas de desarrollo de un corazón durante las primeras etapas de desarrollo embrionario. Tomado de Arteaga y García (2021).

En estudios recientes se ha utilizado la técnica de *CRISPR-Cas9* para estudiar la expresión de la familia de genes DUX los cuales están directamente relacionados a la activación del genoma del cigoto (o ZGA por sus siglas en inglés) (De Iaco et al., 2017). Así mismo se ha estudiado la participación de OCT4, el cual se sabe que es un marcador de pluripotencialidad en etapa de desarrollo de blastocisto (Fogarty et al., 2017).

Es importante recalcar que la pluripotencialidad de las células durante el desarrollo embrionario debe a tres factores importantes, los cuales se pueden encontrar en posteriores etapas de desarrollo, las cuales son: NANOG, OCT4/POU5F1, y SOX2 (Sharov et al., 2008).

Se ha demostrado que los genes Oct4 y Sox2 tienen un papel importante en la embriogénesis de mamíferos y en células trocables embrionarias (Rizzino y Wuebben, 2017). Sin embargo, la familia Sox es necesaria no solamente durante el desarrollo embrionario temprana, se sabe que también participa en procesos del desarrollo y homeostasis en la vida adulta de mamíferos (Julian et al., 2017).

También se conoce que en la embriopatía diabética tienen participación tanto los factores ambientales como la predisposición genética (Eriksson y Wentzel, 2016); sin embargo, no es posible identificar un gen o familia de genes causantes del desarrollo alterado en esta condición clínica.

Los genes de la familia Sox participa activamente en la regulación de diversos procesos, así como fuertes asociaciones entre el grupo de genes Sox y líneas celulares específicas (Kamachi y Kondoh, 2013); un ejemplo claro de estos son el grupo de genes Sox B1 y el desarrollo neural. El análisis del patrón de desarrollo embrionario del grupo *SoxB1* (*Sox1*, *Sox2*, *Sox3*) indica que la expresión de estos genes está fuertemente correlacionada con el desarrollo de tejidos neuronales primordiales, iniciando en la etapa de la placa neural, y continuando a la zona ventricular del posterior sistema nervioso central (SNC) (Wood y Episkopou, 1999). Un análisis funcional de los factores de transcripción indicó que los *SoxB1* de pez cebra tienen casi una función de transactivación equivalente (Okuda et al., 2010); en ratón, se ha visto que dentro de los Sox B1, la expresión de Sox2 cubre totalmente el primordio neural mientras que la cobertura espacial de Sox 1 y Sox 3 es menos completa (Uchikawa et al., 2011). En la fig. 7 se puede observar la estructura general de la familia del gen Sox2.

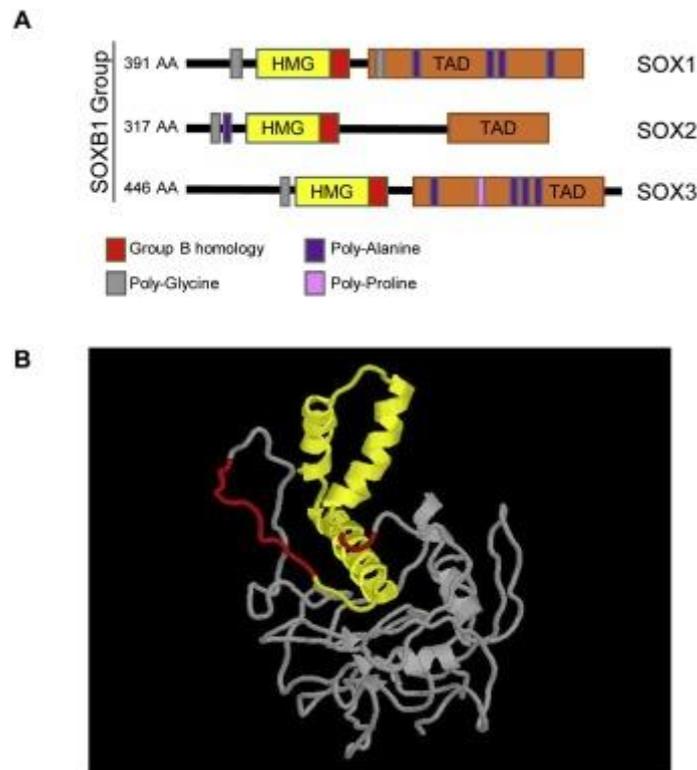


Figura 7. Esquema de la Familia SOXB1 y estructura cristalizada de SOX2.
Tomado de Novak *et al.* (2020).

1.7. 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 (Halliwell y Gutteridge, 2015; Ortiz y Medina, 2020), incluyendo las complicaciones del embarazo (Mora *et al.*, 2019).

Las principales especies reactivas de oxígeno (ERO, o ROS por sus siglas en inglés) son el radical superóxido (-O_2), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y el oxígeno singulete (O), normalmente se producen en pequeñas cantidades por todos los sistemas biológicos (Pizzino *et al.*, 2017), pueden interactuar con muchas macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y están involucrados en procesos celulares como crecimiento, diferenciación, progresión y apoptosis o muerte; (Pizzino *et al.*, 2017; Rajendran *et al.*, 2014),

Los organismos, sin embargo, han desarrollado ciertos mecanismos de defensa contra estos productos del metabolismo; entre estas moléculas antioxidantes se pueden encontrar enzimas como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa,

tioredoxina y otras; además de moléculas de bajo peso molecular no enzimáticas como Glutation, vitaminas C y E, flavonoides, L-arginina y poliaminas (Guija-Gerra y Guija-Poma, 2023).

1.7.1 Antioxidantes

Aunque las especies reactivas de oxígeno han sido consideradas por mucho tiempo como un potencial peligro para la vida, en realidad se producen en pequeñas cantidades en algunos procesos metabólicos y fisiológicos como son la respuesta inmune y la señalización celular; particularmente el H₂O₂ al oxidar ciertas proteínas, sirve como mensajero (Carvajal, 2019).

Las especies reactivas de oxígeno han sido relacionadas a la inducción de apoptosis, que causa fragmentación embrionaria (Jurisicova *et al.*, 1996), daño a la membrana y al DNA, retraso en el crecimiento embrionario, disminución de la viabilidad y calidad embrionaria Agarwal *et al.*, 2003; Guerin *et al.*, 2001); adicionalmente, causa efectos perjudiciales al genoma en la etapa de blastocisto (Gardner y Lane, 2005; Rinaudo *et al.*, 2006).

Para evitar los daños a los sistemas biológicos, los organismos han desarrollado mecanismos específicos para defenderse de los daños causados por las ROS, en general estos mecanismos han sido descritos como “sistemas antioxidantes”, los cuales son diversos y están encargados de la protección de las células de los daños por las ERO’s (Carvajal, 2019).

Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos, por lo general actúan disminuyen o evitan la oxidación de otras moléculas; y se clasifican en dos grandes grupos: enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes no son un grupo químico especial, entre ellos existe una amplia variedad de compuestos; esta diversidad determina el papel individual de cada antioxidante, así como también el sitio de acción. La actividad antioxidante puede estar fuertemente relacionada con el número de grupos funcionales como OH y NH₂, así como la posición de estos grupos funcionales (Cruz, 2014; Jamanca y Alfaro, 2017).

En base a su mecanismo de acción los antioxidantes se clasifican en primarios y secundarios, los primarios tienen la capacidad de atrapar radicales libres, así como inhibir la iniciación, propagación o reacción de escisión, mientras los secundarios

retardan la oxidación por reaccionar con los prooxidantes, como metales de transición o intermediarios de la oxidación (Palma, 2014).

Los antioxidantes primarios, entonces, pueden actuar mediante inhibición de las reacciones de oxidación, por atrapar las ERO's, mientras que los antioxidantes secundarios pueden actuar quelando los iones de los metales de transición y otras acciones específicas que pueden ser mecanismo anti-inflamatorio, inducción de factores protectores, inhibición de la NADPH oxidasa, inhibición de la xantina oxidasa, o la regulación de la señalización de las vías sensibles a redox de transducción, incluyendo los factores de transcripción (Pizzino *et al.*, 2017).

Las células de los mamíferos poseen algunas moléculas de bajo peso molecular endógenas, que tienen la posibilidad de inactivar a los radicales libres de manera espontánea. Entre estas moléculas se encuentran el glutatión y el ácido tiotico. Sin embargo, la gran mayoría de los antioxidantes de bajo peso molecular son derivados de fuentes naturales como plantas o minerales que son provistos normalmente en la dieta, entre estos se encuentran las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol), coenzima Q10, los beta-carotenos y los flavonoides (Madhavi *et al.*, 1995). Los antioxidantes exógenos pueden ser encontrados en una dieta balanceada (Cruz, 2014; Jamanca y Alfaro, 2017; Madhavi *et al.*, 1995; Palma, 2014).

1.7.2 Poliaminas

Las poliaminas son moléculas alifáticas nitrogenadas, de bajo peso molecular. con grupos amino distribuidos de forma regular a lo largo de su estructura. Entre sus principales funciones destacan el empaquetamiento de ácidos nucleicos, la modulación de receptores de membrana y canales iónicos, la regulación de la expresión génica y la señalización celular. Son capaces de inducir apoptosis, participan en el ciclo celular, modulan el sistema inmune y participan en el balance redox del organismo (Guasco-Herrera *et al.*, 2014). Las poliaminas, por su carácter policatiónico, regulan la expresión genética, la transducción de señales y la función de canales iónicos, así como la síntesis de DNA y proteínas mediante la unión intracelular de DNA y RNA; también se ha reportado que las poliaminas son depuradores endógenos de ERO's, por lo cual pueden proteger al DNA, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo (Guasco-Herrera *et al.*, 2014; Igarashi *et al.*, 1998; Muñoz-Esparza *et al.*, 2019). Las principales poliaminas fisiológicas 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. En la figura 8 se representan las principales poliaminas.

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 también 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 glicosilación inducida experimentalmente por el metilgloxal. 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 (Gugliucci y Menini, 2003; Gómez-Gallego et al., 2008).

La biosíntesis de poliaminas en las células de mamíferos tiene lugar por la acción secuencial de cuatro enzimas clave, dos descarboxilasas y dos transferasas. La descripción del metabolismo de poliaminas se ha revisado a partir de varias fuentes (Mendoza y Rocha, 2002; Miller-Fleming *et al.*, 2015; Muñoz-Esparza *et al.*, 2019; Ruiz-Cano *et al.*, 2012). Se puede dividir en dos pasos principales, mostrados en la figura 9:

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.
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).

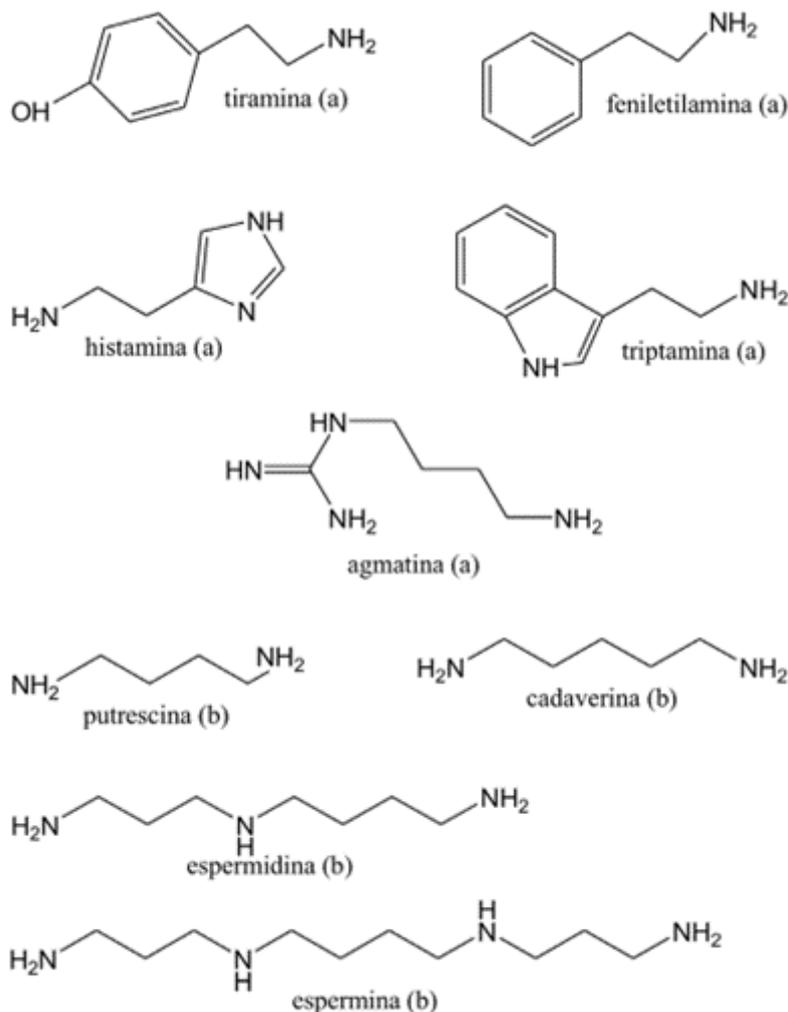


Figura 8. Estructura de las principales poliaminas, tomado de Guasco-Herrera *et al.* (2014).

La conversión de espermina en espermidina, y de ésta a su vez en putrescina tiene lugar por la acción de la 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).

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.

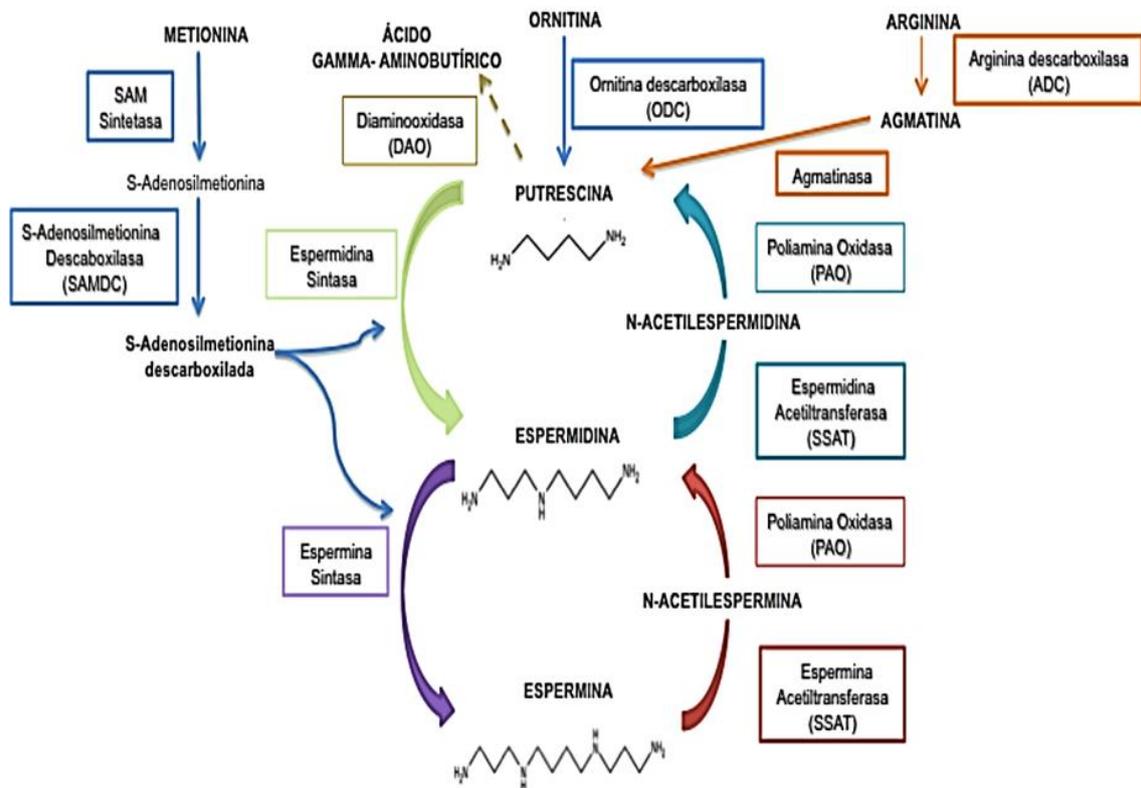


Figura 9. Metabolismo de las poliaminas, tomado de Guasco-Herrera *et al.* (2014).

1.7.3 Regulación genética y Poliaminas

Las Poliaminas participan activamente en la condensación y agregación del DNA, se ha evaluado la unión de Spd y Spm a los surcos menores y mayores de la doble cadena concluyendo que favorecen a su estabilización (Miller-Fleming *et al.*, 2015; Ruiz-Cano *et al.*, 2012), así como un efecto protector de la desnaturalización y agentes ionizantes como la radiación y ERO's; también se ha visto la modulación de la conformación cuádruplex en la región promotora (Guasco-Herrera *et al.*, 2014).

Un incremento en la concentración intracelular de poliaminas puede causar la interrupción de la metilación celular, lo que puede promover la expresión anormal de genes y la interrupción de otros procesos celulares dependientes de la metilación; se ha reportado que las poliaminas afectan la expresión de genes implicados en ciclo celular y apoptosis (Bhattacharya *et al.*, 2009; Landau *et al.*, 2012).

1.8 Rata como modelo biológico

La rata común (*Rattus norvegicus*) es una especie que tiene las cualidades necesarias para dar respuesta al cuestionamiento de cómo estudiar las enfermedades que afectan al hombre; esta especie y el ratón están entre los mamíferos que responden más uniformemente a esos requerimientos, son de fácil manejo y poseen las características zootécnicas adecuadas (Lindsey y Baker, 2005).

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. 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, 2005).

Como ya se señaló, de este animal, al igual que el ratón, se conoce de manera muy precisa el tiempo al cual se llevan a cabo los principales procesos de desarrollo, lo que facilita su uso en estudios de desarrollo (Beaudoin, 1980; Erb, 2005).

2 ANTECEDENTES

La alteración génica de las crías ha sido demostrada en diversos estudios y parece ser un componente integral de la embriopatía diabética (Eriksson y Wentzel, 2016). Un alto de transporte de glucosa por el GLUT2 a las células embrionarias durante la organogénesis afectará de forma adversa al desarrollo embrionario pues esto es responsable por los efectos embriopáticos de la diabetes (Li *et al.*, 2007).

En el 2009, Favaro y colaboradores demostraron que la delección del gen Sox2 causa pérdida en el hipocampo, además de que la ablación de Sox2 causa pérdida regional de los genes Sonic hedgehog (Shh) y Wnt3a, lo que sugiere que Sox2 controla el desarrollo del hipocampo vía regulación del Shh; y concluyen que Sox2 es necesario para el mantenimiento y desarrollo del SNC.

Cavallaro *et al.* (2008) encontraron que el gen Sox2 es importante en las etapas tempranas de la diferenciación en líneas celulares neuronales en un modelo *in vitro*, y comparando embriones nacidos producto del *knokdown* contra ratones adultos, encontrando que al hacer un *knokdown* a este gen en células madre neuronales cultivadas de embriones de rata, no se encontraron neuronas maduras además de diversas anomalías morfológicas, principalmente en el bulbo olfatorio y en el córtex cerebral.

Por otro lado, se demostró que las poliaminas (putrescina, espermina y espermidina) administradas a partir del día cinco de gestación, pueden prevenir las reabsorciones y los efectos embriotóxicos causados por la diabetes mellitus inducida por aloxana (Méndez y Palomar-Morales, 1999).

En un modelo *in vitro* de embriopatía diabética, nuestro grupo de investigación ha encontrado que las poliaminas revierten la frecuencia y severidad de malformaciones producidas por alta glucosa en el medio de cultivo (Chirino-Galindo *et al.*, 2009), sin afectar la actividad de enzimas antioxidantes, aunque la lipoperoxidación si se revierte (Chirino-Galindo *et al.*, 2012).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM es un síndrome que ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas, y pese a que se ha intentado encontrar los mecanismos de acción, no se ha podido dilucidar del todo las consecuencias en los diversos grupos poblacionales en los que esta se encuentra presente. A pesar de que el uso de medicamentos como insulina o hipoglucemiantes orales ha logrado dar una mejor calidad de vida a la población con esta enfermedad (International Diabetes Federation, 2021), siguen faltando estudios que ayuden a disminuir de forma considerable el problema que esta enfermedad genera.

Cerca del 1% de las mujeres embarazadas padecían de diabetes antes de la gestación, y en muchos casos, se diagnostica el embarazo hasta ya avanzado cerca de un mes de éste, y en otros casos, la diabetes era asintomática (García y García, 2009). Esto no es favorable para el embrión, ya que el ambiente hiperglucémico al que está sometido la unidad fetoplacentaria puede producir altos niveles de ERO's, generadas por el incremento en estrés oxidativo, lo que a su vez puede provocar alteraciones tales como malformaciones congénitas en el embrión, especialmente en el periodo de la organogénesis temprana (Freinkel, 1980; Ornoy, 2007).

El gen Sox2 es uno de los genes con mayor importancia, puesto que se encuentra presente en la señalización de diversos procesos clave como lo es el desarrollo embrionario y la diferenciación celular, además del mantenimiento de las células madre y regulación de otros genes como lo es Oct4. De ahí la importancia de la correcta expresión del gen Sox2 (Cavallaro et al. 2008; Favaro et al., 2009; Sharov et al., 2008).

En estudios anteriores del nuestro grupo de investigación, se ha reportado el efecto embrioprotector de las poliaminas espermina y espermidina (Chirino-Galindo et al., 2009, 2012, 2019; Méndez y Palomar-Morales, 1999), y se ha propuesto que dichos efectos pudieran ser debido al cambios en la expresión de genes implicados en el ciclo celular y la apoptosis por acción de las poliaminas (Bhattacharya *et al.*, 2009; Landau *et al.*, 2012).

4 HIPÓTESIS

Se sabe que el incremento de ERO's dado por el estrés oxidativo provoca daño al DNA, y trae consigo la respuesta de daño al DNA en la etapa de neurulación de embriones, bajo las condiciones de diabetes materna, lo que aumenta la apoptosis; nuestro grupo de trabajo ha reportado que la adición de las poliaminas espermidina y espermina reduce la aparición de malformaciones tanto en frecuencia como en severidad, en embriones cultivados *in vitro*.

Pese a que no está del todo dilucidado el mecanismo de acción a nivel celular y molecular, el presente estudio plantea que la expresión del gen Sox2 se ve alterada por los altos niveles de glucosa en ratas diabéticas preñadas lo cual se observaría directamente relacionado a un aumento en las malformaciones de tubo neural, especialmente durante la organogénesis temprana y si las poliaminas revierten dicho cambio en la expresión de Sox2.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la presencia del gen Sox2 en embriones de rata con altas concentraciones de glucosa y el efecto de la adición de poliaminas, así como su alteración morfológica en un modelo *in vitro*.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar la presencia del gen Sox 2 en embriones de rata cultivados en una concentración elevada de glucosa.
- Comprobar que la adición de las poliaminas, espermidina como espermina, al cultivo de embriones en presencia de elevada glucosa, puede prevenir los efectos que esta causa sobre la presencia del gen Sox2.
- Relacionar las diferentes malformaciones causadas por altas concentraciones de glucosa y los grupos tratamientos con la expresión del gen Sox2.
- Calificar y clasificar el grado de malformación con base en el score morfológico modificado desde Klug *et al.* (1985).
- Identificar expresión a nivel celular de los tratamientos con inmunohistoquímica.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Modelo biológico

Se utilizaron 12 ratas Wistar hembras maduras (250-300 gr), proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), que se mantuvieron en condiciones controladas, con alimentación y agua *ad libitum*. Las hembras fueron apareadas por el método de trío, con machos sanos de la misma especie. Al día siguiente, se realizó frotis vaginal, se visualizó al microscopio de luz, y en caso de presencia de espermatozoides, se asignó como el día 0 de gestación.

6.2 Medios de cultivo

Se prepararon los medios de cultivo de acuerdo con lo descrito por Chirino (2007); quien utilizó medio control, medio suplementado con glucosa, medio con glucosa y espermina, y medio con glucosa y espermidina, como se describe en la tabla 2. El medio de cultivo se filtró con un *sweenex*, con ayuda de una membrana millipore® de celulosa de 0.22 µm de poro, y se congeló hasta el momento de uso. El día del experimento, previo a la incubación de los embriones, los medios descongelados se gasificaron 3-5 minutos con una mezcla de gases O₂ 20%, CO₂ 5%, en balance de nitrógeno.

6.3 Diseño de *Primers*

Para el diseño de *primers*, se obtuvo la secuencia de cDNA de la página de NCBI en formato fasta; una vez obtenida la secuencia, se eligieron los *primers* en la página www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi y se corroboraron en la página idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer para evaluar todas las características posibles. Una vez analizados, se mandaron a sintetizar con estas especificaciones a Integrated DNA Technologies (IDT, Iowa, USA). En la tabla 3 se mencionan las características de los *primers* diseñados. Se diseñaron adicionalmente oligonucleótidos para el gen constitutivo gama-actina, que se trabajó como control externo (Reyes, 2019).

Tabla 2.- Preparación de medios empleados en el presente trabajo.

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

Tabla 3. Especificación de los *primers* de Sox2.

Primer SOX2	Longitud	%GC	Tm	ΔG homodimerica	ΔG heterodimerica
Forward (5' a 3') GTACGTTAGGCGCTTCGCA	19	57.9%	58°C	-39.88 kcal/mole	-39.88 kcal/mole
Reverse (3' a 5') AGCAAGAACCCTTTCCTCG	19	52.6%	55°C	-38.15 kcal/mole	

6.4 Cultivo de embriones

Las ratas se sacrificaron el día 10.5 de gestación, y se obtuvieron los embriones para ser incubados en medios de cultivo control, glucosa, espermina y espermidina (Tabla 2) durante 24 h a 37°C, de acuerdo con los principios de cultivo propuestos inicialmente por New (1978). Se cultivaron un mínimo de 20 embriones en cada tratamiento.

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

6.5 Estudio morfológico

Posterior a la incubación, los embriones se obtuvieron, se colocaron en una caja Petri con solución salina y se visualizaron al microscopio estereoscópico Leica L2 (Wetzlar, Alemania), se realizó un análisis morfológico que incluye entre otros, conteo de somitas, medición de la longitud cefalocaudal y porcentaje de malformaciones, que se explica en la tabla 4. Se tomaron fotografías con una cámara digital Moticam 5.0mpx (Vancouver, Canada).

6.6 PCR Convencional

Se aisló DNA a partir de 4 embriones de rata de post-cultivo por grupo, por el método de extracción utilizando el kit Quick-DNA® Microprep Plus Kit (Zymo Research, California, USA), utilizando los *primers* previamente diseñados y siguiendo el protocolo del fabricante, el producto fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% para observar la presencia del gen SOX2 en los embriones cultivados.

Tabla 4. Asignación de puntos para el marcador o score morfológico. Modificado por Chirino (2007) desde Klug *et al.* (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	Neuróporo caudal abierto
	3	Neuróporos craneal y caudal abiertos
	2	Neuróporo 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</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)

6.7 Preparación del RNA total

Se usaron 4 embriones de cada grupo post-cultivo, los cuales se congelaron mediante inmersión del vial eppendorf que los contenía en nitrógeno líquido, y el RNA total de cada embrión se obtuvo por el método de Trizol®.

6.8 Histología

Se seleccionaron aleatoriamente 4 embriones postcultivo de cada grupo, además de un control externo de día 10 y un control positivo de día 11 sin cultivar. Se realizó un Score morfológico y se realizó técnica histológica de rutina. Posteriormente se procedió con la tinción H y E de rutina y se evaluó cualitativamente.

6.9 Inmunohistoquímica

Se tomaron 4 embriones postcultivo de cada grupo, que se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas y después se deshidrataron, aclararon, embebieron y cortaron a 8 micras de grosor y posteriormente se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta, teniendo en cuenta que todas las laminillas se mantuvieron en frío hasta el momento de proceder con la inmunohistoquímica. Se incubaron con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-Sox1 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), y después con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), para finalizar se cultiva con un complejo Diamino Bencidina, esto para generar manchas café pardo en el sitio intracelular donde se haya expresada la proteína Sox 2. Se evaluó cualitativamente las zonas de tubo neural y las zonas de tubo cardiaco con ayuda de un microscopio óptico, marca Leica, modelo DM500 (Wetzlar, Alemania), acoplado a una cámara marca Leica modelo EC3 (Wetzlar, Alemania).

6.10 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para los parámetros morfológicos, número de somitas y score morfológico se analizaron por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

7 RESULTADOS

7.1 Parámetros morfométricos y score morfológico

En la figura 10 se observa un gráfico donde se pueden observar embriones de día 10.5 de gestación, cultivados por 24 h, representativos de cada tratamiento. Se destaca claramente que el grupo con glucosa afecta profundamente el desarrollo embrionario, mientras que el tratamiento con poliaminas revierte los efectos de la elevada glucosa en cultivo.

La incubación en medio de cultivo normal o control es el de mejor resultado morfológico, los embriones presenta una forma de "G" perfecta, un tamaño correcto para su día de desarrollo, además de un buen número de somitas y desarrollo de primordios, lo que nos da como un buen desarrollo embrionario.



Figura 10. Embriones de rata de 10.5 días de gestación, cultivados por 24 h en presencia de distintas adiciones. Se muestran los embriones representativos de cada tratamiento al momento de su cosecha, observando un desarrollo normal en los tratamientos Control, Espermina y Espermidina, se nota la forma aberrante en "S" del embrión sometido a tratamiento con Glucosa.

Con respecto a los embriones incubados en elevada glucosa, podemos observar un evidente retraso en el desarrollo, la forma de "S" que presenta, además la falta de cierre del tubo neural y su tamaño más pequeño, haciendo evidencia de una clara malformación durante su desarrollo. El grupo espermina al igual que espermidina, presentan una forma de "G" y de "C" respectivamente, cierre completo de tubo neural y un desarrollo de primordios correcto, cabe señalar la clara diferencia de somitas y su tamaño lo que nos indica un buen desarrollo embrionario.

Por parte del tratamiento espermidina, también se observó un efecto embrioprotector en el cierre de tubo neural, desarrollo de somitas, forma del embrión y desarrollo de primordios. Sin embargo, el efecto, aunque menor comparado son espermina, estadísticamente no presenta diferencias significativas.

En los embriones post-cultivo se contó el número de somitas, y se realizaron varias mediciones morfométricas: longitud cefalocaudal, diámetro de saco vitelino, tamaño de la cabeza, que se indican en la figura 11. Como había sido reportado previamente, los embriones incubados en medio control muestran parámetros adecuados a su edad, un poco menores a los de embriones de día 11.5 (control externo *in vivo*, no mostrados), en cuanto a las mediciones de diámetro de saco vitelino, longitud cefalocaudal, longitud de la cabeza y número de somitas.

La incubación de embriones en presencia de glucosa causó que los tres parámetros morfológicos y el número de somitas fueran menores, con respecto a lo encontrado en el grupo control. En contraste, los embriones con tratamiento de glucosa y una poliamina mostraron parámetros morfológicos y número de somitas similar al control, y diferentes de los encontrados para embriones tratados sólo con glucosa.

Los embriones postcultivo se analizaron detenidamente para obtener un *score* morfológico, que evalúa ciertos parámetros, los cuales indican el estado de desarrollo embrionario esperado, en dado caso se le asigna una serie de puntos determinados, los cuales, es sumatoria total. En este caso, se observa que la incubación con glucosa reduce el valor de este *score* con respecto al encontrado para embriones del grupo control, y que la co-incubación con espermidina o espermina revierte los efectos nocivos de la glucosa sobre el *score* (figura 12).

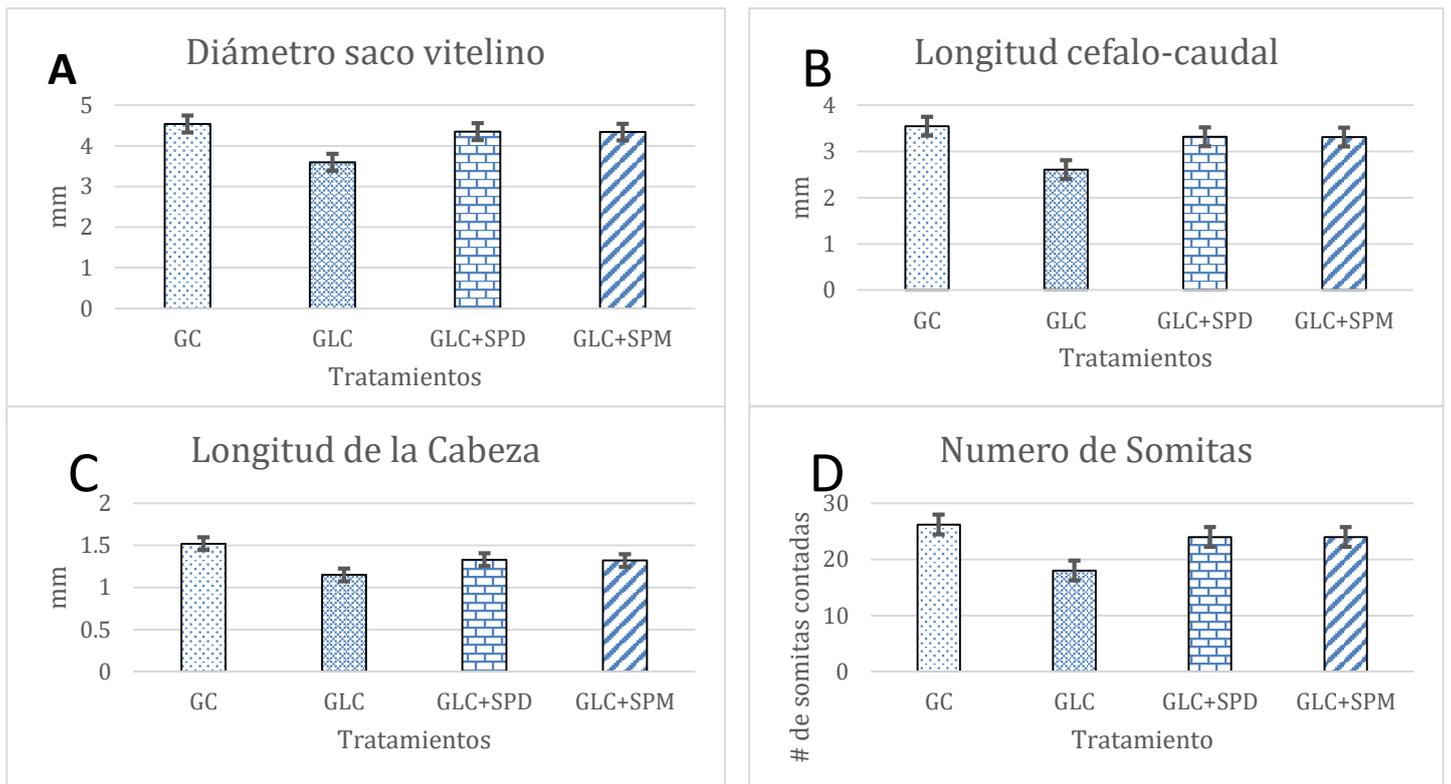


Figura 11. Parámetros morfológicos y morfométricos. A. Diámetro del saco vitelino. B. Longitud céfalo-caudal. C. Longitud de cabeza, D. Numero de somitas. Medidas realizadas en embriones cultivados a 37° C, por 24 h en rotación a 30 rpm, posteriormente se observaron en un microscopio estereoscópico con un aumento a 4x y se midieron con el apoyo de una reglilla micrométrica del ocular. Promedio ± error estándar de 30 determinaciones. El grupo Glucosa (Glc) es estadísticamente diferente al control, $p < 0.05$. Los grupos con tratamiento son estadísticamente diferentes al grupo Glc.

7.2 PCR Convencional

En la figura 13 podemos observar la escalera de peso molecular, mientras que los tratamientos son marcados como control (C) glucosa (G) Espermina (SPM) y espermidina (SPD) además de la beta actina (control externo) el cual indica que efectivamente hay material genético y que se encuentra presente. Además de esto se agregaron grupos de poliaminas sin glucosa añadida. Se puede observar que todos los grupos se encuentra presente, desde los controles hasta los tratamientos, exceptuando grupo con glucosa, lo cual podría indicar la posible ausencia del gen. Esto podría concordar con los resultados obtenidos por Chirino en 2017, donde se indica que el exceso de glucosa en el medio de desarrollo del embrión podría afectar el desarrollo de este.

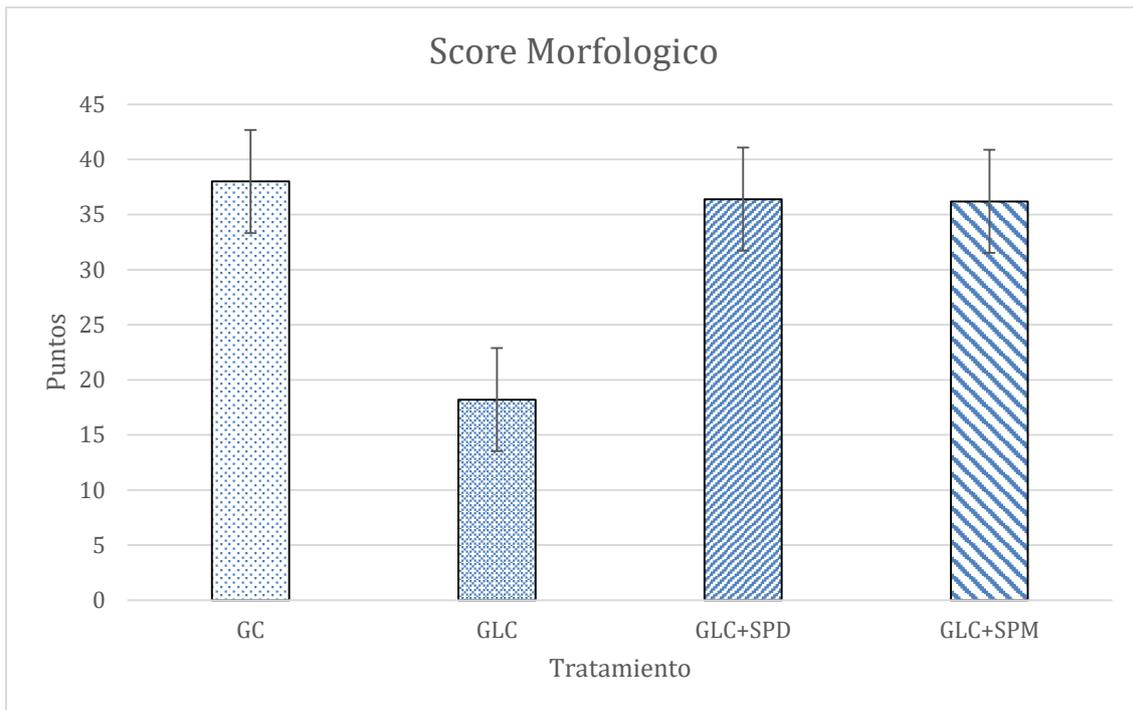


Figura 12. Promedio de las calificaciones del *score* morfológico de embriones cultivados a 37° por 24 h en rotación. El grupo GLC es estadísticamente diferente al grupo GC, $p < 0.05$. Los grupos con tratamiento de poliaminas es estadísticamente distinto al grupo GLC.

7.3 Histología normal

En la figura 14 se pueden observar los cortes histológicos de los distintos tratamientos aplicados. Se han elegido los más representativos de cada grupo para ejemplificar de una mejor y más clara. Los tratamientos son: control (C) glucosa (G) espermina (SPM) y espermidina (SPD).

Estas alteraciones son totalmente incompatibles con la vida, ya que como es comúnmente sabido, el cerebro y el corazón son órganos indispensables, y en caso de que se presenten las malformaciones como las que hemos visto en este embrión, podría acarrear como consecuencia un aborto espontáneo, espalda bífida, hidrocefalia, entre otras complicaciones.

En este caso, el tratamiento con glucosa causa un retraso en el tubo cardiaco, además de un menor tamaño en cola, un tubo neural sin completo desarrollo y una forma aberrante de "C". En general, el tratamiento con glucosa causa anomalías cuando se observan al microscopio los cortes realizados.



Figura 13. Electroforesis de DNA, Se muestran las bandas para control, espermina y espermidina, destacando la falta de presencia de SOX 2 en el tratamiento glucosa.

Con respecto al tratamiento con poliaminas, en este caso en el embrión bajo tratamiento con espermina, se observa que ya existe una segmentación; el desarrollo del tubo cardíaco es evidente, y pese a que la forma no es la de mejor evaluación, presenta un buen tamaño para el día de desarrollo. En el caso del tratamiento con espermina, se observa perfectamente la segmentación neural, además del desarrollo del primordio cardíaco. En otros embriones de los mismos tratamientos, se observa una morfología muy similar a la del grupo control (figura 14).

Se muestra que los grupos con tratamiento, a simple vista tienen un desarrollo morfológico comparable con el grupo control, mientras que el grupo tratado con glucosa posee ciertas malformaciones, como se ve en la Figura 14, el grupo glucosa presenta un retraso en el desarrollo a nivel de tubo neural pues este no presenta un cierre de tubo neural completo esperado para el día de desarrollo 11.5 que es el

evaluado regresando a la figura 9 podemos ver que el tamaño del grupo control tiene una diferencia estadísticamente significativa, pues mientras que los tratamientos restantes presentan un tamaño de poco más de tres reglillas, el grupo control no llega siquiera a tres de estas, además de la segmentación más evidente de las cavidades cardíacas (aurículas y ventrículos) puesto que para el día de desarrollo 11.5 se espera que ya se encuentre regionalizado en 3 cavidades, sin embargo como se aprecia en la figura 14, el grupo control solamente presenta una sola cavidad cardíaca.

7.4 Inmunohistoquímica para Sox2

En la figura 15 se observa la inmunohistoquímica realizada. En las imágenes se puede observar zonas de mayor expresión, las cuales son de color más oscuro; estas zonas de expresión esperadas indican en que regiones del embrión se encuentra mayormente el gen, siendo la más destacable en el tubo neural. Sin embargo, también se puede observar que en el grupo tratado únicamente con glucosa no hay una expresión tan intensa como en los otros grupos, tanto control como espermina y espermidina, lo cual podría indicar una menor expresión de otros genes o el uso de vías de señalización genética no tan eficientes.

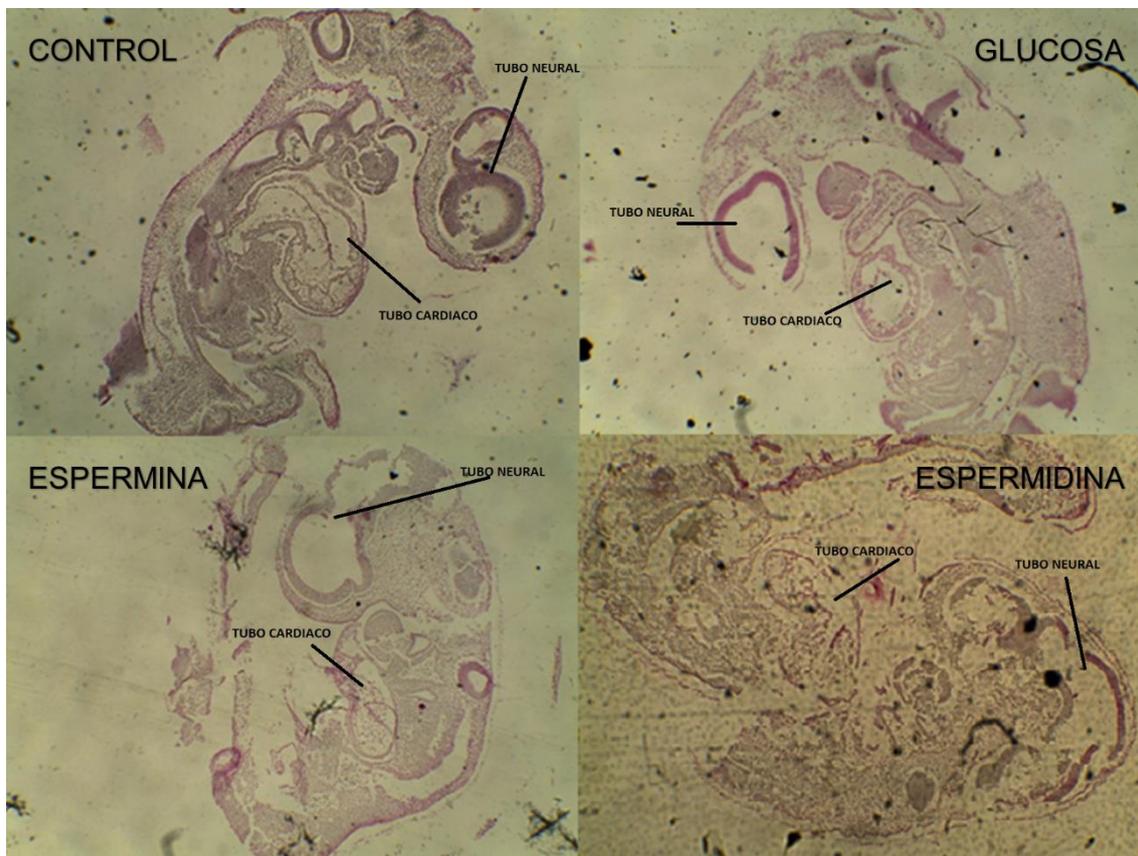


Figura 14. Se observan los embriones representativos de los tratamientos. En el tratamiento control, se observa el desarrollo del tubo cardíaco y otros primordios.

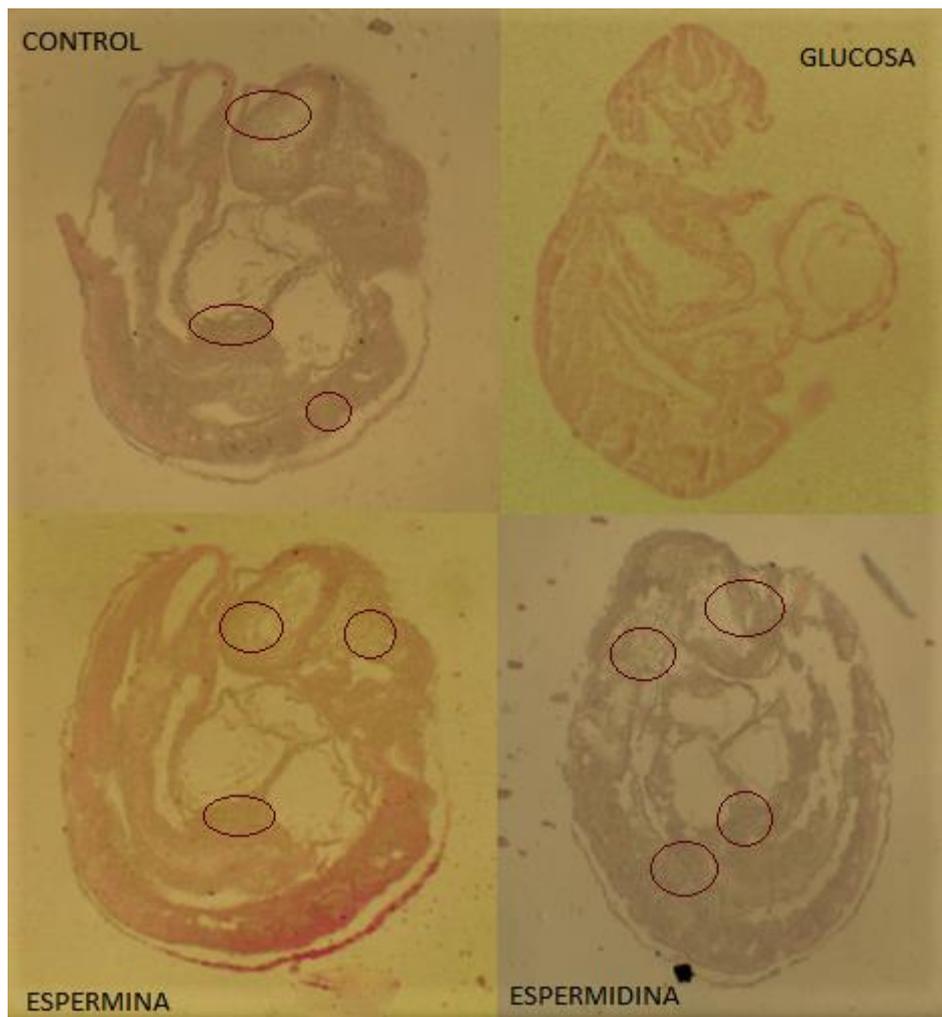


Figura 15. Inmunohistoquímica de embriones de 10.5 días de gestación incubados por 24 horas en medio con elevada glucosa y suplementado con espermina o espermidina; se muestra un embrión de grupo control para su comparación. El embrión control presenta zonas más oscuras donde se presenta el gen, siendo que los tratamientos también presentan las mismas zonas de oscurecimiento, indicando la presencia en las mismas zonas, en contraste, en el embrión del grupo glucosa no se observa una tinción comparando con el grupo control.

Cabe destacar que todas estas pruebas señalan claramente una incorrecta señalización del gen causada por un medio de desarrollo con alta glucosa. Mientras que también los tratamientos han de cierta manera prevenido o auxiliado para poder tener una correcta señalización del gen, dando como consecuencia un estado aceptable de desarrollo embrionario o inclusive mejor que el grupo control.

8 DISCUSION

En el presente trabajo se han evaluado distintos parámetros para una problemática que año tras año aumenta, la embriopatía diabética, que ya se ha mencionado es considerada como una complicación de la diabetes, no del embarazo. Para el estudio de esta entidad, se han hecho grandes avances con el uso de modelos animales, particularmente rata y ratón, entre otras razones porque su gestación es conocida al detalle.

Para la rata, por ejemplo, se tiene establecido el desarrollo normal del cuerpo, así como de los sistemas nervioso, circulatorio y otros. Beaudoin (1980) ha compilado estos datos, y estableció en tablas como se va desarrollando el embrión desde etapas tempranas, y hasta cerca del término. Esto permitió a New (1978) y otros autores a desarrollar el sistema de cultivo de embriones en medios semi-sintéticos, donde la base es suero de rata normal, ya sea macho o hembra; por lo general, por razones éticas se obtiene el suero a partir de ratas “pies de cría” retirados.

El desarrollo y crecimiento de los embriones del grupo control fueron ligeramente menores a los descritos en la literatura, como lo reportó previamente Chirino (2007); quien comparó estadísticamente embriones de 11.5 días de edad gestacional con embriones de 10.5 días cultivados por 24 h, y no encontró diferencias. Ahora bien, analizando el comportamiento de embriones sometidos a elevada glucosa, se encontró un desarrollo total anormal: comparado con el grupo control se obtuvo un menor tamaño del diámetro, menor número de somitas, menor longitud cefalocaudal, y un tubo neural abierto en la gran mayoría de los embriones observados, por mencionar algunos parámetros. La diabetes mellitus causa en humanos y en ratas alteraciones del desarrollo similares (Ornoy et al., 2015; Polanco *et al.*, 2005), y desde hace cerca de 40 años se sabe que en cultivo la glucosa en exceso causa un índice de malformaciones elevado (Sadler, 1980ab). Nuestro grupo de investigación ha logrado reproducir estos eventos (Chirino, 2007; Gaona, 201; Reyes, 2019), y aun cuando no se sabe el mecanismo mediante el cual las poliaminas mejoran el desarrollo embrionario, las hipótesis propuestas por otros autores mencionan que puede ser debido a que inhiben la glicosilación, regulan la síntesis de proteínas, interactúan con ácidos nucleicos y los protegen de daño oxidativo, entre otros efectos subcelulares y moleculares (Chattopadhyay *et al.*, 2003; Gómez-Gallego *et al.*, 2008; Wang et al., 2012).

En investigación clínica, se ha determinado que las principales malformaciones son 1) alteraciones a nivel sistema nervioso central, 2) cardiopatías congénitas, 3) alteraciones musculo-esqueléticas, y 4) malformaciones múltiples, es en este último donde se puede incluir diversos síndromes y daños a diversos órganos; de éstas, las malformaciones a nivel de sistemas nervioso y cardiovascular son incompatibles con la vida los principales defectos a nivel tubo neural tienden a presentarse con una incidencia mucho mayor que en la población general (García y García, 2009; Morgan *et al.*, 2008; Nazer *et al.*, 2005; Padrón-Aguilera *et al.*, 2019; Patiño, 2008; Restrepo, 1992; Vinceti *et al.*, 2014).

Con respecto a los tratamientos con espermidina o espermina, se encontró un efecto de revestimiento de los daños, esto debido probablemente a que las poliaminas son reguladores de algunos factores transcripcionales, síntesis de proteínas, proliferación celular, etc. Los resultados indican que las poliaminas cumplen su papel como reguladores metabólicos, previniendo un daño causado por la hiperglucemia en los medios de cultivo que simulan la condición diabética de una madre gestante, se destaca el tratamiento con espermidina, el cual presento mejores resultados, esto se puede deber a que se ha encontrado que esta poliamina presenta mayor actividad a nivel genético, pues facilita la compactación del ADN, además de que está considerada como imprescindible para la biosíntesis del factor iniciador de traducción para Eucariotas 5A (eIF-5A) (Gómez-Gallego *et al.*, 2008).

Los embriones de los grupos tratados con espermina también presentaron un efecto protector al igual que los tratados con espermidina, sin embargo esto se vio en menor medida; la espermina se ha visto involucrada en distintos procesos celulares como regulación de transcripción así como la interacción con el ADN para promover la condensación y protegerlo de factores ambientales como la desnaturalización por agentes ionizantes y especies reactivas de oxígeno (Gómez-Gallego *et al.*, 2008, Guasco Herrera *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2017). Comparando el grupo control, se logra observar ligeras diferencias, aunque no significativas, estadísticamente hablando, esto puede deberse al proceso de apoptosis, el cual está fuertemente ligado a la espermina, puesto que esta poliamina se encuentra en altas concentraciones modulando respuestas inflamatorias o de destrucción (Seiler y Raul, 2005).

Ahora bien, con respecto al SOX 2, se ha podido identificar en trabajos previos que está presente en el proceso de desarrollo neuronal, su expresión ha sido identificada desde etapas de desarrollo embrionario tempranas, principalmente en el desarrollo del

sistema nervioso central (Mercurio *et al.*, 2022); en este estudio, se encontró en los embriones con tratamiento con poliaminas, una expresión de la proteína en el tubo neural similar a la del grupo control, y una menor expresión en los embriones del grupo glucosa, lo cual es consistente con lo mencionado por Mercurio *et al.* (2022), quienes señalan que las alteraciones de SOX 2 en el desarrollo embrionario pueden causar defectos a nivel sistema nervioso central, incluyendo el campo de visión, daños en el hipocampo, discapacidad intelectual y problemas de control motor; los resultados aquí presentados sugieren que el retraso en el desarrollo embrionario y las malformaciones encontradas en embriones bajo tratamiento con glucosa, se pueden correlacionar con una menor expresión en las regiones neurales.

El gen SOX 2 ha sido identificado a lo largo de la vida de los organismos, su expresión ha sido detectada desde el desarrollo embrionario temprano hasta la etapa adulta; se ha demostrado que SOX 2 está presente a lo largo de la embriogénesis desde la formación de la placa neural desde la etapa en que se diferencia del ectodermo, el cierre de tubo neural y proliferación de las neuronas y formación de vainas de mielina a lo largo del eje rostro caudal, y en la etapa adulta a lo largo de las células troncales del sistema nervioso central (Ellis *et al.*, 2004).

El gen SOX 2 está fuertemente relacionado con las células troncales, se ha demostrado que el gen es necesario para diferenciación del ojo y el cerebro en el desarrollo embrionario, en el cultivo *in vitro*, una deficiencia de células troncales deficientes en la expresión de SOX 2, se ha visto relacionada a una mayor tasa de aborto así como el retraso en la migración de interneuronas específicas: interneuronas corticales e interneuronas de los bulbos olfatorios (Pevny y Nicolis, 2010). La expresión alterada de SOX 2 no solo afecta directamente a las células en las que se expresa SOX 2, sino que al momento que el gen también actúa como señalizador debajo de otros genes, afecta otras rutas de diferenciación celular (Cavallaro *et al.*, 2008). Esto último concuerda con los datos obtenidos en este estudio, pues al verse disminuida la expresión en los resultados de la inmunohistoquímica, también se vieron disminuidos los resultados del score morfológico, pudiendo decir que, en este estudio, el tener una menor expresión del gen, el desarrollo morfológico de los embriones estará correlacionado a esta expresión.

La expresión del gen SOX 2 debe ser precisa y regulada, como ya se ha dicho anteriormente, la baja expresión de este gen causa un mal desarrollo embrionario, sin embargo una sobreexpresión también causa problemáticas, se ha encontrado que el

Sox 2 también está asociado con la tumoración y metástasis (Chaudhary *et al.*, 2019), más a futuro habría que evaluar si la diabetes mellitus no causa otro tipo de alteraciones que lleguen a causar una sobreexpresión del gen y activen los mecanismos de defensa, es decir una apoptosis en el embrión. Adicionalmente, se notó durante la obtención de embriones post-cultivo, que en el grupo con glucosa había una mayor proporción de embriones con degeneración, lo que refuerza los resultados aquí obtenidos.

9 CONCLUSIONES

Las poliaminas espermina y espermidina revierten en gran medida las afectaciones morfológicas causados por las altas concentraciones de glucosa, en embriones de rata de día 10.5 gestacional post-cultivo.

El cultivo de embriones de rata de día 10.5 gestacional suplementado solamente con glucosa está directamente relacionado con los daños en el desarrollo embrionario.

La presencia del gen Sox-2 en los embriones de día 10.5 cultivados 24 h en un medio con alta glucosa se ve directamente afectado, disminuyendo su actividad.

En embriones de día 10.5 de desarrollo embrionario y cultivados 24 h en un medio con alta glucosa y suplementado con poliaminas espermina y espermidina, la presencia del gen Sox-2 se encuentran diferencias significativas en la actividad del gen, comparando con el grupo con alta glucosa

Literatura citada

Agarwal, A.; Saleh, R.; Bedaiwy, M. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.*, 79, 829-843.

Alexopoulos, A.-S.; Blair, R.; Peters, A. L. (2019). Management of preexisting diabetes in pregnancy: A review. *Journal of the American Medical Association*, 321(18), 1811-1819.

American Diabetes Association. (2019). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33 (Supplement 1): S62-S69.

American Diabetes Association. (2018). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 41(Supplement 1), S13-S27.

American Diabetes Association. (2021). 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 44(Supplement 1), S73-S84.

Arizmendi, J.; Carmona Pertuz, V.; Colmenares, A.; Gómez Hoyos, D.; Palomo, T. (2012). Diabetes gestacional y complicaciones neonatales. *Revista Med*, 20(2), 50-59

Arteaga, M.S.M.; García, P.M.I. (2021). Embriología humana y biología del desarrollo, Panamericana. 3ª. Ciudad de México. 554 pp.

Ayala, P.; Calvo, C.; Herrada, M.; Fiallo, M. L.; Tezanos, R. (2002). Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus. *Offarm: farmacia y sociedad*, 21, 120-124.

Baker, L.; Piddington, R. Diabetic embryopathy: a selective review of recent trends. *J Diabetes Complications*. 1993, 7(3): 204-212

Barresi, M.J.F.; Gilbert, S.F. (2020). *Developmental Biology*. Oxford University Press. Twelfth Edition.

Beaudoin, A.R. (1980). Embriology and teratology. En: Baker, H.J., Lindsey, J.R. y Weisbroth, S.H. (editors). The laboratory rat. Volumen II. Research applications. Academic Press. London. Pp. 75-101.

Bello-Chavola, O.Y.; Antonio-Villa, N.E.; Fermín-Martínez, C.A.; Fernández-Chirino, L.; Vargas-Vázquez, A.; Ramírez-García, D.; Basile-Alvarez, M.R.; Hoyos-Lázaro, A.E.; Carrillo-Larco, R.M.; Wexler, D.; Manne-Goehler, J.; Seigle, J.A. (2022). Diabetes-related excess mortality in Mexico: A comparative analysis of national death registries between 2017–2019 and 2020. *Diabetes Care* 45: 2957–2966.

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.

Carvajal, C.C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina legal de Costa Rica* 36(1), 91-100.

Castori, M. (2013). Diabetic embryopathy: A developmental perspective from fertilization to adulthood. *Molecular Syndromology*, 4(1-2), 74-86.

Cavallaro, M.; Mariani, J.; Lancini, C.; Latorre, E.; Caccia, R.; Gullo, F.; Valotta, M.; DeBiasi, S.; Spinardi, L.; Ronchi, A.; Wanke, E.; Brunelli, S.; Favaro, R.; Ottolenghi, S.; Nicolis, S. K. (2008). Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*, 135(3), 541-557.

Chandra, P.; Sharma, R.K.; Arora, D.S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Res International*, doi:10.1016/j.foodres.2019.108849.

Chappell, J.H.; Dan Wang, X.; Loeken, M.R. (2009). Diabetes and apoptosis: Neural crest cells and neural tube. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 14(12), 1472-1483.

Chattopadhyay, M.K.; Tabor, C.W.; Tabor, H. (2003). Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24):13869-13874.

Chaudhary, S.; Islam, Z.; Mishra, V.; Rawat, S.; Ashraf, G.M.; Kolatkar, P. R. (2019). Sox2: A regulatory factor in tumorigenesis and metastasis. *Current Protein & Peptide Science*, 20(6), 495-504.

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 en Biología, FES Iztacala UNAM.

Chirino-Galindo, G.; Barrera-Argüelles, J.-I.; Trejo-González, N.-L.; Mejía-Zepeda, R.; Palomar-Morales, M. (2017). Biphasic effect of alpha-linolenic acid on glucose-induced dysmorphogenesis and lipoperoxidation in whole rat embryo in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(4), 878-883.

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 Cellular & Developmental Biology - Animal*, 48(9), 570-576.

Correa, A.; Gilboa, S.M.; Besser, L.M.; Botto, L.D.; Moore, C.A.; Hobbs, C.A.; Cleves, M.A.; Riehle-Colarusso, T.J.; Waller, D.K.; Reece, E.A. (2008). Diabetes mellitus and birth defects. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(3), 237.e1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2008.06.028.

Cruz, E.J.E. (2014). Determinación de fenoles y flavonoides en extractos de hojas de plantas con actividad antioxidante empleando espectroscopia FTIR y análisis multivariado. Tesis de Maestría en Biotecnología Aplicada. Instituto Politécnico Nacional, México. 123.

Danglot-Banck, C.; Gómez-Gómez, M. (2004). Los hijos de madres diabéticas. *Revista Mexicana de Pediatría*. 7 (5), 248-257.

De Iaco, A.; Planet, E.; Coluccio, A.; Verp, S.; Duc, J.; Trono D. (2017). A family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals. *Nat Genet* 49, 941- 945.

Dunne, F.; Brydon, P.; Smith, K.; Gee, H. (2003). Pregnancy in women with Type 2 diabetes: 12 years outcome data 1990-2002. *Diabetic Medicine*, 20(9), 734-738.

Ellis, P.; Fagan, B.M.; Magness, S.T.; Hutton, S.; Taranova, O.; Hayashi, S.; McMahon, A.; Rao, M.; Pevny, L. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental Neuroscience*, 26(2-4), 148-165.

Erb, C. (2005) Embryology and teratology. En: Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. y Frankin, C.L. (editores). *The laboratory rat*. 2° Ed. Academic Press, Amsterdam, pp. 817-846.

Eriksson, U. J.; Wentzel, P. (2016). The status of diabetic embryopathy. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121(2), 96-112.

Favaro, R.; Valotta, M.; Ferri, A.L.M.; Latorre, E.; Mariani, J.; Giachino, C.; Lancini, C.; Tosetti, V.; Ottolenghi, S.; Taylor, V.; Nicolis, S. K. (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nature Neuroscience*, 12(10), 1248-1256.

Fogarty, N.M.E.; McCarthy, A.; Snijders, K.E.; Powell, B.E.; Kubikova, N.; Blakeley, P.; Lea, R.; Elder, K.; Wamaitha, S.E.; Kim, D.; Maciulyte, V.; Kleinjung, J.; Kim, J.-S.; Wells, D.; Vallier, L.; Bertero, A.; Turner, J.M.A.; Niakan, K.K. (2017).. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 550, 67-73.

Freinkel, N. (1980). Banting Lecture 1980: Of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29: 1023-1035.

Gabbay-Benziv, R.; Reece, E.A.; Wang, F.; Yang, P. (2015). Birth defects in pregestational diabetes: Defect range, glycemic threshold and pathogenesis. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 481-488.

Gaona, U.J.G. (2017). Expresión del gen Sonic Hedgehog (SHh), en un modelo in vitro de embriopatía diabética. Tesis de Biología, FES Iztacala UNAM.

Gardner, D.K.; Lane, M. (2005). Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reproduction Fertility and Development*, 17, 361-370.

García G, D.; García D, R. (2009). Avances en la patogénesis de la embriopatía diabética. *Revista médica de Chile*, 137(12), 1627-1635.

Golden, S. H.; Sapir, T. (2012). Methods for insulin delivery and glucose monitoring in diabetes: Summary of a Comparative Effectiveness Review. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 18(6 Suppl), S1-S17.

Gómez-Gallego, C.; Berrueto, G.R.; Cava, M.J.B.; Conesa, D.P.; Castón, M.J.P. (2008). Papel de las poliaminas en la alimentación. Importancia de las poliaminas en la alimentación infantil. *Arch Latinoam Nutr* 2008, 58: 117-125

González-Villalpando, C.; Dávila-Cervantes, C. A.; Zamora-Macorra, M.; Trejo-Valdivia, B.; González-Villalpando, M.E. (2014). Incidence of type 2 diabetes in Mexico. Results of The Mexico City Diabetes Study after 18 years of follow-up. *Salud Pública de México*, 56(1), 11-17.

Guasco Herrera, C.; Chávez Servín, J.L.; Ferriz Martínez, R.A.; Torre Carbot, K.; Elton Puente, E.; García Gasca, T. (2014). Poliaminas: Pequeños gigantes de la regulación metabólica. *REB. Revista de Educación Bioquímica*, 33(2), 51-57.

Guerin, P.; El Moutassim, S.; Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7, 175-189.

Gugliucci, A.; Menini T. (2003). The polyamines spermine and spermidine protects proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci*; 72(23): 2603-2616

Guija-Guerra, H.; Guija-Poma, E. (2023). Radicales libres y sistema antioxidante. *Horizonte médico* 23(2): e2158.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (2015). 5. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence and death. En: Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (editors). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. pp. 199-283

HAPO Study Cooperative Research Group. (2009) Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations with neonatal anthropometrics. *Diabetes*; 58(2):453-459.

Hernández-Ávila, M.; Gutiérrez, J.P.; Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus in Mexico: Status of the epidemic. *Salud Pública de México*, 55(Suppl. 2): s129-s136.

Hussain, T.; Tan, B.; Ren, W.; Rahu, N.; Dad, R.; Hussain, K.D.; Yin, Y. (2017). Polyamines: therapeutic perspectives in oxidative stress and inflammatory diseases. *Amino Acids* 49: 1457-1468.

Igarashi, K.; Ito, K.; Sakai, Y.; Ogasawara, T.; Kashiwagi, K. (1988). Regulation of protein synthesis by polyamines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 250, 315-330.

International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas*, 10th edn. Brussels, Belgium.

Jamanca, G.N.C.; Alfaro, C.S. (2017). Antioxidantes en los alimentos. Serie Notas de Clases. Universidad Nacional de Barrancas, Perú. 96 pp.

Julian, L.M.; McDonald, A.C.; Stanford, W.L. (2017). Direct reprogramming with SOX factors: masters of cell fate. *Current Opinion in Genetics and Development*. 46, 24-36.

Juriscova, A.; Varmuza, S.; Casper, R.F. (1996). Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Molecular Human Reproduction*, 2, 93-98

Kamachi, Y.; Kondoh, H. (2013). Sox proteins: Regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 140(20), 4129-4144.

Knight, K.M.; Pressman, E.K.; Hackney, D.N.; Thornburg, L.L. (2012). Perinatal outcomes in type 2 diabetic patients compared with non-diabetic patients matched by body mass index. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*: 25(6), 611-615.

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. *Journal of Biological Chemistry* 287, 35825–35837.

Li, R.; Thorens, B.; Loeken, M.R. (2007). Expression of the gene encoding the high-Km glucose transporter 2 by the early postimplantation mouse embryo is essential for neural tube defects associated with diabetic embryopathy. *Diabetologia*, 50(3), 682-689.

Lindsey, J.R.; Baker, H.J. (2005). Historical foundations. En: Suckow, M.A.; Weisbroth, S.H.; Franklin, C.L. (editores). *The Laboratory Rat*. 2a. ed Elsevier. Amsterdam, 1-51.

López-Sánchez, C.; García-López, V.; Mijares, J.; Domínguez, J. A.; Sánchez-Margallo, F.M.; Álvarez-Miguel, I.S.; García-Martínez V. (2013). Gastrulación: proceso clave en la formación de un nuevo organismo. *Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción*, 18(1), 29-41.

López, V.S.M. (2015). Embriología. Fundamentos y actividades prácticas. Manual moderno. México D.F. 172 pp.

Madhavi, D.L.; Deshpande, S.S.; Salunkhe, D.K. (1995). *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*. CRC Press,. Boca Raton, Florida

Maida, C.D.; Daidone, M.; Pacinella, G.; Norrito, R.L.; Pinto, A.; Tuttolomondo, A. (2022). Diabetes and ischemic stroke: An old and new relationship an overview of the

close interaction between these diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2397; <https://doi.org/10.3390/ijms23042397>.

Mattos, M.G.C.; Ochoa, F.A.P. (2015). Adherencia al tratamiento en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 en el Hospital de Bosa, Bogotá entre Agosto y octubre de 2015. Tesis de licenciatura en Medicina, Facultad de Medicina Humana, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Bogotá, Colombia.

Méndez, J.D.; Palomar-Morales, M. (1999). Prevention by L-arginine and polyamines of delayed development and embryotoxicity caused by chemically-induced diabetes in rats. *Reproductive Toxicology* 13(6), 501-509.

Mendoza F.C.; Rocha, P. (2002). Poliaminas: Reguladores del crecimiento con múltiples efectos en las plantas / Polyamines: Growth regulators with multiples effects in plants. *Palmas* 23, 39-46.

Mercurio, S.; Serra, L.; Pagin, M.; Nicolis, S. K. (2022). Deconstructing Sox2 function in brain development and disease. *Cells*, 11(10), 1604. doi: 10.3390/cells11101604.

Miller-Fleming, L.; Olin-Sandoval, V.; Campbell, K.; Ralser, M. (2015). Remaining mysteries of molecular biology: The role of polyamines in the cell. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3389-3406.

Moore, K.L.; Persaud, T.V.N.; Torchia, M.G. (2016). The developing human. Elsevier. 10a. Philadelphia. 524 pp.

Mora, A.S.A.; Zeledón, A.A.S.; Vargas R.T. (2019). Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. *Revista médica sinergia* 4(5):89-100.

Morgan, S.C.; Relaix, F.; Sandell, L.L.; Loeken, M.R. (2008). Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 82(6), 453-463.

Muñoz-Esparza, N.C.; Latorre-Moratalla, M.L.; Comas_Basté, O.; Toro-Funes, N.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. (2019). Polyamines in food. *Frontiers in Nutrition*, 6: 108.

Nazer, H, J.; García, H.M.; Cifuentes, O. L. (2005). Malformaciones congénitas en hijos de madres con diabetes gestacional. *Revista médica de Chile*, 133(5), 547-554.

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

Novak, D.; Hüser, L.; Elton, J.J.; Umansky, V.; Altevogt, P.; Utikal J. (2020). SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, 67(Pt 1), 74-82.

Okuda, Y.; Ogura, E.; Kondoh, H.; Kamachi, Y. (2010). B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish embryo. *PLoS Genetics*, 6(5), e1000936, doi: 10.1371/journal.pgen.1000936.

Organización Mundial de la Salud. (2016). Informe mundial sobre la diabetes. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.

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

Ornoy, A.; Reece, E.A.; Pavlinkova, G.; Kappen, C.; Miller, R.K. (2015). Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 105(1), 53-72.

Ortiz, E.J.M.; Medina, L.M.E. (2020). Estrés oxidativo ¿un asesino silencioso? *Educación química* 31(1): 1-11.

Padrón P.O.I.; Santos, S.M.; Vázquez, M.V.R.; Torres, G.C.J.; Barberis, P.G.B. (2019). Diabetes y malformaciones congénitas. Cienfuegos, 2005-2015. *MediSur*, 17(5), 633-640.

Patiño, C.N. (2008). Recién nacido hijo de madre diabética. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 47(1), 60-66

Pevny, L.H.; Nicolis, S. K. (2010). Sox2 roles in neural stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(3), 421-424.

Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V., Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. doi: 10.1155/2017/8416763.

Plows, J. F.; Stanley, J.L.; Baker, P.N.; Reynolds, C.M.; Vickers, M.H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3342. doi: 10.3390/ijms19113342.

Polanco, P.A.C.; Revilla, M.M.C.; Palomino, G.M.A.; Islas, A.S (2005). Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas. *Ginecología y Obstetricia de México*, 73: 544-552.

Rajendran, P.; Nandakumar, N.; Rengarajan, T.; Palaniswami, R.; Gnanadhas, E.N.; Lakshminarasiah, U.; Gopas, J.; Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332-347.

Restrepo, O.O. (1992). Enfoque y manejo de la embarazada diabética. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 43(2), 97-108.

Restrepo, O.O. (2000). Diabetes y embarazo – Actualización. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 51(1), 19-28.

Reyes, M.L.C. (2019). Efecto de espermina y espermidina en la expresión del gen p53 en un modelo in vitro de embriopatía diabética. Tesis de Biología, FES Iztacala UNAM.

Rizzino, A.; Wuebben, E.L. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1859(6):780-791.

Reyes, M.L.C. (2019). *Efecto de espermina y espermidina en la expresión del gen p53 en un modelo in vitro de embriopatía diabética*. Tesis de Licenciatura en Biología, FES Iztacala UNAM.

Ruiz-Cano, D.; Pérez-Llamas, F.; Zamora, S. (2012). Implicaciones de las poliaminas en la salud infantil. *Archivos argentinos de pediatría*, 110(3), 244-250.

Sadler T.W. (2019). *Langman embriología medica*. 14 ed. Wolters Kluwer. Philadelphia.

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

Sadler, T.W. (1980b). Effects of maternal diabetes on early embryogenesis. 11. Hyperglycemia-induced exencephaly. *Teratology* 21: 349-356.

Seiler, N.; Raul, F. (2005). Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9(3): 623-642.

Shamah-Levy, T.; Vielma-Orozco, E.; Heredia-Hernández, O.; Romero-Martínez, M.; Mojica-Cuevas, J.; Cuevas-Nasu, L.; Santaella-Castell, J.A.; Rivera-Dommarco J. (2020). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Sharov, A.A.; Masui, S.; Sharova, L.V.; Piao, Y.; Aiba, K.; Matoba, R.; Xin, L.; Niwa, H.; Ko, M.S.H. (2008). Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics*. 3;9:269 doi: 10.1186/1471-2164-9-269.

Uchikawa, M.; Yoshida, M.; Iwafuchi-Doi, M.; Matsuda, K.; Ishida, Y.; Takemoto, T., Kondoh, H. (2011). B1 and B2 Sox gene expression during neural plate development in chicken and mouse embryos: Universal versus species-dependent features. *Development, Growth & Differentiation*, 53(6), 761-771.

Varillas, C.; Blanco, S.; Gastelu-Iturri, J.; Reboredo R. (2005). Diabetes gestacional: su complejidad y repercusión en la evolución del embarazo y salud del recién nacido. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*; 48 (6): 289-96

Vinceti, M.; Malagoli, C.; Rothman, K.J.; Rodolfi, R.; Astolfi, G.; Calzolari, E.; Puccini, A.; Bertolotti, M.; Lunt, M.; Paterlini, L.; Martini, M.; Nicolini, F. (2014). Risk of birth defects associated with maternal pregestational diabetes. *European Journal of Epidemiology*, 29(6), 411-418.

Wang, S.-Y.; Lee, Y.-L.; Lai, Y.-H.; Chen, J.J.W.; Wu, W.-L.; Yuann, J.M.P.; Su, W.-L.; Chuang, S.-M.; 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. doi: 10.1371/journal.pone.0047101.

Wentzel, P.; Wentzel, C R.; Gäreskog, M.B.; Eriksson, U.J. (2001). Induction of embryonic dysmorphogenesis by high glucose concentration, disturbed inositol metabolism, and inhibited protein kinase C activity. *Teratology*, 63(5), 193-201.

Wood, H.E.; Episkopou, V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mechanisms of development* 86(1-2), 197-201.

Xu, C.; Chen, X.; Reece, E.A.; Lu, W.; Yang, P. (2019). The increased activity of a transcription factor inhibits autophagy in diabetic embryopathy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 220(1), 108.e1-108.e12. doi: 10.1016/j.ajog.2018.10.001.