

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO
EN LA TERATOGENÉISIS CAUSADA POR DIABETES MELLITUS
Y PROTECCIÓN POR POLIAMINAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTAN

CYNTIA CITLALI MÉNDEZ JIMÉNEZ

Y

JUAN CARLOS HIGAREDA ALMARAZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. MARTÍN PALOMAR MORALES

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en el Laboratorio de Bioregulación y Diabetes Mellitus, bajo la asesoría del Doctor Martín Palomar Morales.

El proyecto tuvo apoyo económico de la División de Investigación y Posgrado de la FES; de la Unidad de Morfología de la FES, y del PAPIIT (Proyecto 205103).

Durante 12 meses se contó con beca del PAPIIT (Proyecto 205103).

DEDICATORIAS

A mi papá (Guaguin):

Por ser la persona que es sin trabas, tapujos y prejuicios, gracias por dejarme ser y no cortarme las alas nunca. Por el apoyo brindado durante estos 23 años, por tus regaños y enseñanzas, por darme las armas para enfrentar la vida, pero sobre todo por dejarme vivirla a mi manera y estar ahí cuando ha sido necesario. Por tus esfuerzos y desvelos para que yo pudiera tener la educación, que es lo que nos hace crecer, por tu cariño y enseñanzas que me han servido para superarme. Te he querido dedicar esta tesis como una pequeña muestra de gratitud por el privilegio de tener a este señorón como PAPÁ. Porque te quiero muchísimo aunque no lo menciono muy a menudo y estoy orgullosa de ti.

A mi mamá (Cholecito):

Por el apoyo que me ha brindado, por educarme de la mejor manera que ha podido y que conoce, por darme armas para poder enfrentar la vida y enseñarme que no todo es tan color de rosa en la vida y que uno siembra lo que cosecha, gracias por estar a mi lado y pelear por mi bienestar. Gracias por cuidarme aún cuando no estuviera enferma y querer lo mejor para mí. Te la dedico porque te quiero mucho y de no ser por ti (y por mi "pa") yo no estaría aquí y menos terminando esta etapa. Gracias por darme la vida.

A mi hermana Itzel (Guguita):

Porque es la única que tengo, no es cierto, por ser la mejor hermana del mundo, porque se que pudieron haber sido otras las hermanas que me pudieron haber tocado, pero me alegro de que fuera ella, por ayudarme en los momentos difíciles y por hacerme reír en los momentos tristes, por ser la personita que es y dejarme crecer con ella. Por nunca dejarse apalear por nadie, por decir siempre lo que piensas, nunca dejes que nadie te quite eso porque es maravilloso y valioso que demuestres siempre quien eres. Te quiero mucho manita y eres parte de mí, cuenta conmigo cuando y para lo que sea.

A mi novio Juan (Cachetón):

Por ayudarme a sobrellevar esto que se llama vida y enseñarme que todo en la vida es posible siempre y cuando uno se decida a hacerlo, por enseñarme lo valioso que es contar con las personas y demostrarles que pueden contar contigo. Por estar ahí todos y cada uno de los días de estos cuatro años que llevamos juntos, por prestarme tu hombro cuando los días se obscurecieron, por ayudarme a cargar mis penas, por ser el hombre que eres, por querer cambiar para que yo sea más feliz, por mostrarme que el sol brilla y las estrellas pueden alcanzarse, por hacerme ver que las estrellas brillan aún cuando el día esta nublado. Por ser el hombre que amo, con quien quiero seguir recorriendo el camino que me falta y llegar tan lejos como sea posible hasta fuera de la galaxia, y si fuera posible aún más lejos. Porque TE AMO con todo mí corazón y me alegra que nos hayamos conocido y estemos juntos.

Méndez Jiménez Cyntia Citlali

A Cyntia, el amor de mi vida, motor de mis logros, compañera y amiga incondicional y co-artífice de este trabajo: Gracias por estar siempre aquí, por estos cuatro años de gratos momentos, difíciles pruebas y ayuda sin igual, te dedico mi parte de la tesis por tu trabajo impecable, atinadas observaciones y paciencia sin igual, TE AMO y recuerda que eres y siempre serás el amor de mi vida, mil gracias por estar aquí y por elegirme para estar a tu lado.

A mis Padres Carlos y Laura, gestores de amor, luchadores incansables y juiciosos consejeros: Gracias por enseñarme a luchar en la vida para lograr lo que deseo, por apoyarme y creer en mis locuras a pesar de parecer incompresibles, gracias por sus días de trabajo y sus noches en vela y sobre todo gracias por darme la vida.

A mi Abuela Amelia, sabia como nadie, siempre atinada, y amorosa persona: Gracias por todos los consejos, por tu ayuda indispensable, por secar mis lagrimas y festejar mis triunfos, gracias por tu guía.

A mis Hermanos Erick y Oscar, personas invaluableles y grandes compañeros: gracias por sus sacrificios y esfuerzos, por la ayuda prestada y por creer en mí.

Higareda Almaraz Juan Carlos

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Martín por aceptarme en su laboratorio y permitirme realizar el proyecto con el cual fue posible mi titulación.

A todos y cada uno de los profesores que de alguna u otra manera contribuyeron con su granito de arena para que pudiera llegar hasta esta etapa en mi vida, por compartir conmigo sus conocimientos que son parte importante de mi formación.

A todas y cada una de las personas que de alguna u otra forma marcaron un momento en mi vida, que estuvieron o están conmigo apoyándome y ayudándome a ser una mejor persona.

A mis compañeros de laboratorio que me brindaron su apoyo y me enseñaron a ver las cosas desde otro punto de vista.

En general les doy las gracias a todas las personas que por motivo de mala memoria omití y que son parte importante de mi vida, pero sobre todo le doy gracias a la vida por permitirme estar aquí en este lugar y en este tiempo y darme todas las cosas que me ha dado.

Méndez Jiménez Cyntia Citlali

Para nuestro tutor Martín Palomar, gracias por la confianza y la oportunidad, nunca lo defraudaré.

A Beto, Gaby, Ivette, David, gracias por compartir una maravillosa carrera, por todos los momentos que disfrutamos juntos, recuérdeme.

Chavela, gracias por estos 10 años de amistad y apoyo, nunca te olvidare.

Damaris, gracias por todo tu apoyo y amistad sincera, por brindarme tu hogar y por las chelas y los jueves de billar.

A todas esas personas que no menciono aquí pero que les guardo un lugar muy especial en mi corazón, este triunfo nunca lo habría logrado sin su intervención, pequeña o grande pero invaluable, mis amigos, familiares, y maestros gracias por poner su granito de arena.

Higareda Almaraz Juan Carlos

CITAS

**"Si quieres salvar a tu hijo del polio puedes rezar o puedes vacunarlo...
Aplica la ciencia". (Carl Sagan)**

"La Ciencia tiene dos reglas. Primero: No hay verdades sagradas; toda presunción tiene que ser examinada críticamente; los argumentos de autoridades no valen nada. Segundo: cualquier inconsistencia con los hechos tiene que descartarse o revisarse. Nosotros tenemos que comprender el Cosmos como es y no confundir como es con como quisiéramos que fuera". (Carl Sagan)

**"El primer pecado de la humanidad fue la fe; la primera virtud la duda".
(Carl Sagan)**

"En primer lugar acabemos con Sócrates, porque ya estoy harto de este invento de que no saber nada es un signo de sabiduría." (Isaac Asimov)

**"El universo no fue hecho a la medida del hombre, tampoco le es hostil.
Es indiferente." (Carl Sagan)**

ÍNDICE

RESUMEN.....	12.
1. INTRODUCCIÓN	13.
2. CLASIFICACIÓN	15.
3. DIABETES MELLITUS Y GESTACIÓN	16.
4. TERATOGENESIS POR DIABETES MELLITUS	17.
5. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO.....	20.
6. POLIAMINAS	23.
7. ANTECEDENTES	26.
8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29.
9. OBJETIVOS	30.
10. MATERIAL Y MÉTODOS	31.
Sujetos Experimentales	31.
Diseño experimental	31.
Análisis Estadístico	34.
11. RESULTADOS	35.
Glucosa	35.
Hidroxibutirato	38.
Tamaño de camada	38.
Peso de embriones	41.
Frecuencia de reabsorciones y malformaciones	41.
Tipo de Malformaciones	44.
TBARS	56.
CAT	56.
GPx	59.
SOD	59.
12. DISCUSION	62.
13. CONCLUSIONES	70.
ANEXO	71.
14. REFERENCIAS	74.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AcAc	Acetoacetato
AGL	Ácidos grasos libres
BPS	Ácido batofenantrolin-disulfónico
CAT	Catalasa
CTR	Grupo Control
DIAB	Grupo Diabético
D+Arg	Grupo diabético tratado con L-arginina
D+Ins	Grupo diabético tratado con Insulina
D+Put	Grupo diabético tratado con Putrescina
D+Spd	Grupo diabético tratado con Espermidina
D+Spm	Grupo diabético tratado con Espermina
DFMO	DL- α -difluorometil-ornitina
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DO	Densidad óptica
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GOD	Glucosa oxidasa
GPx	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation
GSSG	Glutation oxidado
3-HB-DH	3-hidroxi butirato-deshidrogenasa
HO ⁻	Radical hidroxilo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IL-1	Interleucina 1
IFN- γ	Interferón-gamma
LMWA	Antioxidantes de bajo peso molecular lipofílicos e hidrofílicos
MDA	Malondialdehido
NAD ⁺	Dinucleotido de nicotinamida y adenosina

NADH	Dinucleotido de nicotinamida y adenosina reducido
NADP ⁺	Fosfato del dinucleotido de nicotinamida y adenosina
NADPH	Fosfato del dinucleotido de nicotinamida y adenosina reducido
NBT	Nitroazul de tetrazolio
O	Oxígeno atómico
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Superóxido
¹ O ₂	Oxígeno en singulete
O ₃	Ozono
ODC	Ornitina-descarboxilasa
PAO	Poliaminaoxidasa
PGA	Productos de glicosilación avanzada
POD	Peroxidasa
SAMDC	S-adenosil-metionina descarboxilasa
SOD	Superóxido dismutasa
SSAT	Espermidina/espermina N1-acetil-transferasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante tipo beta
TNF-α	Factor Necrosante de Tumores tipo alfa
VLDL	Lipoproteínas de densidad muy baja
XOD	Xantina Oxidasa

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) complicada con el embarazo, genera distintos tipos de problemas, tanto a la madre como al producto. Diversos estudios han sugerido que existe una relación entre las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y las malformaciones, la pérdida de gestación o el retraso del desarrollo fetal. Se ha encontrado protección contra la teratogénesis causada por DM1, mediante la administración de las poliaminas putrescina, espermina y espermidina y su precursor L-arginina, y se ha sugerido que este efecto pudiera ser mediado por mejoría del sistema depurador de EROs. Para probar esta hipótesis; un total de 35 ratas hembras de la cepa wistar fueron cruzadas con machos sanos por el método de trío durante toda la noche y al día siguiente se confirmó el estado de preñez mediante lavado vaginal. Las ratas fueron separadas de los machos y colocadas aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales denominados DIAB, el cual fue tratado con solución salina fisiológica; D+Ins, tratado con insulina; D+Arg, tratado con L-arginina; D+Put, tratado con Putrescina; D+Spd, tratado con Espermidina y D+Spm, tratado con Espermina, a razón de cinco por grupo. Los sujetos experimentales se diabetizaron al día 4 de gestación mediante una dosis de aloxana de 120 mg/Kg de peso i.p. y se contrastaron con un grupo de ratas no diabéticas denominado CTR, tratado con solución salina fisiológica. Las ratas fueron sacrificadas al día 13 de gestación. En los embriones se cuantificaron las actividades de las enzimas purificadoras de EROs (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, además de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). El estado diabético se confirmó mediante la cuantificación de glucosa sérica y la concentración de β -Hidroxibutirato sanguínea. Los resultados encontrados mostraron que la actividad de las enzimas depuradoras de EROs en embriones de ratas normales fue más eficiente que en sus contrapartes provenientes de ratas diabéticas, lo que permite sugerir una disminución de los efectos teratogénicos de las EROs mediante el uso de poliaminas.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) constituye un grupo heterogéneo de trastornos, caracterizados por hiperglucemia; como resultado del defecto en la secreción de la insulina, su acción o ambos. La hiperglucemia crónica de la DM se asocia con daños a largo plazo, tales como disfunción y falla de varios órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Expert Committee, 2002).

Distintos procesos patogénicos se encuentran implicados en el desarrollo de la DM. Éstos se extienden desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas con la consecuente deficiencia de insulina; hasta anomalías que resultan de la resistencia a la acción de la misma. La base de las anomalías en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas observados en pacientes diabéticos es una acción deficiente de la insulina en los tejidos blanco, en los cuales, hay alteración en la respuesta normal a la insulina (Expert Committee, 2002).

La sintomatología de la DM no controlada es muy extensa, a consecuencia de la incapacidad de la glucosa para entrar a la mayoría de las células (supresión celular de la glucosa) y de su alta concentración en la sangre, además de los esfuerzos del riñón para reducir los valores elevados de la glucemia. Entre estos síntomas están el aumento del apetito (polifagia), de la micción (poliuria) y de la sed (polidipsia), así como pérdida de peso y falta de fuerza. La incapacidad para equilibrar la diuresis excesiva aumentando la ingestión de líquido origina deshidratación, desequilibrio electrolítico e incluso cetoacidosis. En la diabetes descompensada, por lo general hay altos niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (AGL), triacilglicéridos y colesterol (Felig y Coustan, 1991). La alta concentración de AGL se debe a un marcado aumento de su liberación a partir de los depósitos de grasa, puesto que en la DM, la lipogénesis se encuentra inhibida y por lo tanto, no existe una formación de novo de estos compuestos. El incremento de la lipólisis se debe a la pérdida del efecto inhibitor normal que la insulina ejerce sobre una lipasa sensible a hormonas del tejido adiposo. Además, la disminución en la utilización de glucosa resulta

en una menor disponibilidad del glicerol-3-fosfato para reesterificar los ácidos grasos dentro del adipocito (Felig y Coustan, 1991).

En la DM, la hipertriacilgliceridemia se debe a un mecanismo mucho más complejo. En condiciones normales, las lipoproteínas ricas en triacilgliceridos entran en el plasma como quilomicrones procedentes de la grasa contenida en la dieta o como lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL) producidas en el hígado e intestino. Los ácidos grasos son extraídos de estas fuentes de triacilgliceridos gracias a la lipasa de lipoproteínas presente en el endotelio capilar, dicha enzima es activada por la insulina. En la diabetes no tratada o mal controlada, la disminución de la actividad de la lipasa produce una elevación en la concentración de triacilgliceridos plasmáticos. El incremento en el aporte de ácidos grasos hacia el hígado contribuye también a un aumento en la síntesis de triacilgliceridos, ya que en el hígado del sujeto diabético no se altera la esterificación de los ácidos grasos con glicerol. Debido a lo anterior, el hígado del sujeto diabético mal controlado o no tratado es adiposo y agrandado, además de presentar hipertriacilgliceridemia, aun cuando la síntesis de ácidos grasos es prácticamente nula (Expert Committee, 2002).

Cuando la insulina es extremadamente baja, las alteraciones del metabolismo de las grasas en el tejido adiposo, el hígado y el músculo producen acumulación de cuerpos cetónicos. Además, la hipercetonemia se debe a disminución en el uso de cetonas por el músculo. El efecto limitante normal de la insulina sobre la cetonemia se debe a su capacidad para inhibir la lipólisis, disminuir la oxidación de ácidos grasos a cetonas en el hígado y estimular la utilización de éstos por el músculo. La deficiencia marcada de insulina, lleva a estimular simultáneamente la entrada de ácidos grasos al hígado y la enzima limitante de su oxidación, la acilcarnitin transferasa (Felig y Coustan, 1991).

2. CLASIFICACIÓN

Los diversos tipos de diabetes tienen causas distintas, aunque sus efectos patológicos son similares una vez que comienzan. Estos distintos tipos se agrupan en cuatro modalidades (Expert Committee, 2002):

- Diabetes mellitus de tipo 1 (Antes DM juvenil o tipo I). Causada por la destrucción de las células β -pancreáticas, a menudo por anomalías en su reconocimiento como propias, por parte del sistema inmunológico, que origina la pérdida de la secreción de insulina y deficiencia absoluta de insulina, lo que explica el origen de la cetoacidosis. Aún no se conocen los elementos causales del proceso autoinmunitario y la destrucción de las células β . Representa entre el 5 y 10% de los casos del síndrome diabético.
- Diabetes mellitus de tipo 2 (Antes DM de aparición tardía o tipo II). Producida por una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia y la deficiencia insulínica. No se conocen los genes específicos, pero se les investiga de manera intensiva. Algunos de los factores de riesgo no genéticos son edad avanzada, consumo excesivo de calorías, sobrepeso, adiposidad central y bajo peso al nacer. Corresponde entre el 90 y el 95 % de los casos del síndrome diabético.
- Otros tipos específicos de diabetes mellitus. Estas variedades comprenden un grupo causal heterogéneo que abarca los casos de diabetes en que las causas se conocen parcialmente. Estas causas comprenden defectos genéticos que alteran las células β o la acción insulínica, trastornos del páncreas exócrino, endocrinopatías, cambios pancreáticos por acciones químicas, y situaciones a las cuales no se ha establecido una causa precisa. Representa entre el 1 y 2 % de los casos de síndrome diabético.

- Diabetes mellitus gestacional (DMG). Ocasionada por resistencia a la insulina y deficiencia relativa de esta hormona durante el embarazo. Ocurre en 3 a 5% de los embarazos. Uno de los síntomas de la DMG es hiperglucemia de ayuno o intolerancia a la glucosa de forma moderada, datos que se advierten en 2 a 5% de las embarazadas en EE.UU. Su frecuencia es mayor conforme avanza la edad, en las mujeres con sobrepeso y en algunas razas o etnias minoritarias.

3. DIABETES MELLITUS Y GESTACIÓN

Durante el embarazo normal, los niveles sanguíneos de la glucosa preprandial son entre 10 y 15 mg/dL menores que en las mujeres no gestantes. Se ha postulado que esta disminución puede ser causada por un aumento en el uso de la glucosa por parte del músculo y por el depósito adiposo. En la gestación avanzada, una concentración muy baja de glucosa en ayuno puede estar relacionada con un aumento en el volumen de distribución. Si el ayuno es más prolongado, los niveles de glucosa materna disminuyen aún más, lo que ocasiona disminución de las concentraciones circulantes de insulina y aminoácidos, y un aumento en los niveles de los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos libres. Durante la gestación, la producción hepática de glucosa aumenta hasta en un 30% (Lesser y Carpenter 1994).

Se ha demostrado, que durante la gestación normal, hay hiperplasia de las células β pancreáticas, lo cual se debe a un efecto directo de los estrógenos y la progesterona. Hay un aumento progresivo en las concentraciones de insulina basal y posprandial a lo largo de la gestación (Palomar, 1998).

El embarazo se vincula con dos alteraciones importantes en el metabolismo de lípidos: la primera es una estimulación progresiva de la lipólisis y cetogénesis conforme avanza la gestación. Datos *in vitro* indican que la lipólisis es producto de la acción de hormonas placentarias, como el lactógeno placentario humano y otras, las cuales estimulan directamente la secreción de AGL del tejido adiposo. El efecto lipolítico normalmente es contrarrestado por las acciones

antilipolíticas de la insulina. Así, la hiperinsulinemia posprandial del embarazo mantiene la concentración circulante de AGL dentro de un margen apenas algo mayor que en mujeres no gestantes durante las primeras 2 a 3 horas después de comer. La segunda alteración importante, es un aumento de la concentración circulante de triglicéridos de 1.5 a 2 veces en el tercer trimestre de la gestación. Esto parece resultar de una combinación de tres factores (Harris, 2003):

- a) Mayor concentración de AGL circulantes e hiperinsulinemia, que se combinan para promover la síntesis de triglicéridos en el hígado.
- b) Mayor ingestión de alimentos, que eleva la presencia de quilomicrones en el intestino.
- c) Disminución de la actividad de la lipasa en tejido adiposo, que causa una menor depuración de triglicéridos circulantes.

4. TERATOGENESIS POR DIABETES MELLITUS

La asociación de la DM tipo 1 y el embarazo es una causa importante de alteraciones del desarrollo embrionario y fetal, que puede causar malformaciones congénitas, muerte intrauterina y retraso del desarrollo, así como un elevado índice de mortalidad perinatal, ya sea en forma de microaborto o aborto (Sadler *et al.*, 1993). El estudio de dichos trastornos durante el desarrollo embrionario es llamado teratología y los agentes responsables de causarlas son llamados teratógenos (Gilbert, 1988). En la DM y su tratamiento los agentes teratogénicos más importantes son aparentemente, la insulina, la glucosa, los cuerpos cetónicos, los metales trazas, los fármacos hipoglucemiantes y las especies reactivas de oxígeno (Nazer y Ramírez, 2000).

Al tratar de estudiar estas anomalías directamente sobre el embarazo humano, existe un problema ético insalvable. Por ello, se han tenido que desarrollar

modelos en animales, con el objeto de estudiar los mecanismos bioquímicos por los cuales la diabetes materna es capaz de producir alteraciones embrionarias (Nazer y Ramírez, 2000).

Para estudiar la DM durante la gestación, el investigador ha tomado ventaja de los modelos animales; estrategia que ha consistido en inducir la diabetes en animales, por medio de agentes químicos, antes o después de la fertilización y en observar las malformaciones fetales y las alteraciones del metabolismo materno, fetal o ambos (Kaufmann *et al.*, 1991).

Dentro de los agentes químicos utilizados para la inducción de diabetes en animales experimentales se encuentran los fármacos que presentan efectos citotóxicos, como la estreptozotocina y la aloxana; este último, producto de la oxidación del ácido úrico, que causa diabetes por la destrucción de las células β en islotes pancreáticos, debido a su elevada afinidad hacia la membrana plasmática, afectando su permeabilidad y ocasionando necrosis (Szkudelski, 2001).

Otra estrategia experimental es el cultivo de embriones: hace más de 25 años, New (1978) desarrolló un sistema en el cual los embriones postimplantacionales de roedor son cultivados *in vitro*, y el medio de incubación es manipulado para mimetizar la situación patológica de embarazo mediado por gestación (Ellington, 1987). Los experimentos en embriones de roedores revelan que la diabetes gestacional puede desembocar en muerte del embrión y la ocurrencia en recién nacidos de anomalías estructurales. El potencial teratogénico de la diabetes ha sido probado en estudios epidemiológicos: la incidencia de un mayor número de anomalías presentes en el nacimiento en madres diabéticas se encuentra en un intervalo de 7.5 a 12.9% comparado con el 2-3% de incidencia en madres no diabéticas (Green *et al.*, 1989 y Cousins, 1991).

La etiología de la diabetes inducida presume la existencia de algunos factores internos que pueden provocar susceptibilidad del embrión a la diabetes, de los cuales las citocinas y los factores de crecimiento juegan un papel crucial en el

crecimiento placentario, diferenciación y defensa del embrión; generando metabolitos teratogénicos como la glucosa, los cuerpos cetónicos y los inhibidores de las somatomedinas (Sadler *et al.*, 1989). Paralelamente, se ha observado que la diabetes es acompañada por una expresión distorsionada de Interleucina 1 (IL-1), Factor Necrosante de Tumores tipo alfa (TNF- α), Interferón-gamma, IFN- γ , y Factor de Crecimiento Transformante tipo beta (TGF- β). (Rabinovitch y Suarez-Pinzon, 1998).

Hace más de dos décadas, Norbert Freinkel (1979) sugirió que las alteraciones en los nutrientes suministrados al *conceptus* en crecimiento, pueden ser la clave de la mayoría de los cambios en la embriogénesis provocada por la diabetes, y acuñó la expresión de teratogénesis mediada por energéticos. Así, durante el estado de preñez los periodos de hiperglucemia e hipoglucemia maternas pueden causar marcados cambios en la disponibilidad de la glucosa por el *conceptus*. También se incrementan las concentraciones de lípidos, cuerpos cetónicos y aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) en la circulación materna, contribuyendo a cambiar la composición de nutrientes hacia el embrión (Eriksson *et al.*, 1991)

Una alta concentración de glucosa *in vitro* causa dismorfogénesis embrionaria por la generación de radicales libres de oxígeno. Una alta producción de radicales libres en el tejido embrionario puede estar relacionada directamente con un incremento en el riesgo de malformaciones congénitas que aparecen en los productos. Las alteraciones en la red de transferencia de los nutrientes celulares de la madre diabética hacia el producto pueden causar dismorfogénesis embrionaria, lo cual, sugiere que la combustión de un exceso de energéticos puede producir compuestos incompatibles con el desarrollo embrionario (Eriksson *et al.*, 1991).

Las desviaciones más pronunciadas en el suministro de nutrientes son las relativas a los carbohidratos, donde periodos de hiperglucemia e hipoglucemia pueden causar marcados cambios en la disponibilidad de glucosa al *conceptus*. Además, la alteración de lípidos permite el incremento de la concentración de

triglicéridos, AGL y cuerpos cetónicos en la circulación de la madre (Eriksson *et al.*, 1991).

5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Existen evidencias de que las especies reactivas de oxígeno (EROs) están implicadas en el síndrome diabético y las complicaciones vasculares de la DM, a través de los siguientes mecanismos (Mamposo *et al.*, 1999):

1. Autoxidación de la glucosa y generación de EROs.
2. Se han encontrado niveles elevados de EROs en: eritrocitos, plasma y retina de diabéticos, lo que se relaciona con un control metabólico deficiente.
3. Todos los antioxidantes endógenos se encuentran disminuidos en los tejidos y en la sangre de pacientes diabéticos.
4. El tratamiento con diferentes antioxidantes puede mejorar muchas de las anormalidades metabólicas observadas en el paciente diabético.

Las EROs son derivadas del oxígeno molecular (O_2) y son más reactivas que éste en su estado basal de triplete. Las principales son: las especies producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , o sea, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno en singulete (O , O_3 , 1O_2) y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (O_2^- , H_2O_2 , HO^\cdot). La toxicidad del O_2 se puede explicar debido a la formación de estas especies reactivas (Hansberg, 2002).

La reducción de oxígeno puede producir EROs con consecuencias tóxicas para las células. Bajo circunstancias normales, los niveles de los productos reducidos de oxígeno son bajos, porque son eliminados efectivamente por los mecanismos de defensa de la célula (Wheeler *et al.*, 1990).

Las EROs se encuentran involucradas en la etiología de numerosas enfermedades, como son, entre otros, los padecimientos arterioscleróticos vasculares, la isquemia; así mismo, también se les relaciona con los procesos del envejecimiento (Gutteridge, 1993; Halliwell, 1990; Halliwell *et al.*, 1992; Halliwell y Gutteridge, 1995) y de la DM en los cuales son producidas en grandes cantidades (Papaccio *et al.*, 1986).

Se ha sugerido recientemente que las EROs juegan un papel importante en la etiología de distintas anomalías congénitas, justo como los producidos por la cocaína (Fantel *et al.*, 1992; Zimmerman *et al.*, 1994), y la diabetes materna (Eriksson, 1991; Eriksson y Borg, 1993; Ornoy *et al.*, 1996; Wentzel *et al.*, 1997).

Los mecanismos de defensa antioxidante incluyen una variedad de enzimas, entre las más importantes están la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) e indirectamente la glutatión reductasa (GR), (Chevion, 1988; Halliwell, 1990; Hass *et al.*, 1989; Trocino *et al.*, 1995). Las tres primeras catalizan la transformación de peróxidos y superóxidos hacia especies no tóxicas.

La glutatión reductasa disminuye el glutatión oxidado (GSSG) hasta glutatión (GSH), un sustrato para la glutatión peroxidasa. Las consecuencias del estrés oxidativo son serias y, en muchos de los casos, se manifiestan por un incremento de la actividad en las enzimas involucradas en la detoxificación del oxígeno (Wheeler *et al.*, 1990).

Además, hay antioxidantes de bajo peso molecular lipofílicos e hidrofílicos (LMWA), como la vitamina C, el ácido úrico, el glutatión y la vitamina E, los cuales actúan directamente sobre los EROs (Sharma y Buetner, 1993). Se encuentran en el ambiente intracelular y tisular como depuradores.

El primer indicio de teratogenicidad de las EROs fue sugerido por Eriksson y Borg (1991), quienes encontraron que la adición de la enzima SOD a “medio de cultivo diabético” (con elevadas concentraciones de glucosa) reduce el

porcentaje de anomalías en embriones de rata de 10.5 días de cultivo provocado por la incubación en dicho medio.

Por otro lado, los hallazgos de Finley y Norton (1991) sugieren alteraciones morfológicas y estructurales en las mitocondrias, atribuibles a las especies reactivas de oxígeno, debido a una disminución en la actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT.

Sivan *et al.*, (1997) encontraron que la actividad de la SOD es menor en los embriones anormales de ratas de 11.5 días de gestación, ya sea en madres diabéticas o sanas, con respecto a embriones normales de ratas diabéticas o sanas, y que la variable asociada con la disminución de la actividad enzimática más que el estado diabético es la presencia del daño a nivel de tubo neural; por otro lado, aunque hay disminución de la actividad de la GPx en los embriones malformados de madres sanas con respecto a embriones normales, no hay relación entre la alteración de la actividad enzimática y el estado diabético materno o la presencia de malformaciones; por último en el caso de la CAT, la actividad enzimática disminuye, asociada al estado diabético materno. En general, parece que el estado diabético no afecta las actividades de las enzimas depuradoras (CAT, SOD, GPx), sino las cantidades presentes de especies reactivas de oxígeno.

Se ha propuesto, aunque no ha sido estudiado, que las EROs causan apoptosis, por un mecanismo mediado por activación de caspasa-3, aldosa reductasa y proteína-quinasa C (Moley, 2001); además se plantea que existe apoptosis causada por generación excesiva de EROs, este mecanismo puede surgir por auto-oxidación de la glucosa (Ha y Lee, 2000; Nishikawa *et al.*, 2000), o por la unión no específica que ocurre entre esta y diversas proteínas formando productos de glicosilación avanzada (PGA), las cuales a su vez pueden generar EROs (Zhang *et al.*, 1997) o por sí mismos inducir apoptosis (Greene *et al.*, 1999). Finalmente, se piensa que el estrés oxidativo causado por los PGA y la vía de aldosa reductasa, actúan sinergizando los efectos de la auto-oxidación de la glucosa (Greene *et al.*, 1999).

6. POLIAMINAS

Las poliaminas naturales putrescina, espermidina y espermina se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos. Estas aminas alifáticas, de bajo peso molecular, se encuentran cargadas positivamente en condiciones fisiológicas. Las células han desarrollado una maquinaria bioquímica regulatoria compleja, con la cual controlan de manera adecuada las concentraciones intracelulares de las poliaminas (Morgan, 1999; Tabor y Tabor, 1984). La vía de síntesis de poliaminas inicia con la conversión de ornitina en putrescina por acción de la enzima ornitina-descarboxilasa (ODC, E.C.4.1.1.17), la enzima reguladora de la vía metabólica. La putrescina es convertida posteriormente a espermidina y espermina por medio de las enzimas espermidina-sintasa (E.C.2.5.1.16) y espermina-sintasa (E.C.2.5.1.22). Otra enzima reguladora es la S-adenosil-metionina descarboxilasa (SAMDC, E.C.4.1.1.50), que aporta descarbo-S-adenosil-metionina para la formación de espermidina y espermina.

A su vez, la espermina y la espermidina son degradadas por la espermidina/espermina *N1*-acetil-transferasa (SSAT, E.C.2.3.1.57) y la poliaminaoxidasas (PAO, E.C. 21.5.3.11) a espermidina y putrescina, respectivamente, con formación de 3-acetamidopropanal y peróxido de hidrógeno. La PAO puede actuar directamente sobre la espermina (o espermidina) produciendo espermidina (o putrescina) y 3-aminopropanal. La putrescina es degradada por la diamino-oxidasa y otras enzimas, a GABA o a otros metabolitos (Morgan, 1999; Tabor y Tabor, 1984).

Aunque no se conoce exactamente el papel de las poliaminas, existe evidencia de que son necesarias para la división, crecimiento, proliferación y diferenciación celular, ya que los estímulos asociados con estos eventos inducen cambios en las concentraciones intracelulares de poliaminas, mientras que la inhibición de la síntesis de poliaminas detiene dichos procesos (Tabor, 1984).

Hace más de 20 años, se descubrió que la actividad de la ODC se incrementa sustancialmente el día anterior a la implantación, en útero de ratas gestantes, aparentemente, en respuesta a estímulos embrionarios (Heald, 1979). La administración oral de DL- α -difluorometil-ornitina (DFMO), inhibidor específico de la ODC a ratas gestantes, un día antes de la implantación, suprime el incremento en la actividad de ODC y retrasa el desarrollo embrionario (Fozard *et al.*, 1980; Mannen *et al.*, 1983). La administración intrauterina de DFMO tiene el mismo efecto, y si las poliaminas son administradas de manera simultánea al fármaco, el desarrollo embrionario progresa adecuadamente (Méndez *et al.*, 1983).

La adición de poliaminas al medio de incubación de ovocitos de ratón aumenta el potencial de desarrollo hasta blastocistos (Muzikova y Clark, 1995), lo cual corrobora que estas moléculas pudieran estar implicadas en el desarrollo embrionario temprano.

En ratón, la inhibición de la PAO o de la SAMDC detiene el crecimiento embrionario (Mehrotra *et al.*, 1997), lo que indica que para el desarrollo embrionario son muy importantes las concentraciones relativas de las poliaminas.

Las poliaminas han sido implicadas tanto como promotoras de apoptosis, como inhibidoras o por lo menos, que retardan el proceso, en diversos sistemas (Schipper *et al.*, 2000; Løvaas, 1997; Marx, 1995).

La adición de poliaminas disminuye la frecuencia de apoptosis en timocitos de ratón *in vitro* (Jan *et al.*, 1999) y en neuronas cerebelares (Harada y Sugimoto, 1997). Una disminución de la concentración intracelular de espermidina se relaciona con el inicio de la apoptosis en células de hibridoma rata/ratón (Penning *et al.*, 1998). La DFMO promueve apoptosis en células de cáncer gástrico humano transplantadas en ratón desnudo atímico (Takahashi *et al.*, 2000). La disminución de la actividad de ODC promueve la aparición de apoptosis en células de tiroides de rata (Matsuzaki *et al.*, 2000) y en células tumorales de ascites de Ehrlich (Moffat, *et al.*, 2000).

Al inicio de la apoptosis, se deprime también la SAMDC en timo de ratón (Hegardt, *et al.*, 2000) y en células de cáncer mamario en cultivo (Thomas *et al.*, 1999), mientras que se observa aumento de la actividad de SSAT en timo de ratón (Hegardt *et al.*, 2000) y en ascites (Moffat *et al.*, 2000). La adición de poliaminas inhibe o retrasa la apoptosis en estos sistemas (Moffat *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1999).

7. ANTECEDENTES

Estudios realizados sobre los efectos teratogénicos de la hiperglucemia en estados tempranos de desarrollo embrionario *in vitro*, han aportado evidencia de que ésta induce malformaciones del sistema nervioso central; los embriones, al ser sometidos a concentraciones elevadas de glucosa equivalentes a la de suero de un mamífero con diabetes severa (alrededor de 8.5 mg/mL), manifiestan un índice elevado de defectos en el cierre del tubo neural y retraso del crecimiento (Sadler, 1980). Otros estudios realizados en los noventa establecen que la diabetes mellitus altera el metabolismo materno durante los estados de gastrulación y neurulación de la embriogénesis en roedores, encontrando que la alternancia entre episodios de hipoglucemia e hiperglucemia provocan retraso del crecimiento, bajo peso al nacer, macrosomías y problemas en la formación y cierre del tubo neural (Sadler *et al.*, 1993).

Al realizar estudios sobre los mecanismos de aparición de malformaciones congénitas en la diabetes mellitus gestacional, se ha demostrado que se deben considerar diversos agentes teratogénicos como la insulina, la glucosa, los metales traza y cuerpos cetónicos; así mismo se ha sugerido que periodos alternativos de hipoglucemia, hiperglucemia e hipercetonemia, los cuales pueden ocurrir en forma independiente o en combinación, tienen un efecto teratológico significativo, alterando los niveles de metales traza, principalmente zinc, que es un factor importante en la producción de malformaciones congénitas; además la predisposición genética de algunos individuos puede ser significativa en los procesos teratogénicos de la diabetes gestacional, lo cual demuestra que dichos padecimientos son de origen multifactorial (Eriksson *et al.*, 1987).

Al evaluar los efectos de la DM inducida mediante estreptozotocina y aloxana en los folículos ováricos y en estados tempranos del desarrollo en ratones, se han encontrado anomalías tales como: disminución en el número total de ovocitos, que señala una falla en la maduración de los mismos, adhesión peritoneal de moderada a severa y contracción de los tubos ovaricos al momento de la liberación de éstos en los folículos, la cual es revertida

administrando insulina a las ratonas diabéticas. Paralelamente, existe un retraso en el desarrollo de los embriones, por lo que se concluye que la DM mal controlada contribuye al desarrollo de malformaciones congénitas, siendo el efecto más evidente en las etapas tempranas del desarrollo (Diamond *et al.*, 1989).

En experimentos sobre los efectos producidos por la embriopatía diabética en modelos animales, se han observado cambios importantes en la disponibilidad de glucosa para el *conceptus*, incremento en la concentración de los lípidos y un cambio en la disponibilidad de aminoácidos, lo cual puede producir compuestos que alteren el metabolismo de las prostaglandinas; la interacción de estos factores produce una alta concentración de especies reactivas de oxígeno; estas alteraciones metabólicas no son compatibles con el desarrollo embrionario (Eriksson *et al.*, 1991).

Por otra parte, al disminuir la actividad de la catalasa en embriones de ratas diabéticas, se producen malformaciones y un alto porcentaje de reabsorciones, relacionando la disminución de la actividad enzimática con teratogénesis, lo que evidencia la participación de las EROs en el proceso teratogénico (Cederberg y Eriksson, 1997).

En investigaciones sobre el papel de las EROs en anomalías de la diabetes inducida en embriones de ratas, se halló que la reducción en la actividad de enzimas antioxidantes y la ausencia de antioxidantes de bajo peso molecular como la vitamina C y E son factores decisivos para que se produzca un incremento en el número de malformaciones, las que incluyen defectos de cierre del tubo neural, exencefalia, ausencia de la vesícula telencefálica, ausencia de las vesículas óticas y ópticas, problemas del corazón entre otras (Ornoy *et al.*, 1999).

En cultivo *in vitro* de embriones de rata, durante la organogénesis temprana se encontró retardo del crecimiento y malformaciones severas al agregar una alta concentración de glucosa y sustratos para la formación de EROs; y la adición al

medio de cultivo de la enzima superóxido dismutasa causa que la tasa de dismorfogénesis disminuya a niveles normales (Eriksson y Borg, 1993).

En busca de un modelo de protección contra la actividad de las EROs, a embriones en cultivo con alta concentración de glucosa, se les suministraron las enzimas SOD, CAT y GPx, las cuales disminuyeron el porcentaje de malformaciones a niveles casi normales, por lo cual se supone que brindan protección a los embriones en cultivo, lo que permitió concluir que las EROs cumplen un papel importante como agentes teratogénicos (Eriksson y Borg, 1991).

Por último se encontró que, la aplicación de poliaminas a ratas diabéticas gestantes, promueve una mejoría de la severidad de las malformaciones, así como disminución de la frecuencia de éstas (Méndez y Palomar-Morales, 1999).

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En modelos animales, se ha podido obtener retraso del desarrollo, teratogénesis y reabsorciones, que son indicadores de daño embrionario: el retraso del desarrollo observado en ratas y ratones es análogo al bajo peso al nacer observado en humanos; y las reabsorciones mimetizan al aborto o el óbito observado en humanos (Simán y Eriksson, 1997). El uso de modelos animales ha sido usado para tratar de dilucidar los mecanismos mediante los cuales la diabetes mellitus provoca efectos sobre la progenie de mamíferos.

Por otra parte, en años recientes se ha postulado que en los mecanismos teratogénicos de la diabetes mellitus, el estrés oxidativo provocado por la oxidación incompleta de la glucosa y/o la interacción del azúcar con proteínas intracelulares tiene una participación importante. El aumento en el estrés oxidativo puede ser causado tanto por la hiperglucemia como por la hipercetonemia.

Por estas razones, es muy probable que un aumento en la frecuencia de malformaciones, retraso del desarrollo o reabsorciones en ratas diabéticas, esté ligado con aumento en estrés oxidativo durante la gestación complicada con diabetes, en ratas.

Además, debido a que se ha propuesto que las poliaminas pudieran funcionar como depuradoras de EROs (Løvaas, 1997; Marx, 1995), es probable que la aplicación de poliaminas a ratas diabéticas gestantes pudiera reducir la aparición y severidad de malformaciones, por un mecanismo mediado por disminución de las EROs.

9. OBJETIVOS

- ❖ Estudiar el efecto de las especies reactivas de oxígeno en la teratogénesis sobre embriones de ratas con diabetes inducida por aloxana.

- ❖ Estudiar el efecto de las poliaminas (espermidina, espermina y putrescina) sobre las especies reactivas de oxígeno, durante la embriogénesis alterada por diabetes mellitus materna.

- ❖ Determinar la actividad de enzimas antioxidantes depuradoras (Catalasa, Superóxido dismutasa, Glutathion peroxidasa) y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en fetos de ratas diabéticas inducidas con aloxana, y sometidos a tratamiento parenteral con poliaminas.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos Experimentales

Para el presente estudio se utilizaron 35 ratas hembra; con peso de entre 250 a 300g, de la cepa wistar, de 2 a 2.5 meses de edad, que fueron proporcionadas por el bioterio de la FES Iztacala, en donde se mantuvieron en condiciones controladas de humedad (16%), fotoperiodo de (12:12) y temperatura (22°C), a las cuales se les proporcionó agua y alimento (purina rat chow) *ad libitum*.

Diseño experimental

Las ratas hembras se aparearon con machos saludables de la misma cepa, por el método de trío; el cual consiste en colocar dos hembras y un macho en una jaula, toda la noche. Al día siguiente, antes de las 9:00 h, se corroboró la presencia de espermatozoides en lavado vaginal, y se asignó como tiempo cero la medianoche anterior a la mañana en la cual esto sucedió.

Las ratas preñadas fueron separadas de las demás, y asignadas aleatoriamente en grupos de cinco sujetos, denominados CTR, DIAB, D+Ins, D+Arg, D+Put, D+Spd y D+Spm. Las características de dichos grupos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los tratamientos.

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS
Grupo Control (CTR)	-Aplicación de 100 μ L de solución salina fisiológica vía i.p. a partir del día cuatro de gestación y hasta un día antes del sacrificio.
Grupo Diabético (DIAB)	-Inducción de diabetes al día cuatro de gestación mediante dosis única de aloxana de 120 mg/Kg de peso. -Aplicación de 100 μ L de solución salina fisiológica vía i.p. a partir del día cinco de gestación y hasta un día antes del sacrificio.
Grupo Diabético tratado con Insulina (D+Ins)	-Inducción de diabetes al día cuatro de gestación mediante dosis única de aloxana de 120 mg/Kg de peso. -Aplicación de 5 UI de insulina/rata/día vía i.p.
Grupo Diabético tratado con L-arginina (D+Arg)	-Inducción de diabetes al día cuatro de gestación mediante dosis única de aloxana de 120 mg/Kg de peso. -Aplicación de 1.0 mL de L-arginina 10 mM disuelta en solución salina fisiológica vía i.p.
Grupo Diabético tratado con Putrescina (D+Put)	-Inducción de diabetes al día cuatro de gestación mediante dosis única de aloxana de 120 mg/Kg de peso. -Aplicación de 1.0 mL de putrescina 10 μ M disuelta en solución salina fisiológica vía i.p.
Grupo Diabético tratado con Espermidina (D+Spd)	-Inducción de diabetes al día cuatro de gestación mediante dosis única de aloxana de 120 mg/Kg de peso. -Aplicación de 1.0 mL de espermidina 10 μ M disuelta en solución salina fisiológica vía i.p.
Grupo Diabético tratado con Espermina (D+Spm)	-Inducción de diabetes al día cuatro de gestación mediante dosis única de aloxana de 120 mg/Kg de peso. -Aplicación de 1.0 mL de espermina 10 μ M disuelta en solución salina fisiológica vía i.p.

Diariamente se tomó una gota de sangre de la vena caudal y se verificó la glucemia, entre las 9:00 y las 10:00 hr. mediante tiras reactivas (One Touch, Lifescan) y un glucómetro digital (One Touch II, Lifescan).

Todos los individuos fueron sacrificados al día 13 de gestación bajo anestesia general (pentobarbital sódico en dosis de 50 mg/Kg de peso vía intramuscular);

se practicó una laparotomía, y se obtuvieron ambos cuernos uterinos, y cerca de 5 mL de sangre, de la cavidad cardiaca. Se realizó la disección del útero para eliminar los residuos de grasa, sangre y se contaron los fetos viables y las reabsorciones. Posteriormente, se obtuvieron por separado cada uno de los fetos, abriendo de manera cuidadosa cada cuerno uterino, sobre hielo, para evitar al máximo cambios *post-mortem*. Cada deciduoma fue abierto, y de cada uno se obtuvo el embrión; que fue pesado y posteriormente, se observó al microscopio estereoscópico (Leica MZ6) con el fin de identificar las posibles malformaciones (Sadler, 1980; Eriksson *et al.*, 1987; Eriksson y Borg, 1993; Sadler *et al.*, 1993; Cederberg y Eriksson, 1997; Simán y Eriksson, 1997; Ornoy *et al.*, 1999). Cuando fue pertinente, se tomaron fotografías con una cámara digital (Samsung SCC-131A), acoplada al microscopio y conectada a una PC.

Para la determinación de las actividades enzimáticas los fetos se homogenizaron individualmente con un homogenizador de teflón y cristal con 1 mL de solución salina fisiológica sobre hielo; para su conservación y uso posterior, se almacenaron en microviales a -20°C . En los extractos se determinaron las actividades enzimáticas de glutation peroxidasa (Paglia y Valentine, 1967), catalasa (Aebi, 1983) y superóxido dismutasa (Beauchamp y Fridovich, 1971), así como la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Okhawa *et al.*, 1979), Tanto las actividades enzimáticas como la cantidad de TBARS presente fueron relacionadas con la concentración de proteínas, que se cuantificó con el método de Bradford (1976). Todos los parámetros bioquímicos antes mencionados se determinaron con un espectrofotómetro Jenway 6305.

Las muestras de sangre obtenidas se dividieron en dos. Una parte se centrifugó sin anticoagulante y se obtuvo el suero, para determinar en él la glucosa con ayuda de un estuche comercial que sigue el método de Trinder (1969). La segunda parte de la muestra fue tratada con un décimo de volumen de anticoagulante (heparina 1000 U/mL) y luego con ácido perclórico concentrado y centrifugada, para obtener un extracto claro desproteinizado que se ajustó a pH cercano a 7.0, para determinar la concentración de β -hidroxibutirato por la técnica de Kientsch-Engel y Siess (1981) modificada.

Análisis Estadístico

Los resultados de las pruebas bioquímicas y el tamaño de camada se analizaron estadísticamente con la prueba de ANOVA simple y cuando fue requerido se aplicó la prueba de LSD. La frecuencia de malformaciones y retraso del desarrollo se evaluaron con χ^2 . Para el análisis estadístico se empleo el programa Sigma Stat 2.0 para Windows.

11. RESULTADOS

Glucosa

La concentración diaria de glucosa en el suero de las ratas control se mantuvo dentro de lo esperado (62.97 mg/dL), mientras que las concentraciones en el grupo DIAB se elevaron hasta 209.52 mg/dL. En el grupo D+Arg disminuyó la concentración del carbohidrato (28%) sin embargo, no presento diferencias significativas con respecto a este grupo. Los grupos D+Ins, D+Put, D+Spd y D+Spm disminuyeron las concentraciones de glucosa en un 73, 54, 60 y 54% respectivamente. (Tabla 2).

Con respecto a la concentración de glucosa sérica el día de sacrificio, el grupo CTR presento en promedio 103.08 mg/dL del carbohidrato, el grupo DIAB mostró un aumento del 400% (415 mg/dL) con respecto a CTR, los grupos D+Ins, D+Arg, D+Put, D+Spd y D+Spm no fueron significativamente mayores que el control; cabe resaltar que el grupo D+Spd presento las menores concentraciones de glucosa (126 mg/dL) de todos los grupos experimentales. (Figura 1).

Tabla 1. Concentración diaria de glucosa en sangre de ratas diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. Media \pm D.E. de cinco valores independientes. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. *P<0.001 con respecto al grupo CTR.

DÍAS DE GESTACIÓN	TRATAMIENTOS						
	CTR	DIAB*	D+Ins	D+Arg*	D+Put	D+Spd	D+Spm
4	72.8 \pm 5	120.3 \pm 8	89.2 \pm 5	67.6 \pm 7	67.6 \pm 5	63.6 \pm 5	71.4 \pm 5
5	64.8 \pm 5	112.2 \pm 5	56.2 \pm 6	103.4 \pm 5	60.8 \pm 5	79.6 \pm 5	71.2 \pm 6
6	66.6 \pm 5	197.0 \pm 9	60.3 \pm 4	131.2 \pm 8	70.0 \pm 6	81.4 \pm 6	108.6 \pm 8
7	63.0 \pm 5	227.4 \pm 8	70.2 \pm 8	172.2 \pm 9	141.6 \pm 9	93.6 \pm 5	123.2 \pm 4
8	57.4 \pm 6	270.6 \pm 8	73.0 \pm 9	151.6 \pm 8	100.2 \pm 7	79.4 \pm 7	68.6 \pm 10
9	61.4 \pm 5	216.8 \pm 8	92.8 \pm 5	157.2 \pm 4	101.4 \pm 5	93.4 \pm 8	127.0 \pm 7
10	60.2 \pm 7	213.0 \pm 9	107.0 \pm 6	216.2 \pm 9	102.4 \pm 6	92.6 \pm 8	108.0 \pm 6
11	61.6 \pm 5	258.8 \pm 8	78.6 \pm 5	166.0 \pm 8	108.4 \pm 8	89.4 \pm 5	94.2 \pm 5
12	59.0 \pm 8	269.6 \pm 10	60.8 \pm 7	196.4 \pm 8	107.3 \pm 7	76.6 \pm 5	104.2 \pm 5

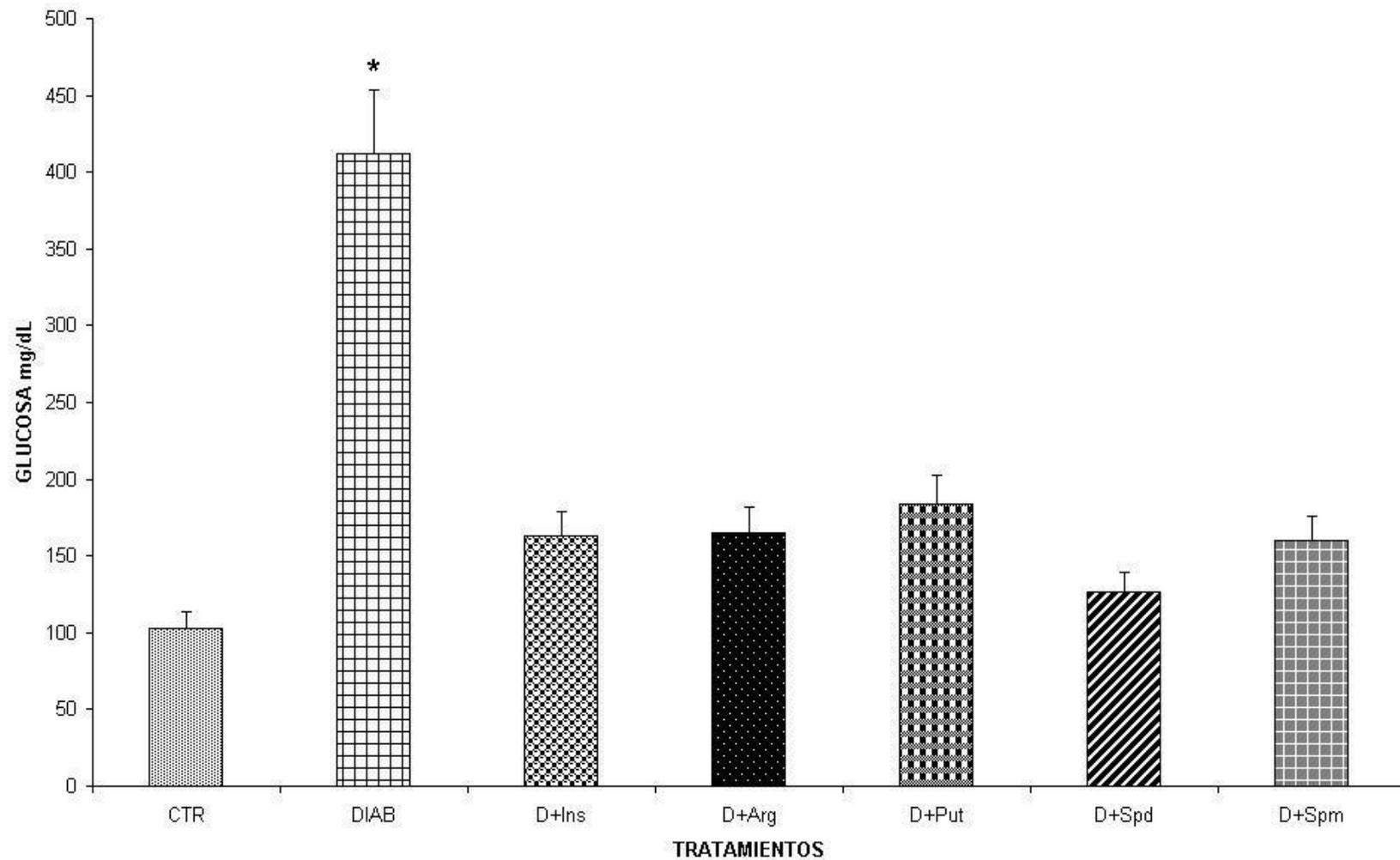


Figura 1. Concentración de glucosa en suero de ratas diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. Las ratas fueron sacrificadas al día 13 de gestación. Media \pm D.E. de cinco pruebas. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. * $p < 0.05$ con respecto al grupo CTR.

β Hidroxibutirato

La concentración de β -hidroxibutirato en sangre fue de 2.76 mmol/L para el grupo CTR, el grupo DIAB presentó un incremento del 210% con respecto a CTR, el resto de los grupos experimentales (D+Ins, D+Arg, D+Put, D+Spd y D+Spm) mostraron un aumento significativo (280, 280, 240, 388 y 290% respectivamente) comparados con CTR. Es de resaltar que la concentración de β -hidroxibutirato en el grupo D+Spd fue la más elevada (10.85 mmol/L) con respecto a los demás grupos experimentales (Figura 2).

Tamaño de camada

Del total de embriones recuperados de los cuernos uterinos para cada uno de los grupos, se pudo observar que el grupo CTR presentó una mayor frecuencia de embriones por camada. Los grupos DIAB, D+Ins y D+Arg presentaron un número de embriones menor que el grupo CTR y al comparar el total de embriones obtenidos para estos 4 grupos con el total de embriones obtenidos por camada en los grupos D+Put, D+Spd y D+Spm, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 3).

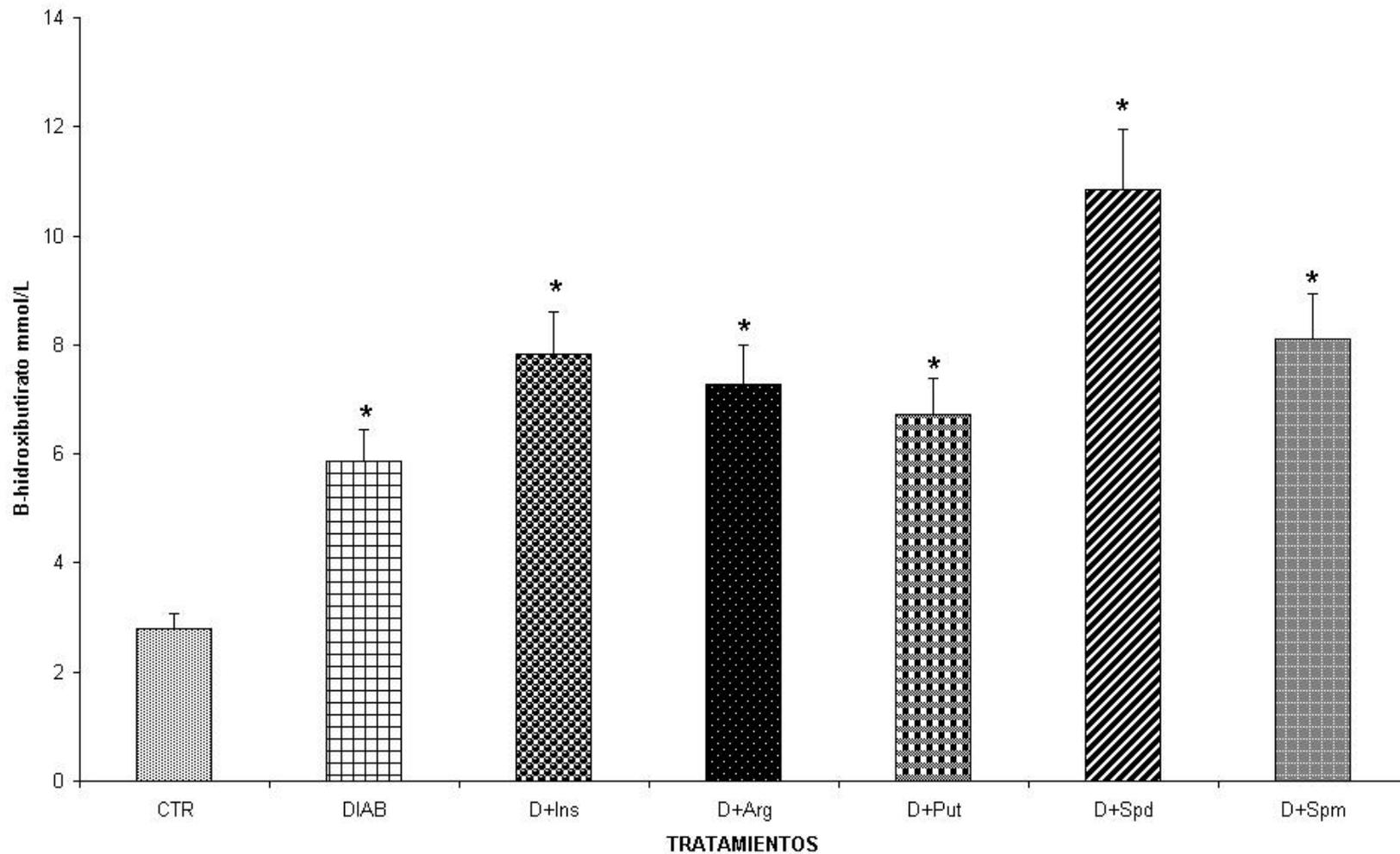


Figura 2. Concentración de β -Hidroxibutirato en sangre de ratas diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. Las ratas fueron sacrificadas al día 13 de gestación. Media \pm D.E. de cinco pruebas. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. * $p < 0.05$ con respecto al control.

Tabla 2. Tamaño de camadas cuantificadas en ratas diabéticas tratadas con 10 mM de L-arginina o 10 µM de poliaminas. Las ratas fueron sacrificadas al día 13 de gestación. Media + D.E. de cinco pruebas. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en cuanto al tamaño de camada. En cuanto a viabilidad *p<.001 con respecto al grupo CTR.

GRUPO	TAMAÑO DE CAMADA	VIABILIDAD
CTR	14 + 4.92	98.61%
DIAB	10 + 2.34	80%
D+Ins	10 + 3.08	48%*
D+Arg	11 + 2.38	83.93%
D+Put	12 + 1.64	85.25%
D+spd	13 + 2.16	95.31%
D+spm	12 + 4.61	90.32%

Peso de embriones

Con respecto al peso de los embriones, el grupo control presentó en promedio valores de 0.0633g, el grupo DIAB presentó una disminución significativa del peso de los embriones del 43%, el grupo D+Ins mostró en promedio una pérdida de peso del 45% y D+Arg del 39%; mientras tanto los grupos, D+Put, D+Spd y D+Spm no mostraron diferencias significativas con el grupo CTR con porcentajes de disminución en la masa corporal de los embriones del 24, 20 y 19% respectivamente. (Figura 3).

Frecuencia de reabsorciones y malformaciones

a) Reabsorciones

La frecuencia de reabsorciones en el grupo CTR fue del 1.3% del total de embriones, en los grupos DIAB y D+Ins esta cifra se incrementa significativamente hasta el 20 y 52% respectivamente. En los grupos D+Arg, D+Put, D+Spd y D+Spm, el porcentaje de reabsorciones no difiere significativamente del grupo CTR con valores de 16, 14, 9 y 9% respectivamente. Cabe resaltar que el grupo D+Ins mostró la frecuencia más alta de todos los tratamientos y estuvo muy por encima del grupo CTR e incluso fue significativamente mayor que el grupo DIAB (Figura 4).

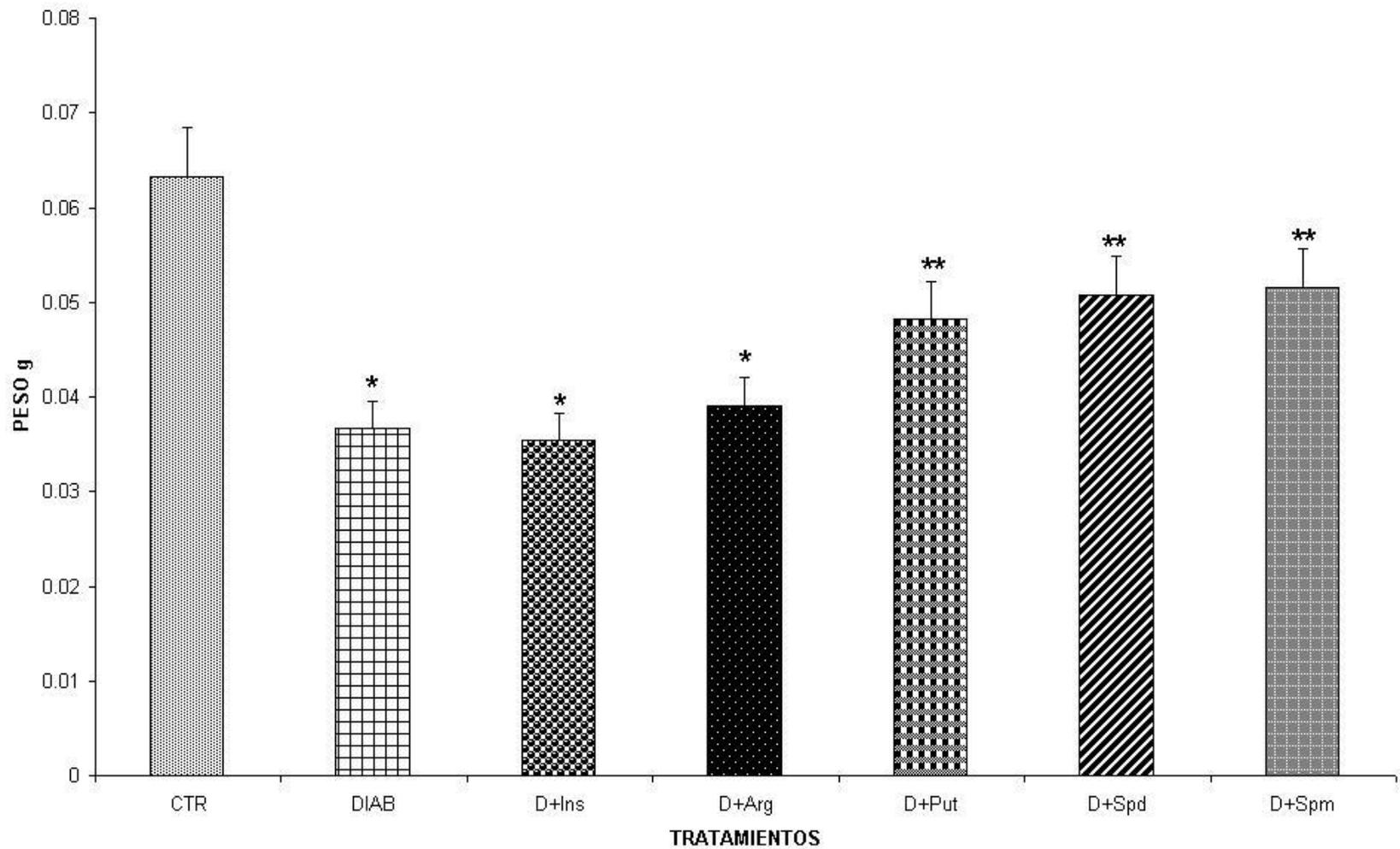


Figura 3. Peso en gramos de los embriones de día 13 de gestación de ratas diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. Media \pm D.E. de 57-60 embriones por grupo. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. * p <0.05 con respecto al grupo control, ** p <0.05 con respecto al grupo diabético tratado con solución salina.

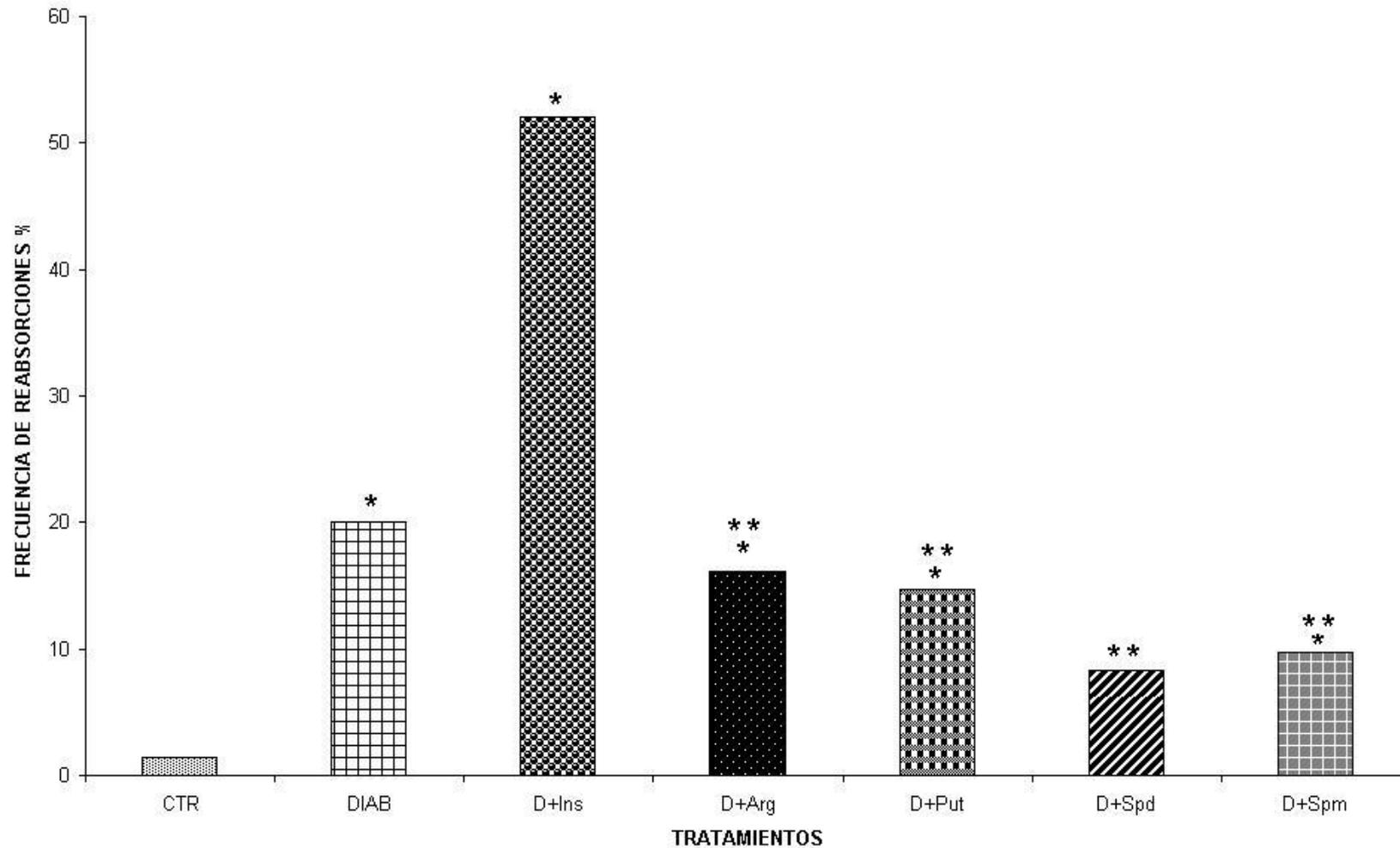


Figura 4 Frecuencia de reabsorciones en embriones de día 13 de gestación de ratas madre diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina.* $p < 0.001$ con respecto al control, ** $p < 0.001$ con respecto al grupo D+Ins.

b) Malformaciones

En cuanto a la frecuencia de malformaciones en el grupo CTR no se presentan; el grupo DIAB arroja una frecuencia del 68% de malformaciones, seguido del grupo D+Ins con 26%, siendo ambos significativamente mayores que el control. Los grupos D+Arg y D+Spm presentaron 10.7 y 9.67% respectivamente. Sin embargo los grupos D+Put y D+Spd presentan frecuencias del 4%, por lo que no tienen diferencias significativas con el grupo control (Figura 5).

Tipo de Malformaciones

En cuanto las malformaciones que se presentaron por grupo se observó que el grupo con valores más elevados fue D+Ins, ya que presentó al menos un embrión con cada una de las malformaciones que se consideraron, además se apreció que la malformación con mayor incidencia fue agnatia; mientras que las malformaciones clasificadas como microagnatia y cavidad abdominal expuesta se mantuvieron en valores ligeramente por debajo de esta, las malformaciones que se presentaron en mucho menor cantidad en comparación con la de mayor incidencia fueron retraso del crecimiento, exencefalia y anencefalia.

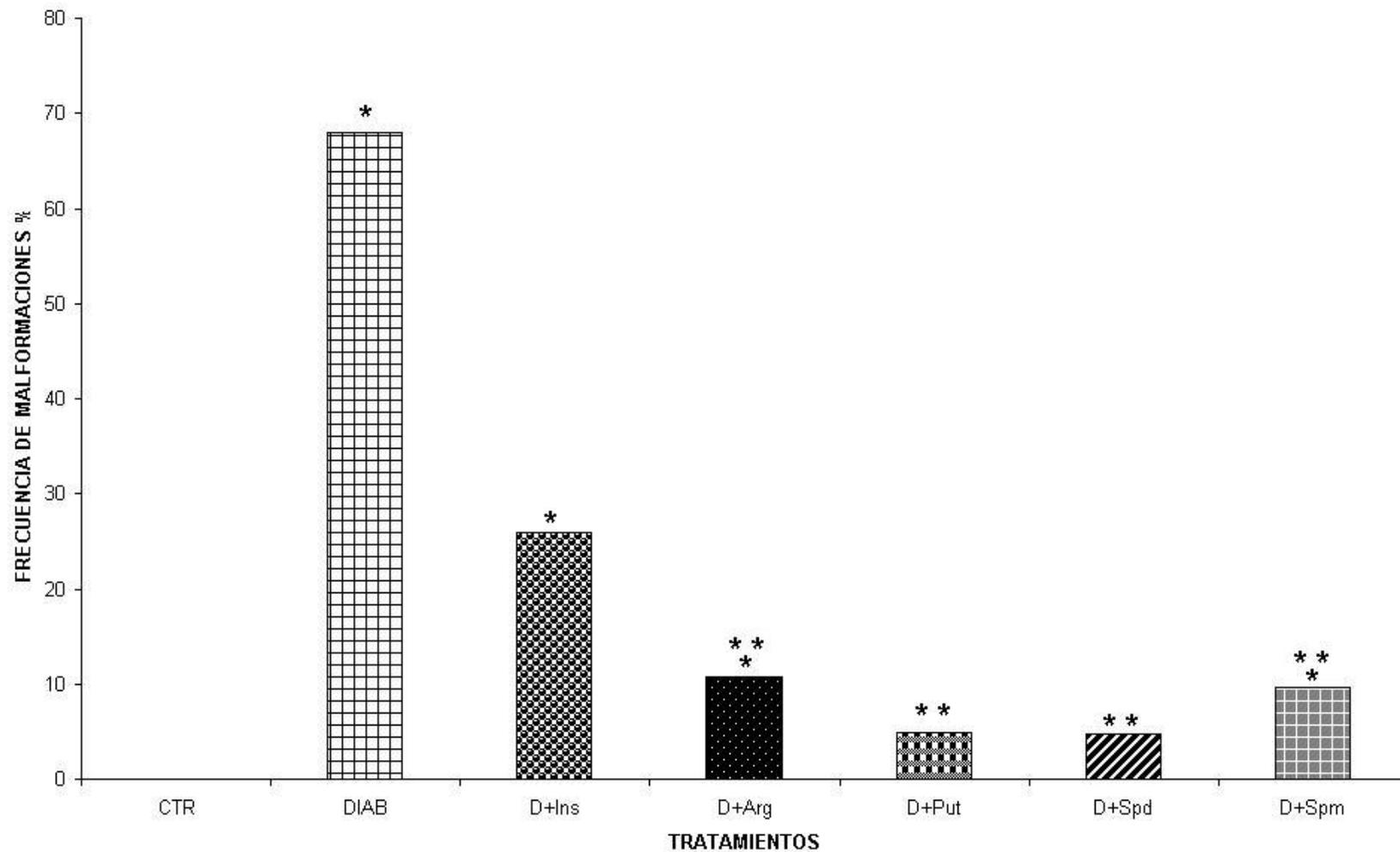


Figura 5. Frecuencia de malformaciones en embriones de día 13 de gestación de ratas madre diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina.* $p < 0.001$ con respecto al control, ** $p < 0.001$ con respecto al grupo DIAB,

El grupo DIAB fue el que presentó el índice más elevado de incidencia en retraso del desarrollo, y se mantuvo ligeramente por debajo del grupo D+Ins en cuanto a la incidencia de malformaciones, ya que presentó 7 de los 9 tipos de malformaciones encontradas, de las cuales la microagnatia, la falta de alguna extremidad y la anencefalia fueron las de más bajo índice en el grupo. Los grupos D+Put y D+Spd fueron los grupos que presentaron menor cantidad de malformaciones, ya que solo se observaron 2 y 3 embriones con malformaciones respectivamente (Tabla 4).

Por último, tanto el grupo D+Arg como el D+Spm manifestaron una incidencia por arriba de la encontrada en los grupos D+Put y D+Spd, sin embargo se mantuvieron por debajo de los grupos D+Ins y DIAB; además solo difirieron en una de las malformaciones presentes (Tabla 5, Figuras 6-12).

Tabla 3. Total de embriones (13 días de gestación) con malformaciones productos de ratas madre diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina.

TRATAMIENTOS	TOTAL DE EMBRIONES POR GRUPO	TOTAL DE EMBRIONES SIN DEFECTOS	TOTAL DE EMBRIONES CON DEFECTOS
CTR	72	72	0
DIAB	50	23	27
D+Ins	50	30	20
D+Arg	56	47	9
D+Put	61	59	2
D+Spd	64	61	3
D+Spm	62	56	6

Tabla 4. Tipos de malformaciones en embriones de día 13 de gestación de ratas madre diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina.

GRUPOS	AGNATIA	RETRASO DEL DESARROLLO	EXCEN-CEFALIA	ESPINA BIFIDA	MICRO-AGNAITA	FALTA DE EXTREMIDAD	ABDOMEN EXPUESTO	ANEN-CEFALIA.	DEGRA-DADO
CTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DIAB	3	26	5	0	1	1	0	1	3
D+Ins	7	2	1	2	4	2	4	1	3
D+Arg	1	4	0	0	0	0	2	0	2
D+Put	0	0	0	0	1	0	1	0	0
D+Spd	0	1	1	0	0	0	1	0	0
D+Spm	3	2	1	0	0	0	0	0	0

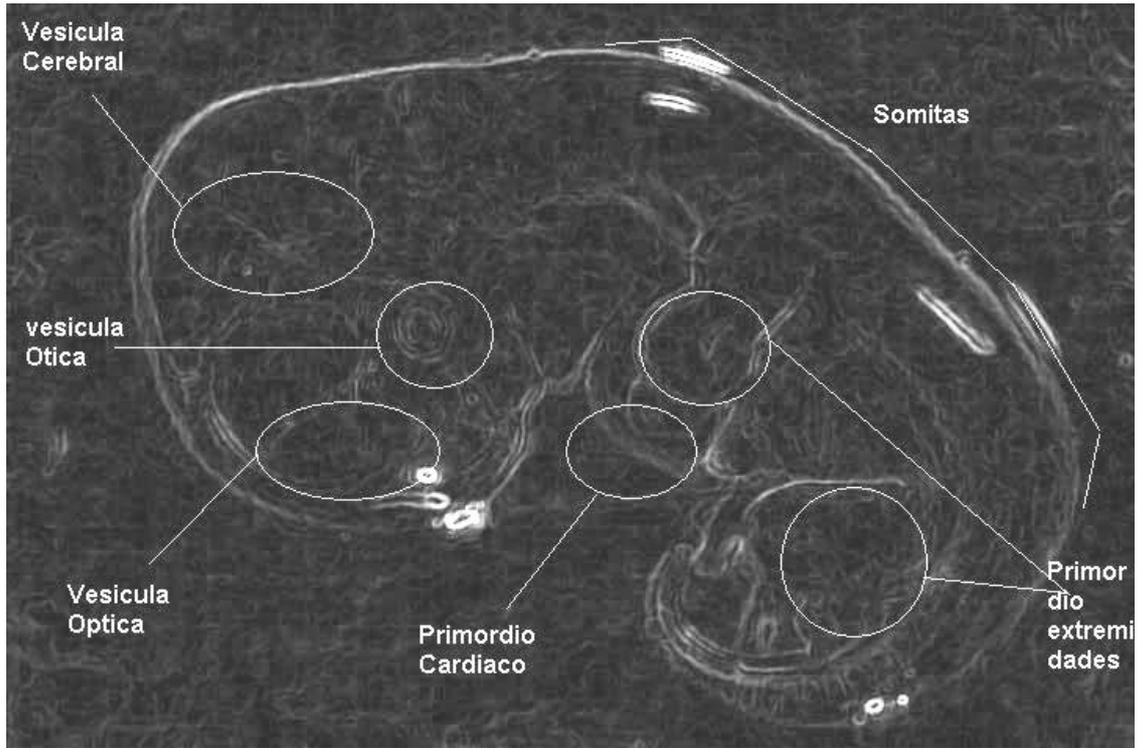


Figura 6. Embrión sano de 13 días de gestación producto de una rata madre no diabética, (CTR). Vista lateral.

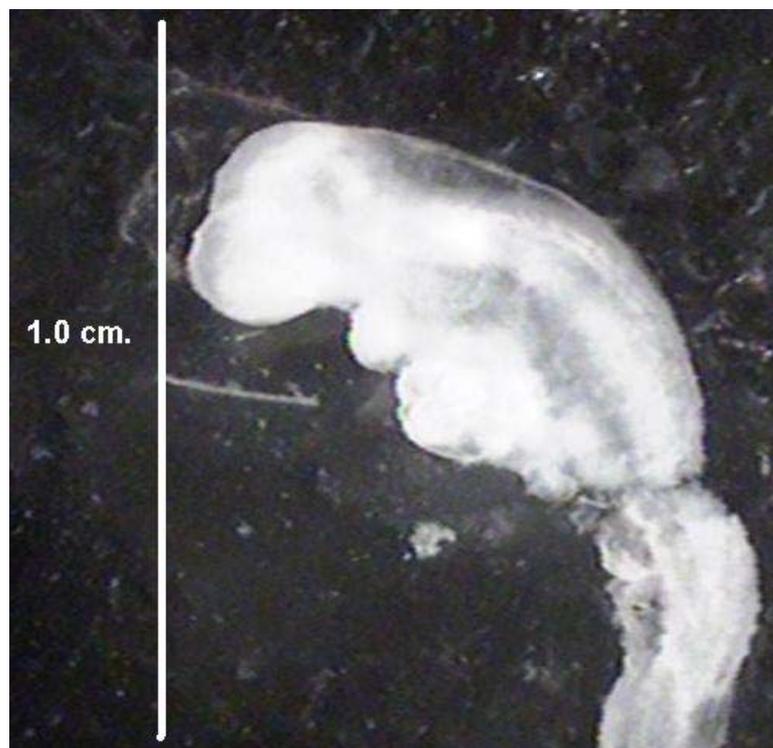
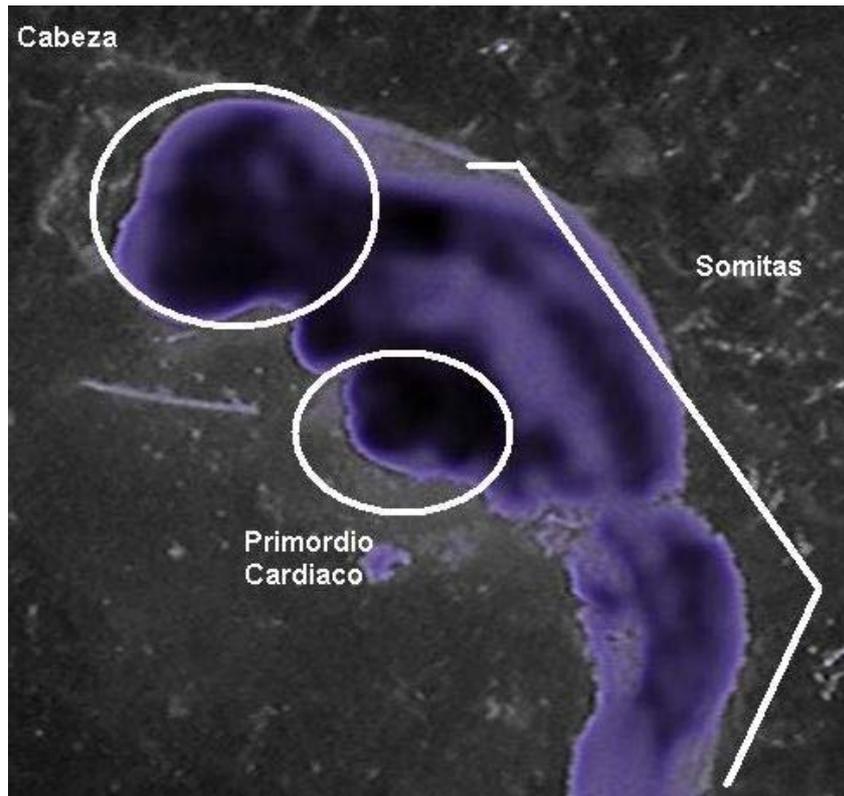


Figura 7. Embrión degradado de 13 días de gestación producto de una rata madre diabética tratada con solución salina (DIAB). Vista lateral.

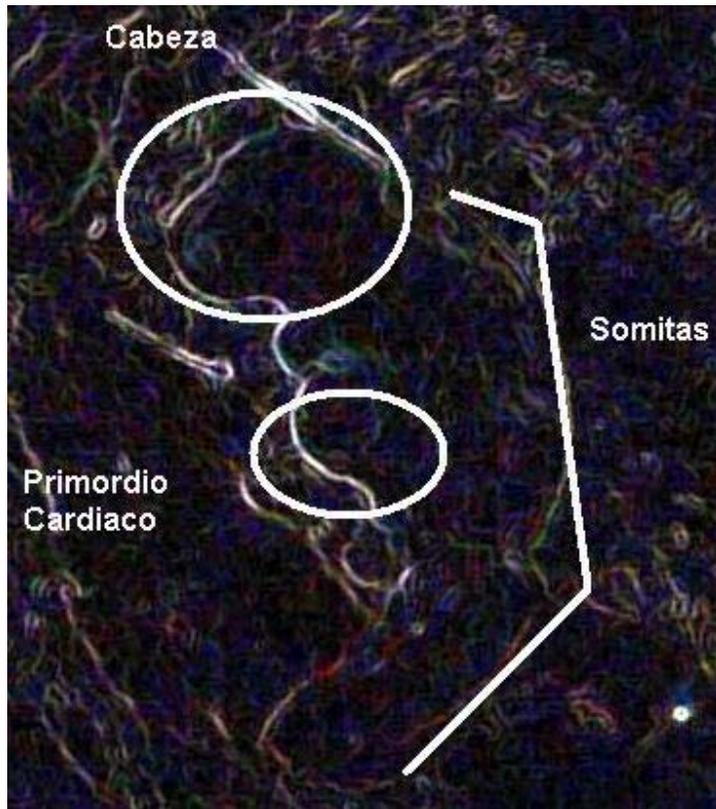


Figura 8. Embrión degradado de 13 días de gestación producto de una rata madre diabética tratada con insulina (D+Ins). Vista lateral.

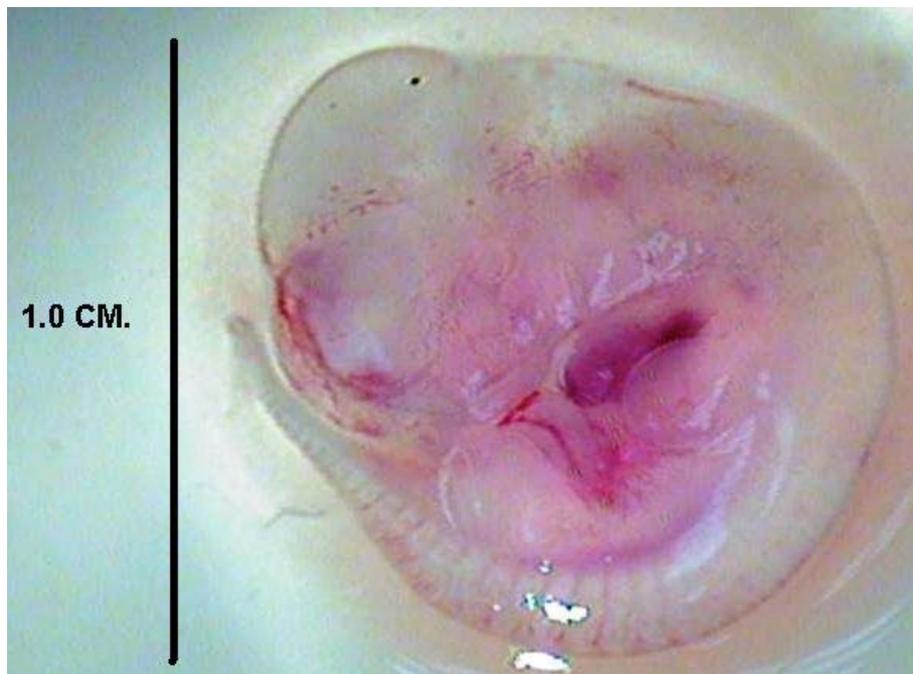
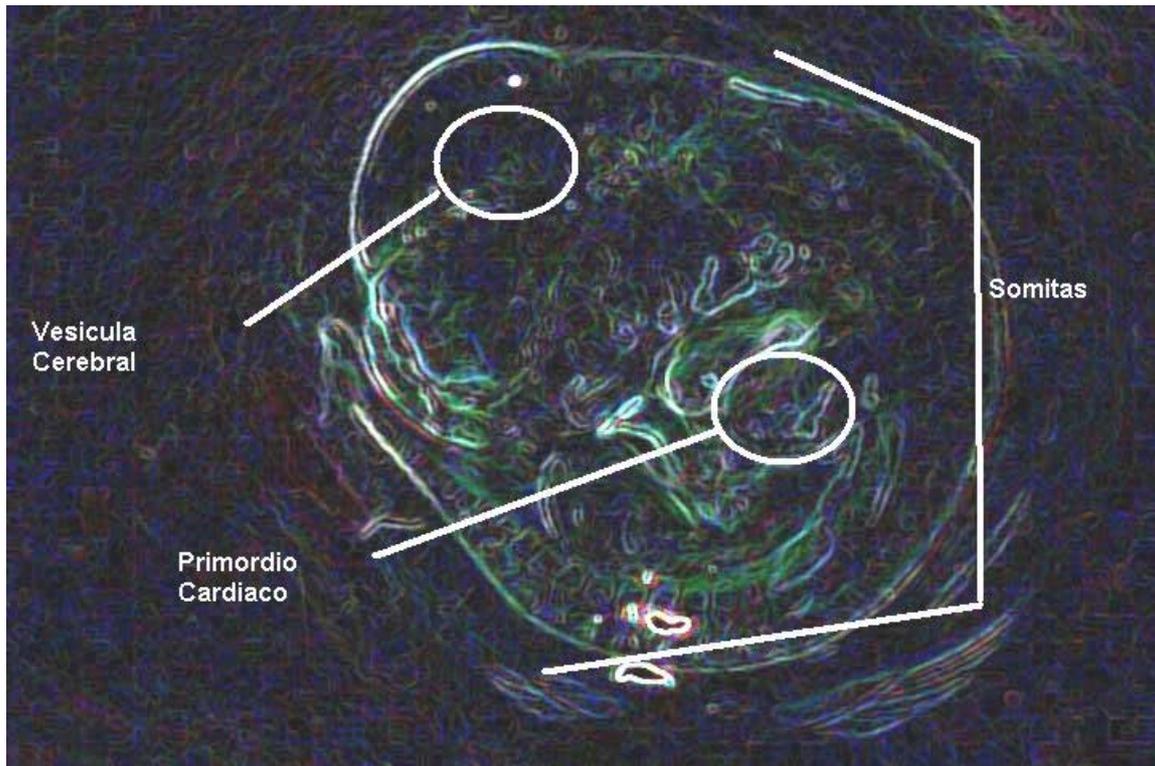


Figura 9. Embrión con retraso del desarrollo de 13 días de gestación producto de una rata madre diabética tratada con espermina (D+Spm). Vista lateral.

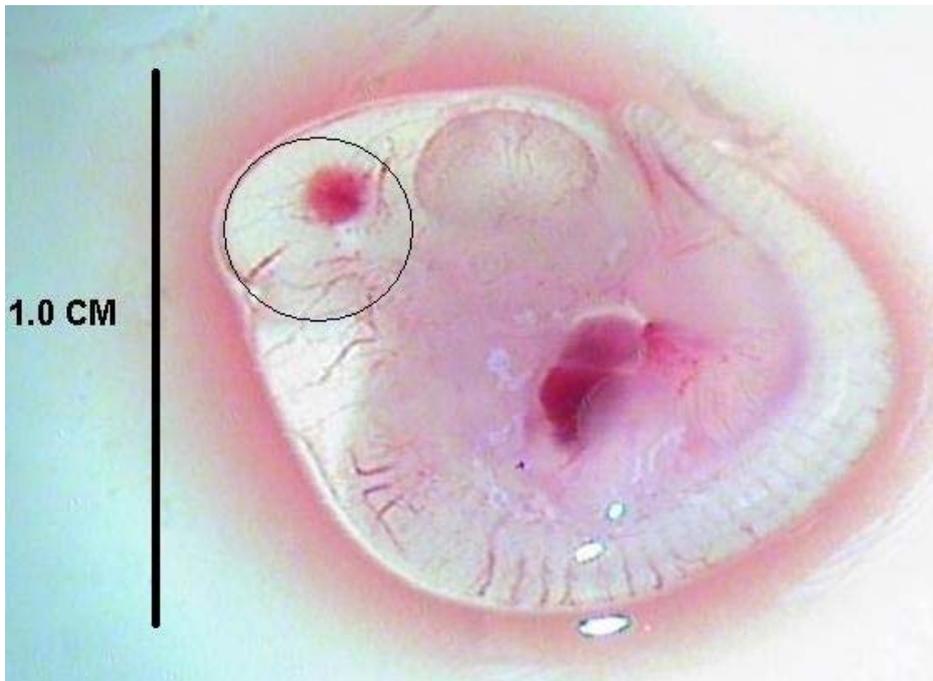
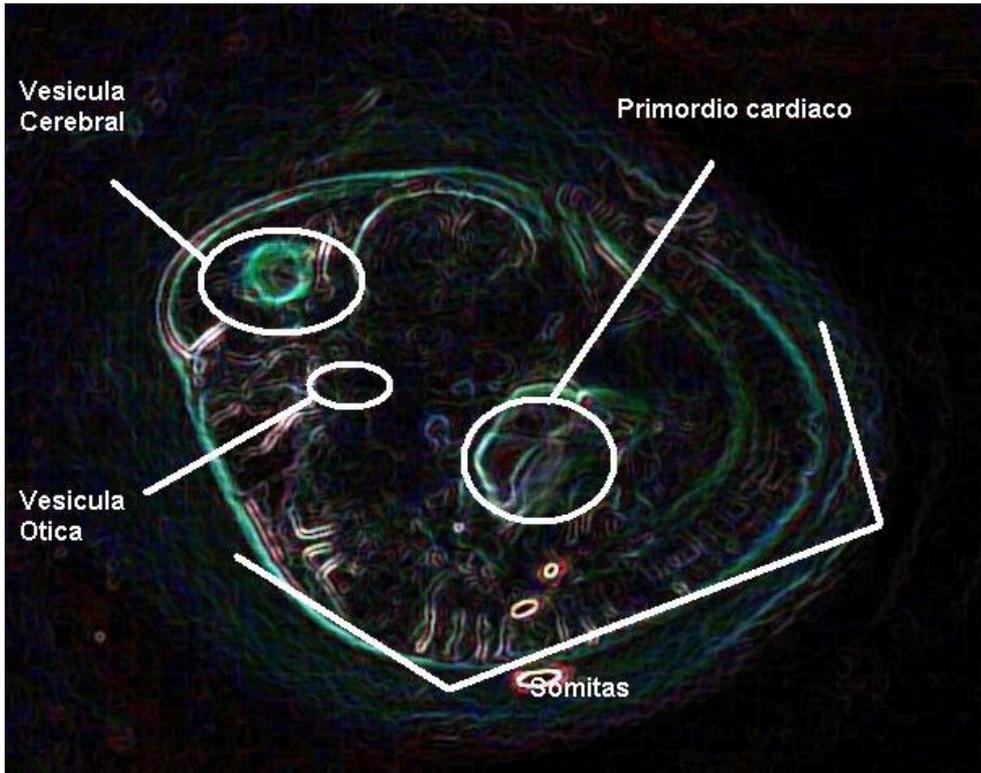


Figura 10. Embrión con excerebración de 13 días de gestación producto de una ratona madre diabética tratada con espermidina (D+Spd). Vista lateral.

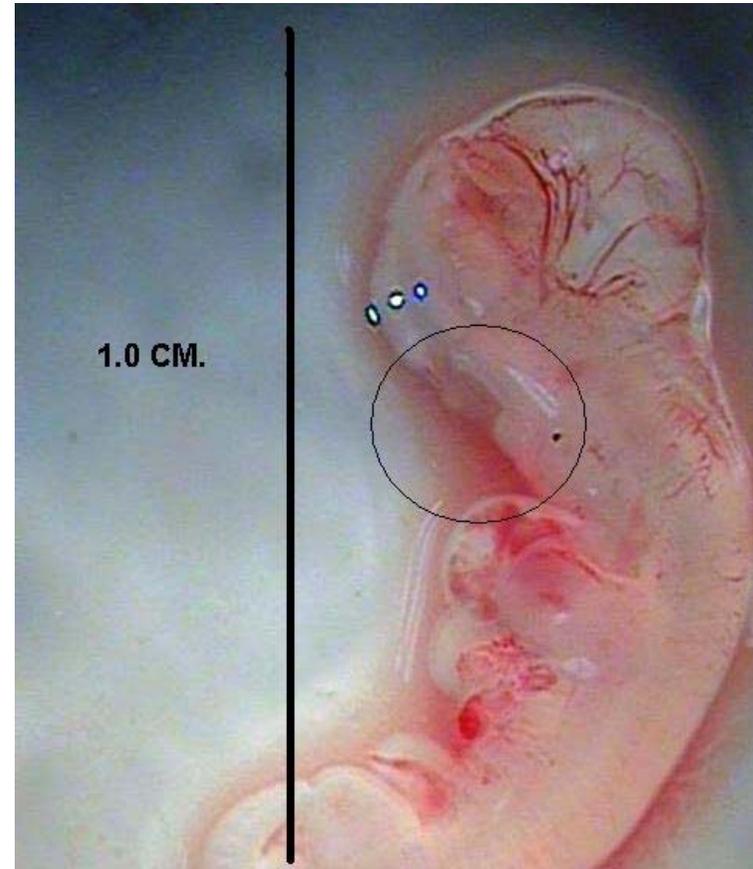
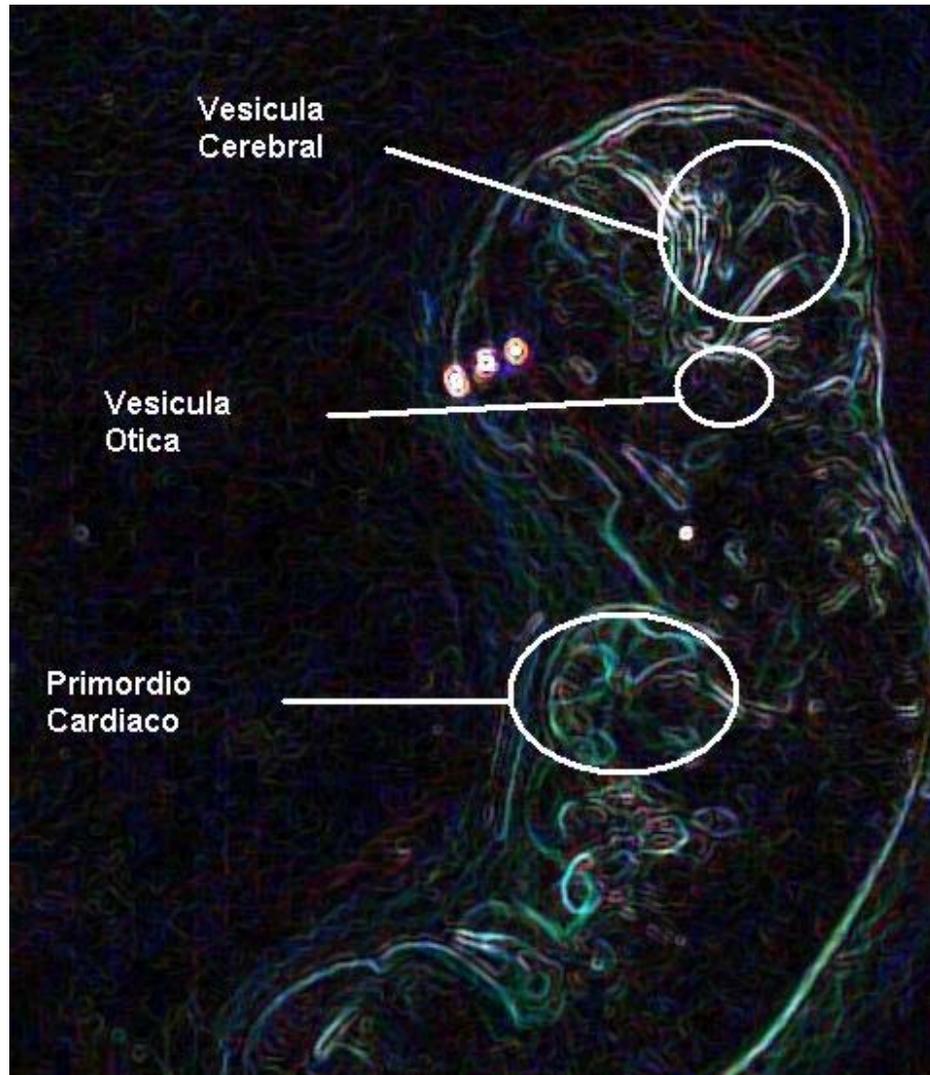


Figura 11. Embrión con agnathia de 13 días de gestación producto de una rata madre tratada con L-arginina (D+Arg). Vista lateral.

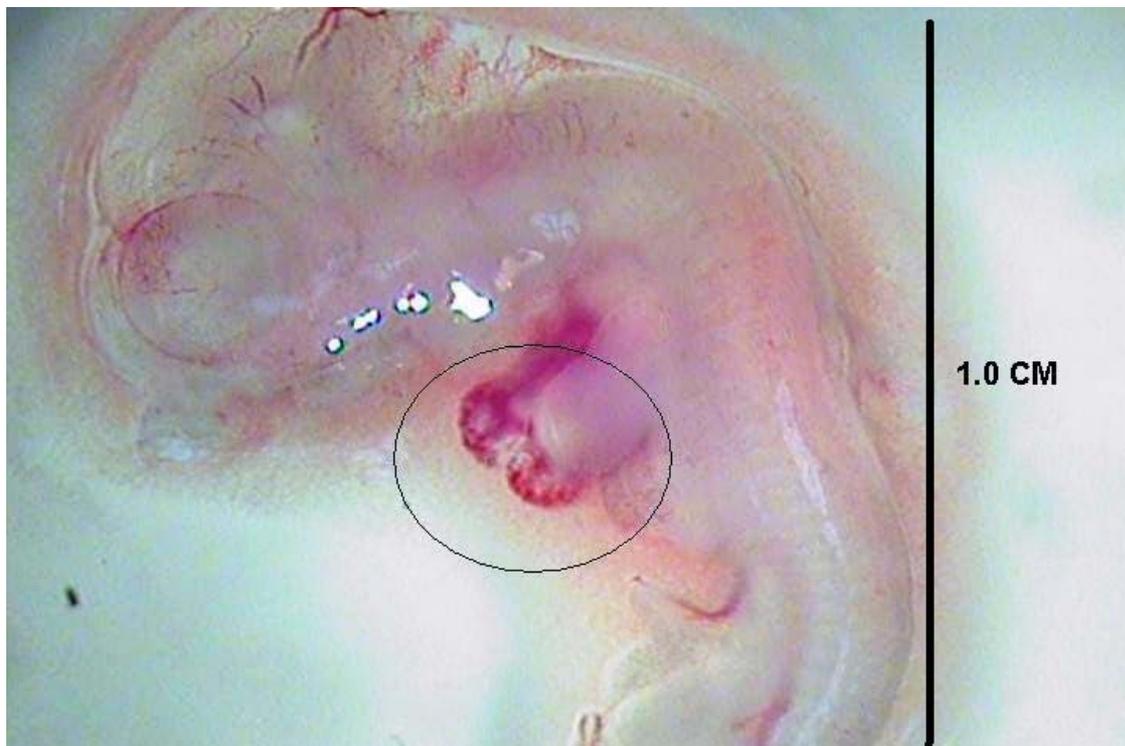
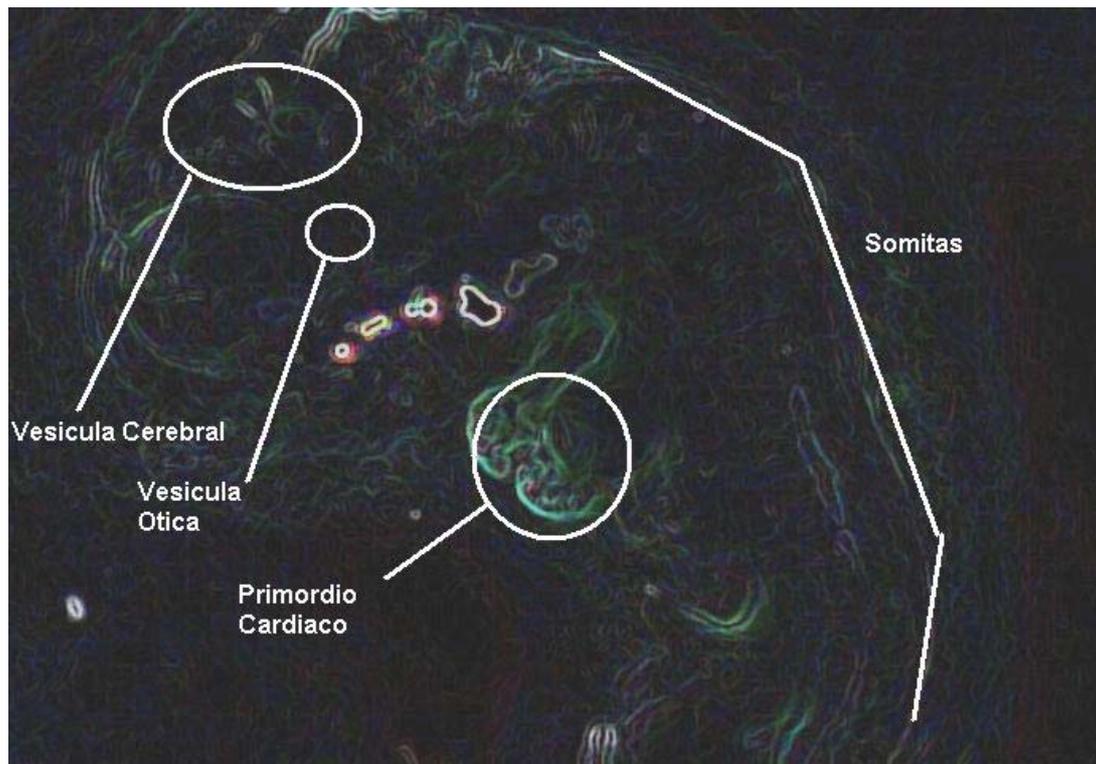


Figura 12. Embrión con cavidad abdominal expuesta de 13 días de gestación producto de una rata madre diabética tratada con putrescina (D+Put). Vista lateral.

TBARS

La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en el grupo CTR fue de 19.82 nmol MDA/g tejido, el grupo DIAB presentó concentración de 41.21 nmol MDA/g tejido, lo que representa un aumento del 208%, el grupo D+Ins ostentó un valor significativamente 723% mayor. Los grupos D+Arg y D+Spd mostraron valores similares estadísticamente al grupo DIAB, mientras que los grupos D+Put y D+Spm no poseen diferencias significativas con el grupo CTR mostrando concentraciones de 19 y 21 nmol MDA/g tejido respectivamente (Figura 13).

CAT

En el grupo CTR, la actividad de la catalasa es de 338 μ UI/mg proteína. Sin embargo, en el resto de los grupos la actividad aumenta significativamente en un 11471% rondando en todos los grupos aproximadamente 38.88 mUI/mg proteína. (Figura 14).

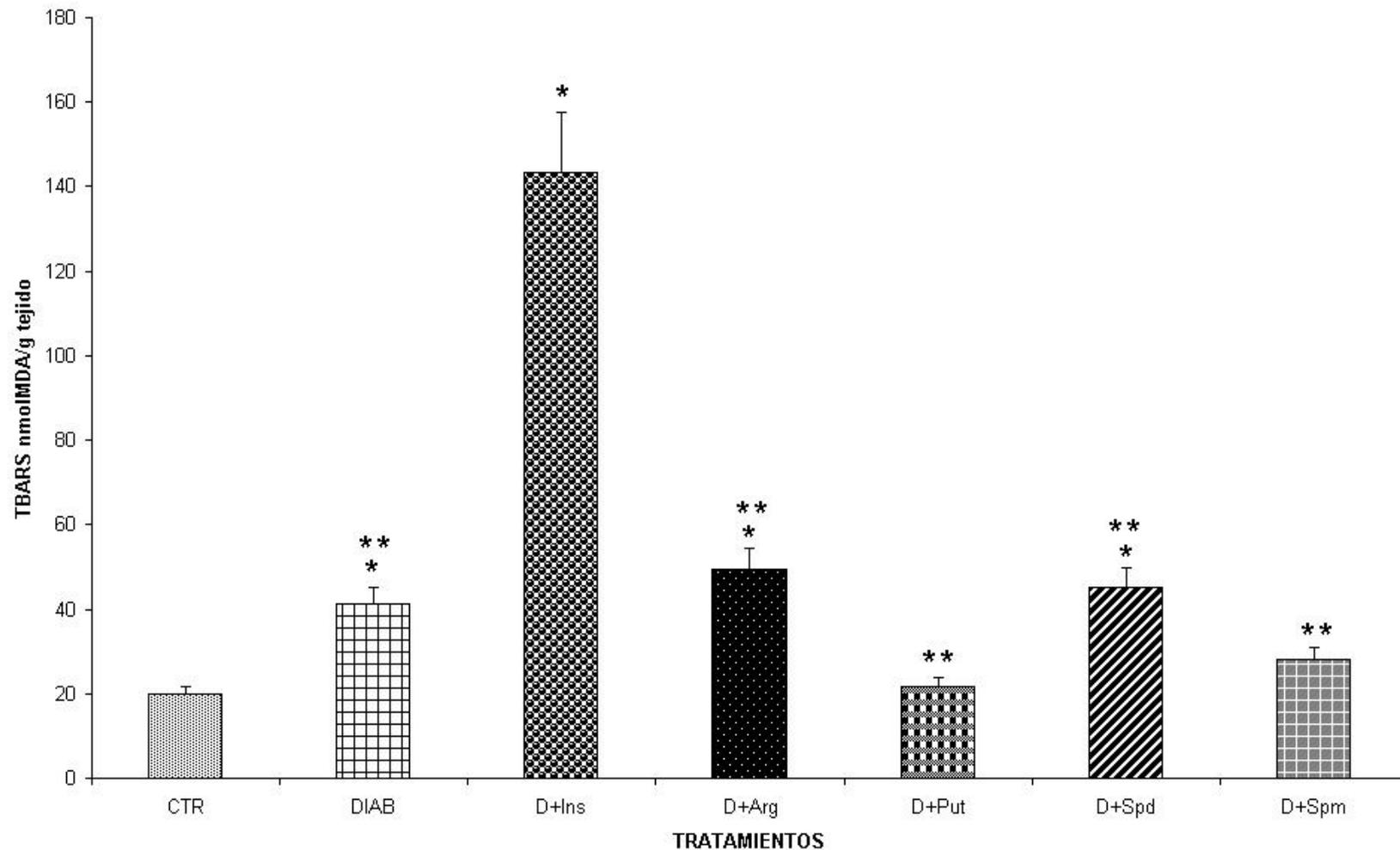


Figura 13. Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en embriones de día 13 de gestación de ratas madre diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. Media \pm D.E. de 59 embriones por grupo. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. * $p < 0.05$ contra el grupo control, ** $p < 0.05$ contra el grupo D+Ins.

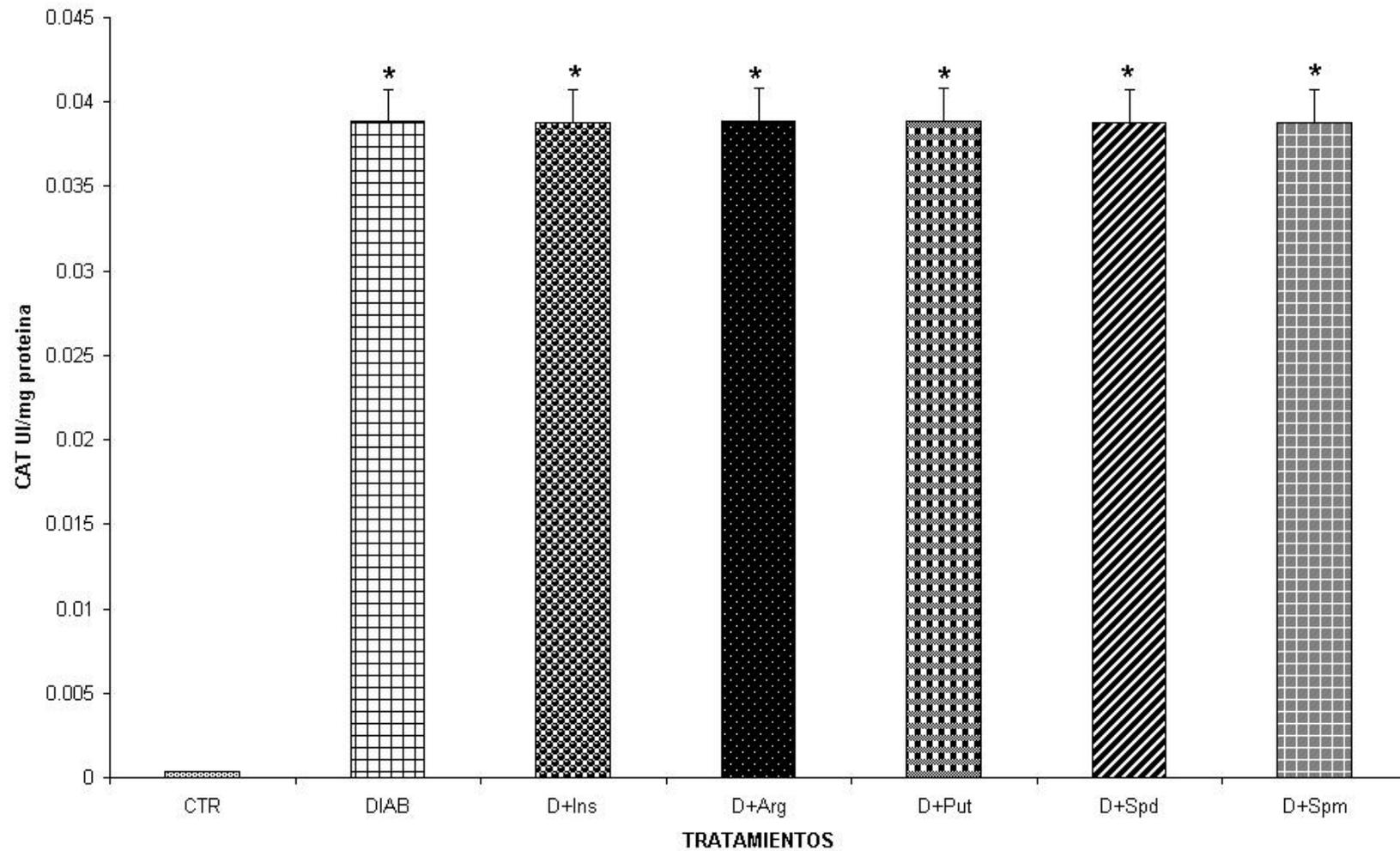


Figura 14. Actividad de Catalasa en embriones de día 13 de gestación de ratas madre diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. Media \pm D.E. de 57-60 embriones por grupo. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. * $p < 0.01$ con respecto al grupo control.

GPx

Referente a la actividad de glutatión peroxidasa, el grupo CTR presenta 25.79 $\mu\text{molNADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, los grupos D+Arg y D+Put no difieren significativamente de este valor con 24.72 y 28.39 $\mu\text{molNADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína respectivamente, los grupos DIAB, D+Ins, D+Spd y D+Spm poseen una actividad significativamente menor (19.76, 16.14, 20.61 y 19.87 $\mu\text{molNADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína correspondientemente) que el grupo CTR (Figura 15).

SOD

En cuanto a la actividad de superóxido dismutasa, el grupo CTR posee una actividad de 0.184 Unidades Mc Cord y Fridovich/mg proteína, el grupo DIAB ostentó un aumento significativo del 204% en la actividad de esta enzima, seguida del grupo D+Arg con un 144%, mientras que los grupos D+Ins, D+Put, D+Spd y D+spm no difieren significativamente del control. (Figura 16).

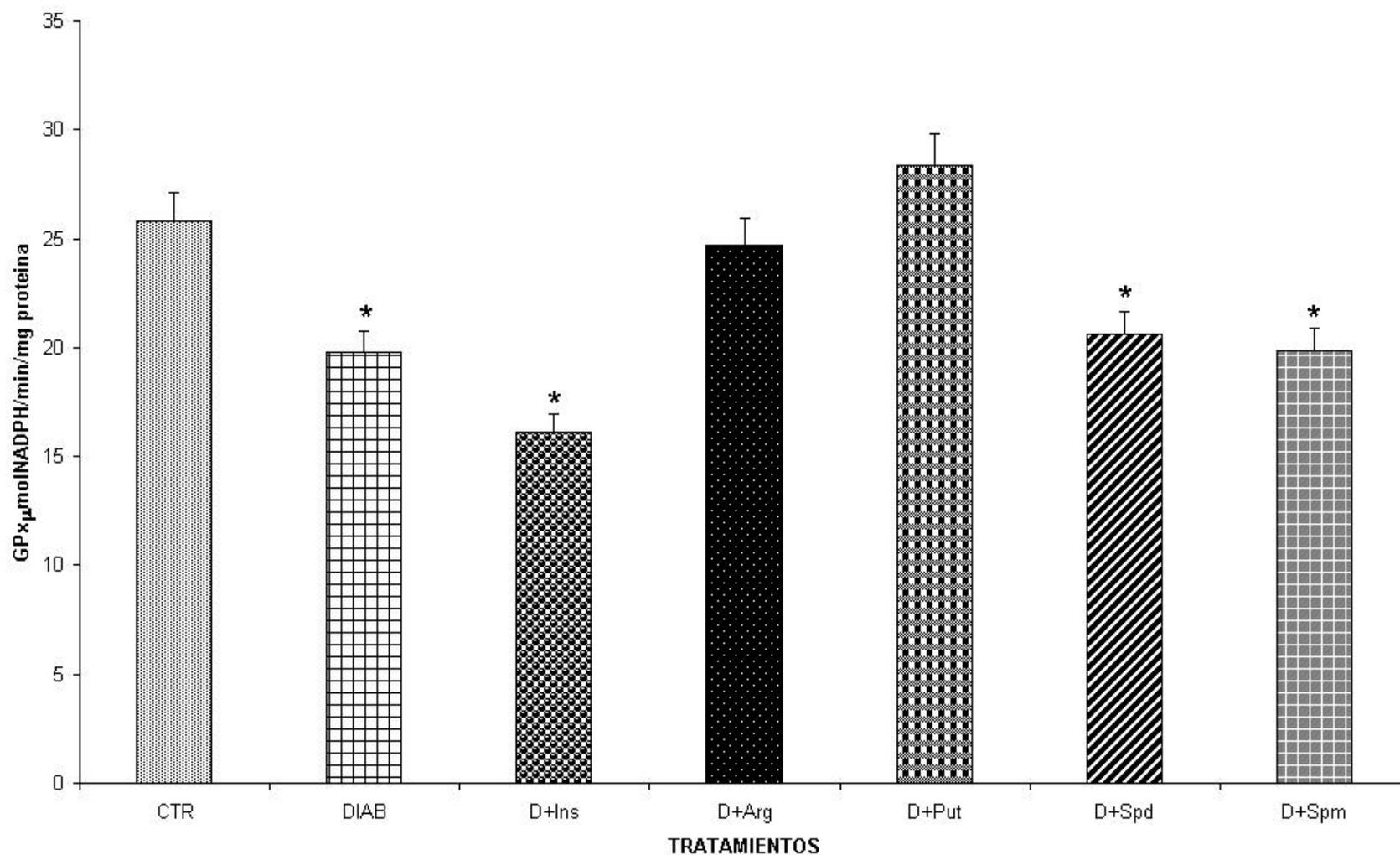


Figura 15. Actividad de Glutacion peroxidasa en embriones de día 13 de gestación de ratas madre diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μM de poliaminas. Media \pm D.E. de 57-60 embriones por grupo. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. * $p < 0.05$ con respecto al control.

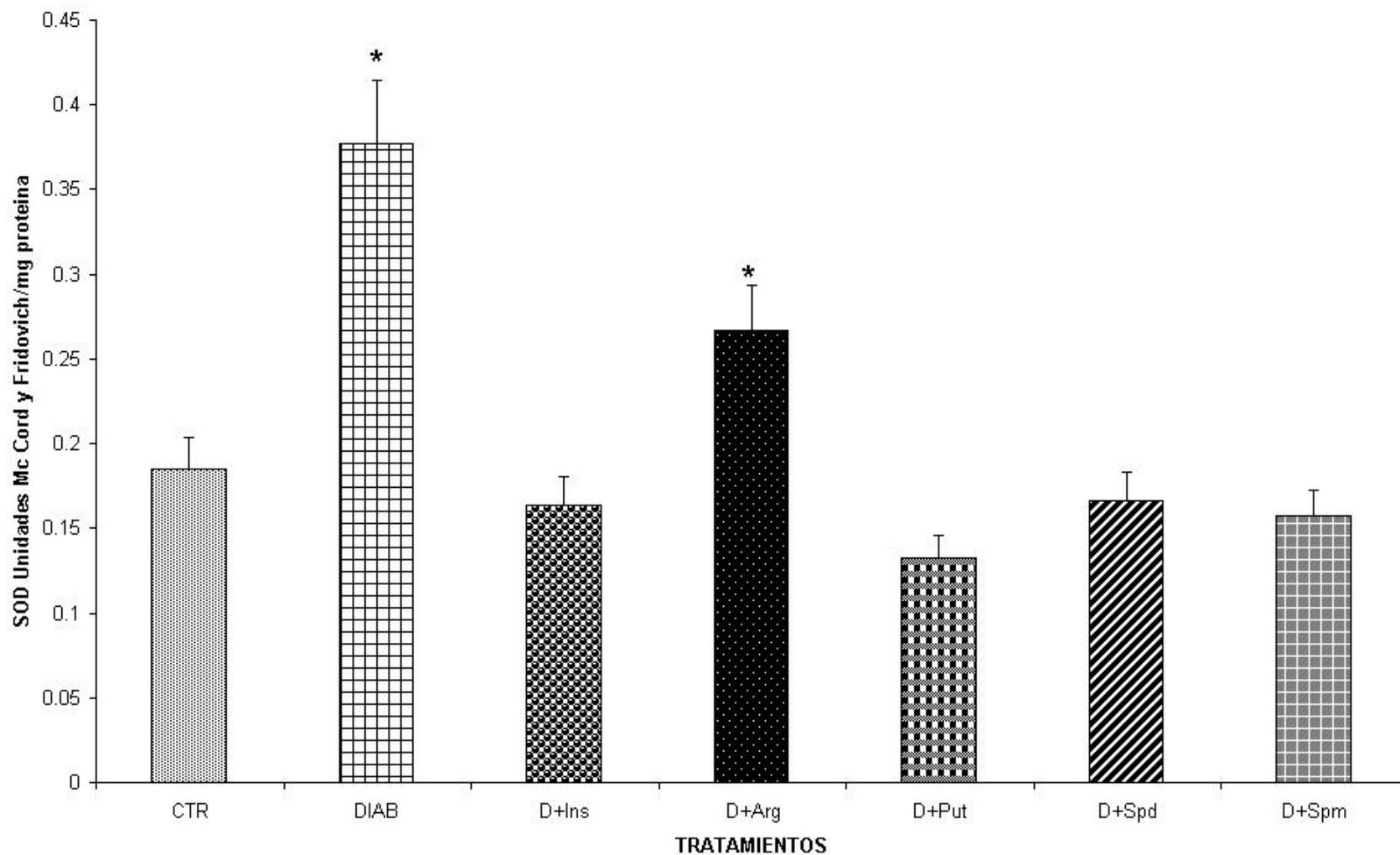


Figura 16. Actividad de Superóxido dismutasa en embriones de día 13 de gestación de ratas madre diabéticas tratadas diariamente con 1.0 ml de una solución 10 mM de L-arginina o 10 μ M de poliaminas. Media \pm D.E. de 57-60 embriones por grupo. CTR, grupo control; DIAB, grupo diabético tratado con solución salina; D+Ins, grupo diabético tratado con insulina; D+Arg, grupo diabético tratado con L-arginina; D+Put, grupo diabético tratado con putrescina; D+Spd, grupo diabético tratado con espermidina; D+Spm, grupo diabético tratado con espermina. * $p < 0.05$ con relación al grupo control.

12. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación indicaron que existen diferencias, en morfología, tipo y frecuencia de reabsorciones, peso, nivel de desarrollo y actividad de enzimas depuradoras de especies reactivas de oxígeno entre los embriones de ratas diabéticas sin tratamiento y aquellas tratadas con insulina respecto a los embriones de ratas sanas. En las ratas diabéticas tratadas con las poliaminas putrescina, espermina, espermidina o su precursor L-arginina, se observó un efecto protector de dichas moléculas en los embriones en contra de la teratogénesis causada por DM; además de encontrar una tendencia a la normalización de la concentración de glucosa en sangre y en suero de las ratas madres.

Diversos autores han mencionado que existen problemas al evaluar el efecto teratógeno de la diabetes mellitus tipo 1. La literatura especializada se encuentra llena de reportes contradictorios sobre los efectos de concentraciones anormales de glucosa, insulina o ambas sobre los *concepti*. Los principales problemas en los modelos experimentales consisten en la interrelación entre la concentración de glucosa e insulina, ya que es difícil modificar una de ellas como variable sin que esta afecte a la otra (Sadler, 1980; Kalter, 1996).

Debido a que en un modelo *in vivo* se pueden cuantificar las dos variables (glucosa e insulina) al mismo tiempo, resulta idóneo para evaluar la teratogénesis por DM por dos factores; primero, dentro de un organismo, la auto-oxidación de la glucosa (Ha y Lee, 2000; Nishikawa, et. al., 2000); y los productos de glicosilación avanzada (PGA) (Zhang *et al.*, 1997), son una fuente importante de EROs y definen de manera bioquímica la teratogénesis por hiperglucemia. Segundo, los mecanismos de apoptosis celular explicados anteriormente definen de forma molecular el efecto teratogénico de la DM.

El tamaño de camada no se ve afectado por la condición diabética, sin embargo, un evento que sí puede influir en el mismo es el peso de la hembra. Con respecto a la baja viabilidad, obtenida en los grupos DIAB y D+Ins se debe

a los efectos teratogénicos que produce el estado diabético y que ha sido descritos (Simán, y Eriksson, 1997; Eriksson, 1991 y Sadler *et al.*, 1993), lo que se relaciona con el porcentaje de reabsorciones. Los valores obtenidos en el grupo D+Ins implican que la insulina aumenta drásticamente el porcentaje de reabsorciones, elevándolo al doble con respecto al grupo DIAB, las reabsorciones se producen por la incompatibilidad del desarrollo embrionario con un incremento en la concentración de lípidos y cambios en la disponibilidad de aminoácidos, el estrés oxidativo causado por los PGA y la vía de aldosa reductasa, actúan sinergizando los efectos de la auto-oxidación de la glucosa, estos eventos probablemente desencadenen un evento apoptótico. El número de embriones obtenidos en los grupos tratados con poliaminas es notablemente mayor que en los grupos arriba citados, lo que supone una disminución significativa de reabsorciones, lo que significa que estas moléculas protegen de alguna forma, aun no conocida a los embriones del estrés oxidativo. Esto corrobora los resultados de Méndez y Palomar-Morales (1999) que sugirieron una posible prevención por parte de las poliaminas de efectos embriotoxicos causados por la hiperglucemia-hipercetonemia.

En el peso de los embriones se ve reflejado nuevamente la misma tendencia; más del 50% de los embriones del grupo tratado con solución salina presenta un retraso del crecimiento, lo que se expresa en su bajo peso. En el caso del grupo tratado con insulina y en el tratado con L-arginina, no se encontraron diferencias significativas en el promedio del peso con respecto al peso de los embriones de ratas diabéticas tratadas con solución salina; sin embargo, la causal de esto no es retraso en el desarrollo, puesto que los porcentajes de esta malformación en dichos grupos son menores que en el grupo tratado con L-arginina, esto se debe a que en el grupo tratado con insulina gran parte de los embriones presentan malformaciones de algún tipo, esto impacta en su peso al nacer o grado de desarrollo, mientras que en el grupo tratado con L-arginina, a pesar de disminuir el porcentaje de malformaciones y presentar pocos casos de retraso del crecimiento, se presenta en promedio bajo peso, la explicación mas plausible para este fenómeno radica en la capacidad del la L-arginina de inducir la secreción de insulina, pues como se ha reportado (Szkudelski, 2001; De Haro *et al.*, 2004) la aloxana no es capaz de destruir en

su totalidad las células β pancreáticas, por lo que aquellas que quedan, responden al tratamiento con el aminoácido produciendo insulina, lo que explica el parecido de este grupo con el grupo diabético tratado con dicha hormona pancreática. De esta forma, el grupo tratado con L-arginina mantuvo concentraciones de glucosa inferiores al grupo diabético tratado con solución salina, sin mostrar diferencias significativas con el grupo diabético tratado con insulina, lo que apoya la hipótesis de concentraciones similares de insulina en ambos grupos; esto no puede ser afirmado categóricamente por esta investigación, puesto que no fue cuantificada la concentración de dicha hormona.

Bajo las condiciones del presente trabajo, se encontró que el grupo diabético tratado con solución salina presentó un elevado porcentaje de malformaciones (del 68%) al compararlo contra el grupo CTR (0%), esto era esperado y concuerda con los reportes de diversos autores (Sadler *et al.*, 1993; Diamond *et al.*, 1989; Eriksson *et al.*, 1991; Eriksson *et al.*, 1987; Green *et al.*, 1989; Cousins, 1991; Freinkel, 1979; etc.), de estas malformaciones la mayor fue el retraso del desarrollo (52%), seguida de exencefalia (10%), embriones degradados o en proceso de reabsorción (6%), microagnatia (2%), anencefalia (2%) y falta de extremidades (2%): todas estas malformaciones se encuentran reportadas y bien documentadas.

El grupo diabético tratado con insulina presentó la mayor incidencia de malformaciones (26%), de tal forma cubre todos los tipos manejados en el presente trabajo; la malformación de mayor incidencia en este grupo fue la agnatia con 14%, a pesar de que no era esperado encontrar malformaciones en este grupo debido a los antecedentes (Palomar, 1998), cabe resaltar que fueron utilizadas cepas distintas de ratas, en el presente trabajo fue utilizada la cepa *Wistar*, mientras que Palomar (1998) utilizó *Sprague-Dawley* y la razón para esta discrepancia radica en las pequeñas diferencias genómicas entre cepas, que pueden influenciar marcadamente la susceptibilidad a los efectos de la diabetes materna en las crías (Grill *et al.*, 1991).

El motivo del comportamiento de este grupo es que la insulina genera EROs por un mecanismo dependiente de NAD(P)H y Fosfatidilinositol 3'-cinasa (Ceolotto *et al.*, 2004) lo que probablemente desencadene un evento apoptótico por altas concentraciones de EROs, lo cual explica además de las malformaciones y reabsorciones, el aumento en las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, las cuales indican de forma indirecta la concentración de especies reactivas de oxígeno (Okhawa *et al.*, 1979), este planteamiento también explica la concentración elevada de TBARS del grupo diabético tratado con L-arginina, ya que, como anteriormente fue mencionado, éste aminoácido es un potente secretagogo de insulina, y como esta genera especies reactivas que al combinarse con las provenientes de la auto-oxidación de la glucosa, lo que resulta en que el potencial teratogénico de la diabetes es sinergizado.

Los grupos diabéticos tratados con las poliaminas putrescina o espermina presentaron en general un peso más parecido al control, lo cual puede explicarse debido a la protección que ejercen las poliaminas en estos grupos en contra de las especies reactivas de oxígeno; que, como se puede observar en la concentración de TBARS mostraron una tendencia a disminuir e igualar al CTR, que coincide con lo reportado anteriormente en diversos trabajos (Gramzinski *et al.*, 1990; Palomar, 1998; Tabor, 1984).

No obstante que el grupo tratado con espermidina no mostró diferencias significativas en cuanto al peso de los embriones con los grupos antes mencionados, ostentó concentraciones de TBARS más elevadas en comparación al grupo control, esto debido a que la espermidina probablemente evita la formación de radicales libres provenientes de la oxidación de la glucosa, por algún mecanismo aún no conocido; proceso que se ve reflejado en la concentración de glucosa sérica presentada por este grupo. La vía de producción de EROs para este grupo forzosamente necesitó ser la unión no específica que ocurre entre ésta y diversas proteínas formando productos de glicosilación avanzada (PGA), las cuales a su vez pueden generar EROs (Zhang *et al.*, 1997).

Los grupos diabéticos tratados con poliaminas normalizaron las concentraciones de glucosa sérica, debido a que como se ha reportado con anterioridad (Méndez y Palomar, 1999) revierten parcialmente la hiperglucemia; aunque en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre el grupo diabético tratado con insulina y los grupos tratados con L-arginina y con poliaminas, con lo que se puede argumentar que las concentraciones de glucosa sérica en este reporte se revirtieron a valores normales, puesto que no hubo diferencias significativas comparados con el grupo control, en cuanto al grupo diabético tratado con L-arginina, era de esperarse un efecto semejante por ser un precursor de las poliaminas, aparte de ser un secretagogo de insulina. Sin embargo, sólo normalizó las concentraciones de glucemia diaria durante los primeros 8 días de tratamiento, al igual que el grupo diabético tratado con putrescina, ya que a partir del día 9, éstas se elevaron, aunque se mantuvieron con diferencias significativas por debajo del grupo diabético tratado con solución salina.

Por otra parte, los grupos diabéticos tratados con espermina o espermidina mantuvieron la normoglicemia a lo largo del tratamiento, estos resultados difieren de los antecedentes, la explicación mas plausible recae de nuevo, en las diferentes cepas utilizadas o incluso en lo variable que es la concentración de glucosa en sangre para los roedores, y que depende en la mayoría de los casos de condiciones de crianza en el bioterio, principalmente luz, temperatura, humedad, alimentación y espacio (Vázquez, 1998).

A pesar de la normalización de la concentración de glucosa sérica, no se presentó esta misma tendencia en cuanto se refiere a concentración sanguínea de β -hidroxibutirato en ningún grupo experimental, lo cual coincide con antecedentes (Méndez *et al.*, 1999; Palomar, 1998) en los que se ha reportado una tendencia a la baja en la hipercetonemia, mientras que, en el presente estudio, no se manifestó una propensión a disminuir como en dichos trabajos, este resultado se atribuye a las diferencias en cepas, crianza y manejo en el bioterio. Este fenómeno explica con precisión el hecho de que se presentasen malformaciones en todos los grupos experimentales, por supuesto sin llegar a las frecuencias de aparición en los grupos diabéticos tratados con solución

salina e insulina, debido al potencial teratógeno del β -hidroxibutirato, el cual es incluso mayor que el de la glucosa por sí misma a causa de su capacidad de liberar EROs al descomponerse (Buchanan *et al.*, 1994; Shubert *et al.*, 1996). De cualquier forma, aunque la concentración de dicho compuesto no descienda a niveles similares a los presentados por el grupo testigo, las poliaminas presentan un efecto protector, en la madre contra la hiperglucemia y en los *concepti* contra las malformaciones.

En modelos *in vitro* (Ornoy *et al.*, 1999) fue encontrado un decremento en la actividad de SOD y CAT en embriones y sacos vitelinos de 10.5 días, cultivados por 24 horas en suero de ratas diabéticas. Sin embargo, bajo las condiciones del presente ensayo, los niveles de la actividad de SOD en los embriones del grupo diabético con tratamiento de solución salina son superiores de manera significativa a los del grupo CTR e igualados por el grupo tratado con L-arginina, mientras que en la actividad de CAT, el grupo control mantiene niveles de actividad muy por debajo de todos los grupos experimentales que fueron inducidos al estado diabético mediante aloxana; esto no es un fenómeno nuevo, ya que otros autores establecieron con antelación el efecto observado en este trabajo (Allen y Balin, 1989) y se relaciona con el hecho de que estas dos enzimas sean las depuradoras más importantes en los organismos, y al existir estrés oxidativo, su actividad aumenta para compensarlo y permitir el desarrollo celular normal.

Un incremento en la generación de EROs puede y debe afectar el mecanismo entero de defensa antioxidante (Allen, 1991), además, fue reportado que los cambios en los mecanismos de defensa antioxidante de los embriones atribuibles a la diabetes en modelos *in vivo*, probablemente no impliquen genes relacionados con la descomposición de peróxido de hidrógeno, lo cual no se observa *in vitro* (Eriksson *et al.*, 1998), este proceso de aumento de actividad, tanto de CAT como de SOD, se explica como un evento de defensa solo detectable en modelos animales y su causa, presumiblemente, se encuentre en el incremento de la traducción de mRNA de estas enzimas depuradoras (Zaken *et al.*, 1999), pero, por el momento la demostración de esta hipótesis queda fuera del alcance del presente trabajo, y la confirmación

proveniente de otros reportes es improbable, pues solo lo abordan en modelos de cultivo de embriones.

El grupo testigo, así como los diabéticos tratados con insulina y poliaminas no presentan diferencias significativas de actividad de SOD entre ellos, se esperaba que el grupo diabético al que le fue administrado insulina presentase una actividad similar al grupo diabético tratado con solución salina y al tratado con L-arginina, la razón para estas diferencias no es clara, pero una forma de explicarlo radica en el posible reestablecimiento de la producción de esta enzima depuradora causado por la normoglicemia inducida mediante la insulina exógena.

Finalmente, los resultados de actividad de GPx indican que existe una diferencia significativa entre el grupo CTR y los grupos diabéticos tratados con solución salina, insulina, espermidina y espermina; sin embargo los grupos que fueron tratados con L-arginina y putrescina no presentaron diferencias contra el CTR, lo que indica que, tanto el aminoácido como la poliamina putrescina llevan esta actividad a un nivel de acción normal; al parecer, esta enzima se ve impactada negativamente por el estado diabético, lo cual concuerda con estudios previos (Eriksson y Borg, 1991), al contrario que la SOD y la CAT, las cuales, bajo las condiciones del presente ensayo, se ven impactadas positivamente, reflejándose en su nivel de actividad.

De acuerdo a estudios realizados en ratón macho y hembra (Friesen *et al.*, 2004), los autores llegaron a la conclusión que las enzimas depuradoras de especies reactivas de oxígeno (SOD, CAT) encuentran reforzada su actividad en las hembras preñadas, estos y otros resultados concuerdan con los nuestros (Allen y Balin, 1989; Allen, 1991; Zaken *et al.*, 1999), sin embargo, el grupo de Friesen también reporta un aumento en la producción de GPx en hembras, aunque cabe resaltar que los datos fueron obtenidos de islotes pancreáticos *ex vivo*. En general, existen experimentos que presentan el descenso de la actividad de todas las enzimas depuradoras, otros que exhiben un alza en las mismas, y otros, como el nuestro, que demuestran aumento en algunas y disminución en otras.

El mecanismo exacto responsable de la organogénesis anormal embrionaria durante la preñez complicada con diabetes mellitus aun no es entendido del todo, sin embargo, la hipótesis planteada en este estudio, sobre el mecanismo oxidativo como causa principal de la teratogénesis mediada por diabetes mellitus se ve fortalecida por nuestros resultados. Dentro de la literatura, existen reportes de que las enzimas depuradoras de EROs responden diferente al ambiente adverso creado por la diabetes materna durante la preñez, pero, al parecer, el incremento relativo de SOD parece jugar un papel crucial en la protección contra la dismorfogénesis embrionaria (Hagay *et al.*, 1995; Forsberg, *et al.*, 1996).

Por lo pronto, aunque hace falta esclarecer por completo los mecanismos por los cuales la diabetes mellitus genera teratogénesis, poco a poco son develados cada uno de ellos. En el presente trabajo y bajo nuestras condiciones experimentales, proponemos que la insulina promueve la formación de especies reactivas de oxígeno cuantificadas por la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, que inducen teratogénesis por disminución en la actividad de las enzimas depuradoras de EROs, CAT, SOD y GPx. Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, además de su precursor L-arginina, ofrecen una protección limitada en contra de las EROs.

13. CONCLUSIONES

1. Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, se concluye que la alta concentración de especies reactivas de oxígeno produce teratogénesis en embriones de ratas diabéticas inducida con aloxana.
2. Las poliaminas (espermidina, espermina y putrescina) y el aminoácido L-arginina disminuyen la frecuencia de malformaciones *in vivo*, en embriones de rata.
3. Las actividades de enzimas antioxidantes depuradoras (CAT, SOD, GPx), se ven afectadas por la condición diabética materna.
4. Las poliaminas espermidina, espermina y putrescina y el aminoácido L-arginina pueden prevenir, aunque de manera parcial, el daño provocado por las Especies reactivas de oxígeno sobre la actividad de las enzimas depuradoras.
5. Bajo las condiciones del presente trabajo, la insulina parece ser un importante agente teratogénico, que promueve la generación de Especies reactivas de oxígeno.

ANEXO

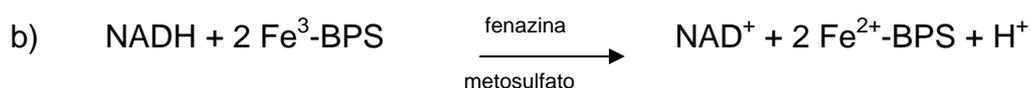
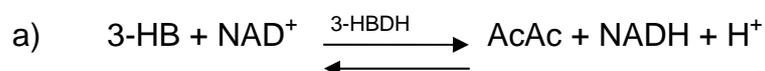
Fundamentos de Técnicas

Glucosa en suero. La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de una peroxidasa (POD):



La quinona resultante absorbe luz a 550 nm. La reacción es estequiométrica.

β -Hidroxibutirato. El NADH generado por la 3-hidroxibutirato-deshidrogenasa (3-HB-DH) en la reacción (a) reduce el Fe³⁺ a Fe²⁺ con fenazina metosulfato como el mediador redox en la reacción (b). Esto produce un incremento en la absorbancia del complejo Fe²⁺-BPS que se mide a 546 nm, lo cual es proporcional a la cantidad de 3-HB hasta una Δ D.O. de = 0.850.



TBARS. La peroxidación de lípidos produce malondialdehído (MDA) como producto secundario. El MDA en presencia de ácido acético a pH ácido, reacciona con el ácido tiobarbitúrico para producir un complejo que absorbe

energía en la región cercana a 550 nm. Para un ensayo fotométrico, se lee a 532 nm, el pico de absorción. La D.O. en esta región es proporcional a la cantidad de MDA presente.

Glutation peroxidasa. Esta enzima cataliza con alta especificidad la destoxificación *in vitro* del peróxido de hidrógeno mediante la oxidación del glutatión reducido de acuerdo a la siguiente reacción:



El Glutatión reducido es oxidado de nueva cuenta por la Glutatión reductasa, con formación equimolar de NADP⁺:



En condiciones de equilibrio, la reacción se vuelve a realizar de manera cíclica, de forma que la disminución de la D.O. a 340 nm es proporcional a la concentración de GSH originalmente presente.

Catalasa. En el intervalo ultravioleta, el peróxido de oxígeno (H₂O₂) muestra un incremento continuo en la absorción con una disminución en la longitud de onda. La descomposición del H₂O₂ puede seguirse directamente por la disminución en la absorbancia a 240 nm ($\epsilon_{240} = 0.00394 + 0.0002 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$). La diferencia en absorbancia (ΔA_{240}) por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la catalasa, dado que ni la enzima ni sus productos (H₂O y O₂) absorben luz a estas longitudes.

Superoxido dismutasa. Inhibición de la reducción de NBT por la Xantina Oxidasa (XOD).

La XOD cataliza la reacción:



El formazán absorbe luz a 560 nm. En presencia de SOD o un extracto que la contenga, la reacción se inhibe de manera relacionada con la cantidad de SOD presente.

14. REFERENCIAS

Aebi, H. E. (1983). Oxidoreductases acting on groups other than CHOH 3.9 Catalase: hydrogen-peroxidase: hydrogen-peroxidase oxidoreductase E. C. 1. 11. 1. 6. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. III (ed. H. U. Bergmeyer), p.p. 273-286. Weinheim: Verlag Chemie.

Allen, R. G. (1991). Oxygen-reactive species and antioxidant response during development. The metabolic paradox of cellular differentiation. *Soc. Exp. Biol. Med.* 196: 117-129.

Allen, R. G. y Balin, A. K. (1989). Oxidative influence on development and differentiation. An overview of a free radical theory of development. *Free Radic. Biol. Med.* 6: 631-639.

Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971). Superoxide Dismutase: Improved Assays and Assay Aplicable to Acrylamide Gels. *Annal Biochem.* 44: 276-287.

Buchanan, T. A., Denno, K. M., Sipos, G. F. y Sadler, T. W. (1994). Diabetic teratogénesis: *in vitro* evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose *per se*. *Diabetes* 43: 656-660.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitative of microquantities of protein. *Annal Biochem.* 72: 248.

Cederberg, J. y Eriksson, U. J. (1997). Decreased catalase activity in malformation-prone embryos of diabetic rats. *Teratology.* 56: 350-357.

Ceolotto, G., Bevilacqua, M., Paparella, I., Baritono, E., Franco, L., Corvaja, C., Mazzoni, M., Semplicini, A. y Avogaro, A. (2004). Insulin generates free radicals by

an NAD(P)H, Phosphatidylinositol 3' -Kinase dependent mechanism in human skin fibroblasts *ex vivo*. *Diabetes*. 53: 1344-1351.

Chevion, M. (1988). The role of free radicals and transition metals in biological aberrations; the relevance of aging of the skin. *Free Radic Metals Aging Skin*. 4: 34-52.

Cousins, L. (1991). Etiology and prevention of congenital anomalies among infants of overt diabetic woman. *Clin. Obstet. Gynecol*. 34: 481-493.

De Haro-Hernández, R., Cabrera-Muñoz, L. y Mendez, J. D. (2004). Regeneration of β -cells and neogenesis from small ducts or acinar cells promote recovery of endocrine pancreatic function in alloxan-treated rats. *Archiv. Med. Res*. 35: 114-120.

Diamond, M. P., Moley, K. H., Pellicer, A., Vaughn, W. K. y De Cherney, A. H. (1989). Effects of streptozotocin and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development. *J. Reprod. Fert*. 86: 1-10.

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

Eriksson, U. J. (1991). Diabetes in pregnancy: effects on post implantation embryos. *Isr. J. Med. Sci*. 27: 478-486.

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

Eriksson, U. J. y Borg, L. A. H. (1993). Diabetes and embryonic malformation. Role of substrate- induced free oxygen radicals production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes*. 42: 411-419.

Eriksson, U. J., Borg, L. A. H., Forsberg, H. y Styruud, J. (1991). Diabetic embryopathy. *Diabetes*. 40: 94-98.

Eriksson, U. J., Cederberg, J. y Wenzel, P. (1998). Diabetic environment, oxidative stress and embryogenic gene expression. En: Abstracts of the 26th conference of the European Teratology Society. Stockholm. Sept. 1998. p33.

Eriksson, U. J., Karlsson, M. G. y Styruud, J. (1987). Mechanisms of congenital malformations in diabetic pregnancy. *Biol. Neonate*. 51: 113-118.

Fantel, A. G., Barber, C. V. y Mackles, B. (1992). Ischemia reperfusion a new hypothesis for the developmental toxicity of cocaine. *Teratology*. 46: 285-292.

Felig, P. y Coustan, D. (1991). Diabetes sacarina. En: Complicaciones medicas durante el embarazo. G.N. Burrow, T.F. Ferris (Eds). Panamericana. 2a ed. Buenos Aires, Argentina.

Finley, B. E. y Norton, S. (1991). Effects of hyperglycemia on mitochondrial morphology in the region of the anterior neuropore in the explanted rat embryo model. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 1661-1666.

Forsberg, H., Borg, L. A. H., Cagliero, E. y Eriksson, U. J. (1996). Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. *Free Radic. Res.* 24: 451-459.

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

Freinkel, N. y Metzger, B. E. T. (1979). Pregnancy as a tissue culture experience. The critical implications of maternal metabolism for fetal development, en: Pregnancy, metabolism, diabetes and the fetus. CIBA Foundation Symposium no. 63. Ámsterdam; *Excerpta Medica*. pp. 3-23.

Friesen, N. T. E., Büchau, A. S., Schott-Ohly, P. y Lgssiar, A. H., Gleichmann. (2004). Generation of hydrogen peroxide and failure of antioxidative responses in pancreatic islets of male C57BL/6 mice are associated with diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetología*. 47: 676–685.

Gilbert, S. F. (1988). Developmental biology. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. 2^a ed. Pp. 187-191.

Green, M. F., Hare, J. W., Cloherty, J. P., Benacerraf, B. R., Soeldner, J. S. (1989). First trimester haemoglobine A-1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology*. 39: 225-231.

Greene, D. A., Stevens, M. J., Obrosova, I., Feldman, E. L. (1999). Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 217-223.

Grill, V., Johansson, B. y Eriksson, U. J. (1991). Influence of severe diabetes mellitus early in pregnancy in the rat: effects on insulin sensitivity and insulin secretion in the offspring. *Diabetología*. 34: 373-378

Gramzinski, R. A., Parchment, R. E., Pierce, G. B. (1990). Evidence linking programmed cell death in the blastocyst to polyamine oxidation. *Differentiation* 43: 59-65.

Gutteridge, J. M. (1993). Invited review on free radicals in disease processes and complication of causes and consequences. *Free Radic. Res. Commun.* 19: 141-158.

Ha, H. y Lee, H. B. (2000). Reactive Oxygen Species as a glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int.* 58(Suppl. 77): S19-S25.

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

Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant? *Free Radic. Res. Común.* 9: 1-31.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. (1995). Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. y Cross, C. (1992). Free radicals antioxidants and human diseases: where are we now? *Lab. Clin. Med.* 119: 598-613.

Harris, M. I. (2003). Definición y clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para el diagnóstico. En: Diabetes mellitus fundamentos y clínica. LeRoith, H., Taylor, S. I., y Olefsky, J. M. Editores. 2^a ed. Ed. Mc Graw Hill. México. Pp. 406-416.

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

Harada, J. y Sugimoto, M. (1997). Polyamines prevent apoptotic cell death in cultured cerebellar granule neurons. *Brain. Res.* 753: 251-259

Hass, M. J., Iqbal, L. B., Clearch, L., Brank, D. y Massaro, (1989). Rat lung Cu, Zn superoxide dismutase, isolation and sequence of full-length cDNA and studies of enzyme induction. *J. Clin. Invest.* 83: 1241-1245.

Heald, P. J. (1979). Changes in ornithine decarboxylase during early implantation in the rat. *Biol. Reprod.* 20: 1195-1199.

Hegardt, C., Andersson, G. y Oredson, S. M. (2000). Changes in polyamine metabolism during corticoid-induced programmed cell death in mouse thymus. *Cell Biol. Int.* 24(12): 871-880.

Hougaard, D. M., Nielsen, J. H. y Larsson, L. I. (1986). Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. *Biochem. J.* 238: 43-47.

Jan, M. S., Wing, Y. C., Lin, M. T. y Lin, Y. S. (1999). α -Difluoromethylornithine blocks thymocyte apoptosis via a reduction in tyrosine phosphorylation. *Scand. J. Immunol.* 50: 605-611.

Kalter, H. (1996). Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. *Reprod. Toxicol.* 10, (6): 417-438.

Kaufmann, R. C., Coso, F. K., Verhulst, S. J. y Amankwah, K. S. (1991). Effect of pregnancy on glucose metabolism in glucose intolerant 'BB' wistar rats. *Am. J. Perinatol.* 8: 11-14.

Kientsch-Engel, R. y Siess, E. A. (1981). D-(-)-3-Hidrxibutyrate and acetoacetate. En: Bergmeyer, H. U. (ed.). *Methods of enzymatic análisis*. 3^a. Vol. 8, VCH Publishers. Weinheim, FR Germany. pp. 60-69.

Lesser, K. B. y Carpenter, M. W. (1994). Metabolic changes associated with normal pregnancy and pregnancy complicated by diabetes mellitus. *Semin. Perinatol.* 18: 399-406.

Lindsay, G. S. y Wallace, H. M. (1999). Changes in polyamine catabolism in HL-60 human promyelogenous leukaemic cells in response to etoposide-induced apoptosis. *Biochem. J.* 337:83-87.

Lφvaas, E. (1997). Antioxidative and metal-chelating effects of polyamines. *Adv. Pharmacol.* 38: 119-149.

Mamposo, S. M., León, F. O. S., Licea, P. M. E., Pérez, M. B. y Castillo, J. R. (1999). Especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus con retinopatía diabética y sin ella. *Rev. Cub. End.* 10 (1): 8-15.

Mannen, C. A., Hood, R. D., Farina, J. (1983). Ornithine decarboxylase inhibitors and fetal growth retardation in mice. *Teratology* 28: 237-242.

Marx, M., Trittenwein, G., Aufricht, C., Hoeger, H. y Lubec, B. (1995). Agmatine and spermidine reduce collagen accumulation in kidneys of diabetic db/db mice. *Nephron.* 69: 155-158.

Matsuzaki, S., Ma, H. T. y Burikhanov, R. B. (2000). Anti-goitrous effect of lecithin-bound iodine in propylthiouracil treated rats. *Endocr. Regul.* 34: 57-63.

Méndez, J. D., Díaz-Flores, M., Durán, G., Hicks, J. J. (1983). Inhibition of rat embryonic development by the intrauterine administration of α -difluoromethylornitine. *Contraception* 28: 93-98.

Méndez, J. D. (1989). Poliaminas, en: Bioquímica e Inmunología. Vol. II. Hicks, J. J. y Díaz-Zagoya, J. C. (Eds). Facultad de Medicina, UNAM, México. Pp. 365-385.

Méndez, J. D. y Palomar-Morales, M. (1999). Embryotoxicity for diabetes induced in rat: prevention for L-arginine and polyamines. *Reprod. Toxicol.* 13(6): 501-509.

Mehrotra, P. K., Kitchlu, S., Farheen, S. (1997). Effects of inhibitors of enzymes involved in polyamine biosynthesis pathway on pregnancy in mouse and hamster. *Contraception.* 57: 55-60.

Metzger, B. E. (1991). Biphasic effects of maternal metabolism on fetal growth. *Diabetes.* 40: 99-105.

Moffat, J., Hashimoto, M., Kojima, A., Kennedy, D. O., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. y Matsui-Yuasa, I. (2000). Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumour cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. *Carcinogenesis* 21(12): 2151-2157.

Moley, H. K. (2001). Hyperglucemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism.* 12 (2): 78-82.

Morgan, D. M. L. (1999). Polyamines: an overview. *Mol. Biotechnol.* 11: 229-250.

Muzikova, E., Clark, D. A. (1995): Polyamines may increase the percentage of in-vitro fertilized murine oocytes that develop into blastocysts. *Human. Reprod.* 10: 1172-1177.

Nazer H, J. y Ramírez, F. R. (2000). Congenital malformations in the offspring of diabetic mothers. *Rev. Méd.* 128, (9): 1045-1052.

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

Nishikawa, T., Edelstein, D., Brownlee, M. (2000). The missing link: a single unifying mechanism for diabetes complications. *Kidney Int.* 58(Suppl. 77): S26-S30.

Ohkawa, H, Ohishi, W. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem*, 95: 351-358

Ornoy, A., Kimyagarov, D., Yaffe, P., Raz, I. y Cohen, R. (1996). Role of reactive oxygen species in diabetes-induced embryotoxicity: studies on pre-implantation mouse embryos cultured in serum from diabetic pregnant woman. *Isr. J. Med. Sci.* 32: 1066-1073.

Ornoy, A., Zaken, V. y Kohen, R. (1999). Role of reactive oxygen species (EROs) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos *In Vitro*: Reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidant (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology.* 60: 376-386.

Paglia, E. D. y Valentine, N. W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. & Clin. Med.* 70 (1): 158-168.

Palomar, M. M. (1998). Embriotoxicidad por diabetes mellitus en rata. Prevención por L-arginina y poliaminas. Tesis doctoral. UAM Iztapalapa. México D.F. 124 p.

Palomar, M. M., Baiza, A. L., Verdin, T. L., Roman, R. R., Altamirano, L. M. y Méndez, D. J. (1998). Fetal development in alloxan-treated rats. *Reprod. Toxicol.* 12 (6): 1-7.

Papaccio, G., Pisanti, F. A. y Frascatore, S. (1986). Acetyl homocysteine thiolactone induced increase: superoxide dismutase counteracts the effect of sub-diabetogenic doses of streptozocin. *Diabetes.* 35: 470-474.

Penning, L. C., Schipper, R. G., Vercammen, D., Verhofstad, A. A. J., Denecker, T., Beyaert, R. y Vandenabeele, P. (1998). Sensitization of TNF-induced apoptosis with polyamine synthesis inhibitors in different human and murine tumour cell lines. *Cytokine* 10(6): 423-431.

Persson, L. y Heby, O. (1990). Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci.* April 15: 153-158.

Pfeffer, M. L., Yang, H. C., Murti, A., McCormack, A. S., Viar, M. J., Ray, M. R. y Johnson, R. L. (2001). Polyamine depletion induces rapid NF- κ B activation in IEC-6 cells. *Jo. Biol. Chem.* 276: 45909-45913.

Ravinovitch, A. y Suarez-Pinzon, W. L. (1998). Cytokines and their roles in pancreatic islet β cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1139-1149.

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

Sadler, T. W., Denno, K. M. y Hunter, E. S. (1993). Effects of altered maternal metabolism during gastrulation and neurulation stages of embryogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 678: 48-61.

Sadler, T. W., Hunter, E. S., Wynn, R. E. y Philiphs, L. S. (1989). Evidence for multifactorial origin of diabetes-induced embriophathie. *Diabetes.* 38: 70-74.

Schipper, R.G., Penning, L.C., Verhofstad, A.J. (2000). Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin. Cancer Biol.* 10(1): 55-68.

Sharma, M. K., Buetner, G. R. (1993). Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma. *Free Radic Biol. Med.* 14: 649-653.

Shubert, P. J., Gordonm, M. C., Landon, M. B., Gabbe, S. G. y Kniss, D. A. (1996). Ketoacids attenuate glucose uptake in human trophoblast isolated from first-trimester chorionic villi. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 56-62.

Simán, C. M. y Eriksson, U. J. (1997). Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* 46: 1054-1061.

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

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546.

Tabor, C. W. y Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.

Takahashi, Y., Mai, M. y Nishioka, K. (2000). α -Difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model. *Int. J. Cancer*. 85: 243-247.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2002): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 25: s5-s20

Thomas, T., Balabhadrapathruni, S., Gardner, C. R., Hong, J., Faaland, C. A. y Thomas, J. T. (1999). Effects of epidermal growth factor on MDA-MB-468 breast cancer cells: alterations in polyamine biosynthesis and the expression of p21/CIP1/WAF1. *J. Cell. Physiol.* 179: 257-266.

Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. *Am. Clin. Biochem.* 6: 24-7.

Trocino, R. A., Akasawa, S., Ishibashi, M., Matsumoto, H., Matsuo, H., Yamamoto, H., Goto, S., Vrata, Y. y Kondo, T. (1995). Significance of glutathione depletion and oxidative stress in embryogenesis in glucose-induced rat embryo culture. *Diabetes*. 44: 992-998.

Vázquez, G. N. (1998) Efectos teratogénicos producidos por la diabetes inducida durante la gestación en la rata. Tesis de licenciatura. UNAM. FES-I. Estado de México. P. 61.

Wetzel, P., Thunberg, L. y Eriksson, U. J. (1997). Teratogenic effect of diabetic serum is prevented by supplementation of superoxide dismutase and N-Acetylcysteine in rat embryo culture. *Diabetología*. 40: 7-14.

Wheeler, C. R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T. y Korte, D. W. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathion reductase activity. *Analytical Biochem.* 184: 193-199.

Zaken, V., Kohen, R., Ornoy, A. (1999). The role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro. En: Abstracts of the 16th meeting of the Israel diabetes association. Enero. 1999. p. 25.

Zhang, W., Khanna, P., Chan, L. L., Campbell, G. y Ansari, N. H. (1997). Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. *Biochem. Mol. Med.* 68: 58-62.

Zimmerman, E. F., Potturi, R. B., Resnick, E. y Fisher, J. E. (1994). Role of oxygen free radicals in cocaine- induced vascular disruption in mice. *Teratology.* 49: 192-201.