

00322
104

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ EFECTO DE LA DIABETES MATERNA SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA PLACENTA DE 20 DIAS DE DESARROLLO”

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGA**

**PRESENTE:
E LIDIA LOREDO NÚÑEZ**

**DIRECTOR DE TESIS.
MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE**



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

MEXICO, D.F. 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Efecto de la Diabetes materna sobre la estructura de la Plácenta de 20 días de desarrollo".

realizado por LOREDO NÚÑEZ ELIDIA.

con número de cuenta 9337631-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de: BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Maria Cristina Revilla Monsalve. 

Propietario

Dr. Sergio Agustín Islas Andrade. 

Propietario

M en C. Miguel Angel Palomino Garibay. 

Suplente

Dra. Concepción Sánchez Gómez. 

Suplente

M en C. Alejandro Martínez Mena. 

FACULTAD DE CIENCIAS
 U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez 



DEPARTAMENTO

2

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN:

**LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
MÉDICA EN ENFERMEDADES
METABÓLICAS (UIMEM). CENTRO
MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI. IMSS.**

DEDICATORIAS.

A mis padres por haberme ayudado a llegar hasta esta mi primera meta, por su amor y comprensión. Por dejarme ser una persona independiente y siempre confiar en mí.

A mis padres adoptivos Maru, Héctor y Jero por su apoyo incondicional durante toda mi carrera profesional, por alentarme a seguir adelante, por su cariño, comprensión e incluso por los regaños.

A mis hermanos y mis manitos por compartir los mejores momentos de mi vida.

A Ale, Tanis y Alocandra por su apoyo y por su confianza.

A mis tíos Ausencia y Eugenio por todo el apoyo que me han brindado durante todo este tiempo y por las facilidades que me han otorgado cada fin de semana.

A Vicente por estar conmigo en los momentos de histeria y stress, pero sobre todo por tu cariño, amor y comprensión.

A las personas encargadas de formar el equipo número uno en el UIMEM: Dra. Ma Cristina Revilla Monsalve y Dr. Sergio Islas Andrade. Gracias por su confianza y apoyo; pero sobre todo por permitirme ser parte de su equipo.

A Miguel Ángel por el apoyo técnico y académico, pero sobre todo por la motivación y por su amistad. No sé que hubiera hecho sin ti.

AGRADECIMIENTOS.

Al jurado que revisó este trabajo:

Dra. María Cristina Revilla Monsalve.
Dr. Sergio Islas Andrade.
M. en C. Miguel Ángel Palomino Garibay.
Dra. Concepción Sánchez Gómez.
M. en C. Alejandro Martínez Mena.

Al M. en C. Alejandro Martínez Mena y a la M. en C. Isabel Bieler Antolin, del Departamento de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM. Por el apoyo técnico para la realización de las Micrográficas.

A Minerva, Aquiles y Baldo, del Departamento de Informática de la Facultad de Ciencias, UNAM. Por el apoyo técnico y de Infraestructura para la realización de éste trabajo.

Al Dr. Enrique Follo y la Técnica Margarita por sus enseñanzas en el área de la Histología y el manejo de animales de Bioterio.

A Arturo Carlos II Becerra Bracho por su amistad, confianza y apoyo incondicional.

A los que conforman el equipo número uno en el UIMEM: Graciela, Morelia y Mario por su amistad y apoyo moral.

A mis amigos de generación: Anahi por corretearme, regañarme y auxiliarme con mis tramites escolares, por tu amistad y comprensión. a Carlitos por su amistad, su cariño y por todo su apoyo. a Artufo y Jorge por compartir toda la carrera conmigo, por su amistad y su apoyo. a Rick, Elisa y Flor por los buenos momentos compartidos, su cariño incondicional y su comprensión. a Cristalito por la ayuda que me proporciono durante la carrera. a Diego, Esteban. Nino, José Luis, Lalo, y Tizelito por su amistad sincera. Con todos he compartido excelentes momentos y espero sigan siendo parte de mi vida.

INDICE**PAG.**

I. Resumen.	1
1. Antecedentes.	
1.1. Diabetes mellitus.	2
1.2. Concepto y clasificación.	3
1.3. Diabetes experimental.	4
1.3.1. Inducción de la Diabetes.	4
1.3.2. Modelos de Diabetes espontánea.	4
1.3.3. Modelos de Diabetes Inducida.	6
1.3.3.1. Inducción Quirúrgica.	6
1.3.3.2. Inducción hormonal.	6
1.3.3.3. Inducción viral.	7
1.3.3.4. Inducción química.	8
1.3.3.4.1. Aloxana.	9
1.3.3.4.2. Estreptozotocina.	10
1.4. Relación de la estreptozotocina con la severidad de la diabetes.	13
1.5. Preparación de la estreptozotocina.	15
1.6. Susceptibilidad a la estreptozotocina en las diferentes cepas de ratas.	16
2. Diabetes inducida y reproducción.	16
2.1. Diabetes inducida y desarrollo.	17
3. Definición de la placenta.	20
3.1. La placenta y su relación con la reproducción en los mamíferos.	20
3.2. Diabetes e Implantación.	21
3.3. Diferenciación de la placenta.	24
3.4. Estructura de la placenta a termino en roedores.	26
3.5. Estructura de la barrera placentar en rata.	26
3.6. Placenta y desarrollo.	26
3.7. Alteraciones en la placenta de ratas diabéticas.	27
4. Planteamiento del Problema.	29
5. Hipótesis.	29
6. Objetivos.	29
6.1. Objetivo general.	29
6.2. Objetivos particulares.	29

6

7. Material y Métodos.	30
7.1. Microscopía de luz.	31
7.2. Parámetros bioquímicos.	31
7.3. Análisis estadístico.	32
7.4. Diagrama de flujo.	33
8. Resultados.	34
8.1. Peso.	34
8.2. Glucosa.	35
8.3. Cetonuria.	36
8.4. Glucosuria.	37
8.5. Química sanguínea.	38
8.5.1. Glucosa.	38
8.5.2. Colesterol.	39
8.5.3. Triglicéridos.	39
8.5.4. Lipoproteínas de muy baja densidad.	40
8.5.5. Insulina.	41
8.5.6. Hemoglobina glucosilada.	41
9. Fetos.	42
9.1. Número de fetos por camada.	42
9.2. Peso.	43
9.3. Talla.	44
9.4. Reabsorciones.	45
10. Placentas.	46
10.1. Peso y diámetro.	46
11. Análisis Morfológico de la placenta.	48
12. Discusiones.	54
13. Conclusión.	58
14. Bibliografía.	59
II. Anexo I.	68
III. Índice de Abreviaturas.	72

I. RESUMEN.

Se determinó el efecto de la diabetes materna inducida con estreptozotocina (STZ), sobre la placenta de 20 días de gestación. Se utilizaron 85 ratas hembras gestantes con un peso de 250-350g de la cepa Sprague-Dawley. A 51 el día 6 de la gestación se les inyectó intraperitonealmente (ip) 50mg/kg de peso de STZ (EI), a 23 se les inyectó ip 60mg/kg de peso de STZ el día 6 de la gestación (EII), a 6 se les inyectó amortiguador de acetatos 0.1M pH 4.3 (CI) y 5 se puncionaron con aguja del mismo calibre que los otros lotes (CII). Se consideraron diabéticas las ratas con niveles ≥ 200 mg/dl de glucosa sérica a las 48 horas de la inducción. Se determinó la glucosa sérica, cetonuria, glucosuria y el peso corporal cada semana.

El día 20 de la gestación se sacrificaron las ratas por dislocación cráneo cervical, se diseccionaron y extrajeron los fetos, registrándose el número de reabsorciones, el número de fetos viables su peso y talla.

Se obtuvieron las placentas y se registró su peso y su diámetro, se diseccionaron y se procesaron para microscopía de luz. Se realizaron cortes histológicos que se tiñeron con las técnicas de hematoxilina-eosina, Van Gieson, Masson y Pass-Schiff.

El peso y el diámetro de las placentas de ratas diabéticas de 20 días de gestación fue mayor que en los lotes controles. El número de fetos por camada fue menor en los lotes experimentales. El peso y la talla de los fetos controles fue mayor que el presentado por los lotes experimentales. El número de reabsorciones es mayor en los lotes experimentales, siendo aún mayor en el lote EII.

En las tres zonas de la placenta de rata diabética comparadas con las controles se observaron cambios morfológicos; en la zona laberintica el mesénquima fetal se encuentra aumentado, con abundantes vasos fetales inmersos en él, los sinusoides maternos son de mayor calibre, y separan a las células del trofoblasto entre las vellosidades aumentando el grosor de la barrera placentaria. El espongiotrofoblasto es extenso y está delimitado por células del trofoblasto, su distribución es uniforme y en él pueden observarse células gigantes del trofoblasto que presentan gran cantidad de glucógeno en su interior.

La inducción de diabetes con 50 y 60 mg/kg de peso de STZ es igualmente efectiva, siendo la dosis de 50mg/kg menos tóxica. La dosis de 60 mg/kg de peso de STZ disminuye en forma significativa el número de placentas, fetos y aumenta el número de reabsorciones.

La combinación de hiperglucemia, hipercetonemia e hiposulinemia inducen mayores alteraciones en el desarrollo de los fetos de ratas diabéticas.

1. ANTECEDENTES.

1.1. DIABETES MELLITUS.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica progresiva que se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, debido al incremento en su prevalencia, cronicidad y complicaciones tardías incapacitantes.

Estudios realizados por King y colaboradores (1998), indican que la prevalencia de la diabetes tipo 2 aumentará del 4% que se había calculado en 1995 a 5.4% en 2025. El número de adultos diabéticos en el mundo aumentará de 135 millones que había en 1995 a 300 millones en 2025 y la mayor parte de este incremento ocurrirá en los países en vías de desarrollo en los que aumentará 170% con 228 millones de pacientes diabéticos. En el 2025 más del 75% de los pacientes diabéticos habitarán en países en vías del desarrollo y sus edades fluctuarán entre 45 y 64 años y habrá más mujeres que hombres diabéticos que se concentrarán en las áreas urbanas.

Para México los cálculos resultan alarmantes, ya que la prevalencia de esta enfermedad que era de 7.7% en 1995 se incrementará a 12.3% para 2025 lo que significará que 11.7 millones de mexicanos serán diabéticos (1,4).

En 1970 en México la diabetes mellitus era la sexta causa de mortalidad en personas mayores de 60 años (411 defunciones por cada cien mil personas), pero esta frecuencia aumentó un 175% en 1980 pasando al quinto lugar (720 defunciones por cada cien mil personas) y posteriormente en 1990 se incrementó nuevamente un 121%, siendo en éste año la cuarta causa de mortalidad (869 defunciones por cada cien mil personas) (2,3). En 1995 era la segunda causa de mortalidad hospitalaria con un total de 3148 defunciones por cada cien mil habitantes (2).

Estos datos por demás preocupantes hacen necesario realizar todo esfuerzo que esté a nuestro alcance para prevenir el desarrollo de esta enfermedad y para brindar a estos pacientes diversas alternativas de tratamiento antes de que desarrollen las complicaciones tardías, que necesariamente provocarán un deterioro en su calidad de vida y finalmente su muerte.

1.2. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN.

La Diabetes mellitus es un padecimiento multifactorial, caracterizado por la carencia absoluta o relativa de insulina, que se manifiesta con estados de hiperglucemia. El concepto actual sobre la diabetes señala que la enfermedad, mas que ser un solo desorden, es un síndrome caracterizado por hiperglicemia crónica, existiendo al menos cuatro grandes tipos de la enfermedad (5).

I. Diabetes tipo 1.- anteriormente conocida como Diabetes tipo I o Diabetes Mellitus Insulino-dependiente (IDDM), incluye a pacientes con destrucción ideopática o inmune de las células β del páncreas.

II. Diabetes tipo 2.- anteriormente conocida como Diabetes tipo II o Diabetes Mellitus no Insulino-dependiente (NIDDM), incluye pacientes con resistencia tisular a la acción de la insulina que pueden presentar de manera paralela defectos en la secreción de esta hormona.

III. Otros tipos de diabetes.- inducida por defectos genéticos a nivel de las células β del páncreas que son heredados en forma autosómica dominante o a nivel de alteraciones en la estructura de la molécula de insulina, por enfermedades del páncreas exócrino, por endocrinopatías, por drogas capaces de inducir el estado diabético, por infecciones, por mediación inmunológica o por síndromes asociados a la enfermedad.

IV. Diabetes gestacional.- comienza en el embarazo y desaparece después del parto. En estos casos, el efecto de la insulina es bloqueado parcialmente por hormonas antagonistas producidas por la placenta a partir de la vigésimocuarta semana de la gestación humana por lo que se dice que el embarazo es un estado diabetogénico *per se*.

La expresión de diabetes mellitus por sí sola no define la enfermedad, pero en la práctica cualquier trastorno que produzca elevación de la glucosa plasmática después de ayuno tiende a denominarse diabetes mellitus. Esta enfermedad está determinada genéticamente y el sujeto que padece diabetes mellitus presenta alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de los pacientes con larga evolución de la enfermedad, por complicaciones microangiopáticas, en especial renales y oculares, así como microangiopatía con afección a las arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía. La diabetes afecta a casi todos los tejidos del organismo de manera severa al sistema cardio vascular, sistema nervioso central y al genital- urinario (6).

Aunque la deficiencia de insulina puede ser reducida con la dieta, el ejercicio, la terapia con agentes hipoglucemiantes o la administración de insulina, no siempre se logra evitar el desarrollo de las complicaciones crónicas que acompañan a esta enfermedad (6).

1.3. DIABETES EXPERIMENTAL

La imposibilidad práctica y ética de realizar los estudios de la embriopatía diabética en humanos en las primeras etapas del desarrollo que es en la que ocurre el mayor daño hace necesario recurrir a modelos animales que puedan proveer una aproximación directa e identificar los factores teratógenos y mecanismos a través de los que opera. Las observaciones en éstos pueden extrapolarse al hombre después de un análisis riguroso (7).

1.3.1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES.

La diabetes puede ser producida experimentalmente por cirugía, infección viral y la administración de hormonas o de agentes químicos (7,8).

1.3.2. MODELOS DE DIABETES ESPONTÁNEA.

La diabetes espontánea en animales es relativamente común. Desde 1851 Leblanc documentó el caso de diabetes espontánea en un mono. Posteriormente se ha documentado la presencia ocasional de diabetes en gatos, perros, ardillas, zorros, delfines, hipopótamos, antilopes y animales de granja. La diabetes en la mayoría de estos animales está frecuentemente caracterizada por obesidad, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. En el caso de animales no obesos las características son hipoinsulinemia, cetosis y dependencia a la insulina. La enfermedad puede ser inducida en muchos animales, particularmente en roedores de laboratorio, utilizando una variedad de agentes químicos y otros procedimientos experimentales (7,8,9,10). Los modelos genéticos que semejan a la diabetes mellitus tipo 2 son producidos por la selección de una mutación espontánea o por ingeniería genética. Son muchos los ejemplos incluyendo el ratón db/db, el ratón ob/ob, ratón kkk, ratón NZO, rata fa/fa Zucker, y rata diabética fa/fa Zucker. Muchos de estos modelos muestran varios grados de glucemia, insulinemia y obesidad.

Los modelos genéticos de Diabetes tipo 1 incluyen el ratón NOD y la rata diabética BB. En el cuadro 1 se muestran algunas características de animales con diabetes espontánea.

CUADRO 1. Características de algunos animales con diabetes inducida.

Nombre	Constitución	Insulina plasmática	Tipo de diabetes	Cetosis	Célula β
Rata BB (Bio-Breder)	delgada	Muy baja	tipo 1	++++	Insulinitis. Necrosis de las células β
Ratón NOD (diabético no obeso) Jcl:ICR	delgado	baja	tipo 1	+++	Destrucción autoinmune mediada por células T
Hámster Chino (Cricetulus griseus)	delgado	normal o baja	tipo 1	+	Degranulación, ↓ en el número de células β ; con cetosis: necrosis
Hámster Sudáfrica (Mysomys albicaudatus)	delgado	?	tipo 1	++	Hiperplasia e infiltración de glucógeno; con cetosis: necrosis
Perro Keeshond	delgado	baja	tipo 1	+++	Ausencia de células β ; células β solitarias.
Ratón C57BL/ 6J ob/ob	muy obeso	Inicio muy alta, después normal.	tipo 2	—	Inicio: degranulación; después: hiperplasia y regeneración.
Ratón C57BL/KsJ db/db	muy obeso	Inicio: alta, después normal	tipo 2	ocasionalmente	Inicio: degranulación, después: necrosis de células β
Ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO)	obeso	Alta	tipo 2	—	Inicio: Aumento de la insulina pancreática.
Ratón amarillo	obeso	Alta	tipo 2	—	Hipertrofia e hiperplasia
Ratón KK	obesidad moderada	Alta	tipo 2	—	Hipertrofia e hiperplasia
Ratón amarillo-KK	obesidad moderada	Alta	tipo 2	—	Hipertrofia e hiperplasia
Rata obesa de la cepa Zuker (fa/fa Zuker)	obesa	Alta	tipo 2	—	Inicio: alargamiento de islotes; después: ↓ insulina pancreática, ↓ número de células β .
Rata de arena (Psammomys obesus)	obesa	Alta	tipo 2	ocasionalmente	Alargamiento de los islotes: degranulación de células β ; depósitos de glucógeno; con cetosis: necrosis
Ratón rápido??? (Acomys cahirinus)	obeso	Alta	tipo 2	ocasionalmente	Hipertrofia e hiperplasia masiva
Ratón híbrido Wellesley (C3Hf X I)	obeso	Alta	tipo 2	—	Hiperplasia, hipertrofia y degranulación de las células β .

Hámster Djungarian (Phodopus sungorus)	obeso	Alta	tipo 2	+	Hipertrofia e hiperplasia
Tuco-tuco (Ctenomys talarum)	muy obeso	?	tipo 2 ?	—	Hipertrofia
Simio negro (Macaca nigra)	delgado	Normal	?	—	Amiloide
Mono rehesus (Macaca mulatta)	obesidad central	Inicio: alta, después: baja	tipo 2	—	Alteraciones en la secreción de insulina.

1.3.3. MODELOS DE DIABETES INDUCIDA

1.3.3.1. INDUCCIÓN QUIRÚRGICA.

Los primeros intentos de inducir la diabetes experimental se realizaron en perros a través de la pancreatometomía parcial o total. Este procedimiento también fue el primero que se utilizó para causar diabetes en ratas gestantes. Posteriormente mediante la lesión selectiva de las células del núcleo ventromedial del hipotálamo de ratas, se logró que éstas desarrollaran una diabetes experimental que semeja a la tipo 2, presentando obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (7).

1.3.3.2. INDUCCIÓN HORMONAL

Las llamadas hormonas "anti-insulina" como la epinefrina, el glucagon, los glucocorticoides y la hormona de crecimiento, tienen un efecto antagónico al de la insulina. Cuando la epinefrina y el glucagon se encuentran en cantidades elevadas, ya sea por la presencia de tumores o por la respuesta al estrés, se reduce la tolerancia a la glucosa y se presenta la hiperglucemia. La epinefrina y el glucagon administrados en altas dosis a animales, tienen el mismo efecto anti-insulina que el que se presenta en humanos. Incluso se ha reportado la presencia de hiperglucemia e hiperplasia de las células beta del páncreas en animales a los que se les administró hidrocortisona o ACTH (8,9).

1.3.3.3 INDUCCIÓN VIRAL.

Los virus representan otro mecanismo de inducción de la diabetes, están asociados con el desarrollo de la diabetes tipo 1 en humanos y en animales. Pueden destruir directamente a las células β por efecto citolítico propio del virus o bien actuar indirectamente por una respuesta autoinmune iniciada y aumentada por el virus. La presencia de diabetes en estos casos, se correlaciona con la habilidad de las células β para mantener la duplicación viral cuadro 2 (11).

Cuadro 2 . Virus que inducen el desarrollo de diabetes.

Virus	Tipo	Huésped	Factores Genéticos	Características
Encefalo-Mio-Carditis (EMC)	RNA	ratón hámster	+	Producen degranulación de células β y necrosis.
Coxsackie B	RNA	ratón primates no humanos	+ no determinado	Inflamación focal exócrina con lesiones necrotizantes; alteraciones finas de células β sin necrosis.
Retrovirus	RNA	ratón humanos	+ no determinado	Necrosis de islotes focal a extensa.
Virus bovino	RNA	ganado	no determinado	Necrosis de células β .
Virus Kilham de la rata	DNA	rata	+	
Citomegalovirus	DNA	humanos	no determinado	
Epstein-Barr	DNA	humanos	no determinado	
Varicela zoster	DNA	humanos	no determinado	

1.3.3.4. INDUCCIÓN QUÍMICA.

Existen diferentes sustancias capaces de producir diabetes:

- *Las sustancias que son tóxicas para las células beta del páncreas que las destruyen, produciendo un efecto citotóxico irreversible.
- *Las que actúan sobre las células beta del páncreas produciendo un efecto citotóxico reversible.
- *Las que aumentan los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y secundariamente producen diabetes Cuadro 3. (8,9,10).

En general, los agentes químicos de la primera categoría producen lesiones que ocurren durante la destrucción de la célula β semejante a lo que ocurre con la diabetes tipo 1. Estos agentes permiten estudiar a los modelos animales por tiempos prolongados ya que producen lesiones prácticamente a largo plazo.

Cuadro 3. Agentes químicos inductores de diabetes.

Agentes con efectos citotóxicos irreversibles en las células beta	Agentes con efecto citotóxico reversible en las células beta	Otros agentes
Aloxana Estrepto. otocina Difenilthiocarbazona Oxine-9- hidroxiquinolona Vacor	6 aminonicotinamida L-asparginasa Azida Cianida Ciproheptamina Ácido dehidroascórbico Fluorida Iodoacetato Malonato Tiazidas 2-deoxiglucosa Mannoheptulosa	Anticuerpos anti-insulina Somatostatina Catecolaminas Glucocorticoides Glucagon

Los agentes químicos más utilizados en la inducción de diabetes por sus efectos citotóxicos irreversibles en las células β son la aloxana y la estrepto. otocina. Ambos son citotoxinas β , que dependiendo de la dosis, pueden producir efectos secundarios.

Aunque la aloxana fue el primer agente en ésta categoría, la estreptozotocina ha demostrado ser más efectiva y es el agente más utilizado para producir diabetes experimental. La estreptozotocina tiene una gran selectividad por la célula β (12), produce una menor mortalidad de los animales (13).

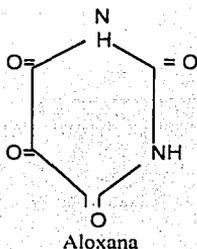
1.3.3.4.1. ALOXANA.

Fórmula, Vida Media y Acción.

La aloxana fue la primera sustancia química descrita con capacidad diabetogénica. Aunque su mecanismo de acción aún no se conoce con exactitud, existe evidencia de su afinidad por la membrana de las células β del páncreas (7).

La aloxana, es un derivado del ácido úrico (2,4,5,6 tetraoxohexahidropirimidina). Su capacidad para destruir las células β del páncreas en forma selectiva fue descrita por Dunn en 1946 durante sus estudios de nefrototoxicidad. Desde entonces se ha utilizado para la inducción de diabetes permanente en animales de laboratorio (14). (Figura 1).

Figura 1



La aloxana esta formada por anómeros α y β ,es soluble en agua y ligeramente ácida en solución. Cuando se encuentra en solución a un pH 3 o menor, es estable a temperatura ambiente. A pH 7, debe conservarse por abajo de 4°C para prevenir que se convierta en ácido aloxánico. Tiene una vida media de entre 1 a 2.8 min. después de la administración intravenosa de 50 a 100 mg/kg (14).

El efecto diabetogénico de la aloxana es rápido, evidenciado por una hipoglucemia aguda una hora posterior a la administración seguida de una franca hiperglucemia a las 48 horas (15).

La aloxana induce diabetes destruyendo las células β de los islotes pancreáticos. Una característica importante de la aloxana es que sus efectos diabetogénicos pueden ser bloqueados tanto por azúcares metabolizables como no metabolizables (D-glucosa y 3-O-metil-D-glucosa). Se ha visto que este mecanismo protector de los azúcares es altamente estereo-específico siendo mayor para los anómeros α . También existe evidencia que sugiere que la aloxana actúa en un sitio de glucoreceptores responsable de la liberación de insulina, que es diferente del sitio de transporte.

El anómero α de la D-glucosa que tiene mayor efecto protector que el anómero β , es también un estímulo más potente para la liberación de insulina. Sin embargo el anómero β es transportado más rápidamente al interior de la célula (15,16,17).

La dosis necesaria para inducir la diabetes varía dependiendo de la especie y la edad del animal. Sin embargo se ha visto que las células β pancreáticas tienden a recuperarse en número y función a través del tiempo, lo que se ve reflejado en un aumento de los niveles sanguíneos de insulina, los cuales en ratas prácticamente se normalizan a los 20 días de inducción de la diabetes con aloxana (15,16).

Okamoto al estudiar el mecanismo de acción de la aloxana propuso un modelo en el cual la fragmentación del DNA nuclear de las células β era importante para la inducción de la diabetes con acumulación de radicales hidroxilo y superóxido (18,19).

La alta toxicidad de la aloxana produce una elevada mortalidad en las ratas. Las dosis bajas de aloxana para inducir diabetes experimental, ocasionan una reducción parcial de la masa de células β y produce un moderado estado de deficiencia de insulina, sin cetosis y con resistencia a la insulina (15,16,17,20,21,22).

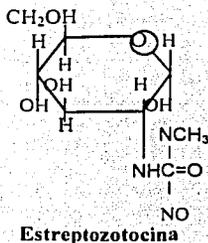
1.3.3.4.2. ESTREPTOZOTOCINA

Fórmula, Vida Media y Mecanismo de Acción.

La estreptozotocina (STZ) es un antibiótico de amplio espectro producido por *Streptomyces achromogenes* que ha sido ampliamente utilizado como agente antitumoral y diabetogénico. Presenta una citotoxicidad específica *in vivo* sobre las células β del páncreas sin afectar otros tejidos. Es análoga de la glucosa (2-deoxi-2-[3 metil-3-nitrosourea] 1-D-glucopyranosa). Presenta una cadena de metil nitrosourea unida a la posición C2 de la D-glucosa (Figura 2).

Está compuesta por isómeros α y β con respecto a la glucosa. Es inestable a temperatura ambiente, por lo que hay que mantenerla congelada. La STZ se descompone rápidamente en solución acuosa a un pH neutro y su estabilidad óptima se consigue a pH 4 (7,14,23,24).

Figura 2



La STZ tiene una vida media de 5 minutos y es eliminada de la circulación en un lapso de 4 a 6 horas. Se ha demostrado que su efecto es severo e irreversible. La hiperglucemia que produce se considera como una forma específica sin cetogénesis ni elevación de ácidos grasos libres (7).

La STZ produce la degeneración de los islotes de Langerhans. A dosis bajas, puede ocasionar daño en el DNA y provocar apoptosis de las células β del páncreas, mientras que en dosis mayores la forma predominante de muerte celular es la necrosis. Administrada *in vivo* a dosis de 40 mg/kg. de peso por día durante 5 días consecutivos causa apoptosis, mientras que a dosis única entre 100 y 200 mg/kg. de peso provoca necrosis de las células β (25,26,27).

Aún no se sabe con exactitud cual es el mecanismo de acción de la STZ, aunque se han propuesto varios y más bien podría ser una combinación de éstos. La STZ se une a las membranas de las células β del páncreas. El reconocimiento de la STZ se da por un receptor específico en la superficie de las células β -mayor afinidad por el anómero α de la parte glucosamina, el transportador de glucosa 2 (GLUT2). Se ha visto que las células que expresan transportador de glucosa 1 (GLUT1) pero no GLUT2, no se afectan por esta sustancia (28).

Una vez dentro de la célula, ocurren frecuentemente 3 fenómenos responsables de la muerte de la célula β : (Figura 3).

1) Procesos de Metilación. El efecto deletéreo de la estreptozotocina resulta de la degeneración altamente reactiva de iones carbonio (CH_3^+) formados por la descomposición de la nitrosourea. Estos iones causan ruptura del DNA por alquilación de las bases de DNA en varias posiciones (29) originando activación de enzimas nucleares poli-sintetasas (ADP-ribosa) como parte del mecanismo reparador celular. Como nucleótidos celulares particularmente el NAD^+ , son utilizados como sustratos por enzimas nucleares ocurriendo así una disminución en NAD^+ dentro de los primeros 20 minutos. El brusco e irresistible agotamiento de NAD^+ conduce a una interrupción de la energía y metabolismo proteico dependientes de NAD^+ llevan finalmente a la muerte celular. El CH_3^+ tiene la capacidad de alquilar las bases del DNA, lo que produce la ruptura de sus puentes en varias posiciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuando el daño es lo suficientemente severo para que el DNA no pueda ser reparado, estas células inician el proceso de apoptosis (25,26,36).

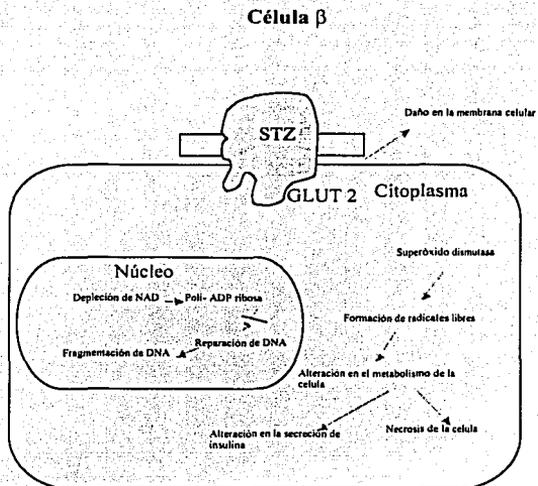
2) Formación de Radicales libres. Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno puede ser producido por los islotes del páncreas después de la exposición a la estreptozotocina tanto *in vivo* como *in vitro* (30,31). Estos radicales tienden a fragmentar una considerable cantidad de DNA. La STZ inhibe a la superóxido-dismutasa –que es un acarreador endógeno de radicales libres– por lo que se ha concluido que el estrés oxidativo tiene un papel importante en la citotoxicidad de la STZ (25,30,31,32,33).

3) Generación de óxido nítrico (NO). Se ha propuesto al óxido nítrico, dentro de las sustancias que actúan para mediar los efectos diabéticos de la estreptozotocina. No queda claro el mecanismo preciso de la acción que conduce a la generación de óxido nítrico, sin embargo dicha producción de óxido nítrico generada por estreptozotocina, parece estar involucrada en la citotoxicidad hacia las células β (25,26,30,34,35,37).

Recientemente, se ha propuesto una hipótesis que intenta explicar el mecanismo de acción de la estreptozotocina, a través de la producción de superóxido que genera superoxinitritos. Estos a su vez, se disocian en óxido nítrico y radicales de hidroxilo que conducen a dañar el DNA de la célula β produciendo apoptosis (38). Cualquiera que sea el mecanismo, el DNA nuclear y mitocondrial son reparados utilizando la poli-sintetasa (ADP-ribosa) nuclear. La actividad de esta enzima se incrementa de manera importante dentro de los 10 minutos después de la inyección de la estreptozotocina. Esta enzima utiliza como sustrato a NAD la cual disminuye notablemente dentro de los 20 minutos después de la inyección, con ello se producen unidades de ADP-ribosa, necesarias para reparar el DNA (39). Después de múltiples inyecciones de estreptozotocina a dosis bajas, se produce una degeneración de islotes por acción directa citotóxica, lo cual inicia la respuesta inflamatoria con migración de las células mononucleares y la transformación a macrófagos (40). Dichas células fagocitan a las células β , liberando mediadores químicos celulares e infiltración de linfocitos (41).

Diversos mecanismos han sido postulados para explicar porque ocurren estos efectos letales selectivos sobre las células β , que incluyen; la elevada afinidad de la estreptozotocina sobre la membrana de la célula β ; la presencia de grupos SH- con sensibilidad especial a las interacciones oxidativas; la baja capacidad de las células β para deshacerse de radicales libres y por último, una disminución en la relación NAD^+ / DNA en islotes, comparada con la de otros tejidos. Figura 3.

Figura 3. Posible mecanismo de acción de la estreptozotocina (STZ) en la célula β .



1.4. RELACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA CON LA SEVERIDAD DE LA DIABETES.

Desde el inicio de la utilización de la estreptozotocina en 1963 por Rakieten y colaboradores (43), ésta ha sido administrada en un amplio rango de dosis, vías de administración tanto en ratas como en otros animales (cuadro 3) (36,43).

Estudios realizados por Kulvinder y colaboradores, demuestran que las dosis bajas de STZ (15mM) sobre las células β tratadas, inducen apoptosis, observándose rasgos morfológicos característicos de ésta como son: compactamiento y separación de las células β de sus vecinas, masas de cromatina bien definidas ligadas a la membrana nuclear, rompimiento de la membrana nuclear y fragmentación celular para formar cuerpos apoptóticos. También observaron que las altas dosis de STZ (30mM) provocan que las células β tratadas presenten apoptosis, pero en mayor grado necrosis. Con una severa inflamación de compartimientos citoplasmáticos y mitocondriales, desaparición de ribosomas y cromatina condensada irregularmente distribuida por todo el núcleo (42).

Junod y colaboradores fueron los primeros en describir el patrón trifásico de cambios en la glucosa sanguínea e insulina en las 24 horas siguientes a la administración de 65 mg/kg de

la droga, en ratas macho de la cepa Wistar. Una hiperglucemia inicial que fue seguida de un periodo crítico de marcada hipoglucemia, la cual traducía una degranulación masiva de las células β con una gran cantidad de insulina pancreática liberada. La hiperglucemia se estableció dentro de las 24 a 48 horas siguientes, permaneciendo las cifras de la glucosa de 3 a 4 veces por arriba de lo normal, con una reducción de insulina plasmática y pancreática del 5% con respecto a los controles. Aunque estos animales son deficientes de insulina, no requieren suplementos de insulina para sobrevivir durante un cierto tiempo y no desarrollan cetonuria. Después de una sola dosis de estreptozotocina, la necrosis de la célula β puede detectarse dentro de 2 a 4 horas en el examen ultraestructural y dentro de 24 horas con microscopía de luz (44). Cuatro días después de la administración de estreptozotocina en ratas adultas, los islotes remanentes muestran degranulación y proliferación celular que puede durar varios meses (45).

La dosis de 100 mg/kg de estreptozotocina provoca necrosis severa de la célula β . La desintegración y la fagocitosis de las células necróticas es rápida sin evidencia de inflamación visible después de 3 días. De la misma forma, hubo marcada elevación de glucosa sérica dentro de las primeras 24 horas y cetonuria importante con muerte de la mayor parte de los animales, debido a la ausencia de insulina endógena y a la falta de insulina exógena para suplir a la primera. Dosis entre 25 y 100 mg/kg mostraron una variación en la severidad de la diabetes, tanto en la elevación de la glucosa como en la disminución de la insulina pancreática. La severidad se reflejó en los cambios en el peso corporal de las ratas en un período de 5 semanas, con las ratas que recibieron entre 55 y 65 mg/kg de estreptozotocina, no aumentaron de peso.

Con dosis de 35mg/kg, el 25% de las ratas se recuperaron espontáneamente la diabetes que habían presentado al inicio, con una correlación entre la insulina pancreática y la recuperación de la diabetes. También demostraron que una segunda inyección de estreptozotocina, produjo diabetes de manera similar a la primera inyección, por ejemplo; dos inyecciones de 25 mg/kg con algunos días de diferencia, provocaron diabetes de manera similar a una sola dosis de 50mg/kg, incluso con la primera dosis de 25 mg/kg no presentaron signos clínicos de diabetes. Todos estos datos sugieren que el contenido de insulina pancreática es una buena forma de medir la severidad de la diabetes.

Los hallazgos del grupo de Junod con relación a la dosis respuesta de la estreptozotocina fueron confirmados por Bar-On (46) quien administró entre 25 a 85 mg/kg de estreptozotocina a ratas Sprague-Dawley con pesos entre 150 a 200g. Las dosis de 25 a 35 mg/kg no incrementaron la glucosa plasmática ni los triglicéridos, mientras que dosis de 45 a 55 mg/kg, si la incrementaron. La estabilidad a largo plazo de la diabetes fue analizada por Ar'Rajab (47) quien utilizó ratas macho Sprague-Dawley con pesos de 240 a 260g, administrando dosis de 50 a 70 mg/kg de peso de estreptozotocina.

Los estudios mencionados demuestran una dependencia de las dosis de estreptozotocina, sin embargo, no hay un consenso sobre las dosis en particular. Mientras que Junod y su grupo utilizaron ratas Wistar en ayuno antes de la inyección de estreptozotocina, Ar'Rajab, y Bar-On utilizaron ratas Sprague-Dawley, sin que tuvieran ayunas antes de la inyección de la droga. Bar-On encontró al menos una muerte de seis animales con dosis de 55mg/kg, mientras que Ar'Rajab no encontró muertes. Resultados de otros estudios, indican que aún

cuando la vía de administración y la dosis de estreptozotocina son constantes, existe una amplia variabilidad en la severidad de la diabetes, entre los diferentes grupos de investigadores y con diferentes cepas de ratas (Cuadro 4).

CUADRO 4. Dosis y vía de administración de la STZ.

Vía	dosis (mg/kg)	peso (g)	Cepa (mmol/l)	glucosa (mmol/l)
i.v.	50	100-120	Sherman	16.5
i.v.	25-100	170-230	Wistar	varía
i.v.	25-85	150-250	Sprague-Dawley	varía
i.v.	30-70	250		
i.v.	30-100	150-200	Sprague-Dawley	varía
i.p.	40-60	350-450	Wistar	varía
i.p.	100	200	Sprague-Dawley	25.3
i.p.	35	260-270	Wistar	27.5
i.p.	100	180-220	Sprague-Dawley	>16.6
i.p.	70	140-160	Sprague-Dawley	23.9
i.p.	50	200-225	Sprague-Dawley	25.3
s.c.	40 dos veces	170-190	Sprague-Dawley	25
s.c.	40 dos veces			
i.c.	65	290-350	Sprague-Dawley	15.9
i.m.	20-100	100-300	Sprague-Dawley	varía

Nota. *i.v.* intravenoso, *i.p.* intraperitoneal, *s.c.* subcutáneo, *i.c.* intracardiaco, *i.m.* intramuscular.

1.5. PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA

La estabilidad de la droga se alcanza a un pH de 4 la cual pierde si el pH aumenta o disminuye. Debe ser preparada en un amortiguador de acetatos ajustando el pH de 4.5 inyectando la solución en un corto tiempo (5 minutos aproximadamente). El requerimiento convencional para un pH de 4.6 en amortiguador de citratos fue puesto en duda por Axler (48) quien encontró una efectiva acción diabetogénica en solución salina a pH de 7.2, incluso cuando la solución fue calentada a 37°C por 30 minutos antes de ser inyectada a ratones hembra BALB/c. Povoski (49) utilizó soluciones de estreptozotocina preparadas y almacenadas a 6°C por varios días para inducir diabetes en hamsters dorados; no encontrando diferencias en los niveles de glucosa plasmática al día 9 después de la inyección de estreptozotocina. Él utilizó soluciones frescas comparadas con las almacenadas a temperatura ambiente por 7 días. La dosis utilizada fue de 50 mg/kg inyectadas intraperitonealmente por 3 días consecutivos. Los niveles de glucosa plasmática 9 días después de la inyección final, fueron de 16.2 a 17.8 mmol/l. Los autores concluyen que es preferible preparar la solución de estreptozotocina, equilibrarla o ajustar a su pH y almacenar alícuotas a 6 °C.

1.6. SUSCEPTIBILIDAD A LA ESTREPTOZOTOCINA EN LAS DIFERENTES CEPAS DE RATAS.

Ramanadham y colaboradores (50) han utilizado ratas Wistar y Wistar- Kyoto con pesos de 175 a 200g con dosis de 55 y 65 mg/kg por vía intravenosa. Diferencias en los niveles de lípidos sanguíneos fueron evidentes entre las dos cepas. Las ratas Wistar- Kyoto desarrollaron hiperlipidemia menos severa y menor afección cardíaca que las ratas de la cepa Wistar, estudios que también fueron confirmados por Rodrigues (51). En las ratas Wistar- Kyoto no se demostró una elevación importante de los niveles de triglicéridos plasmáticos a pesar de haber utilizado dosis elevadas de estreptozotocina (75mg/kg). Las diferencias en la respuesta diabtogénica de la estreptozotocina entre esas dos cepas cercanas de ratas, indica que existen diferentes tipos de respuesta entre las diferentes cepas de ratas. Otras cepas pueden ser aún más sensibles a los efectos de estreptozotocina. Como son las ratas espontáneamente hipertensas, en las que los niveles séricos de glucosa y triglicéridos se elevan después de la administración de una dosis de 35mg/kg de la droga, mientras que en la cepa de ratas Wistar- Kyoto, no tuvieron mayor elevación (52).

2. DIABETES INDUCIDA Y REPRODUCCIÓN.

La diabetes es un padecimiento que provoca alteraciones en la función reproductora, se han reportado modificaciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, tanto en el sexo femenino como en el masculino, así como problemas de infertilidad y disfunción reproductiva (53,54).

En ratas macho con diabetes inducida se han reportado diversas alteraciones en el tracto genital (54,55). Ford (1984) reporta que en las ratas machos la diabetes inducida produce atrofia de las glándulas sexuales accesorias, pero no afecta el peso del testículo ni la cantidad de espermatozoides en el epidídimo (54).

En estudios realizados en relación con el metabolismo de la glucosa a nivel del túbulo seminífero y epidídimo, encontraron que el testículo no es dependiente de insulina, debido a que la presencia de esta hormona en altas concentraciones no tiene un efecto sobre el metabolismo de la glucosa en el túbulo seminífero o en el espermatozoide.

Sin embargo, Hassan (1993) informa cambios en el peso de los órganos reproductores, el contenido testicular y epididimario así como en la movilidad espermática y alteraciones en la conducta sexual. Así mismo, encuentra decremento en la producción de testosterona en células de Leydig tanto en cultivo como *in vivo*, además de un decremento en los niveles séricos de LH (6).

Se ha demostrado que ratas macho diabéticas presentan deficiencias en la secreción de LH, FSH, prolactina y testosterona, así como un incremento en la sensibilidad en la retroalimentación negativa por testosterona (56).

En el caso de hembras diabéticas se han reportado disfunciones reproductivas, siendo las principales asociadas con atrofia ovárica, foliculogénesis anormal, insuficiencia en la liberación de progesterona del cuerpo lúteo, involución uterina y problemas asociados con el mantenimiento de la gestación (57).

Se han realizado diferentes estudios sobre las alteraciones a nivel del eje hipotálamo-hipófisis, y el efecto de la diabetes sobre éste (58,59,60,61).

Valdes y colaboradores (1991) informan que en hembras con diabetes inducida por estreptozotocina se produce anovulación, lo cual se ha asociado con una reducción de GnRH y demostró que las concentraciones hipotalámicas de GnRH son más bajas en las hembras tratadas con estreptozotocina, que en hembras sanas; produciendo un daño generalizado en el hipotálamo, lo cual se refleja en la reducción de la producción de GnRH, que se restablece con el suministro de estrógenos.

Demostraron que la hipófisis responde más en hembras diabéticas tratadas con estrógenos que en ratas diabéticas sin tratamiento, por lo que concluyeron que es el hipotálamo el sitio primario de disfunción y que la respuesta alterada de la hipófisis a la estimulación con estrógenos, es secundaria a la disfunción hipotalámica; por lo que la función hipotalámica alterada puede dar como resultado diferentes anormalidades, especialmente en el sistema porta hipofisario, o bien puede ser debida a diversos cambios metabólicos asociados con la diabetes (58).

Kienast (1993) demostró que los mecanismos de retroalimentación positiva de LH son severamente alterados en la rata diabética (60). Stegar y Kienast (1992) establecen que en hembras tratadas con STZ, también se encuentra una amplificación de la respuesta a la retroalimentación negativa a los estrógenos, lo cual aparentemente se debe a un incremento en la capacidad de los estrógenos para inhibir el metabolismo de la norepinefrina hipotalámica más que una acción directa sobre la glándula hipófisis. Concluyendo que los efectos de la STZ sobre la secreción de LH también incrementa la liberación de dopamina e inhibe el efecto estimulador de los estrógenos sobre la producción *in vitro* de prolactina (62).

2.1. DIABETES INDUCIDA Y DESARROLLO

Experimentos realizados en animales de laboratorio con diabetes inducida por estreptozotocina han demostrado la presencia de malformaciones congénitas, reabsorciones y retardo en el desarrollo. En ratas gestantes con un control estricto de la diabetes por administración de insulina, se presenta una reducción en la embriofetalidad y en la incidencia de malformaciones congénitas.

La alteración en la relación materno-fetal, resultado de la diabetes durante la gestación ofrece una evidencia importante de la modulación de la glucosa y la insulina sobre el crecimiento fetal. Aunque un incremento de la glucosa fetal y la disponibilidad de insulina están estrechamente relacionados con el desarrollo de macrosomía fetal; sin embargo poco se conoce acerca de los mecanismos a través de los cuales la diabetes materna regula el crecimiento fetal en ratas. Se ha demostrado que el exceso de glucosa puede contribuir con un retraso en el crecimiento fetal, no conociéndose el mecanismo a través del cual ejerce este efecto (63).

Estudios en modelos experimentales acerca del efecto de la diabetes en las crías amplían el panorama del conocimiento sobre este tema. En los trabajos de Eriksson (1984) utilizando embriones de ratas con diabetes inducida de 11.5 días de gestación, reporta un retardo en el crecimiento y desarrollo, con una reducción significativa del eje anteroposterior, así como en el número de somitas, el contenido de proteínas totales y DNA del embrión, pero sin un alto índice en la tasa de malformaciones del tubo neural. Concluye que la diabetes materna puede comprometer el crecimiento y desarrollo intrauterino durante el período coincidente con el establecimiento de la circulación de la placenta corioalantoidea (64).

Phellan y colaboradores (1997) en estudios posteriores en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina, encontraron que la incidencia de defectos del tubo neural en los embriones de madre diabética es tres veces más alta que en embriones de no diabéticas, siendo las alteraciones principalmente a nivel de estructuras de cerebro medio y posterior, así como defectos del cierre del tubo neural. Ellos encontraron que la expresión del gen Pax-3, un gen requerido para el cierre del tubo neural, se reduce considerablemente en los embriones de madres diabéticas, relacionando a este gen con una alta tasa de células apoptóticas, encontradas en estos defectos neurales. Sugieren que Pax-3 es un gen importante en el control del desarrollo y que las alteraciones en su expresión en embriones de madres diabéticas, producen alteraciones del sistema nervioso así como inducción de apoptosis en éste (65).

Menegola (1995) realizó estudios con embriones de rata en cultivo, para lo cual extrajo embriones de 9.5 a 10 días de gestación, de madres con diabetes inducida con estreptozotocina y madres sanas, cultivándolos en suero de rata normal y en suero de rata diabética. Los embriones de madre normal cultivados en suero de rata normal, no manifestaron embriopatías, sin embargo los embriones de madres normales cultivados en suero de madres diabéticas presentaron retraso en el crecimiento manifestándose a diferentes niveles como son el diámetro del saco vitelino, longitud de cabeza, o longitud total, además de presentarse en algunos embriones retraso en el cierre del tubo neural. El desarrollo de los embriones obtenidos de madres diabéticas cultivados en suero normal fue semejante al de los embriones de madres sanas cultivados en suero diabético; sin embargo, una tercera parte de los embriones de este grupo presentaron severas malformaciones, como prosencéfalo hipoplásico, malformaciones cardíacas, y diferentes malformaciones severas. En los embriones de madres diabéticas cultivados en suero de madre diabética sólo se observó un deterioro ligeramente mayor de las condiciones de los embriones en comparación con los otros grupos. Concluye que los embriones de rata diabética son capaces de desarrollarse normalmente independientemente del medio de cultivo, manifestando que el efecto de la diabetes materna afecta principalmente estados muy tempranos del desarrollo, razón por la cual el suero de madres diabéticas no ejerció ningunas alteraciones en embriones de 9.5 días. Establece que durante los estadios más tempranos del desarrollo en los que se realizan los eventos morfogénicos más importantes, tales como la gastrulación, inducción del tubo neural, establecimiento de simetría, etc; es cuando se pueden producir el mayor número de alteraciones, quedando aún por estudiar los mecanismos de acción (66).

Durante el desarrollo embrionario la hiperglucemia tiene un gran efecto teratogénico. Al parecer, en etapas tempranas del desarrollo, la glucosa puede causar daño en el DNA provocando mutaciones que retrasan la duplicación del DNA y por lo tanto, la división celular, lo que interrumpe el desarrollo y la organogénesis (67).

La hiperglucemia puede producir su efecto teratogénico mediante la formación de radicales libres de O_2 *in vitro*. Se ha visto que la adición de citiolona, superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa a cultivos en suero diabético de embriones de ratas, tienen un efecto protector para el embrión, sobre todo la SOD que disminuye el retraso en el crecimiento y las malformaciones embrionarias (67,68). El efecto principal de los radicales libres de O_2 podría ser un aumento en la peroxidación de los lípidos, aunque también se deben considerar efectos directos sobre el DNA (69).

La producción excesiva de cuerpos cetónicos como el β -hidroxibutirato que es uno de los que se producen en mayor cantidad en animales con diabetes inducida, alteran el ambiente intrauterino y son los responsables del retraso en el desarrollo de los embriones de ratas diabéticas y de las malformaciones congénitas que presentan. Tanto la glucosa como los cuerpos cetónicos (en especial el β -hidroxibutirato) actúan sinérgicamente para producir retraso en el crecimiento e inducir malformaciones (70).

Se ha demostrado que la adición de β -hidroxibutirato a los cultivos de embriones de ratas diabéticas, aumenta hasta en un 29% la tasa de malformaciones comparada con aquellos cultivos en los que únicamente se utilizó suero hiperglucémico; mientras que la adición de los inhibidores de somatomedina exacerbaban la inducción de malformaciones producidas por los cuerpos cetónicos y la glucosa (71,72). Por esto, se concluyó que la glucosa tiene un papel en la teratogénesis mucho menos importante que el que presentan los cuerpos cetónicos, en especial el β -hidroxibutirato (73).

Estudios *in vitro* con embriones de ratas diabéticas se ha asociado la disminución de enzimas antioxidantes, tales como la superóxido-dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), con el aumento en la incidencia de malformaciones congénitas, disminución del peso y del contenido de proteínas de las crías.

Las lesiones angiopáticas de la vasculatura pélvica, tienen como consecuencia una reducción importante en la perfusión placentaria y un transporte de nutrientes reducido, lo que puede dar origen a alteraciones en la embriogénesis temprana y retraso en el crecimiento fetal (74,75).

3. DEFINICIÓN DE LA PLACENTA.

La placenta ha sido definida por varios autores, Mossman (1937) afirmó que es la aposición o fusión íntima de órganos fetales a tejidos maternos para realizar intercambio fisiológico (76).

Otros autores como Amoroso (1961) consideran que es un órgano que implica relaciones tróficas y respiratorias entre el feto y la madre, además de la eliminación de desechos y la síntesis de hormonas (77).

Moll (1985) afirmó que la placenta es un sistema de canales de circulación sanguínea materna y fetal en aposición adaptado para el intercambio metabólico (78).

Graham (1992) coincide en que la placenta, es esencialmente un órgano fetal derivado, y es un elemento indispensable del desarrollo en mamíferos. Es una estructura que permite que la sangre materna y fetal tenga una cercanía íntima para un intercambio eficaz y apropiado de moléculas (79).

Existen diferentes tipos de placenta los cuales se forman dependiendo del grado de invasión que establece el tejido fetal al materno y la respuesta de éste ante esta invasión (80).

La placenta es un órgano que presenta grandes diferencias morfofisiológicas en los distintos grupos de mamíferos. Estas pueden corresponder a: 1) las membranas extraembrionarias involucradas en la formación de la placenta, 2) la disposición de las vellosidades placentarias o corion frondoso, 3) la relación entre los tejidos materno y fetal (77,81,82).

3.1. LA PLACENTA Y SU RELACION CON LA REPRODUCCIÓN EN LOS MAMÍFEROS.

La placenta es un órgano esencial en la reproducción de los mamíferos euterios. A lo largo de la evolución de los vertebrados, este tipo de desarrollo intrauterino ha requerido de adaptaciones específicas que hagan posible los intercambios indispensables y continuos entre los tejidos maternos y los embrionarios (83).

En el caso de los reptiles, los intercambios fetomaternos no se relacionan con la obtención de alimento, sino con el intercambio gaseoso, la obtención de agua y de algunos metabolitos, así como, la eliminación de desechos (84,85).

El desarrollo de la placenta permite que el tejido periférico embrionario o corion se relacione con la mucosa uterina estableciendo una asociación entre las circulaciones sanguínea materna y fetal, lo que hace posible el intercambio fisiológico.

Los niveles de intercambio dependen de la amplitud de la superficie de aposición, así como del grado de invasión del corion a la mucosa uterina (77,81). La superficie de aposición placentaria permite mantener una barrera permeable, a través de la cual, las sustancias transferibles atraviesan ambos tejidos. Esta barrera, más que un filtro pasivo es una estructura activa y selectiva en el paso de sustancias, lo que se refleja en modificaciones morfológicas progresivas a lo largo de la gestación, como son el incremento de las zonas de aposición, el adelgazamiento del trofoblasto, el acercamiento de los vasos sanguíneos a la

periferia o los cambios de las características bioquímicas de los componentes celulares que controlan el intercambio (77,78).

3.2. DIABETES E IMPLANTACIÓN.

La implantación del embrión en la pared del útero es un evento básico en el desarrollo de los mamíferos. Es el resultado de una compleja serie de pasos que comienzan con la fijación del blastocisto en el útero y culmina con la formación de la placenta definitiva (87).

La interacción directa del trofoblasto con el epitelio luminal del útero es un paso esencial para dar inicio a la implantación, el mecanismo responsable de la aposición y de la reacción de adhesión aún no se conocen. Pero se sabe que el trofoblasto es capaz de reconocer receptores del epitelio uterino con los que se asocia iniciando con ello el reconocimiento de una serie de señales moleculares entre el útero y el blastocisto que en pocas horas desencadenan diferentes eventos que incluyen la transformación del estroma uterino, el reclutamiento de células inflamatorias y epiteliales, la invasión transepitelial del trofoblasto hacia el endometrio y la apoptosis del epitelio uterino (88).

En roedores y otros mamíferos el desarrollo de la placenta hemocorial o endoteliocorial es seguido de la invasión del endometrio por el trofoblasto. Después de que inicia su transporte por el oviducto, el blastocisto. Tardará de 24- 48 horas en orientarse en la cavidad uterina. El contacto entre el trofoblasto y la superficie del epitelio uterino se incrementa gradualmente a partir del inicio de la implantación y es probablemente causado por la combinación del hinchamiento del blastocisto y el cierre del lumen uterino que virtualmente desaparece en este estado de gestación en las regiones que contienen al embrión (70).

En roedores el primer día de gestación, entre la fertilización y el comienzo de la implantación, las modificaciones celulares, bioquímicas, hormonales y vasculares ocurren en el estroma endometrial, probablemente para recibir al embrión.

La implantación se inicia en el día 4 en el hámster dorado, en el 4.5 en el ratón y en el 6 en la rata y el hámster chino. Las modificaciones que sufren la superficie del trofoblasto y las células epiteliales se han observado durante la aposición y la adhesión. La adhesión del blastocisto es seguida de una penetración del epitelio uterino por el trofoblasto (89).

El primer evento de diferenciación durante la formación de la placenta ocurre después de la compactación de la mórula (aproximadamente en el día 3.5 de la gestación), con la formación del blastocisto. Las células que delimitan a la mórula se diferencian en el trofoectodermo, mientras que las células más internas constituyen el macizo celular interno (MCI). Los componentes endodermal y mesodermal de la placenta derivan del MCI. Durante el proceso de implantación, se realiza una respuesta endometrial, al adquirir las células del MCI un carácter invasivo, estableciendo un patrón diferencial en la producción de moléculas de adhesión como respuesta para el reconocimiento de la matriz extracelular presente en el endometrio, y desencadenar la liberación de enzimas que favorecen el avance del blastocisto hacia el estroma endometrial (88,89).

La implantación y la placentación en el humano, así como en la rata están asociados con la transformación del estroma endometrial en tejido decidual. En la rata este proceso es normalmente disparado por el contacto del blastocisto con el epitelio uterino (90). Y se inicia aproximadamente a los 6 dpc (días post coito) etapa en la que la receptividad del útero depende del establecimiento de la "ventana de implantación", la cual está determinada por una combinación de progesterona y estrógenos que preparan al útero para aceptar al embrión. El trofoblasto raramente entra en contacto con el tejido materno antes de que el blastocisto se ponga en contacto con la lámina basal del epitelio uterino, la lámina basal es penetrada inicialmente por células deciduales adyacentes. Las células del trofoblasto entran en contacto primero con las células deciduales antimesometriales (día 7), las células endoteliales y las células sanguíneas forman parte de la pre-placenta. El epitelio luminal de la región degenera y es reemplazado por células endoteliales, un evento morfogénico trae como resultado una continuidad luminal de la región mesometrial y la región de implantación con una gran cantidad de sinusoides mesometriales. La capa de células del trofoblasto situadas en la superficie exterior del cono ectoplacental de algún modo desplazan a la capa de células endoteliales de la región mesometrial a la región de implantación y entran en contacto con las células deciduales ricas en glucógeno que rodean los sinusoides mesometriales. Estas células del trofoblasto serán las células gigantes de la zona de empalme de la placenta corioalantoidea y la región ocupada por las células deciduales ricas en glucógeno y sinusoides mesometriales que se convertirán en la decidua (91,92,93,94).

El siguiente paso de la implantación en roedores es la invasión del tejido conectivo endometrial, de la región subepitelial que no ha sido transformado en tejido decidual. La invasión resulta principalmente por la acción de la población de células gigantes del trofoblasto. Las células gigantes penetran entre las células deciduales. En roedores el desarrollo de la placenta corio-alantoidea resulta del crecimiento del cono ectoplacental, la diferenciación de estas células y su asociación con células de origen alantoideo (70,89).

La implantación en roedores es acompañada por cambios muy marcados en el endometrio como son los cambios de forma, organización y metabolismo de las células estromales residentes en el tejido conectivo endometrial. La presencia del blastocisto en el lumen uterino inicia el día 6 en rata, un proceso complejo y continuo del desarrollo llamado respuesta o reacción decidual, que se caracteriza por la hiperplasia y la diferenciación celular característica en distintas regiones del estroma en diferentes etapas durante la gestación (70,89,95,96,97).

Las células deciduales poseen numerosas funciones entre las cuales destacan la producción de hormonas u otros productos específicos para el embrión y una función inmunológica, como una barrera física para la invasión del trofoblasto (96,98).

La decidualización en roedores tiene características importantes: 1) las células del estroma han sido adecuadamente preparadas por la influencia de esteroides del ovario, 2) en condiciones normales en algunas regiones del endometrio la decidualización no ocurre, 3) puede ser inducido artificialmente en ausencia del embrión, resultado de la formación de un

tejido similar a la verdadera decidua. 4) este proceso puede inducirse en animales gestantes o pseudogestantes (70,89).

Los primeros lagunas de sangre en el trofoblasto se derivan del espacio intracelular lateral o trofoblasto mural, que comienza con la formación del trofoblasto mural del blastocisto. La superficie basal del trofoblasto está destinada a formar parte de la membrana de Reichert's. Las células de la decidua antimesometrial al desarrollarse comienzan a formar la vasculatura materna (99,100). Fig 4.

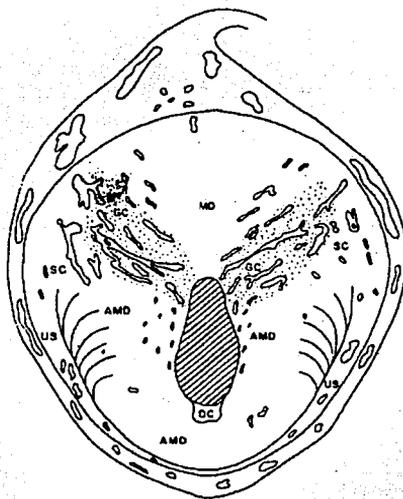


Fig 4. Esquema que representa la reacción decidual; Líneas diagonales = Zona ocupada por el "conceptus". GC= Área de células con glucógeno. AMD= Decidua antimesometrial. DC= Cripta decidual. MD= Decidua mesometrial.. SC= Células espinosas. US= Estroma indiferenciado.

En la postimplantación tardía, aproximadamente en el día 9.5 dpc el alantoides se ha fusionado con el corion, por un proceso que es mediado por la interacción entre VCAM-1 y la integrina $\alpha 4$ desarrollándose de este modo la zona laberíntica la cual es intermedia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

entre los vasos maternos y los fetales. Subsecuentemente el desarrollo del feto dependerá de esta relación y la decidua comenzará su regresión, estableciéndose la placenta como órgano totalmente desarrollado estructural y funcionalmente (88).

La capacidad invasiva del blastocisto ha sido estudiada *in vitro* mediante el cultivo de blastocistos de ratón sobre superficies de proteínas de matriz extracelular presentes en el endometrio como la fibronectina (101). Las células del trofoblasto aparentemente interactúan específicamente con la fibronectina, indicando que el receptor de fibronectina es expresado sobre la superficie de las células trofoblásticas; sin embargo en estudios posteriores demuestran que no sólo es indispensable la fibronectina, sino que la secuencia RGD (Secuencia de Reconocimiento a Aminoácidos del receptor de Fibronectina) también es mediadora de migración por reconocimiento de vitronectina, colágena y entactina (88)

La interacción del trofoblasto con las proteínas de la matriz extracelular depende de la familia de integrinas expresadas en las células trofoblásticas. Estudios con anticuerpos de amplio espectro anti-integrinas, demuestran la pérdida de unión del blastocisto a sustratos no solo de fibronectina, sino también de laminina y colágena tipo IV (88,101).

En los estudios realizados por Pampfer y colaboradores (1990) obtienen morulas y blastocistos de ratas diabéticas gestantes y examinaron individualmente el número de células presentes en el macizo celular interno (MCI) y células del trofoectodermo (TE).

En este estudio encontró que los embriones obtenidos de ratas diabéticas presentan un decremento significativo en el número de células del MCI de blastocistos obtenidos el día 5 de la gestación, comparado con los controles, pero la población celular del TE de estos embriones parece no estar afectada. Estas diferencias no se observaron entre los dos grupos de morulas obtenidas el día 5, sugiriendo que se expresó una susceptibilidad distinta en el MCI y que se expresó después de la formación del blastocisto. En el día 6, se presentó un efecto significativamente inhibitorio sobre el número de células del MCI y TE, presentando una reducción más severa las del MCI al compararlas con las del TE, la proporción de MCI de estos blastocistos fue de nuevo mas baja que la presentada por los embriones control. Concluyeron que las alteraciones en el crecimiento celular del MCI de los blastocistos de rata diabética pueden estar asociadas con un incremento significativo en la incidencia de muerte celular local predominantemente en el MCI y que estos sugieren que la sensibilidad de las células del MCI y TE en la etapa de preimplantación del blastocisto pueden contribuir con un patrón de efectos en la postimplantación en las gestaciones diabéticas (102).

3.3. DIFERENCIACIÓN DE LA PLACENTA.

Aproximadamente el día 7.5 dpc; el conceptus (embrión), se divide en 3 distintos compartimientos: la cavidad amniótica, la cavidad exocelómica y la cavidad ectoplacental. La expansión de las cavidades amnióticas y exocelómicas dependen de la cavidad ectoplacental, con un progresivo colapso. Estas dos cavidades se fusionaran, aproximadamente el día 8.5 post coito (p.c); con la obliteración de el lumen (103).

En embriones que cuentan con 7-10 pares de somitas, el alantoides crece, y se expande sobre la cavidad exocelómica y eventualmente se fusiona con las células de la superficie y

de la periferia del cono ectoplacental. En este estadio, el alantoides esta delimitado por células endoteliales con primitivas células rojas sanguíneas nucleadas (103).

Posterior a esta secuencia, el embrión es rodeado por las membranas extra embrionarias. La membrana visceral (proximal) en este momento consiste de componentes mesodermales que se vascularizan, y subyacen en columnas de células endodermales. Las microvellosidades rodean a estas columnas incluso en la cavidad amniótica. En la placenta primitiva tienen la función de absorber nutrientes de la cavidad y transferirlos hasta el compartimiento embrionario (103).

La zona parietal (distal) del amnios, en contraste con la zona visceral, consiste de una capa simple de células endodermales con una apariencia escamosa; estas se adherirán a la membrana acelular de Reichert's (103).

El cono ectoplacental, migra hacia la región parietal, y eventualmente completa su llegada al sitio de implantación con una perdida de células gigantes.

El crecimiento de las células del cono ectoplacental es rápido e invade los tejidos maternos, causando la ruptura de los vasos sanguíneos maternos. La característica más visible del cono ectoplacental en este momento es su contenido de numerosas células ricas en glucógeno, y estas ascienden hasta la zona intermedia de la placenta (103).

Aproximadamente el día 9-9.5 p.c, un gran número de células gigantes del trofoblasto se posicionan en el polo embrionario y el tamaño del conceptus ha incrementado considerablemente. En el sitio embrionario, la vasculatura primitiva alantoica es abundante y también se observan vasos sanguíneos maternos, los cuales formaran parte de la zona laberíntica de la placenta. Este será el sitio en el cual la circulación embrionaria y materna entrarán en contacto (103).

Para el día 10 p.c. la vesícula del alantoides forma parte importante de la región coriónica, y el cono ectoplacental aun no forma parte de la zona laberíntica de la placenta. La placenta en este estadio aun no es divisible en sus zonas características definitivas (103).

En términos generales en una placenta madura entre los días 12-17.5 p.c, la zona laberíntica incrementa en volumen. El volumen de esta zona permanecerá constante hasta el momento del nacimiento (103).

Aproximadamente en el día 16 p.c, la zona laberíntica ocupa más de la mitad del volumen de la placenta. Los vasos sanguíneos embrionarios pueden ser identificados por la presencia de células rojas sanguíneas primitivas nucleadas; los sinusoides de sangre materna contienen células sanguíneas no nucleadas. Después del día 11.5 p.c todas las células sanguíneas embrionarias son nucleadas, pero entre los días 12-15 p.c, la proporción de células sanguíneas nucleadas disminuye, el día 16.5 p.c todas las células sanguíneas en la circulación embrionaria son no nucleadas (103).

3.4. ESTRUCTURA DE LA PLACENTA A TERMINO EN ROEDORES.

En ratón, se encuentran tres distintas zonas en la placenta madura que se formaron en el embrión el día 10 y persisten a través y hasta el fin de la gestación. La capa más interna llamada laberíntica, la capa intermedia llamada espongiotrofoblasto y la capa más externa de las células gigantes del trofoblasto. La capa laberíntica es análoga en función a las vellosidades coriónicas flotantes en humanos. Formando una zona altamente plegada y ramificada dando a la placenta una enorme área para el intercambio de gases y nutrientes. El tejido consiste en dos capas de sincicio (sinciotrofoblasto) que separa a los espacios de la sangre materna de los vasos sanguíneos fetales. La capa de espongiotrofoblasto se forma como resultado de la expansión y achatamiento del cono ectoplacental después de los 7.5 días. Las células gigantes del trofoblasto son células post-mitóticas mediadoras de la implantación y el proceso de invasión del útero, y se encuentran en la periferia de la placenta (104). Estas tres distintas zonas también se encuentran en la placenta de rata.

3.5. ESTRUCTURA DE LA BARRERA PLACENTAL EN RATA.

La barrera placental en la zona laberíntica se constituye a partir del día 12 p.c y consiste de 3 zonas de trofoblasto (103).

En condiciones normales la sangre del feto y de la madre ni se mezclan ni entran en contacto una con otra siempre quedan separadas por la disposición estructural de los tejidos que se interrelacionan para permitir el intercambio de sustancias disueltas en la sangre del feto y que serán difundidas hacia la madre y viceversa.

La barrera placental de rata está compuesta de las siguientes zonas siguiendo la dirección feto-materna:

*Endotelio Fetal.

*Tejido conjuntivo muy heterogéneo interrumpido intermitentemente en los sitios de fusión entre el endotelio y las laminas basales trofoblásticas.

*La zona trofoblástica interna (zona III), compuesta de sincicio multinucleado.

* La zona trofoblástica intermedia (zona II), también es de naturaleza sincicial.

* La zona trofoblástica externa (zona I), que está compuesta por células del trofoblasto y espacios de sangre materna (105).

3.6. PLACENTA Y DESARROLLO

La placenta es un órgano indispensable en el desarrollo de los mamíferos dado que ella proveerá al embrión de sus requerimientos alimenticios, de intercambio de sustancias, así como la eliminación de desechos. En el caso de los embriones que cuentan con abundante vitelo proveniente de la formación de un ovocito telolécito, como ocurre en los reptiles

vivíparos, los intercambios fetomaternos no se relacionan con la obtención de alimento, sino con el intercambio gaseoso, la obtención de agua y de algunos metabolitos, así como, con la eliminación de desechos del metabolismo de la cría (85). Cuando el embrión no cuenta con abundantes sustancias nutritivas provenientes de la ovogénesis, como es el caso de los mamíferos, en los cuales el ovocito es de tipo alcítico, los intercambios fetomaternos se incrementan significativamente ante los requerimientos de alimentación fetal y, en consecuencia, la relación de los tejidos de ambos organismos se desarrolla notablemente, formándose una compleja estructura placentaria. Esta estructura permite el intenso intercambio metabólico que se adapta continuamente durante el crecimiento a las diferentes etapas del desarrollo embrionario y fetal (86).

3 7. ALTERACIONES EN LA PLACENTA DE RATAS DIABÉTICAS.

En estudios realizados sobre la estructura de la placenta de ratas diabéticas, se manifiestan alteraciones en la capacidad invasiva de las células trofoblásticas que se reflejan en un incremento de la división celular, con lo que se establece un estado inmaduro del trofoblasto, así como un incremento en la vasculatura uterina, siendo estos vasos más delgados que los de placentas de ratas no diabéticas (106).

La placentomegalia es el efecto más significativo de las complicaciones de la diabetes materna, se ha atribuido este incremento de masa placental a un insuficiente mecanismo compensatorio para la reducción del flujo útero placental. Se ha encontrado también adelgazamiento de las membranas trofoblásticas, así como un alto grado de vesiculación y vacuolización y un incremento en el número de células que almacenan glucógeno. Además de un incremento en la cantidad de DNA y lípidos. Los fetos son más pequeños que los controles; presentan un decremento en el peso fetal y un incremento en las reabsorciones fetales y malformaciones congénitas (107,108,109,110,111,112,113,116).

Wentzel y colaboradores (1995) evaluaron el flujo uterino sanguíneo en sitios de implantación individuales en ratas gestantes diabéticas y ratas gestantes normales. Encontraron un alto incremento en el flujo uterino sanguíneo y el tejido decidual de los animales diabéticos comparados con las ratas normales en los días 9,10,11,12. También encontraron que la tasa de implantación es baja mientras que la tasa de reabsorciones y la tasa de malformaciones es alta. Concluyen que el desarrollo embrionario es asociado con un aumento en el suministro de nutrientes al sitio de implantación. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados *in vivo* que sugieren que el estrés oxidativo puede incrementar la disponibilidad del sustrato siendo un factor importante para la teratogenesis diabética (109).

Se han reportado la degeneración quística de las células esponjosas, adelgazamiento de la lámina basal y alteraciones vasculares (110).

En ratas de 20 días de desarrollo se presentan cambios en la concentración de colágena tipo IV (105). Los cambios en la expresión de la matriz extracelular en la placenta regulados por

los niveles de glucosa han sido reportados en humanos y en ratas, lo que sugiere que los cambios en la expresión de las proteínas de matriz extracelular pueden ser un factor común en la diabetes materna (114).

La gestación normal es caracterizada por un incremento temprano en el contenido de glucógeno placental, seguido por un descenso progresivo al término; pero en humanos y en animales las gestaciones complicadas por diabetes mellitus hay un marcado incremento en la cantidad de glucógeno placental. Las concentraciones de glucógeno en las placentas diabéticas y las normales incrementan del día 14 al 16 de la gestación, después las concentraciones de glucógeno declinan rápidamente en ambas (107). La importancia del glucógeno placental radica en que es un sustrato potencial de energía para la placenta y para el feto. Investigaciones previas han reportado un incremento de glucógeno placental en condiciones en donde se induce experimentalmente diabetes mellitus. Se ha sugerido que el mecanismo bioquímico de la acumulación del glucógeno en ratas tratadas con STZ es la hiperglucemia (107,115,116).

En los estudios de microscopía electrónica realizados por Ne'eman y colaboradores (1987), encontraron que tanto las placentas de rata diabética como las placentas de ratas normales presentan una gran cantidad de células con glucógeno. El glucógeno en estas células se deposita en gránulos en el citoplasma de la célula. En las placentas de ratas diabéticas las mitocondrias y el retículo endoplasmático rugoso parecen estar limitados a pequeñas áreas. No encuentran diferencias significativas en la apariencia ultraestructural de las placentas diabéticas y las controles. Pero sí un marcado incremento en el contenido de glucógeno en las placentas de rata diabética, localizado en las células gigantes y en la zona basal. En la zona laberíntica de las ratas diabéticas hay un incremento en el contenido de glucógeno que fue cuantificado por una reacción específica al reactivo ácido periódico-Schiff (PASS) (116).

En los estudios de Husain y colaboradores (2001) examinaron el efecto de la diabetes materna sobre la celularidad de la placenta usando como medida el peso seco y húmedo, contenido de DNA y proteínas en las placentas de ratas diabéticas no tratadas, tratadas con insulina y controles el día 21 de la gestación. Encontraron que el contenido de DNA placental y proteínas no difiere entre los grupos controles y los grupos diabéticos. Atribuyen el incremento del peso placental en las ratas diabéticas a un aumento en el contenido de glucógeno y los solutos intracelulares que se requieren para mantener el equilibrio osmótico en presencia de hiperglicemia materna. El porcentaje de agua contenida en todos los grupos fue del 84%, no se encontró diferencia significativa con respecto al peso seco, pero sí con respecto al peso húmedo (117).

Los niveles de DNA alcanzan su valor máximo el día 16 en las placentas de rata control encontrando que las placentas de ratas diabéticas continúan con un incremento en el contenido de DNA hasta el día 18-19 y son morfológicamente inmaduras comparadas con los tejidos controles (111).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La diabetes materna provoca un ambiente intrauterino anormal induciendo alteraciones en la implantación, la placentación y las funciones propias de la placenta definitiva. Lo que causa una inadecuada transferencia de nutrientes entre la madre y el feto provocando gestaciones prolongadas, un menor número de crías, un mayor número de reabsorciones, retardo en el crecimiento y desarrollo.

5. HIPÓTESIS.

La diabetes materna provoca alteraciones estructurales y funcionales en la placenta que afectan el intercambio de sustancias entre el feto y la madre ocasionando alteraciones en el desarrollo de los fetos.

6. OBJETIVOS.

6.1. GENERAL.

Analizar los cambios estructurales de la parte fetal de la placenta de rata diabética el día 20 de la gestación y correlacionarlos con alteraciones en el desarrollo de las crías.

6.2. PARTICULARES.

- Comparar las características histológicas de la placenta de rata diabética y las no diabéticas.
- Correlacionar el daño de la placenta con los niveles de glucosa, glucosuria, cetonuria, colesterol, triglicéridos, insulina, VLDL, HbA1c de la madre durante la gestación.
- Correlacionar el daño de la placenta con el tamaño y peso de las crías.
- Correlacionar el daño de la placenta con el número de reabsorciones y viabilidad de las crías.

7. MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 85 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con un peso entre los 250-350g que permanecieron en condiciones controladas de bioterio con temperatura controlada (22-25 °C), y un periodo de luz oscuridad 12/12, con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Se aparearon con machos de fertilidad comprobada, colocándolos en una jaula en una relación de 3 hembras y 1 macho toda la noche. A la mañana siguiente se realizó frotis vaginal. La presencia de tapón vaginal mucoso y/o la presencia de espermatozoides en el frotis determinó éste como el primer día de gestación. Las hembras gestantes se dividieron aleatoriamente en 4 lotes:

Lote experimental 1 (EI): 51 ratas a las que el sexto día de gestación se les administró ip. una dosis única de 50 mg/kg de peso de estreptozotocina en amortiguador de acetatos 0.1M a pH 4.3. Se consideraron diabéticas aquellas cuyos niveles de glucosa fueron ≥ 200 mg/dl 48 horas después de la administración de STZ.

Lote experimental 2 (EII): 23 ratas a las que el sexto día de gestación se les administró ip. una dosis única de 60 mg/kg de peso de estreptozotocina en amortiguador de acetatos 0.1M a pH 4.3. Se consideraron diabéticas aquellas cuyos nivel de glucosa fueron ≥ 200 mg/dl 48 horas después de la administración de la STZ.

Lote control 1 (CI): 6 ratas a las que el sexto día de gestación se les administró por vía intraperitoneal, amortiguador de acetatos 0.1M pH4.3, en volumen adecuado a su peso corporal.

Lote control 2 (CII): 5 ratas a las que el sexto día de gestación se les puncionó con una aguja de 27x13 (mismo calibre que los lotes anteriores).

Todas las hembras gestantes se colocaron en jaulas individuales.

Entre las 8-10 a.m se realizaron las siguientes determinaciones:

*Glucosa sanguínea (tomada de la vena caudal), se realizó una vez por semana (la determinación se realizó con glucómetro 4 de marca Bayer, con tiras reactivas de Glucotid de Bayer).

*Glucosuria y cetonuria, se realizó una vez por semana (con tiras reactivas Ketodiastix de Bayer).

*Peso corporal, 2 veces por semana.

Todas las ratas se sacrificaron el día 20 de la gestación mediante dislocación cervical, se les realizó una disección abdominal y se registró:

- El número de fetos viables.
- El número de fetos no viables (que nacen muertos).
- El peso y diámetro de los fetos.
- El número de placentas, su peso y su diámetro.
- El número de reabsorciones.

Se tomó sangre total de la aorta y se realizó la determinación de Hemoglobina Glucosilada fracción 1c (HbA1c).

El resto de la sangre obtenida fue centrifugada a 3000 r.p.m por 15 minutos (en una centrifuga marca Beckman GS-15R), se separó el suero y se congeló a -70°C para el análisis posterior de glucosa, triglicéridos, colesterol, VLDL (analizador Kodak Ektachem DT 60 II) e insulina (RIA).

7.1. MICROSCOPIA DE LUZ.

Las placentas se fijaron en formol al 10%. Se lavaron, se deshidrataron en alcoholes graduales y se incluyeron en parafina (Anexo 1).

Mediante la técnica histológica, se realizó la inclusión de la placenta en parafina, se realizaron cortes en micrótomo de rotación de 5µm, que se tiñeron con:

- Hematoxilina Eosina (estructura general del órgano).
- Macson (permite observar el tejido conjuntivo con sus estructuras características como son las células y las fibras colágenas, etc.).
- Van Gieson (permite observar los elementos del tejido conjuntivo, pero esta técnica nos provee de una mejor definición de las límites celulares).
- Pass- Schiff (permite observar la presencia y distribución de elementos positivos al reactivo como es el glucógeno).

7.2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.

Las determinaciones de los parámetros bioquímicos se realizaron por medio de química seca en el analizador Kodak Ektachem DT 60 II.

*Glucosa: reacción en la que la glucosa de la muestra reacciona con el oxígeno en presencia de glucosa oxidasa.

*Triglicéridos: separación de los triglicéridos de los acarreadores lipoprotéicos, los triglicéridos son hidrolizados por una lipasa y se retiran los residuos de ácido ascórbico con ascorbato oxidasa.

*Colesterol: el colesterol se disocia de los acarreadores de lipoproteínas. Los ésteres de colesterol se hidrolizan a colesterol libre que se oxida con colesterol oxidasa. La reacción final produce color a través de la cual se calcula la cantidad de colesterol presente.

Las determinaciones de insulina se realizaron por radioinmunoensayo (RIA). Se utilizaron estuches comerciales CIS Bio International. Todos los análisis se realizaron de acuerdo al

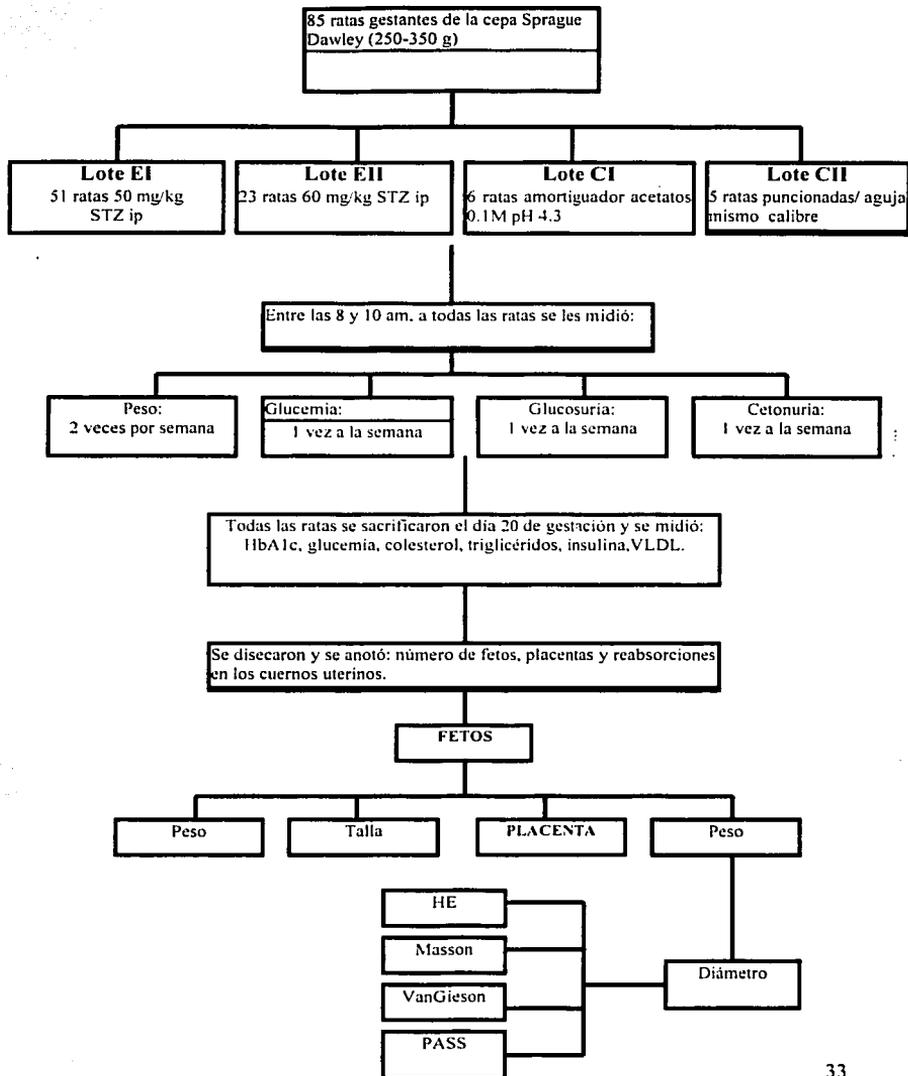
protocolo proporcionado por los fabricantes en la Unidad Médica en Endocrinología I.M.S.S.

La determinación de hemoglobina glucosilada se realizó en el DCA 2000 de Bayer. En este análisis se determinan las concentraciones de HbA1c, la concentración de Hb total y la relación entre ambas, que se reporta como porcentaje de HbA1c. Para la determinación de Hb total, se usa ferricianuro potásico, el cual oxida la Hb de la muestra a metahemoglobina. La metahemoglobina forma entonces un complejo con el tiocinato, formándose tiocinmetahemoglobina, que es la que se mide. Para la medida específica de la HbA1c se utiliza la inhibición de la aglutinación de partículas de látex, recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón, específico para HbA.

7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) la cual consiste en la comparación de las diferencias cuadráticas (varianzas) entre e intra-grupos. La prueba fue significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$. Para la comparación específica de los grupos, se realizó una post-prueba de Tukey.

7.5. DIAGRAMA DE FLUJO.



8. RESULTADOS.

8.1. PESO.

Las ratas del lote EI aumentaron de peso durante la gestación, su peso inicial fue de 268.60 gramos \pm 24.01 y su peso el día de sacrificio fue de 285.45 gramos \pm 27.82.

Las ratas del lote EII disminuyeron de peso durante la gestación, su peso inicial fue de 291.14 gramos \pm 25.78 y su peso el día de sacrificio fue de 261 gramos \pm 46.56.

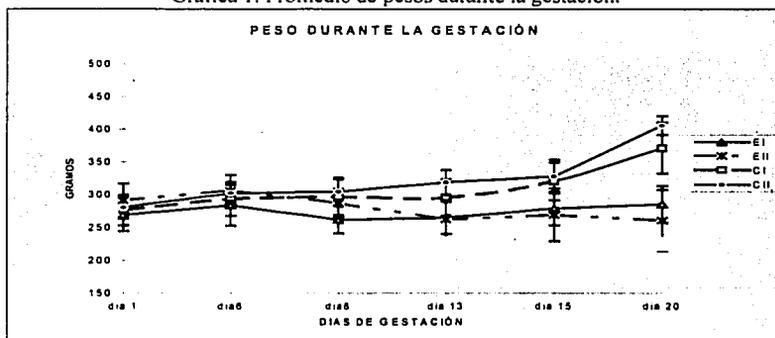
Los grupos CI y CII aumentaron su peso de forma constante durante la gestación, con un peso inicial de 276.33 gramos \pm 23.16 y 280.60 gramos \pm 17.21 respectivamente y un peso el día de sacrificio de 371.33 gramos \pm 38.99 y 406.00 gramos \pm 14.14. Al comparar el peso de las ratas del lote EII presenta diferencia significativa con las ratas de los lotes control a partir del día 13 de la gestación y hasta al día de sacrificio, mientras que no hay diferencia con las ratas del lote EI (tabla 1, gráfica 1).

TABLA 1: Promedio de pesos de las ratas durante la gestación.

PESO	DIA 1	DIA 6	DIA 8	DIA 13	DIA 15	DIA 20
EI n=51	268.60 \pm 24.01	284.21 \pm 31.17	261.90 \pm 20.51	265.10 \pm 24.67 *	269.30 \pm 40.13 *	285.45 \pm 27.82 °
EII n=23	291.14 \pm 25.78	291.14 \pm 25.78	287.46 \pm 21.69	287.46 \pm 21.69 *	269.30 \pm 40.13 *	261.00 \pm 46.56 °
CI n=6	276.33 \pm 23.16	293.83 \pm 25.87	296.66 \pm 27.42	296.00 \pm 27.62	320.66 \pm 28.91	371.33 \pm 38.99
CII n=5	280.60 \pm 17.21	302.60 \pm 16.07	305.20 \pm 21.06	319.20 \pm 18.89	328.00 \pm 25.52	406.00 \pm 14.14

Valores expresados en promedio \pm DE. *p<0.05 VS CII, °p<0.05 vs CI, CII. • p= no significativa.

Gráfica 1: Promedio de pesos durante la gestación.



Valores expresados en promedio \pm DE. *<0.05 vs CII, °p<0.05 vs CI, CII. • p= no significativa.

8.2. GLUCOSA

Los niveles de glucosa en los lotes experimentales EI y EII incrementaron a lo largo de la gestación, alcanzando niveles mayores a los 380 mg/dl el día 20 de la gestación, sin presentar diferencias significativas entre ellos.

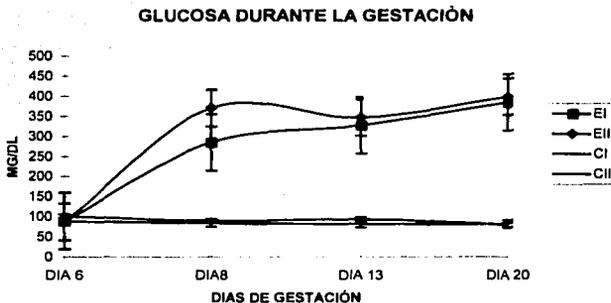
Las ratas de los lotes control mantuvieron niveles de glucosa menores a los 100 mg/dl durante toda la gestación. Al comparar los lotes experimentales con los controles se encontraron diferencias significativas (tabla 2, gráfica 2).

TABLA2: Niveles de glucosa durante la gestación.

GLUCOSA	DIA 6	DIA 8	DIA 13	DIA 20
EI n=51	89.56 ± 15.33	284.75 ± 57.64*	327.85 ± 70.39*	385.66 ± 95.31*
EII n=23	87.52 ± 9.579	370.75 ± 45.63*	346.91 ± 74.58*	399.20 ± 81.33*
CI n=6	88.33 ± 11.02	84.50 ± 15.25	82.33 ± 9.157	82.00 ± 3.162
CII n=5	101.40 ± 11.71	89.60 ± 6.877	93.00 ± 5.000	79.50 ± 3.535

Valores expresados en promedio ± DE. *p<0.001 vs CI, CII.

Gráfica 2: Niveles de glucosa durante la gestación.



Valores expresados en promedio ± DE. *p<0.001 vs CI, CII.

8.3. CETONURIA.

El lote EI presentó una elevación de cetonas en orina, llegando a tener su valor máximo el día 13 de la gestación: 18 ± 42.32 , disminuyendo hasta el día 20 presentando un valor de 0.476 ± 1.50 mg/dl.

El lote EII presentó un aumento en la concentración de cetonas en orina aproximadamente a la mitad de la gestación llegando a tener un valor promedio de 103.18 ± 78.93 mg/dl el día 13 de la gestación, disminuyendo el día 20 hasta llegar a un valor de 48 ± 67.46 mg/dl.

Los lotes CI y CII no presentaron elevaciones de cetonas en orina.

Al comparar los valores de cetonas de los lotes experimentales EI y EII se encontró una diferencia significativa los días 13 y 20 de la gestación con un valor de $p < 0.001$. La comparación entre el lote EI con respecto a los controles CI y CII no presentó diferencia significativa. La comparación entre el lote EII con respecto a los controles CI y CII fue significativa con un valor de $p < 0.005$ los días 13 y 20 de la gestación (tabla 3, gráfica 3).

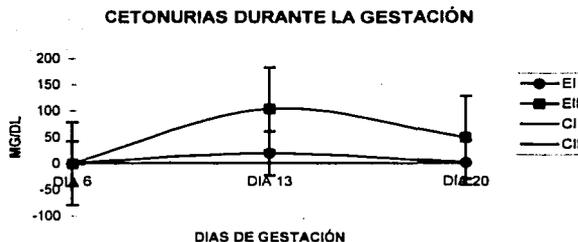
TABLA 3: Cetonuria durante la gestación.

LOTE	DIA 6	DIA 13	DIA 20
EI	0	$18 \pm 42.32^*$	$0.476 \pm 1.50^*$
EII	0	$103.18 \pm 78.93^*$	$48 \pm 67.46^*$
CI	0	0	0
CII	0	0	0

Valores expresados en promedio \pm DE. * $p < 0.005$ VS EII, CI, CII.

• $p =$ no significativa VS CI, CII.

Gráfica 3: Cetonuria durante la gestación.



Valores expresados en promedio \pm DE. * $p < 0.005$ VS EII, CI, CII.

• $p =$ no significativa vs CI, CII.

8.4. GLUCOSURIA.

El lote EI presentó un ligero aumento de glucosuria para el día 13 de la gestación con un valor promedio de 1540.74 ± 655.30 mg/dl, aumentando nuevamente el día 20 de la gestación con un valor de 2000 mg/dl.

Los niveles de glucosa en orina (glucosuria) en las ratas de EII alcanzaron un nivel promedio el día 13 de la gestación con un valor de 1200 ± 682.27 mg/dl, aumentando el día 20 de la gestación con un valor de 1410 ± 825.22 mg/dl.

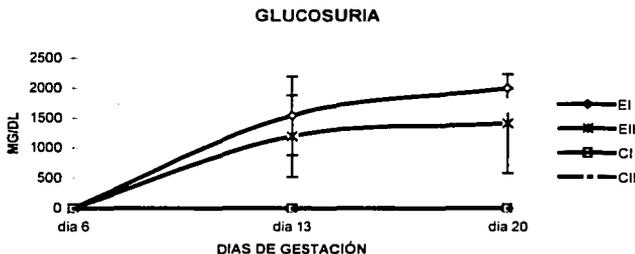
Las ratas del lote EII presentaron niveles de glucosa en orina significativamente mayores que las ratas de los lotes control con un valor de $p < 0.001$, y significativamente mayores que los valores del lote EI con un valor de $p < 0.001$. Las ratas del lote EI presentaron niveles significativamente mayores que las ratas de los lotes control con un valor de $p < 0.001$ (tabla 4, gráfica 4).

TABLA 4: Glucosuria de la gestación.

LOTE	DIA 6	DIA 13	DIA 20
EI	0	1540.74 ± 655.30●	2000 ●
EII	0	1200 ± 682.27*	1410 ± 825.22*
CI	0	0	0
CII	0	0	0

Valores expresados en promedio ± DE. * $p < 0.001$ VS EII,CI,CII.
● $p < 0.001$ VS CI, CII.

Gráfica 4: Cetonuria durante la gestación.



Valores expresados en promedio ± DE. * $p < 0.001$ VS EII,CI,CII.
● $p < 0.001$ VS CI, CII.

8.5. QUÍMICA SANGUÍNEA.

8.5.1. GLUCOSA SÉRICA

El día del sacrificio de las madres, el promedio de glucosa sérica que presentó el lote EI fue de 445.04 ± 122.40 mg/dl y del lote EII fue de 467.63 ± 154.81 mg/dl, al compararlos no tienen diferencia significativa con una $p > 0.05$. La glucosa sérica que presenta el lote CI fue de 79.166 ± 8.518 mg/dl y del lote CII fue de 81 ± 2.645 mg/dl, tampoco representa diferencia significativa.

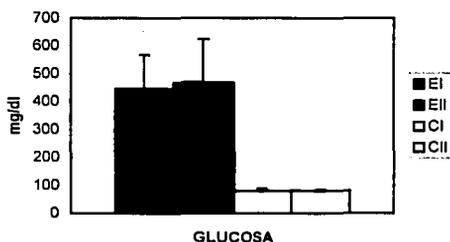
Los valores de glucosa sérica en los lotes experimentales EI y EII fueron significativamente más elevados que los de los lotes controles CI, CII (tabla 5, gráfica 5).

Tabla 5. QUÍMICA SANGUÍNEA DE LAS RATAS DE TODOS LOS LOTES EL DÍA DE SACRIFICIO.

LOTE	Glucosa (mg/ dl)	Colesterol (mg/ dl)	Triglicéridos (mg/ dl)	VLDL (mg/ dl)	HBA1c (%)	Insulina μ U/dl
EI	$445.04 \pm 122.40^*$	$68.56 \pm 27.46^\bullet$	$325.90 \pm 209.37^\bullet$	$65.09 \pm 41.78^\bullet$	$7.42 \pm 0.60^*$	$15.04 \pm 3.60^*$
EII	$467.63 \pm 154.81^*$	$57.54 \pm 18.65^\bullet$	$330.63 \pm 175.28^\bullet$	$66.18 \pm 35.06^\bullet$	$5.95 \pm 0.79^*$	$11.05 \pm 4.42^*$
CI	79.166 ± 8.518	69.2 ± 12.17	396.33 ± 159.56	78.83 ± 31.67	1.6 ± 0.60	15.71 ± 4.88
CII	81 ± 2.645	72 ± 12.05	386 ± 143.37	77.33 ± 28.37	2.9 ± 0	14.13 ± 5.25

Valores expresados en promedio \pm DE. * $p < 0.009$ VS CI, CII. $^\bullet p =$ no significativa.

Gráfica 5. Glucosa sanguínea durante la gestación.



* $p < 0.001$

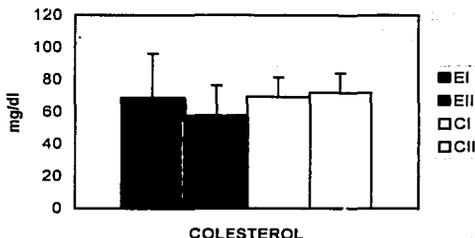
8.5.2. COLESTEROL

Los valores de colesterol del lote EI fueron de 68.56 ± 27.46 mg/dl y el lote EII de 57.54 ± 18.65 mg/dl, siendo esta una diferencia no significativa con un valor de $p > 0.05$.

Los valores de colesterol en el lote CI fueron de 69.2 ± 12.17 mg/dl y de CII fueron de 72 ± 12.05 mg/dl lo cual no fue significativo con un valor de $p > 0.05$.

Las ratas del grupo EI vs CI, EI vs CII, EII vs CI y EII vs CII no fueron significativas con un valor de $p > 0.05$ (tabla 5, gráfica 6).

Gráfica 6. Colesterol durante la gestación.



$p > 0.05$

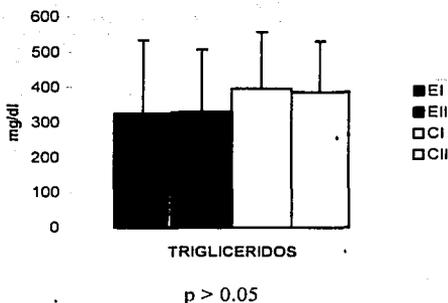
8.5.3. TRIGLICERIDOS

Los niveles de triglicéridos de las ratas del lote EI fueron de 325.90 ± 209.37 mg/dl, y los del lote EII fueron de 330.63 ± 175.28 mg/dl lo cual no fue significativo con un valor de $p > 0.05$.

Los niveles de triglicéridos de las ratas de CI fueron de 396.33 ± 159.56 mg/dl y los del lote CII fueron de 386 ± 143.37 mg/dl lo cual no representa una diferencia significativa con un valor de $p > 0.05$.

Al comparar los valores de triglicéridos entre los lotes experimentales EI y EII y CI y CII no se encontraron diferencias significativas (tabla 5, gráfica 7).

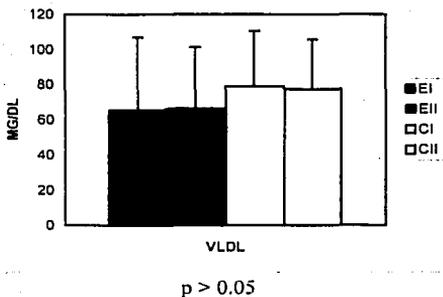
Gráfica 7: Triglicéridos.



8.5.4. VLDL (LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD).

Las lipoproteínas de muy baja densidad, se calculan basándose en los niveles de triglicéridos, porque se comportan de manera similar a éstos. El lote EI presentó 65.09 ± 41.78 mg/dl, el lote EII presentó 66.18 ± 35.06 mg/dl, al compararlos la diferencia no fue significativa $p > 0.05$. Al comparar los lotes experimentales EI y EII contra los controles CI y CII no se encontró una diferencia significativa $p > 0.05$ (tabla 5, gráfica 8).

Gráfica 8: VLDL.

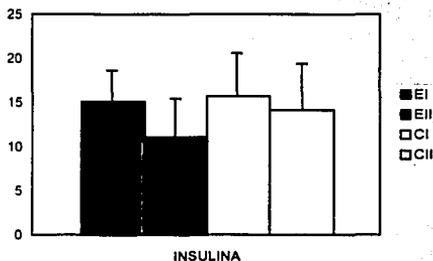


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.5.5. INSULINA

Las ratas del lote EI tuvieron un promedio de insulina de $15.04 \pm 3.60 \mu\text{UI}$. Las ratas del lote EII presentaron un promedio de insulina de $11.05 \pm 4.42 \mu\text{UI}$. Las ratas del lote CI presentaron un promedio de $15.71 \pm 4.88 \mu\text{UI}$ mientras que las ratas del lote CII fue de $14.13 \pm 5.25 \mu\text{UI}$. Los valores de insulina son menores en las ratas de los lotes experimentales EI y EII comparados con los de los lotes controles CI y CII. Y son significativas las diferencias con una $p=0.009$ (tabla 5, gráfica 9).

Gráfica 9: Insulina.



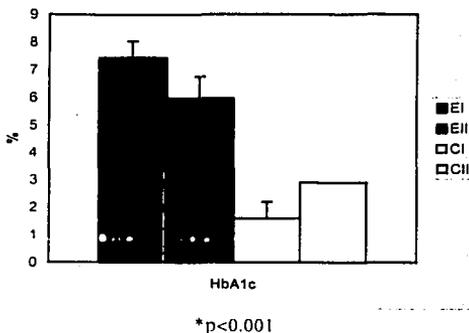
* $p=0.009$

8.5.6. HBA_{1c} (HEMOGLOBINA GLUCOSILADA).

El porcentaje de HbA_{1c} del lote EI fue de $7.42 \pm 0.60\%$, y el del lote EII fue de $5.95 \pm 0.79\%$. Las ratas de los lotes EI y EII presentaron niveles significativamente más elevados de HbA_{1c} (tabla 5, gráfica 10).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 10:HbA_{1c}



9. FETOS.

9.1. NUMERO DE FETOS POR CAMADA

El promedio de fetos fue significativamente mayor en los lotes controles al compararlo con los lotes experimentales $p < 0.001$. El número de fetos del lote EII es significativamente mas bajo que el del lote EI $p < 0.001$ (tabla 6, gráfica 11).

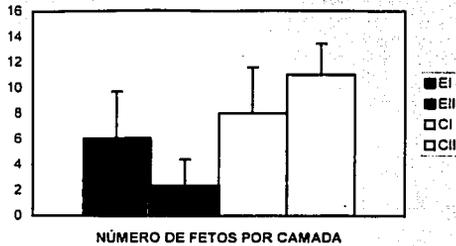
TABLA: 6. NUMERO DE FETOS POR CAMADA

LOTE	FETOS
EI	6.06* ± 3.64
EII	2.33* ± 2.08
CI	8 ± 3.57
CII	11 ± 2.44

Datos expresados en promedio ± DE. * $p < 0.001$ CI VS CII

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 11: Número de fetos por camada.



* $p < 0.001$ VS CI, CII

9.2. PESO

El promedio de peso de los fetos fue significativamente mayor para los lotes control que para los experimentales $p < 0.001$. Los fetos del lote EII presentaron un peso significativamente mas bajo que el del lote EI $p < 0.001$ (tabla 7, gráfica 12).

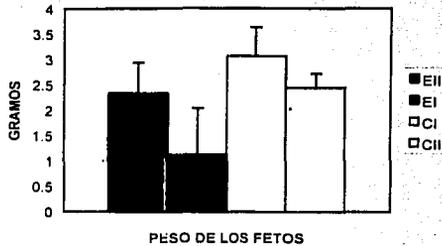
TABLA 7. Peso de los fetos de 20 días.

LOTE	PESO(gramos)
EI	2.33 \pm 0.61*
EII	1.12 \pm 0.92**
CI	3.06 \pm 0.56
CII	2.44 \pm 0.27

* $p < 0.001$ VS CI, CII, ** $p < 0.001$ VS EI

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 12: Peso de los fetos.



* $p < 0.001$ VS CI, CII, * $p < 0.001$ VS EI

9.3. TALLA.

En lo que respecta a la talla de los fetos los lotes control tuvieron una talla significativamente mayor que los fetos de los lotes experimentales $p < 0.001$. los fetos del lote EII tuvieron una talla significativamente menor $p = 0.008$ (tabla 8, gráfica 13).

TABLA 8. Talla de los fetos de 20 días.

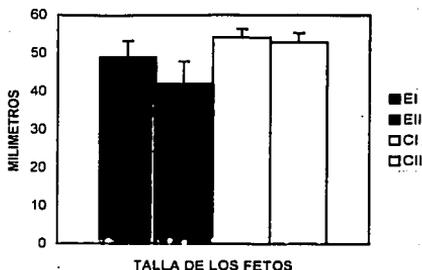
LOTE	TALLA (milímetros)
EI	48.91 ± 4.42*
EII	41.93 ± 5.98**
CI	54.16 ± 2.19
CII	52.9 ± 2.41

Valores expresados en promedio ± DE.

* $p < 0.001$ VS CI, CII. ** $p < 0.008$ vs EI, * $p < 0.001$ vs EI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 13: Talla de los fetos.



* $p < 0.001$ vs CI/CII, $p < 0.008$ VS EI

9.4. REABSORCIONES

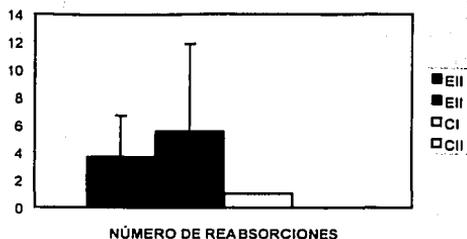
El promedio de reabsorciones fue significativamente mayor para los lotes experimentales $p < 0.001$. Mientras que los lotes controles no presentan reabsorciones incluso en el lote CII no se presentó ninguna reabsorción (tabla 9, gráfica 14).

TABLA: 9. REABSORCIONES

LOTE	PROMEDIO	DESVIACION
EI	3.63*	3.04
EII	5.5*	6.36
CI	1	0
CII	0	0

Valores expresados en promedio \pm DE. * $p < 0.001$ VS CI, CII

Gráfica 14: Número de Reabsorciones.



* $p < 0.005$ vs EI, CI, CII

10. PLACENTAS.

10.1. PESO Y DIÁMETRO DE LAS PLACENTAS.

En el peso de las placentas hubo diferencia significativa entre el lote EI y los lotes control (tabla 10). El lote EI sí presenta diferencia significativa al compararlo con los lotes control, pero no con el lote EII (gráfica 15).

El diámetro de las placentas fue significativamente mayor en los lotes experimentales al compararlos con los controles. La diferencia entre EI y EII fue también significativa (tabla 10, gráfica 16).

TABLA 10: PLACENTAS.

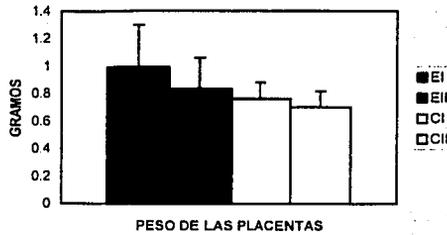
LOTE	PESO (gramos)	DIAMETRO (milímetros)
EI n=7	0.99 \pm 0.30*	17.70 \pm 2.66*
EII n=99	0.83 \pm 0.22 ^o	16.93 \pm 1.72 ^o
CI n=8	0.76 \pm 0.11	16.53 \pm 1.24
CII n=45	0.70 \pm 0.14	15.29 \pm 2.37

Valores expresados en promedio \pm DE. * $p < 0.005$ VS CI, CII.

^o $p < 0.001$ vs EI, $\bullet p =$ no significativa.

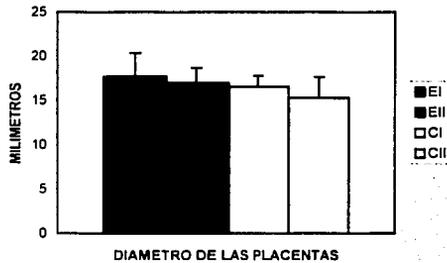
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 15: Peso de las placentas.



•p= no significativa. *p<0.005 VS CI, CII

Gráfica 16: Diámetro de las placentas.



°p<0.001 vs EI. *p<0.005 VS CI,CII

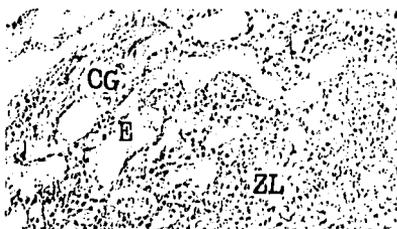
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA PLACENTA.

La placenta de ratas de 20 días de desarrollo está constituida de 3 regiones que en dirección feto-materna son: a) región laberíntica, b) región intermedia (espongiotrofoblasto) y c) región de células gigantes. Sus características se resumen en el cuadro 4. Micrograffas 1,2,3 y 4.



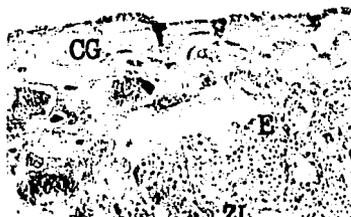
Micrograffa 1: Placenta de ratu de 20 días de de Gestación. Donde se observan las tres regiones que la forman: CG (Células Gigantes), E (Espongiotrofoblasto), ZL (Zona Laberíntica). Cl. H/E. 25X.



Micrograffa 2: Placenta de ratu de 20 días Gestación. Donde se observan las tres regiones que la forman: CG (Células Gigantes), E (Espongiotrofoblasto), ZL (Zona Laberíntica). Cl. H/E. 25X.



Micrograffa 3: Placenta de ratu de 20 días de Gestación. Donde se observan las tres regiones que la forman: CG (Células Gigantes), E (Espongiotrofoblasto), ZL (Zona Laberíntica). E1. H/E.25X.



Micrograffa 4: Placenta de ratu de 20 días de Gestación. Donde se observan las tres regiones que la forman: CG (Células Gigantes), E (Espongiotrofoblasto), ZL (Zona Laberíntica). E11. H/E.25X.

a) Región laberíntica.

En los lotes controles esta región comprende más de la mitad del volumen total de la placenta; es la porción más cercana al embrión. Está constituida por trofoblasto que se ramifica formando vellosidades que en su interior presenta vasos sanguíneos fetales; al exterior entre ellas se encuentran vasos maternos. Las vellosidades están limitadas por una capa sincicial multinucleada en la que se observan células de forma ovoide con un núcleo esférico central y citoplasma granular con inclusiones de glucógeno. En esta región se observaron células trofoblásticas con apariencia cúbica, que presentan un núcleo central esférico y con un citoplasma ligeramente denso. Se observaron células gigantes mono y binucleadas siendo éstas de mayor tamaño y localizadas en la proximidad de los vasos sanguíneos. Estas células se caracterizan por presentar un citoplasma granuloso y un núcleo excéntrico. Micrografías 5 y 6.

En región se puede observar la presencia de linfocitos y gran cantidad de vasos sanguíneos fetales de diferentes calibres.

El mesénquima fetal es escaso con apariencia laxa y se encuentra rodeando a los vasos sanguíneos fetales que contienen de eritrocitos no nucleados (Micrografía 6).



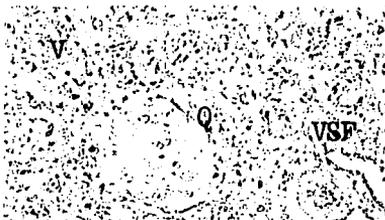
Micrografía 5: Zona Laberíntica (ZL). Donde se observa la presencia de vasos sanguíneos fetales (VSF). Vellosidades (V).
CII. H/E. 50X.



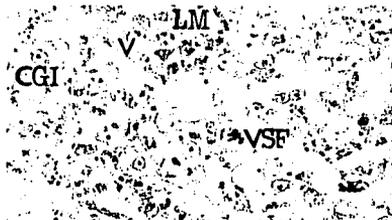
Micrografía 6: Zona Laberíntica (ZL). Donde se observan la presencia de Células con Glucógeno (CGI), Vellosidades (V), Vasos sanguíneos fetales (VSF), Lagunas de Sangre materna (LM).
CII. H/E. 100X.

En los lotes experimentales se observó una disminución en el grosor de la pared de las vellosidades siendo más delgada que en los controles (Comparar Micrografías 6 con la Micrografía 8 y 10). Las vellosidades están rodeadas por una capa sincicial multinucleada, con una menor cantidad de células trofoblásticas inmersas en él. La vascularización es

mayor comparada con la observada en los lotes controles, incluso es mayor en el lote EII. Las paredes de los vasos sanguíneos presentan un menor grosor y se observan más dilatados (Micrografía 7). El mesénquima fetal, de apariencia fibrilar, es abundante y rodea a los vasos sanguíneos. Hay un notable aumento en la cantidad de linfocitos. La presencia de quistes y material en degeneración fue observado en esta región (Micrografía 7), siendo mayor en el lote EII, con lo cuál la barrera placental aumenta su grosor (Micrografía 10).



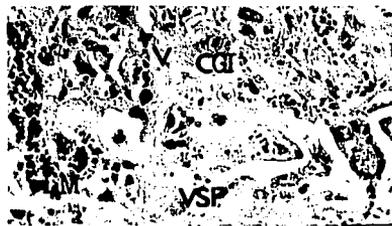
Micrografía 7: Zona Laberíntica (ZL). Donde se observa la presencia de vasos sanguíneos fetales (VSF). Vellosidades (V). Quiste (Q). EI. H/E. 50X.



Micrografía 8: Zona Laberíntica (ZL). Donde se observan la presencia de Células con Glucógeno (CGI), Vellosidades (V), Vasos sanguíneos fetales (VSF), Lagunas de Sangre materna (LM). EI. H/E. 100X.



Micrografía 9: Zona Laberíntica (ZL). Donde se observa la presencia de vasos sanguíneos fetales (VSF). Vellosidades (V). Quiste (Q). Células Gigantes (CG). EII. H/E. 50X.



Micrografía 10: Zona Laberíntica (ZL). Donde se observan la presencia de Células con Glucógeno (CGI), Vellosidades (V). Vasos sanguíneos fetales (VSF), Lagunas de Sangre materna (LM). EII. H/E. 100X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b) Región intermedia (espongiotrofoblasto).

En los lotes controles, esta región está ubicada entre la región laberíntica y la región de células gigantes y está rodeada por vasos sanguíneos maternos provenientes de la zona de células gigantes. Está constituido por células trofoblásticas que forman varias capas y pueden ser mono o binucleadas. Su distribución es regular a lo largo del disco placentar y en ocasiones se observó rodeado de trofoblasto (Micrografía 11).



Micrografía 11: E (Espongiotrofoblasto).
N (Núcleo de espongiotrofoblasto).
CII. H/E. 100X.

En los lotes experimentales esta región es extensa, encontrándose grupos de este tejido inmersos entre las capas de células gigantes e incluso presentan una imagen que sugiere la invasión del espongiotrofoblasto hacia la región laberíntica. Se observaron zonas reducidas de espongiotrofoblasto que se encuentran inmersas dentro de la región laberíntica y están rodeadas de células con glucógeno, formando quistes (Micrografía 12,13).



Micrografía 12: E (Espongiotrofoblasto).
N (Núcleo de espongiotrofoblasto).
CGI (Células con glucógeno).EI. H/E. 100X.



Micrografía 13: E (Espongiotrofoblasto).
N (Núcleo de espongiotrofoblasto).
CGI (Células con glucógeno).EII.H/E.100X.

c) Región de células gigantes del trofoblasto.

En los lotes controles esta región se compone predominantemente por:

1. células gigantes.
2. células basofílas pequeñas.
3. células con glucógeno.

Las células gigantes del trofoblasto son células voluminosas, localizadas principalmente en la periferia de la placenta y se encuentran muy cercanas a los sinusoides maternos, los cuales sólo se observaron en esta región. Estas células se observaron muy cercanas a la base de la placenta y en algunos casos formando grupos. Son fácilmente distinguidas por su gran tamaño, presentan un citoplasma con acumulaciones de glucógeno y un núcleo esférico y central (Micrografía 1 y 2).

Las células con glucógeno se distribuyen cerca de la base de la placenta en las proximidades de las células gigantes del trofoblasto, presentan núcleos picnóticos y en algunos casos desplazados hacia el centro de la célula. Se observó también un número reducido de células basofílas muy cercanas a las células con glucógeno y muy cercanas al espongiotrofoblasto (Micrografía 2).

La capa de células gigantes está constituida por una menor cantidad de células, localizadas en la periferia de la placenta. Al comparar la cantidad de células con glucógeno de estos lotes con los lotes experimentales se pudo observar un aumento considerable de células con glucógeno (Micrografía 1).

En los lotes experimentales la capa de células que constituye a la región de células gigantes se encontró incrementada. La distribución de estas células varía con respecto a los controles, pues aquí se encuentran en gran número distribuidas a lo largo de la periferia del disco placentar, formando grupos. La apariencia de células gigantes en muchos casos es vacuolada, observándose cambios degenerativos indicados por la acidofilia del citoplasma celular (Micrografías 3,4,9).

En algunos casos se observan grandes espacios o sitios con material amorfo acidófilo causado por la degeneración de las células con glucógeno (Micrografía 4).

Cuadro 4: Principales características de la placenta de roedores.

REGIÓN	FUNCIÓN	MORFOLOGÍA	POSICIÓN Y TIPOS CELULARES
LABERÍNTICA	<ul style="list-style-type: none"> *Análoga en función a las vellosidades libres del corión humano. *Intercambio de gases y nutrientes. 	<p>Altamente plegada, se ramifica formando vellosidades.</p>	<p>Región más cercana al embrión.</p> <ul style="list-style-type: none"> *Células con glucógeno. *Células trofoblásticas de apariencia cúbica. *Células gigantes mono o binucleadas. *Linfocitos.
INTERMEDIA (ESPONGIOTROFOBLASTO)	<ul style="list-style-type: none"> *Zona de mayor contacto para la captación de nutrientes. 	<p>Constituido de varias capas de células trofoblásticas.</p>	<p>Región Intermedia.</p> <ul style="list-style-type: none"> *Células trofoblásticas mono o binucleadas.
CÉLULAS GIGANTES DEL TROFOBLASTO	<ul style="list-style-type: none"> *Mediadoras de la implantación, promueven la invasión hacia el útero. *Producen VEGF, proliferina y adrenomedulina. *Promueven el flujo sanguíneo materno al sitio de implantación. *Fuente de hormonas. 	<ul style="list-style-type: none"> *Mayor tamaño. *Esféricas u ovoides. *Poseen uno o varios núcleos. *Citoplasma granuloso. *Cercanas a los vasos sanguíneos. 	<p>Periferia del disco placentar.</p> <ul style="list-style-type: none"> *Células basofílas pequeñas. *Células con glucógeno.

12. DISCUSIÓN.

Se ha demostrado que la STZ es uno de los agentes más eficaces en la inducción de la diabetes en diferentes modelos experimentales (13,15,43,44,53). Su eficacia depende del modelo animal y la dosis empleada para lograr establecer un estado permanente del efecto diabético (13,15,53).

En diferentes estudios, utilizando dosis de STZ desde los 25 hasta los 100 mg/kg se ha comprobado que existen efectos diabetogénicos que varían en intensidad y en la aparición de las complicaciones (15). Las dosis más utilizadas son las de 45 a 70 mg/kg de peso. Las dosis de 30 y 40 mg/kg de peso producen una elevación de los niveles de glucosa, pero este efecto se pierde al día 10 en el que los niveles tienden a regularizarse (15, 37, 55, 118).

Se ha planteado que la forma de acción inicial de la STZ para inducir el efecto diabetogénico es la destrucción de las células β (lo que promueve un descenso de insulina que produce una hipoglucemia que puede tener como resultado un efecto letal sobre los animales durante las primeras 48 horas de la inducción. Los animales que sobreviven adquieren un estado de hiperglucemia a largo plazo, presentándose las complicaciones propias de la diabetes.

En nuestro estudio, en los lotes experimentales los niveles de glucosa se elevaron a las 48 horas posteriores a la inducción, y se mantuvieron con valores superiores a los 200 mg/dl hasta el día 20 (sacrificio), lo cual confirma el efecto permanente de la inducción de la diabetes, gráfica 2.

La pérdida de peso se ha asociado con la severidad de la diabetes, reportes de ratas inyectadas con 55mg/kg de peso y 65 mg/kg de peso, describen que estas ratas son incapaces de aumentar de peso durante la gestación (13,57,108).

En este estudio los lotes controles CI y CII, aumentaron constantemente de peso a lo largo de la gestación, presentando una diferencia significativa con los lotes experimentales EI y EII; los cuales no tuvieron una elevación considerable en su peso a lo largo de la gestación. El día del sacrificio, el lote EII presentó un peso menor que al inicio del estudio. Esto se puede atribuir a la hiperglucemia (71).

Diferentes factores como el hipoinsulinismo y la alteración en los niveles de glucosa han sido reportados como agentes responsables de la producción de anomalías en fetos y crías de rata (53,55,57,66).

Dentro de las complicaciones que han sido descritas en los estudios sobre diabetes experimental se encuentra la cetonuria, la que también se ha relacionado con alteraciones en el desarrollo. La cetonuria es el reflejo de la disminución de insulina, la reducción de la disponibilidad tisular de glucosa y el consecuente aumento de la lipólisis al interior de las células, lo que produce una sobreproducción de cuerpos cetónicos como el hidroxibutirato,

el ácido acetoacético y la acetona, que el hígado es incapaz de metabolizar por lo que son excretados en la orina. La consecuencia de la carencia de glucosa tisular lleva a un incremento de la glucogenólisis en el hígado, lo que se refleja en una mayor hiperglucemia (119).

En este estudio, el lote EII presentó los niveles más elevados de cetonuria, el día 13 de la gestación, sin embargo estos niveles disminuyen conforme transcurre la gestación. Este lote presenta el menor número de productos y el mayor número de reabsorciones, por lo que podríamos pensar que el efecto de sinergia entre la cetonuria y la hiperglucemia es responsable del número de reabsorciones por una ampliación del efecto teratogénico en etapas clave del desarrollo. En el caso del lote EI los niveles de cetonuria fueron más elevados, sin embargo tuvieron un comportamiento similar al del lote EII, al alcanzar el pico máximo y disminuir gradualmente hasta el día de sacrificio, probablemente en este lote la relación cetonuria-hiperglucemia fue menor debido a la dosis de inducción empleada, lo que se refleja en un mayor número de fetos y menor número de reabsorciones.

Los estudios realizados por Sybulski con ratas gestantes a las que se les administró una dosis de 50mg/kg de peso de STZ mostraron que solo una rata tuvo evidencias de gestación y presentó disminución de peso y cetonuria (26). Estos estudios son discordantes con nuestros datos, debido a que el porcentaje de ratas con embriones y cetonuria fue considerablemente mayor en este estudio utilizando la misma dosis.

Las ratas del lote EII presentaron niveles significativamente menores de insulina que los presentados por el lote EI y que los lotes control. La falta casi absoluta de insulina, provoca un aumento en la lipólisis y por ende en los niveles de ácidos grasos libres, los cuales son oxidados en el hígado, incrementando la producción de cuerpos cetónicos, cetonuria y en el último de los casos acidosis (pH) (119).

No se observó un incremento significativo en los niveles de triglicéridos en las ratas del lote EII al compararlos con el resto de los lotes, éste parámetro suele estar alterado en ratas diabéticas, de tal forma que la correlación de hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipoinsulinemia puede servir para predecir el desarrollo de los productos de madres diabéticas y su estricto control puede prevenir la aparición de malformaciones e incluso la muerte intrauterina (120).

Existen estudios controversiales tanto en ratas como en humanos diabéticos en donde las concentraciones de colesterol plasmático se encuentran elevadas, no se presentan o se encuentran disminuidas. En nuestro estudio, las ratas presentaron aumentos muy ligeros en la concentración plasmática de colesterol el día del sacrificio; los niveles de colesterol que presentaron las ratas del lote EI no son diferentes de los presentados por las ratas de los lotes EII, CI, CII.

El porcentaje de fetos por camada en los lotes control CI y CII fue mayor, mientras que en los lotes experimentales el número de fetos fue mucho menor.

El lote EII presentó un mayor número de reabsorciones, seguido por el lote EI y por último los lotes control. Estos datos muestran que la gestación en un ambiente hiperglucémico está

relacionada con un aumento en el porcentaje de reabsorciones y por lo tanto una disminución en el número de fetos por camada.

El efecto de la hiperglucemia sobre el desarrollo se ha relacionado con la dosis y la edad del embrión, los estudios de Sadler en cultivos de embriones concluyen que la hiperglucemia afecta a los embriones desde las etapas de la embriogénesis temprana tales como la gastrulación, la inducción del tubo neural, el establecimiento de los ejes de simetría, etc (71). Durante estos períodos de la embriogénesis temprana se encuentran activados la mayor parte de los genes que controlan los procesos del desarrollo, por lo que el efecto hiperglucémico puede incrementarse, lo que demuestran los estudios de Phellan, en los que establece una alteración del gen Pax3 que produce alteraciones en la formación del tubo neural, estas alteraciones dependen de la concentración de glucosa en cultivo de embriones de rata (65).

En este estudio se utilizaron dosis de 50 mg/kg de peso y 60 mg/kg de peso de STZ, estas dosis produjeron hiperglucemia (lote EI y EII respectivamente). El lote EI tuvo mayor porcentaje de embriones y menos reabsorciones que el lote EII. La tasa de mortalidad en el lote EII es mayor que el presentado en el lote EI, podemos pensar que la dosis de 60mg/kg de peso probablemente ejerce un efecto mayor disminuyendo la sobrevivencia de las crías. Los animales que sobreviven a este efecto podrían establecer un cuadro hiperglucémico, debido a que el efecto teratogénico se manifiesta muy tempranamente por lo que el número de embriones es menor, y la tasa de reabsorción es mayor.

Existen diversos reportes que establecen un retraso en el desarrollo de los productos de madres diabéticas, relacionándolo con una disminución de la talla y el peso de los fetos que está en relación con la severidad de la diabetes (118). En este estudio estos datos se confirman pues los fetos de los lotes CI y CII, tuvieron una talla y un peso significativamente mayor que los de los lotes EI y EII. El lote EII presentó menor talla y peso que el lote EI, lo que puede atribuirse a niveles más altos de glucosa.

El retraso en el desarrollo y la disminución en la talla de los fetos en la diabetes experimental, también han sido atribuidas a alteraciones en el desarrollo de la placenta. Forsberg manifiesta que las placentas de los fetos que se desarrollan en un ambiente diabético sufren alteraciones en el momento del desarrollo en que se está llevando a cabo la vascularización corioalantoidea, lo que provoca un decrecimiento en la eficiencia placentaria que se refleja en una disminución en la talla del embrión y un retraso en el desarrollo. Considera que las placentas de madres diabéticas presentan un mayor volumen debido a una alteración de las proteínas de matriz extracelular que regulan su establecimiento, con lo que las placentas adquieren un fenotipo proliferativo, más que un fenotipo invasivo, lo que le confiere un posible carácter de inmadurez, que se refleja en una ineficiencia placental.

Las placentas de los lotes CI y CII presentaron un menor diámetro y peso que las placentas de los lotes EI y EII, y de estas las del lote EI alcanzaron un mayor diámetro y peso. Estos resultados concuerdan con lo planteado por Forsberg (114).

Al analizar la estructura de la placenta de 20 días de desarrollo se observó que una capa de tejido conjuntivo delimita a la placenta, su análisis mediante microscopía de luz muestra diferencias entre los grupos controles y los experimentales y al comparar el grupo experimental I contra el II no se observan grandes diferencias estructurales.

Gewolb y colaboradores (1986) analizaron por medio de microscopía de luz y electrónica las placentas de ratas diabéticas inducidas con una dosis de 40-45mg/kg de STZ i.v los días 14, 18 y 22. Encontraron que las placentas de ratas diabéticas son más grandes y los fetos más pequeños que las de los controles. Las placentas de ratas diabéticas especialmente al inicio de la gestación, presentan numerosas células con glucógeno que pueden ser distinguidas en la zona basal. En la zona laberíntica, las vellosidades trofoblásticas son significativamente más gruesas en las placentas diabéticas los días 18 y 22 y presentaron acumulaciones de lípidos, especialmente en la zona trofoblástica 2. La zona laberíntica el día 22 en las placentas diabéticas contienen más glucógeno y retículo endoplásmico rugoso en las zona trofoblásticas y esta característica también se encuentra en las placentas de 18 días control. Estudios bioquímicos han demostrado la continua división celular y el incremento en la cantidad de glucógeno en placentas diabéticas, atribuyéndole un carácter inmaduro. La evidencia citológica confirma la presencia de un incremento en el glucógeno y las reservas de lípidos en la zona laberíntica especialmente en el área celular entre la sangre materna y la fetal. Concluyen que las modificaciones que presenta la membrana interhemal en la zona laberíntica de las placentas diabéticas incrementa la distancia de difusión entre la circulación materna y la fetal y tiene un efecto placental adverso a su funcionamiento y resulta en un retardo en el crecimiento fetal en este modelo de gestación diabética. Los fetos en este modelo fueron más pequeños que los controles el día 14 de la gestación. Las placentas son más grandes que los controles el día 18, pero no poseen diferencias en tamaño los días 14, 16 (106).

Estos planteamientos concuerdan con nuestros estudios ya que las placentas de 20 días de desarrollo mostraron un aumento en su peso y diámetro, este aumento en la masa placental puede atribuirse a un mecanismo insuficiente para disminuir el flujo uteroplacental en este modelo. Mientras que los fetos tuvieron una disminución en su peso y talla. Las modificaciones morfológicas planteadas por Gewolb y colaboradores son observados en nuestro modelo.

Nuestros estudios concuerdan con los estudios realizados por Padmanabhan y Shafiullah (2001), quienes examinaron las placentas de ratas diabéticas gestantes, inducida con 50 mg/kg de STZ, los días 14-20. Ellos encuentran que el retardo en el crecimiento en el grupo de STZ es significativo desde una etapa temprana (día 15) y persiste hasta el último día de observación (día 20). Al término los fetos del grupo de STZ pesaron sólo el 60% del peso corporal de los grupos controles y el grupo tratado con insulina tuvo una recuperación significativa en el peso (118).

La morfología de las placentas de ratas diabéticas los días 14, 16 y 18 varió a la presentada por los controles. Estas placentas se caracterizaron por presentar más cantidad de células con glucógeno. En las placentas de 16 y 18 días de gestación observaron mesénquima fetal

y fibrosis perivascular. Ellos concluyen que no esta claro si los cambios en la placenta son la causa primaria de los disturbios en el crecimiento fetal, por consecuencia estos podrían traducirse como las consecuencias de un proceso de diabetes materna (118).

Estas observaciones concuerdan con las realizadas en nuestro estudio ya que las placentas experimentales de 20 días de desarrollo. En la región laberíntica presentaron un adelgazamiento en las paredes de las vellosidades resultado de una probable disminución en la cantidad de tejido conjuntivo. Una menor cantidad de células trofoblásticas inmersas en él. La vascularización de la región laberíntica se haya incrementada en donde se observó que las paredes de los vasos sanguíneos presentan un menor grosor y se encuentran dilatados. El mesénquima fetal es abundante, la presencia de quistes en degeneración es observada con lo cual la barrera placentar aumenta.

La región de espongiotrofoblasto es extenso y se encuentra aumentado en su número de capas. En la región de células gigantes del trofoblasto se observó un aumento en la cantidad células con glucógeno y de células gigantes distinguidas mediante la reacción positiva a PASS- Schiff comparada con los lotes controles, además de cambios degenerativos indicados por la acidofilia del citoplasma celular y en la vacuolización presente en las células gigantes. En muchos casos se observan espacios o sitios en donde este material se ha depositado.

13. CONCLUSIONES.

La inducción de diabetes con 50 y 60 mg/kg de peso de STZ es igualmente efectiva, siendo la primera menos tóxica. La dosis de 60 mg/kg de peso de STZ disminuye en forma significativa el número de placentas, fetos y aumenta el número de reabsorciones.

La combinación de hiperglucemia, hiperketonemia e hipoinsulinemia ejercen mayor influencia en la génesis de las alteraciones del desarrollo de los fetos de ratas diabéticas.

La diabetes materna altera la morfología placentar provocando:

- a) Alteración en la vascularización de la placenta.
- b) Aumento en la cantidad de células ricas en glucógeno.
- c) Disminución en el grosor de las vellosidades placentarias.
- d) Alteración en la distribución del espongiotrofoblasto.
- e) Degeneración quística y vacuolización de las células gigantes.
- f) Aumento en la cantidad de capas que forman la zona de células gigantes.

14. BIBLIOGRAFÍA:

1. Informe de la OMS, 1999 (http://www.who.int/ncd/dia/nl_no3.htm)
2. IMSS, boletines, 1999 (<http://rtn.net.mx/protoimss/boletines/bioct968.htm>)
3. Reece E.A, Homko CJ and Wu Y. Multifactorial basis of the syndrome of diabetic embryopathy. *Teratology*, 1996; 54(4):171-182.
4. King H , Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995- 2025 : prevalence, numerical estimates and projection .*Diabetes Care*.1998; 21:1414-1431.
5. Fernandez.M.C.Biología Molecular de la Diabetes Mellitus. *Revista de Endocrinología y Nutrición*.1996;4 (3) julio-septiembre.
6. Islas, A. S.,Revilla M.C., Diabetes Mellitus: Concepto y nueva clasificación. En *Diabetes Mellitus*. Segunda edición Mc Graw-Hill Interamericana.1999;448pp.
7. Méndez. D. J y Ramos G.H. Modelos Experimentales. En *Diabetes Mellitus*, 1993; Cap 28, ed Sergio Islas, Alberto Lifshitz; Ed. Mc Graw- Hill Interamericana, primera edición: 303-333.
8. Mordes, J.P. and Rossini A. A. Animal models of diabetes. *American Journal of Medicine*. 1981; 70:353-360.
9. Kalter. H. Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. *Reproductive Toxicology*. 1996; 10(6):417-438.
10. Karsten. B. Diabetic animal models. *APMIS*. 1996;104:609-614.
11. Pickup, J. And W.S. Goseth. Environmental factors in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. In *textbook of Diabetes . Second edition. Volume I*. Blackwell Science.1997: 14.2-14.3.
12. Johanson. E.B,Tjalve, H. Studies on the tissue-deposition and fate of [14-c]-Streptozotocin with special reference to the pancreatic islets. *Acta Endocrinol*.1978;89:339-342.
13. Rodrigues.B. Poucheret.P, Battel.M.L,McNeill.J.H.Streptozotocin-Induced diabetes:Induction, Mechanism (s). and Dose Dependency. In *Experimental Models in Diabetes*: McNeill .J.H.Ed.CRC Press LLC.1999.Chapter 1, pp 3-17.

14. Richard .H. Bell, Jr., M. D and Robert J. Hye, M.D. Animal Models of Diabetes Mellitus: Physiology and Pathology. *Journal of Surgical Research* .1983. 35,433-460.
15. Islas Andrade, S, Revilla Monsalve M. C., Escobedo de la Peña, J., Polanco Ana C., Palomino M.A and A. Feria Velasco. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of the Two Models in rats. *Acta histochem.Cytochem.* 2000.33(3):201-208.
16. Jacobs, H.R. Hyperglycemic action of alloxan. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1937.37:407-409.
17. Watkins D, Cooperstein SJ, and Lazarow A. Effect of alloxan on permeability of pancreatic islets tissue in vitro. *American Journal of Physiology.* 1964; 207:436.
18. Tomita T. and Watanabe I. Effect of alloxan on the permeability of isolated pancreatic islets to horseradish peroxidase. *Virchows Archives (B).* 1976; 22:217.
19. Okamoto.H. Molecular basis of experimental diabetes: degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic (-cells of islets of Langerhans. *Biossays.*1985;2:15-21.
20. Renold A.E. Animal models : an aid to the understanding to the etiology and pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Annu.*1988;4:592-608.
21. Rudge MVC et al. Diabetes and Experimental pregnancy in rats Course of maternal blood glucose levels and pancreas of new born pups. *Braz J Med Biol Res.*1995;28:219-225.
22. Alder .M. Evidence for direct action of alloxan to include insulin resistance at the cellular level. *Diabetologia.*1998;41:1327-1336.
23. Wiley, P. F., R. Herr, H.K. Jahnke, C.G. Chidester, S.A. Mizesack, L. Bayard, A. D. Argoudelis. 1979. Streptozotocin : structure and chemistry. *J. Org. Chemistry.*44 (1): 9-16.
24. Herr, R.R., H. K. Jahnke, A. D. Argoudelis. 1967. The structure of streptozotocin. *J. Am. Chem. Soc.* 89:18. 4808-4809.
25. Batell, L.M., Yuen, V.G., Verma, S. and J.H. McNeill. Other Models of type I diabetes. In *Experimental Models of Diabetes.* John H. McNeill, CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999. 219-229.
26. Sybulsky, S and G.B. Maughan. Use of Streptozotocin as Diabetic Agent in Pregnant Rats. *Endocrinology.*1971.89:1537-1540.
27. Gandy, S.E; Buse, M.G; and Crouch, R.K. Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J. Clin. Invest.* 1982;70:650-653.
28. Wolfgang, J., S. Ferber, J.H. Johnson, C.B. Newgard. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT-2- expressing cells. *Diabetes.* 1994 (43):1326-1333.

29. Uchigata, Y.; Yamamoto, H.; Kawamura, A.; and Okamoto, H. Protection by superoxide dismutase, catalase and Poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin- induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.* 1982;257: 6084-6088.

30. McIntosh, C.H.S. and Pederson R.A. Non-insulin- dependent animal models of diabetes mellitus. In *Experimental Models of Diabetes*. Jhon H. McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A.; 1999:337-398.

31. Papaccio, G; Pisanti, F.A ; and Frascatore, S. Acetyl -homo cysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozotocin. *Diabetes*. 1986;35: 470-474.

32. Robbins, M.J.; Sharp, R.A; Slomin, A.E; and Burr, I.M. Protection against streptozotocin induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia*. 1980;18:55-58.

33. Morgan, N.G., H.C. Cable, N.R. Newcombe, G.T. Williams. Treatment of cultured pancreatic β cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Bioscience Reports*. 1994. 14 (5):243-246.

34. Nyoun, S. K., S. H. Lee, C.S. Choi, T. Kho, H.S. Lee. Nitric oxide generation from STZ. *Research Communications* . 1994 (8):529-533.

35. Tsuji, A., H. Sakurai. Generation of nitric oxide from streptozotocin (STZ) in the presence of copper (II) plus ascorbate: implication for the development of STZ- induced Diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998. 245:11-16.

36. John. H. McNeill. Ph. D. *Experimental Models of Diabetes*. 1999. John H. McNeill. CRC Press LLC. New York. U.S.A. 1999.3-12.

37. Tanaka, Y.; Shimizu, H.; Sato, N.; Mori, M.; and Shimomura, Y.; Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. *Pharmacology*. 1995;50:69-73.

38. Bedoya, F.J. Solano, F.M. Lucas, M. N-Monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia*. 1996;52:344-346.

39. Schein, P.S. Cooney, D.A. McMenamin, M.G. Anderson, T. Streptozotocin diabetes further studies on the mechanism of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mouse pancreatic islets and liver. *Biochem. Pharmacol.* 1973;22:2625-2630.

40. Bonnevie-Nielsen, V.; Steffes, M.W ; and Lernmark, A. A mayor loss in islets mass and (-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes*. 1981;30:424-430.

41. Papaccio G, Esposito V. Ultrastructural observations on cytotoxic effector cells infiltrating pancreatic islets of low dose streptozotocin treated mice. *Virchows Arch Pathol Anat.* 1992;420:5-9.
42. Kulvinder, S., C. Thompson, C. M. Winterford, N. I. Walker, P. Cameron. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic (cell line, INS-1). *Biochemistry and Molecular Biology International.* 1996; 39,(6):1229-1236.
43. Rakićen, N, Rakićen. M.L, Nadkarni, M.V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37919). *Cancer Chemother.* 1963;29:91-99.
44. Junod, A, Lambert, A.E, Stauffacher, W, Renold, A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin invest.* 1969;48:2129-2134.
45. Hammking, N.A., Reynolds, W.A. DNA synthesis in pancreatic islet and acinar cells in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Horm Metab.* 1977;9:114-118.
46. Bar-On, Roheimps, Eder, H.E. Hyperlipoproteinemia in streptozotocin-treated rats. *Diabetes.* 1976;8:50-54.
47. Ar'Rajab, A, Ahrén, B. Long-term diabetogenic effect of streptozotocin in rats. *Pancreas.* 1993;8:50-54.
48. Giorgino, F., Chen, J.H., Smith, R.J. Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and 170,000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin and glucose. *Endocrinology.* 1992;130:1433-1437.
49. Pivoski, S.P., McCullough, P.J., Zhou, W., Bell, R.H. Jr. Induction of diabetes mellitus in syrian golden hamsters using stored equilibrium solutions of streptozotocin. *Lab Anim Sci.* 1993;43:310-315.
50. Ramanadham, S.; Dorcudian, A., McNeill, J.H. Myocardial and metabolic abnormalities in streptozotocin-diabetic Wistar and Wistar-Kyoto rats. *Can. J. Cardiol.* 1990;6:75-79.
51. Rodrigues, B., McNeill, J.H. Comparison of cardiac function in male and female diabetic rats. *Gen Pharmacol.* 1987;18:421-424.
52. Reave, G.M., Ho, H. Low-dose streptozotocin induced diabetes in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism.* 1991;40:335-339.
53. Eriksson, U.J. Diabetes in pregnancy: retarded fetal growth, congenital malformations and fetomaternal concentrations of zinc, copper and manganese in the rat. *J. Nutr.* 1984; 14: 477-484.

54. Ford, W.C.L and D.W. Hamilton. The effect of Experimentally Induced Diabetes on the Metabolism of Glucose by Seminiferous Tubules and Epididymal Spermatozoa from the Rat. *Endocrinology*. 1984; 115:716-722.
55. Hassan, A.A; Hassouna, M.M; Taketo, t; Gagnon, C. And M.M ;Elhilali. The effect of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *The Journal of Urology*. 1993;149:148-154.
56. Chandrashekar, V; Steger, RW; Bartke, A; Fadden, C.T; Kienas, G.S. Influence of diabetes on the gonadotropin response to the negative feedback effects of testosterone on a hypothalamic neurotransmitter turnover rates in adult male rats. *Neuroendocrinology*. 1991; 54:30-35.
57. McLean, M. P; Warden, K.J; Sandhoff, T.W; Irby, R.B; D. B. Hales: Altered Ovarian Sterol Carrier Protein Expression in the Pregnant Streptozotocin-Treated Diabetic Rat. *Biology of Reproduction* .1996.55:38-46.
58. Valdes, C.T; Elkind-Hirsch, K.E; Rogers, D. G. J. P. Adelman. The hypothalamic- Pituitary Axis of Streptozotocin Induced Diabetic Female Rats is Not Normalized by Estradiol Replacement .*Endocrinology*. 1991.128 (1): 433-440.
59. Steger, R.W. Testosterone replacement fails to reverse the adverse effects of streptozotocin-induced diabetes on sexual behavior in the male rat. *Pharm. Biochem. Behavior*. 1990.35:557.
60. Kienast, S.G; Fadden, C; R.W. Steger. Streptozotocin-induced Diabetes Blocks the Positive Feedback Release of Luteinizing Hormone in the Female Rat. *Brain Research Bulletin*. 1993;32:399-405.
61. Rondeel, J.M; Greef, W.J, Heide, R. T. J. Visser. Hypothalamo-hypophysial-thyroid Axis in Streptozotocin- Induced Diabetes. 1992. *Endocrinology*. 30 (1): 216-220.
62. Steger, R.W. Kienast, S.G; Pillai, S; M. Rabé. Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes on Neuroendocrine Responses to Ovariectomy and Estrogen Replacement in Female Rats. 1993. *Neuroendocrinology*. 57 (3):525-531.
63. Atkins, V. Flozack, A.S. Ogata, E.S.R.A. Simmons. The Effects of Severe Maternal Diabetes on Glucose Transport in the Fetal Rat. *Endocrinology*. 1994;135 (1): 409-415.
64. Eriksson, U.J. Lewis, N.J.N. Freinkel. Growth Retardation During Early Organogenesis in Embryos of Experimentally Diabetic Rats. *Diabetes*. 1984;33:281-284.
65. Phellan, A.S; Ito, M; M.R. Loeken. Neural tube Defects in Embryos of Diabetic Mice. Role of the Pax-3 Gene and Apoptosis. *Diabetes*. 1997;46:1189-1197.
66. Menegola, E; Prati, M; Broccia, M.L; Ricolfi, R; E. Giviani. In Vitro development of rat embryos obtained from diabetic mothers. *Etia*. 1995;51:394-397.

67. Eriksson U.J, Borg L.A.H, Forsberg H and Styrud J. Diabetic embryopathy. Studies with animal and *in vitro* models. *Diabetes*. 1991; 40 (suppl 2):94-98.
68. Eriksson U.J, Borg LAH. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. *Diabetologia*. 1991; 34: 325-331.
69. Warso M.A, Lands W.E.M. Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *British Medical Bulletin*. 1983; 39: 277-80.
70. Hunter E.S, Sadler T.W and Wynn R.E. A potential mechanism of DL-(3-hydroxybutyrate-induced malformations in mouse embryos. *American Journal of Physiology*. 1987; 253 (1): E72-E80.
71. Sadler T.W, Hunter E.S III, Wynn R.E and Phillips L.S. Evidence for multifactorial origin of diabetes-induced embryopathies. *Diabetes*. 1989; 38:70-74.
72. Balkan W, Phillips L.S, Goldstein S and Sadler T.W. Potential role of somatomedin inhibitors in the production of diabetic embryopathies. *Teratology*. 1988; 37: 271-282.
73. Buchanan T.A, Denno K.M, Sipos G.F and Sadler T.W. Diabetic teratogenesis. *In vitro* evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose per se. *Diabetes*. 1994; 43:656-660.
74. Brown Z.A, Mills J.L, Metzger B.E, Knopp R.H, Simpson J.L, Jovanovic-Peterson L, Scheer K, Van Allen M.I, Aarons J.H and Reed G.F. Early sonographic evaluation of fetal growth delay and congenital malformations in pregnancies complicated by insulin-requiring diabetes. *Diabetes Care*. 1992;15:613.
75. Hay W.W.J. The role of placental-fetal interactions in fetal nutrition. *Semin. Perinatol*. 1991; 15: 424-433.
76. Mossman W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst.* 1937. 26:129-245.
77. Amoroso E.C. Histology of the la placenta. *Brit. Med. Bull.* 1961. 17(2):81-90.
78. Moll W. Physiological Aspects of Placental Ontogeny and Phylogeny. *Placenta*. 1985. 6:141-154.
79. Graham H.C. and Lala K.P. Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem. cell. Biol.* 1992; 70:867-874.

80. Pijnenborg, R., W.B. Robertson and I. Brosens. Morphological aspects of placental ontogeny and phylogeny. *Placenta*. 1985. 6:155-162.
81. Bjorkman, N. 1976. placentation. In : *Textbook of Veterinary Histology*. Eds. Dellmann, H. D. and Brown, E.M. Lea & Febiger, Philadelphia.
82. Enders, A.C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. *Am.J. of Anat.* 1965. 116: 29-68.
83. Uribe A. M. C. "Estudio Histológico comparado de la Placenta de Cinco Especies de Mamíferos". Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias (Biología). Facultad de Ciencias UNAM. 1994. 104pp.
84. Gillette, L.J. Jr. 1987. The Evolution of Viviparity in Fishes, Amphibians and Reptiles: an Endocrine Approach. In: *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. Eds. D. O. Norris and R.E. Jones. Plenum Press. New York and London.
85. Stewart, J.R. and Blackburn, D.G. Reptilian Placentation: Structural Diversity and Terminology. *Copeia*. 1988. (4):839-852.
86. Morris, G. 1975. Placental Evolution and Embryonic Nutrition. In : *Comparative Placentation . Essays in structure and function*. Ed. D.H. Steven. Ac. Press. London. N.Y. San Fco.
87. Knobil, E and Neill, J. D. *The physiology of Reproduction*, 2da edición. Raven Press, LTD; New York. 1994: 441- 450.
88. Cross, J.C., Zena Werb, Susan J. Fisher. Implantation and the placenta: Key Pieces of the Development Puzzle. *Science*. 1994. 266:1508-1518.
89. Sutherland A.E., Calarco P.G., Damsky C.H. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development*. 1993;119 (4):1175-1186.
90. Norambuena, J., Pijnenborg R and Brosens I. Decidual Changes in the Endometrium and Morphological Adaptation of the Associated Supplying Arteries in the Normal and Diabetic Pseudopregnant Rat. *Placenta*. 1984. 5:249-260.
91. Rinkenberger, J.L., Cross, J.C., Werb, Z. Molecular Genetics of Implantation in the Mouse. *Developmental Genetics*. 1997. 21: 6-20.
92. Stewart, C.L. and Cullinan E.B. Preimplantation Development of the Mammalian Embryo and Its Regulation by Growth Factors. *Developmental Genetics*. 1997. 21: 91-101.
93. Carson, D.D., Bagchi, I., Dey, K.S., Enders, C.A., Yoshinaga, K. Embryo Implantation. *Developmental Biology*. 2000. 223: 217-237.

94. Jollie.P.W.Development, Morphology, and Function of the Yolk-Sac Placenta of Laboratory Rodens. *Teratology*.1990.41:361-381.
95. Abrahamsohn. P.A. and Zorn. T. M. T. Implantation and Decidualization in Rodents. *The Journal of Experimental Zoology*. 1993. 266: 603-628.
96. Welsh, A.O and Endres, A.C. Light and Electron Microscopic Examination of the Mature Decidual Cells of the Rat With Emphasis on the Antimesometrial Decidua and its Degeneration. *The American Journal of Anatomy*. 1985.172: 1-29.
97. Kliman .J.H.The Story of Decidualization, Menstruation, and Trophoblast invasion. *American Journal of Pathology*.2000.157,6:1759-1768.
98. Kearns. M And Lala.P.K. Liñe history of Decidual Cells: A Review. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1983. 3: 78-82.
99. Welsh, A.O and Endres, A.C. Trophoblast-Decidual Cell Interactions and Establishment of Maternal Blood Circulation in the Parietal Yolk Sac Placenta of the Rat. *The Anatomical Record*. 1987. 217: 203-219.
100. Allen C. Enders and Alerick O. Welsh. Structural Interactions of Trophoblast and Uterus During Hemochorial Placenta Formation. *The Journal of Experimental Zoology*.1993. 266:578-587.
101. Damsky, C.H. Librach. C. Lim K.H, Fitzgerad M.L, Mc Master M.T, Janatpour M, Zhou Y, Logan S.K, Fisher S.J. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*.1994;120:3657-3666.
- 102.Pampfer.S, De Hertogh. R, Vanderheyden.I, Michiels. B, and Vercheval. M. Decreased Inner Cell Mass Proportion in Blastocysts From Diabetic Rats. *Diabetes*.1990. 39: 471-476.
- 103.Kaufman.M.H.The Atlas of mouse development. 5th ed. Academic Press.2002.
104. Cross.J.C. Genetic insights into trphoblast differentiation and placental morphogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.2000. 11:105-113.
105. Kertschanska.S, Stulcová.B, Kaufmann.P and Stulc.J. Distensible Transtrophoblastic Channels in the Rat Placenta. *Placenta* .2000. 21: 670-677.
106. Gewolb.I.H, Barrett C, Warshaw.J.B and Enders.A.C. Fine structural Abnormalities of the Placenta in Diabetic Rats.*Diabetes*. 1986. 35:1254-1261.
107. Gewolb, I.H.,Barrett, C, and Warshaw. J.B. Placental growth and glycogen metabolism in streptozotocin- diabetic rats. *Pediatr. Res*. 1983.17:587-591.
108. Giavini .E. Broccia M.L, Prati M. Roversi G.D and Vismara C. Effects of streptozotocin- Induced Diabetes on Fetal Development of the Rat. *Teratology*.1986.34:81-86.

109. Wentzel P, Jansson L and Eriksson U.J. Diabetes in Pregnancy : Uterine Blood Flow and Embryonic Development in the Rat. *Pediatric Research*. 1995. 38(4): 598-606.
110. Reece, E.A, Eriksson U.J. The pathogenesis of diabetes associated congenital malformations. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 1996, 23 (1):29-45.
111. Sissom.F.J, Stenzel.K.W and Warshaw B.J. Decreased Binding of Epidermal Growth Factor in Placentas from Streptozotocin- diabetic Rats. *Journal of Clinical Investigation*. 1987. 80:242-247.
112. Diamant Y, Z, Metzger .B.E , Freinkel .N and Shafir,E. Placental lipid and glycogen content in human and experimental diabetes mellitus. *Am. J.Obstet. Gynecol.* 1982;144 (5): 5-11.
113. Palacin. M., Lasunción M.A., Martín. A, Herrera. E. Decreased Uterine Blood Flow in the Diabetic Pregnant Rat Does Not Modify the Augmented Glucose Transfer to the Fetus. *Biol. Neonate*. 1985. 48:197-203.
114. Forberg.H; Wentzel.P; and Eriksson U.J. Maternal diabetes alters extracellular matrix protein levels in rat placentas. *American J Obstetrics Gynecol.* 1998;179:772-778.
115. Barash .V, Gutman. A. and Shafir .E. Fetal diabetes in rats and its effect on placental glycogen. *Diabetologia*. 1985. 28:244-249.
116. Ne'eman Z, Barash. V, Rossenmann. E. & Shafir. E. Localization of Glycogen in the Placenta of Diabetic Rats: a Light and Electron Microscopic Study. *Placenta*. 1987. 8: 201-208.
117. Husain.M.S and Mughal.M.Z. Effect of Diabetes mellitus on rat placenta cellularity. *Early Human Development*. 2001. 60:207-214.
118. Padmanabhan.R and Shafiullah.M. Intrauterine Growth Retardation in Experimental Diabetes: Possible Role of the Placenta. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2001. 109, 3: 260-271.
119. Hagay.Z.J. Diabetic Ketoacidosis in pregnancy: etiology, pathophysiology and management. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1994; 37 (1):39-49.
120. Styrod. J, Thunberg L, Nybacka O and Eriksson U.J. Correlation between maternal metabolism and deranged development in the offspring of normal and diabetic rats. *Pediatric Research*. 1995; 37 (3):343-353
121. Lee.G.L. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3a edición. Mc Graw Hill. New York. 1968. 258 pp.
122. Estrada F.E, Peralta Z.L, Rivas.M.P. AGT Editor. 1ª edición. México. 1982. 140 pp.

II. ANEXO 1.

Se denomina método o técnica histológica al conjunto de operaciones destinadas a demostrar la disposición estructural de los tejidos (122).

Fijación: Tiene como principales finalidades el evitar la descomposición y autólisis, ya que son la causa de las rápidas modificaciones que experimentan las células al morir.

Lavado: Después de la fijación es casi siempre necesario el lavado abundante en agua con un tiempo variable de acuerdo al fijador.

Deshidratación: Los disolventes de las sustancias empleadas en la inclusión, como son el éter, cloroformo, xilol, etc.; no se mezclan con el agua, por lo que es necesario una perfecta deshidratación de la pieza con alcoholes graduales, hasta absoluto, para que la sustancia de inclusión penetre bien en los tejidos.

Inclusión: Es la operación mediante la cual se hace penetrar en la pieza deshidratada una materia solidificable que tiene a lo más la consistencia del tejido y facilita la ejecución de cortes; puede usarse para este fin la parafina.

INCLUSION EN PARAFINA (122).

1. Fijar en formol al 10% por 24 horas como mínimo.
2. Lavar en agua corriente 1 hora.
3. Deshidratar con alcoholes de concentración ascendente, de 50,70,80,96°, y absoluto, 45 minutos en cada alcohol.
4. Aclarar en xilol 30 minutos.
5. Incluir en parafina. Se sumerge la pieza en parafina fundida a 58° C; se hacen 2 cambios, de 1 hora cada uno.
6. En cajas de plástico se coloca parafina fundida limpia; se introduce la pieza y se orienta de acuerdo a la forma en que se va a cortar.
7. Se etiqueta.
8. Se rodea la pieza con una aguja de disección caliente, con el objeto de sacar las burbujas que se hayan formado al introducir el fragmento.
9. Se deja solidificar a temperatura ambiente.

CORTES EN PARAFINA (122).

1. Ya solidificada la parafina, se delimita con una navaja, dando forma de pirámide.
2. Se coloca en el micrótomo paralelo al filo de la navaja.
3. Se hacen cortes de 5 micras.
4. Los cortes se colocan en un baño de flotación a 46°C con gelatina bacteriológica previamente disuelta.
5. Se dejan extender y se adhieren al portaobjetos.
6. Se dejan secar a temperatura ambiente.

DESPARAFINACIÓN E HIDRATACIÓN DE LOS CORTES (122).

1. Colocar en la estufa a 58°C 30 minutos.
2. Colocar en xilol 10 minutos.
3. Colocar en alcoholes de 100°, 96°, 70° y 50°, por 5 minutos cada uno.
4. Colocar en agua destilada.

Tinción.

Es un método indispensable que permite obtener una clara imagen de conjunto de los tejidos y órganos. La elección de una tinción depende de los elementos que se deseen observar.

HEMATOXILINA-EOSINA (hematoxilina de Harris-eosina alcohólica). (121)

La técnica de Hematoxilina-Eosina se considera como una excelente tinción nuclear que permite observar el panorama general de un tejido.

1. Fijar en formol 10%.
2. Hacer cortes para parafina.
3. Desparafinar e hidratar los cortes en agua destilada.
4. Teñir con hematoxilina de Harris, 5 minutos.
5. Virar con agua de la llave.
6. Lavar con agua destilada para detener el viraje.
7. Teñir con eosina alcohólica, 3 minutos.
8. Deshidratar en alcoholes de 70°, 96° y absoluto durante 3 minutos en cada uno.
9. Aclarar en xilol durante 5 minutos.
10. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS:

Núcleo	Azul.
Citoplasma	Rosa ó Rojo.
Mas estructuras o tejidos.	Rosa o Rojo.

VAN GIESON (122).

La técnica de Van Gieson es especifica para teñir fibras colágenas.

1. Fijar en formol 10%.
2. Hacer cortes para parafina.
3. Desparafinar e hidratar en agua destilada.
4. Teñir con hematoxilina de Weigert, 7 minutos.
5. Virar con agua de la llave.
6. Lavar con agua destilada para detener el viraje.

7. Teñir con solución de Van Gieson durante 12 minutos.
8. Deshidratar en alcoholes 96° y absolutos durante 3 minutos en cada uno.
9. Aclarar en xilol durante 5 minutos.
10. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS.

Colágena	Roja.
Músculo	Amarillo.
Epitelio	Amarillo.
Núcleo	Negro

METODO TRICROMICO DE MASSON (121).

La técnica de Masson es específica para teñir elementos propios del Tejido Conjuntivo.

1. Fijar en formol 10%.
2. Hacer cortes para parafina.
3. Desparafinar e hidratar en agua destilada.
4. Solución de Bouin por 1 hora a 56°C o toda la noche a temperatura ambiente.
5. Lavar en agua corriente hasta desaparecer el color amarillo.
6. Enjuagar en agua destilada.
7. Teñir con hematoxilina de Weigert, 12 minutos.
8. Virar con agua de la llave.
9. Lavar con agua destilada para detener el viraje.
10. Teñir con solución de Escarlata de Biebrich durante 2 minutos.
11. Lavar en agua destilada.
12. Solución de ácidos de Masson durante 10 minutos.
13. Solución de Azul de Anilina durante 5 minutos.
14. Lavar en agua destilada.
15. Solución de Agua Acética 1% durante 3 minutos.
16. Deshidratar en alcoholes 96° y absoluto durante 3 minutos en cada uno.
17. Aclarar en xilol durante 5 minutos.
18. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS.

Núcleo	Negro
Músculo, Citoplasma y Fibras	Rojo
Colágena	Azul

PASS-SCHIFF (122).

La técnica de PAS-SCHIFF es específica para teñir Glucógeno.

1. Fijar en formol 10%.
2. Hacer cortes para parafina.
3. Desparafinar e hidratar hasta alcohol 70°.
4. Solución de Ácido Peryódico durante 12 minutos.
5. Enjuagar en alcohol 70°.
6. Lavar en enjuague reductor 5 durante minutos.
7. Lavar en alcohol 90°.
8. Solución de Schiff durante 15 minutos.
9. Lavar en 3 cambios seguidos de Bisulfito de Sodio durante 2 minutos cada uno.
10. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
11. Teñir con Píero Índigo Carmín 10 minutos.
12. Deshidratar en alcoholes 96° y absoluto durante 3 minutos en cada uno.
13. Aclarar en xilol durante 5 minutos.
14. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS.

Núcleo	Azul
Glucógeno	Rosa

III. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DM	Diabetes Mellitus
OMS	Organización Mundial de la Salud
HbA	Hemoglobina Glucosilada
HbA _{1c}	Hemoglobina Glucosilada fracción 1c
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
SOD	Superóxido Dismutasa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
mM	Milimolar
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
AI	Aloxana
NAD	Nicotidamina adenin dinucleótido
STZ	Estreptozotocina
GLUT	Transportador de Glucosa
NO	Oxido Nítrico
LH	Hormona Luteinizante
FSH	Hormona Folículo Estimulante
PRL	Prolactina
T	Testosterona
ip	intraperitoneal
iv	intravenoso
dpc	días post coito
pc	post coito
ANOVA	Análisis de Variancia
RDG	Secuencia de reconocimiento a Aminoácidos para el receptor de fibronectina
MCI	Macizo Celular Interno