



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA DIABETES INDUCIDA EN RATAS  
GESTANTES EN LA MORFOHISTOLOGÍA CARDIACA DE  
LA PROGENIE EN EDAD PERINATAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ZYANYA SARAI SÁNCHEZ SALAZAR**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. CONCEPCIÓN SANCHEZ GÓMEZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1.Datos del alumno

Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre (s)  
Teléfono  
Universidad Nacional  
Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Carrera  
Número de cuenta

### 2.Datos del tutor

Grado  
Nombres  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 3.Datos del sinodal 1

Grado  
Nombres  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 4.Datos del sinodal 2

Grado  
Nombres  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 5.Datos del sinodal 3

Grado  
Nombres  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 6.Datos del sinodal 4

Grado  
Nombres  
Apellido paterno  
Apellido materno

### 7.Datos del trabajo escrito

Título

Número de páginas  
Año

### 1.Datos del alumno

Sánchez  
Salazar  
Zyanya Sarai  
55 44 97 69 45  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
309158798

### 2.Datos del tutor

Dra.  
Concepción  
Sánchez  
Gómez

### 3.Datos del sinodal 1

Dra.  
María Genoveva  
González  
Morán

### 4.Datos del sinodal 2

Dra.  
Patricia  
Rivas Manzano

### 5.Datos del sinodal 3

M. en C.  
Miguel Angel  
Palomino  
Garibay

### 6.Datos del sinodal 4

Dra. en C. QB  
Marcela  
Salazar  
García

### 7.Datos del trabajo escrito

Efecto de la diabetes inducida en ratas gestantes en la morfohistología cardíaca de la progenie en edad perinatal  
90 p  
2016

*“Instruye al niño en su camino,*

*Y aunque fuere viejo no se apartará de él”*

*Proverbios 22:6*

*“Y Todo lo que hagáis, hacedlo de corazón, como para el  
Señor y no para los hombres”*

*Colosenses 3:23*

## Agradecimientos



**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de “México Federico Gómez”. Bajo la dirección de la Dra. Concepción Sánchez Gómez.**

A la Dra. Concepción Sánchez Gómez por el apoyo en la elaboración de este trabajo y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo del laboratorio donde aprendí mucho y disfrute de mi estancia, debido al entusiasmo que muestra al enseñar.

A la Dra. Marcela Salazar García, por su ayuda y comentarios durante la elaboración y revisión de mi tesis, también agradezco sus consejos que me hicieron mejorar.

A la M. en C. Laura Villavicencio por brindarme su ayuda durante las tinciones y por aclarar todas mis dudas.

A Jorge Arturo Hilario por el apoyo en la elaboración de este proyecto y por siempre estar dispuesto a ayudarme.

A todo el equipo del Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Genética del Hospital Infantil de “México Federico Gómez”, por facilitarme material para la toma de fotografías.

## Dedicatoria

A Dios, por estar a mi lado siempre y mostrarme su amor infinito e incondicional a través de mi familia y amigos.

A mis padres, María Salomé Salazar Flores y José Luis Sánchez Hernández, ¡Lo logramos!, pues este camino lo hemos recorrido juntos como familia. Todo su amor y su apoyo han rendido frutos. En verdad les agradezco su amor y su dirección a lo largo de mi vida, los consejos, los regaños, las llamadas de atención, aun cuando en ocasiones no estuviera de acuerdo; todo eso ha edificado mi vida. Son mi ejemplo a seguir pues con sus vidas me han enseñado el valor del trabajo, la honestidad, el amor, la humildad, la perseverancia y el esfuerzo. Gracias por cultivar en mí tanto amor, ustedes son mi más grande amor en el mundo, y les debo tanto. Gracias en verdad por estar siempre conmigo y por esforzarse siempre para darme lo mejor, no tengo palabras para agradecerles por tanto, los amo con todo mi ser.

A mi hermana Cesia Dominique Sánchez Salazar, gracias por escucharme y por ser un gran apoyo para mí, gracias porque siempre me has demostrado tu amor, como todos los sábados en que nos quedábamos a platicar por la madrugada, no sabes cuan alegre hizo eso a mi corazón.

A mi hermana Emma Jocelyn Sánchez Salazar, aun cuando somos extremadamente distintas, siempre hemos podido ser buenas amigas y no sabes cuánto te quiero, gracias por estar ahí para mí, por escucharme y hacerme reflexionar.

A mis abuelos Emma Flores Olvera y Rodolfo Salazar Roldán, por demostrarme su amor tantas veces. Ustedes han sido una bendición para mi vida, han estado ahí para mí desde el principio de mi vida, gracias abuelita por los consejos que me diste y a ti abuelito por siempre pensar en mi seguridad. Les agradezco que siempre me ayudaran y se preocuparan por mí, gracias por cuidarme tanto, los amo mucho.

A mi tía María Magdalena Salazar Flores, porque a medida de lo posible estuviste ahí para mí y me demostraste tu amor, gracias porque siempre me has hecho sentir especial y capaz de lograr mis metas.

A mi tío José Salazar Flores, por ser una inspiración para mí, me habría gustado que estuvieras aquí para ver este momento y aunque ya no estés con nosotros siempre te recuerdo alegre y resplandeciente.

A mi tía Elizabeth Salgado Córdoba y a Manolo Lastra Ramos, que me han demostrado su amor y apoyo de muchas formas, gracias porque sé que en sus oraciones siempre estuve y no se imaginan cuánto bien me hicieron.

A mi tía Margarita Salazar Juárez y mi prima Jazmín Salazar, que con su apoyo me demostraron el verdadero valor de la familia, les agradezco mucho en verdad todo lo que hicieron por mí.

A Víctor, gracias por estar ahí conmigo, por tu amor y por enseñarme a tener un poco de paciencia en todo tiempo, por nuestras largas platicas y los momentos de reflexión, pero sobre todo por acompañarme en esta aventura, gracias por todo en verdad.

A Diana Ixchel; gracias por presionarme y siempre estar al tanto de mí, aun si no nos vemos por largas temporadas, tu amistad ha sido un regalo preciado para mí desde la preparatoria, a veces la vida da vueltas y las mejores personas que has podido conocer aparecen sin esperarlas. Eres una gran amiga y te quiero un montón.

A Sebastián. Gracias por ayudarme, por escucharme, por tus consejos y por haberme acompañado hasta ahora. Te agradezco muchísimo el hacerme reír en los momentos de estrés y lo mejor de todo... gracias por tu amistad.

A Natalia, gracias por tu amistad incondicional, por tu ayuda, tus consejos y nuestras pláticas que siempre son interesantes, muchas gracias querida Naty.

A Elizabeth, gracias amiguita por tu apoyo y cariño, por compartir tantas cosas. Siempre agradeceré que me ayudaras a poner más atención y a ser más responsable.

A Frida, gracias por hacerme reír y ayudarme cuando lo necesitaba, tu amistad se convirtió en un evento inesperado pero lleno de cariño.

A Daniel, gracias por ser bueno conmigo y por hacerme reír tanto, jamás olvidaré nuestras aventuras al inicio de la carrera y porque aun con el paso del tiempo sigues mostrándome tu cariño.

A mis amigos del taller de Inmunología: Omar, Arely y Karla, gracias por su apoyo y por sus consejos, las experiencias, el estrés previo a entregar nuestros reportes, las risas y todo lo demás.

A mis abuelos Gregorio Sánchez Valencia y Emma Hernández Espejel; a mis tíos Inés Sánchez, Francisco Sánchez, Irene Sánchez y Elizabeth Sánchez, con quien con mucho orgullo comparto este momento de felicidad y bendición en mi vida.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	6
Diabetes Mellitus .....	6
Clasificación .....	6
Epidemiología .....	9
Fundamentos biomoleculares de la Diabetes Mellitus .....	11
Bases moleculares de las acciones de insulina .....	13
Diabetes mellitus durante la gestación .....	15
Programación <i>in útero</i> .....	17
Efectos a corto plazo (defectos congénitos) .....	18
Efecto de la diabetes materna en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la vida posnatal en humanos .....	20
Inducción de Diabetes Materna.....	22
Anatomía del corazón .....	23
Histología del corazón .....	26
<b>ANTECEDENTES EXPERIMENTALES</b> .....	33
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	35
<b>OBJETIVOS</b> .....	36
Objetivo general:.....	36
Objetivos particulares: .....	36
<b>HIPÓTESIS</b> .....	37
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	38
<b>MATERIALES</b> .....	39
Material biológico.....	39
Material de laboratorio .....	39
<b>METODOLOGÍA</b> .....	41
Control materno .....	41
Inducción de DM materna .....	41
Obtención de crías .....	42
Obtención de corazones y fijación .....	42
Análisis morfométrico del corazón completo.....	43

Previo al análisis histológico.....	43
Inclusión del material biológico .....	43
Cortes histológicos en micrótopo.....	45
Desparafinar y rehidratar.....	45
Tinciones.....	45
Análisis morfométrico e histológico de cortes seriados.....	45
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>Control materno.....</b>	<b>47</b>
Glucemia.....	47
Peso corporal .....	48
Crías por camada .....	50
<b>Resultados en la progeñe .....</b>	<b>51</b>
Glucemia.....	51
Peso y talla .....	51
Análisis morfométrico del corazón.....	52
Estudios histológicos .....	55
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 1: PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....</b>	<b>76</b>
I Soluciones salinas y buffers .....	76
II Fijadores .....	76
III Fármacos.....	76
IV Colorantes y soluciones para tñción.....	76
<b>ANEXO 2: TRATAMIENTO PREVIO A LA INCLUSIÓN .....</b>	<b>79</b>
❖ Corazones fijados en formol F21 y RN.....	79
❖ Corazones fijados en Bouin F21 y RN .....	79
<b>ANEXO 3: TIEMPOS DE TINCIÓN .....</b>	<b>80</b>
El protocolo de la técnica H&E:.....	80
Protocolo de la técnica de Tricrómica de Masson: .....	80
<b>ANEXO 4: RESULTADOS NUMÉRICOS DE GRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>

## **ABREVIATURAS**

ADA Asociación Americana de Diabetes

ATP Adenosina Trifosfato

cAMP Adenosina Monofostato cíclico

DM Diabetes Mellitus

DM1 Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 Diabetes Mellitus tipo 2

DMG Diabetes Mellitus Gestacional

E21 Fetos de 21 días de gestación

ECC Enfermedad Cardíaca Congénita

Ensanut Encuesta Nacional de Salud

HDL Lipoproteínas de alta densidad

H&E Hematoxilina-Eosina

IFD Federación Internacional de Diabetes

INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía

LDL Lipoproteína de baja densidad

NO Óxido nítrico

OCDE Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

OMS Organización Mundial de la Salud

P0 Crías recién nacidas

PVD Pared del ventrículo derecho

PVH Hipertrofia ventricular patológica

PVI Pared del ventrículo izquierdo

RC Ratas Control

RD Ratas Diabéticas

ROS Especies reactivas de Oxígeno

STZ Estreptozotocina

TIV Tabique interventricular

## RESUMEN

**ANTECEDENTES:** La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad caracterizada por hiperglucemia crónica, resultado de resistencia a la insulina y/o deficiencia secundaria de insulina por falla en las células beta del páncreas, que ocasiona deterioro morfofuncional del cerebro, riñones y corazón. Su presencia durante el embarazo puede impactar negativamente el desarrollo embriofetal. Se conocen dos tipos de diabetes materna: gestacional y pregestacional, la gestacional es diagnosticada hacia el tercer trimestre del embarazo. En cambio la DM pregestacional se manifiesta en la etapa reproductiva desde antes del embarazo, lo que significa que sus efectos impactan el desarrollo temprano del embrión y a menudo causa muerte embrionaria o fetal y defectos congénitos de varios órganos, causas comunes de muerte perinatal. En casos menos extremos, la hiperglicemia materna afecta el crecimiento prenatal provocando defectos del crecimiento como macro o microsomía. Evidencias clínicas y epidemiológicas señalan que los descendientes de madres diabéticas son más susceptibles a padecer síndromes metabólicos, diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. También se ha documentado que los defectos del crecimiento fetal derivados de la hiperglucemia materna están asociados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares entre las que destacan la hipertrofia cardíaca, infarto, daño al miocardio y arritmias. Por razones éticas es imposible investigar en los humanos el papel de la diabetes materna en la homeostasis y función del corazón posnatal y comprender los mecanismos celulares y procesos moleculares implicados, por esta razón se ha recurrido al empleo de modelos animales como la rata en la que se puede controlar el momento en que se manifiesta la diabetes materna, niveles de glucemia y duración de la gestación. **OBJETIVO.** Investigar los cambios anatómicos e histológicos en el corazón de crías perinatales obtenidas de rata con diabetes inducida antes de la implantación del embrión. **HIPOTESIS.** El ambiente intrauterino hiperglucémico provoca una desregulación cronológica del desarrollo, promoviendo cambios en la morfometría e histología del corazón de la progenie en el periodo perinatal. **MATERIAL Y METODOLOGIA.** Se emplearon ratas gestantes de la cepa Sprague-dawley con diabetes inducida el quinto día de gestación mediante la administración intraperitoneal de estreptozotocina (50 mg de /kg de peso) y ratas gestantes control tratadas con amortiguador de acetatos. Las crías se clasificaron en 4 grupos de estudio: **E21:** Fetos de 21 días de madres diabéticas (RD) y control (RC) obtenidas por operación cesárea. **P0:** Recién nacidas de madres diabéticas (RD) y control (RC) adquiridas por

parto espontáneo. A las crías se les determinó: Peso, Talla, (longitud cráneo-rabadilla) y Glicemia. El corazón de las crías fue utilizado para analizar la morfometría y características histológicas del miocardio ventricular, trabéculas y vasos coronarios para determinar la posible existencia de hipertrofia y/o fibrosis. **RESULTADOS:** Las ratas con diabetes inducida (RD) empleadas para obtener crías E21 y P0 tuvieron glucemia con valores >300 mg/dL y menor ganancia de peso corporal a lo largo de la gestación en comparación con el grupo control (RC). El grupo RC tuvo un periodo gestacional de 21 días en cambio en las RD duró 23 días con menor número de crías RN. Crías E21 y P0 de grupos RD mostraron valores de glucosa en sangre significativamente mayores que E21 y P0 de RC. La talla de E21, fue similar entre RC y RD, pero menor peso en RD que RC. Los RN fueron más pequeños y menos pesados RD en comparación RC. El eje horizontal del corazón en E21 y P0 fue similar, pero el eje vertical del corazón del grupo diabético en la edad E21 fue menor que en el RC. Los valores del grosor de las paredes ventriculares derecha e izquierda y tabique interventricular no mostraron diferencias significativas entre los grupos de RC y RD. En la histología se observó una mayor inmadurez del miocardio ventricular en los grupos RD de E21 y P0 al compararlos con las crías de los grupos RC. Los vasos coronarios en ambos grupos mostraron inmadurez propia de la edad de las crías pero no una diferencia entre grupos RC y RD de la misma edad. Ningún grupo mostró fibrosis. **CONCLUSIONES:** La hiperglucemia materna inducida con STZ antes de la implantación del embrión además de alargar la duración de la gestación, en el periodo perinatal provoca menor peso y talla y retrasa la histodiferenciación del miocardio, afectando la citoarquitectura del miocardio ventricular y vasculatura coronaria.

## INTRODUCCIÓN

El impacto de la diabetes a nivel mundial ha causado alarma en el Sector Salud ya que se ha observado un aumento en la incidencia de pacientes con diabetes mellitus en grupos de edad muy diversos [1]. En el 2014 la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que alrededor del mundo existían 350 millones de personas con este padecimiento, lo más alarmante es que de acuerdo a las estadísticas se predice que para el año 2030 será la séptima causa de muerte a nivel mundial [2]. En México las estadísticas nacionales, también son alarmantes pues la Federación Internacional de Diabetes (FID) ha clasificado a nuestro país como el 6º lugar mundial en número de personas con diabetes [3].

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica, en la cual el síntoma más evidente es la hiperglucemia crónica. La causa de esta enfermedad es la secreción baja de insulina o bien, su incapacidad de regular los niveles de glucosa en sangre del organismo [4]. La insulina es una hormona producida por las células  $\beta$  que se encuentran en los islotes de Langerhans del páncreas, su función anabólica es de las más importantes puesto que es necesaria para: 1) el transporte de glucosa, 2) La formación de glucógeno en el músculo esquelético, 3) síntesis de lípidos, 4) síntesis de ácidos nucleicos y 5) la síntesis de proteínas. En general cumple un papel muy importante el cual consiste en garantizar el aporte energético que requiere el organismo [5].

Sin embargo, los pacientes que padecen diabetes carecen de esa capacidad de regular los niveles de glucosa en sangre, así la glucosa circula libremente por el torrente sanguíneo ocasionando daños graves en el tejido de diferentes órganos como el corazón, ojos, riñones, cerebro, entre otros, causando deterioro y finalmente complicaciones letales para la salud [3]. Debido a que los factores de riesgo de esta enfermedad son variables, se ha clasificado a este padecimiento en relación a la etiología es decir a sus orígenes o causas. De acuerdo a lo anterior se describen 4 grupos principales de diabetes: a) DM tipo 1; b) DM tipo 2, c) Otros tipos específicos y d) diabetes gestacional [6] la cual es de gran interés en esta tesis.

La DM que se presenta en la etapa de gestación (DMG) es una complicación común entre las mujeres, y se define como un desorden metabólico que implica una baja tolerancia a la glucosa [7]. De manera natural, se observa aumento en la concentración de glucosa en la sangre después de comer, pues durante el proceso de gestación se liberan diferentes hormonas, algunas de ellas tienen efecto directo sobre la producción y funcionamiento correcto de la insulina, tal es el caso del lactógeno placentario observable a las 20-24 semanas de embarazo. Pero este proceso es indispensable pues la placenta le provee al feto gran cantidad de nutrientes para su crecimiento y desarrollo correcto [8].

De acuerdo al período de gestación en que se manifiesta la diabetes y los efectos que tiene sobre el desarrollo embrionario y fetal, la DMG se ha dividido en 2 subtipos: 1) DM pregestacional, que incluye a todas las mujeres que ya presentaban DM de cualquier tipo (DM1 o DM2) en la etapa reproductiva antes de su embarazo, y 2) la DM gestacional, en la cual hay alteración de la concentración de glucosa en la sangre de severidad variable, que es reconocida durante el embarazo [9]. Los efectos de la diabetes pregestacional y gestacional en la progenie tienen manifestaciones diferentes.

La nutrición de un feto depende totalmente de la madre, en los casos en que las madres presentan DMG se ha demostrado que la desregulación en la disponibilidad de sustratos energéticos en la vida prenatal originan alteraciones en el desarrollo del embrión [10], inclusive guarda una estrecha relación con el aumento en las probabilidades de que la progenie presente malformaciones congénitas [11, 12] las más recurrentes son enfermedades cardíacas congénitas (ECC), contribuyendo de manera importante en la morbilidad y mortalidad de la descendencia de madres con DM [12-15].

## **MARCO TEÓRICO**

### **Diabetes Mellitus**

Se define diabetes al grupo de enfermedades crónicas metabólicas caracterizadas por la presencia de hiperglucemia en sangre, provocada por escasa secreción de insulina o resistencia a esta hormona [6].

### **Clasificación**

La palabra Diabetes Mellitus engloba enfermedades metabólicas que tienen como consecuencia la hiperglicemia crónica, es decir que se trata de un término general [4]. Por ello la clasificación de este padecimiento es de suma importancia para comprender lo que sucede en un paciente.

El establecimiento de una clasificación general ha sido un proceso continuo y ha representado un reto, debido a que los pacientes presentan diferentes síntomas que no se parecen entre sí o bien las razones que llevan a que un paciente tenga hiperglicemia no son las mismas. Sin embargo el Comité Experto en Diagnóstico y Clasificación de Diabetes Mellitus, ha establecido una clasificación general en la que la gran mayoría de casos de diabetes suelen corresponder a dos grandes categorías etiopatogénicas, conocidas como Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM 1) y Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM 2) (Figura 1) [6].

A estas dos grandes ramas, se añaden otros dos grupos importantes, Otros tipos específicos de diabetes y Diabetes gestacional [6].

La DM 1 se conocía como diabetes insulino-dependiente o juvenil, por sus características más comunes, pues esta enfermedad resulta de un proceso celular de autoinmunidad donde hay una destrucción de células  $\beta$  en el páncreas, que como anteriormente se describió son las responsables de producir insulina y suele presentarse en su mayoría en pacientes jóvenes, inclusive infantes [16]. En cuanto a la tasa de destrucción de las células  $\beta$  es variable en cada paciente, pero se ha observado que es más rápida en los casos de infantes y jóvenes a comparación de los adultos que es más lenta. El resultado de la destrucción de estas células tiene graves consecuencias puesto que el paciente ya no puede producir insulina y

no puede regular la concentración de glucosa en sangre, de esta forma los pacientes dependen de la administración de insulina para sobrevivir [6].

La destrucción autoinmune se presenta como resultado de una predisposición genética y se relaciona también con factores ambientales que aún no se han descrito detalladamente. Otro dato interesante es la predisposición que tienen los pacientes con DM 1 para otras enfermedades autoinmunes como es el caso de la enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, vitiligo, entre otras [6, 17].

Aun cuando se ha relacionado a una autodestrucción inmune, se han encontrado casos clínicos donde no existe evidencia de un proceso de autoinmunidad, pero esto solo ocurre en una población muy baja y en su mayoría están relacionados con sus antecedentes genéticos emparentados con personas africanas o asiáticas. A este tipo de DM 1 se le conoce como idiopática [17].

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2) es el segundo grupo de la clasificación oficial de DM por el Comité Experto en Diagnóstico y Clasificación de Diabetes Mellitus, también conocido como no insulino-dependiente. Este tipo de diabetes aparece en personas adultas con obesidad, y es la forma más común de diabetes en el mundo [16]. Los pacientes que padecen DM 2 presentan resistencia a la insulina y una baja producción de insulina, pero puede ser solo una de estas características o una combinación de ellas [9]. La etiología de esta enfermedad no es conocida, pero se sabe que la obesidad por sí sola causa resistencia a la insulina lo cual es un dato interesante ya que en su mayoría los pacientes con DM2 tiene obesidad o al menos un alto índice de grasa distribuido únicamente en la región abdominal [6]. Los pacientes con esta forma de DM tienen tasas elevadas de insulina pero es insuficiente para compensar la resistencia a la insulina y regular los niveles de glucosa.

Se ha observado una correlación entre el riesgo de padecer DM 2 que aumenta con factores como edad, obesidad y sedentarismo. Inclusive se ha asociado con una predisposición genética, sin embargo, la genética de esta enfermedad no ha sido definida completamente [17].

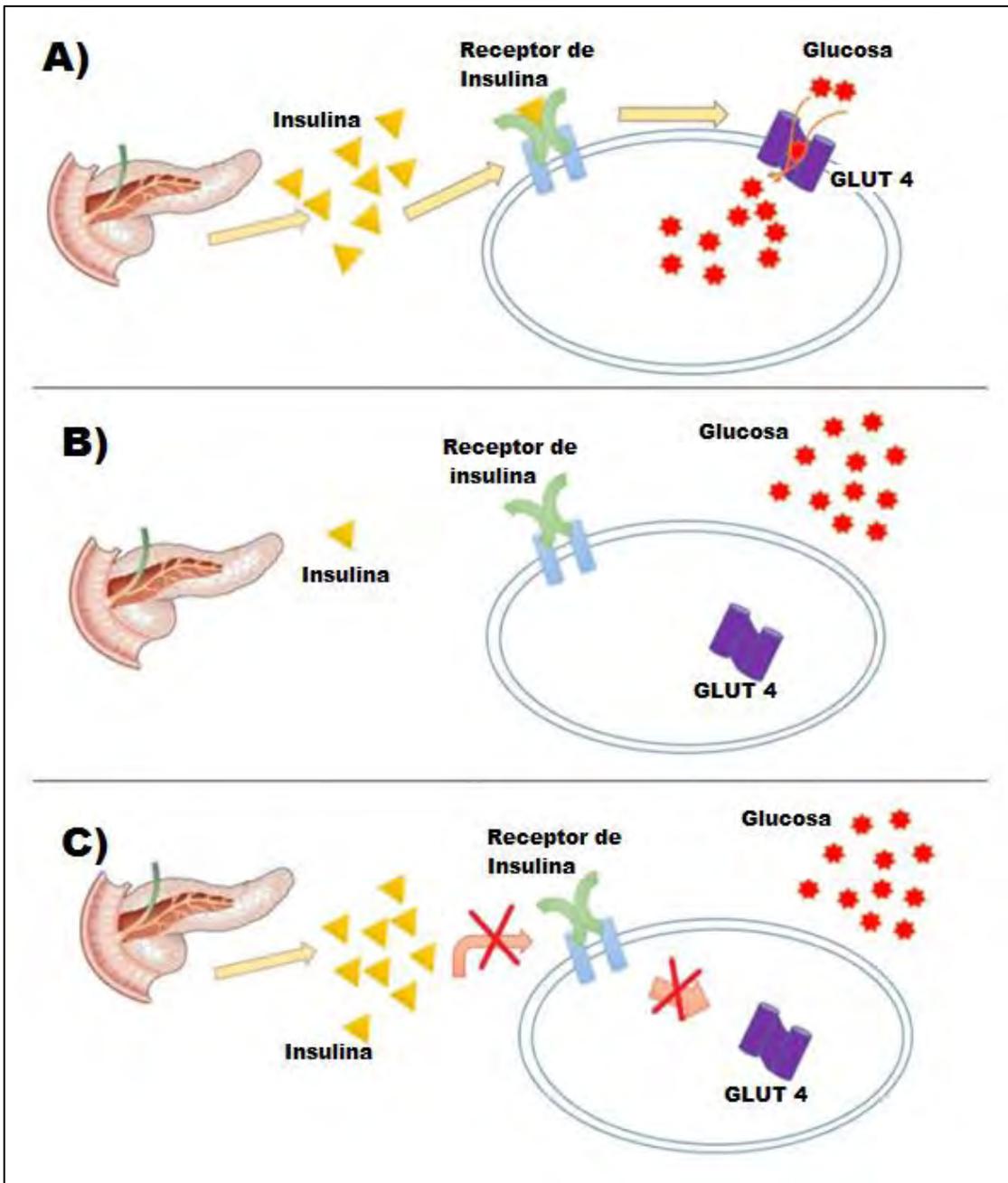


Ilustración 1. Tipos de diabetes. En A) se representa un metabolismo normal con una producción de insulina normal y el aprovechamiento de glucosa; en B) se observa lo que ocurre en la DM 1, el cuerpo no produce la cantidad necesaria de insulina; en C) DM 2 que comprende al mayor número de casos de DM en el mundo, la insulina producida no es utilizada adecuadamente (Modificada de mejorconsalud.com).

Otros tipos específicos de Diabetes, es un grupo donde se clasifican diferentes enfermedades que tienen como consecuencia hiperglucemia en los pacientes que las padecen [4]:

- Enfermedades exocrinas de páncreas e.g. pancreatitis, fibrosis quística, hemocromatosis.
- Endocrinopatías e.g. síndrome de Cushing, acromegalia.
- Defectos genéticos de la función de las células  $\beta$
- Defectos genéticos en la acción de insulina
- Infecciones

### **Epidemiología**

El aumento en la incidencia de pacientes con Diabetes a nivel Mundial es alarmante, de acuerdo a la OMS en el año 2014 las cifras establecían que existían 347 millones de personas con este padecimiento, con un prevalencia de 9 por ciento en adultos mayores de 18 años. Otros datos arrojados por la OMS señalan que en 2012 fallecieron 1.5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes; pero del total de muertes, la gran mayoría de personas aproximadamente el 80 por ciento pertenecían a países en desarrollo es decir de ingresos bajos y medios como México [2].

La Federación Internacional de Diabetes publicó una lista con los países que tienen un mayor número de pacientes diabéticos, en orden son: China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México [3].

Este padecimiento desencadena un alto número de enfermedades graves algunas de ellas son cardiopatías, pie diabético, amputaciones, ceguera e insuficiencia renal entre otras, lo cual genera altos costos económicos en el tratamiento de estas enfermedades, sumado al costo requerido para el manejo correcto de la Diabetes, propiciando más problemas para las familias como el detrimento de la calidad de vida [18]. Lo que ha propiciado que el Sector Salud ponga atención particular.

No podemos olvidar los altos costos que se generan para el Sector Salud de los países en desarrollo y el impacto que representan estos gastos. Se estima que la atención médica absorbe más de \$39,000 millones de pesos por cada 10 millones de diabéticos, lo cual equivale a 7 por ciento del gasto nacional en Salud [19].

En el caso particular de nuestro país, la Encuesta Nacional de Salud (Ensanut) determinó en el 2012 que existen cerca de 6.4 millones de adultos con diabetes, sin embargo, se sabe que existe un gran número de personas que no tienen acceso a un Servicio Médico pues no están asegurados por ninguna de las Instituciones de Salud mexicanas o bien las comunidades en las que viven son de acceso limitado a ciertos servicios y no han sido diagnosticados con dicha enfermedad, lo cual podría duplicar la cantidad de individuos con ésta enfermedad, y se prevé que en 2020 esta cifra podría alcanzar 20 millones, de los cuales solo el 25 por ciento tienen un tratamiento y control adecuado. Esta misma encuesta demostró que las personas con diabetes reducen su esperanza de vida de 40 años a 10.9 años [20].

De acuerdo a la Fundación Mexicana de Diabetes los estados con mayor número de individuos con DM son: CDMX, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí [21].

Existen nuevos datos que son aún más alarmantes y que muestran la urgencia que existe por controlar esta enfermedad en nuestra sociedad, es el caso de un modelo matemático realizado en la Universidad de Michigan que se encuentra en curso, difundido por la Alianza por la Salud Alimentaria indicó que a partir de los datos recabados en 2010 en nuestro país, uno de cada 3 niños nacidos a partir de 2010 sufrirá diabetes en su vida adulta [18].

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), realizó un informe denominado “Enfermedades Cardiovasculares y Diabetes: Políticas Públicas para una Mejor Salud y Calidad de la Atención Médica”, en el cual recalca que el inicio de este padecimiento en edades tempranas es más frecuente en comparación a cualquier otro país, en donde 23.8 por ciento se presenta en

personas de 40 a 59 años de edad y 5.9 por ciento en personas de 20 a 39 años de edad, las cuales corresponden a las cifras más altas de la OCDE [22].

### **Fundamentos biomoleculares de la Diabetes Mellitus**

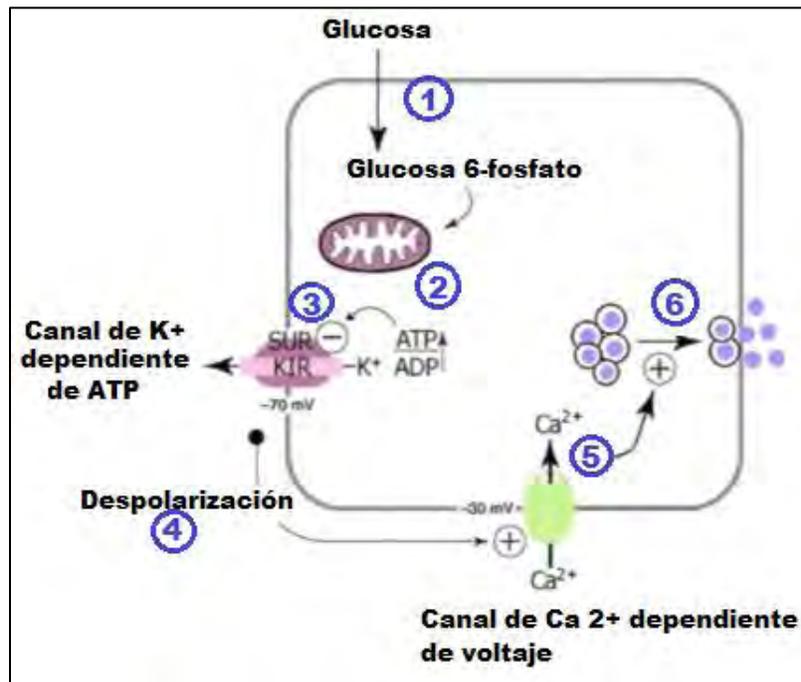
Existen un gran número de procesos relacionados en el desarrollo de la diabetes, ya sea destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, receptores GLUT deficientes o ausentes [6].

Los receptores GLUT son transportadores de difusión facilitada de hexosas y con base de la homología de la secuencia primaria de las proteínas se conocen 3 subfamilias [23]:

- a. Clase I: Formada por los Glut-1,2,3 y 4
- b. Clase II: Constituida por los Glut- 5, 7, 9 y 11
- c. Clase III: Formada por Glut-6, 8, 10, 12, el Glut-13 o transportador para mioinositol y Glut14.

Entre los GLUTs más estudiados están el Glut 1 y Glut 2. El primero parece ser el más ampliamente distribuido en el ser humano. Posee alta afinidad por la glucosa, es decir que se trata de un transportador basal de este azúcar lo que lo hace sumamente importante para las células que requieren un suministro constante de glucosa para la producción de energía como es el caso del tejido nervioso. También se expresa en los eritrocitos y células endoteliales. El Glut 2, un transportador de baja afinidad por glucosa pero que transporta a la glucosa de forma proporcional a su concentración, es decir que actúa como sensor en las células que lo poseen, como en los hepatocitos y células  $\beta$ -pancreáticas. El Glut 2 en células  $\beta$ -pancreáticas actúa como regulador, ya que permite la entrada de glucosa únicamente cuando está elevada en plasma, por lo que su papel es importante en la liberación de insulina. Se considera a este transportador como bidireccional debido a que transporta glucosa desde la sangre al tejido o desde el tejido hacia la sangre, de forma particular en el hígado. Además contribuye directamente a la capacidad del hígado para aumentar la captación de la glucosa, regulando la síntesis de glucógeno, y la glucogenólisis [23].

La glucosa es una molécula esencial que funciona como combustible para los seres vivos. La regulación de la concentración de la glucosa en sangre depende de diversas hormonas pero la más importante es la hormona polipeptídica insulina [24, 25] sintetizada en las células  $\beta$  pancreáticas. El aumento en la concentración de glucosa en sangre después del consumo de alimentos inicia en las células  $\beta$  pancreáticas una cascada de señalización que conduce a la secreción de la insulina [26]. El proceso es muy rápido y eficiente y sigue los pasos señalados en la Ilustración 2 [9, 27]:

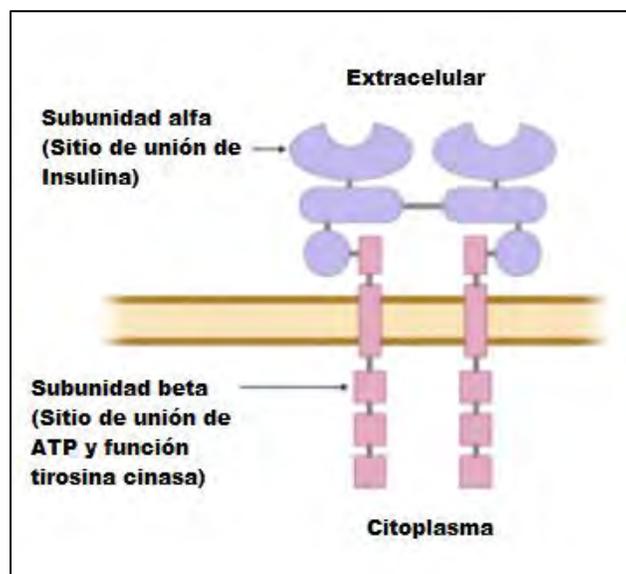


**Ilustración 2. Liberación de insulina.** Se muestran seis pasos importantes del total descritos de la liberación de insulina (Modificada de: *Dean, L & McEntyre, J; 2004*). **1)** Transporte de la glucosa al interior de la célula a través del transportador de glucosa GLUT 2 **2)** Fosforilación de glucosa por la glucocinasa, el producto de esta reacción es la glucosa 6 fosfato. En el citosol la glucosa 6 fosfato es oxidada en dos moléculas de piruvato, a partir de este proceso se producen dos moléculas de ATP y de NADH. El piruvato, producto de la glucólisis, es el sustrato para la síntesis de Acetil CoA, y la transferencia de electrones a través de la cadena transportadora de electrones de la membrana mitocondrial permite la síntesis de ATP **3)** El aumento en la relación ATP: ADP promueve el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP en la membrana de las células  $\beta$ , impidiendo su salida. Como resultado existe una carga positiva dentro de la célula  $\beta$  que causa la despolarización de la membrana **4)** Simultáneamente los canales de calcio dependientes de voltaje se abren permitiendo la entrada de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) al interior de la célula **5)** El incremento en la concentración intracelular de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) activa el citoesqueleto, promoviendo la translocación de los gránulos de insulina desde el aparato de Golgi hacia el citosol **6)** Liberación de los gránulos secretorios de insulina por exocitosis hacia la circulación.

La respuesta al estímulo promovido por la glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas para la liberación de la insulina mediado por los receptores Glut-2 suele ser inmediato, puesto que la hormona ya ha sido sintetizada y se encuentra reservada en gránulos secretores del aparato de Golgi donde permanecen hasta que se produce el estímulo para su liberación, después de un tiempo corto en el que la insulina reservada se consume casi en su totalidad comienza a sintetizarse más hormona [9].

### **Bases moleculares de las acciones de insulina.**

El receptor de insulina es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr, los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr. Se encuentra en la membrana plasmática y se compone de 4 subunidades, dos  $\alpha$  y dos  $\beta$ . Ambas subunidades alfa se encuentran en la parte extracelular y en estas es donde se ubica el sitio de unión a insulina. En contraste, las subunidades beta tienen un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico (ver Ilustración 2), con función de tirosina-cinasa para fosforilar proteínas [9, 24]. En condiciones de no estímulo las subunidades  $\alpha$  ejercen un papel supresor sobre las unidades  $\beta$ , evitando que se autofosforile [28].



**Ilustración 3** Receptor de insulina, formado por 2 subunidades alfa y dos beta (Modificado de *Dean, L & McEntyre, J; 2004*).

La insulina tiene efecto sobre las células adiposas y de músculo estriado promoviendo diferentes procesos como la remoción de glucosa de la sangre y su entrada al citoplasma celular donde es empleada para liberar energía en forma de ATP (glucólisis y ciclo de Krebs) [26].

Durante la digestión, los carbohidratos consumidos en la dieta se transforman en glúcidos de seis átomos de carbono, por medio de procesos químicos que incluyen las reacciones de hidrólisis catalizadas por amilasas presentes en saliva y en el páncreas. Después de la digestión, se eleva la glucemia y se estimula la secreción de insulina por el mecanismo anteriormente explicado [28].

Cuando se trata de un individuo sano, la glucosa se utiliza en la síntesis de glucógeno hepático y muscular por el proceso de glucogénesis, en este proceso la enzima más relevante es la glucógeno sintetasa que está regulada positivamente por la insulina. Si hay una disminución de glucosa a nivel plasmático, el glucógeno se usa para la síntesis hepática de glucosa, ésta posteriormente es liberada a la circulación para equilibrar los niveles de glucosa. A este proceso se le conoce como glucógenolisis y es activado a partir de la hormona glucagón que a su vez activa a la glucógeno fosforilasa a través de cAMP, la cual inhibe a la glucógeno sintetasa [28].

La afección de este proceso en los pacientes con DM depende del tipo diabetes que padecen. En el caso de la DM tipo 1, los individuos poseen receptores de insulina deficientes aunque son capaces de producir glucagón y llevar a cabo la glucogenólisis y la gluconeogénesis, pero la baja producción de insulina provoca una disminución en el número de transportadores de glucosa GLUT 4 (músculo esquelético y células adiposas), como resultado tenemos una hiperglucemia que persistente después de la ingesta de comida. Esto se agrava, puesto que las células dependientes de insulina no transportan glucosa y el organismo lo registra como si existieran niveles bajos de glucosa, movilizandando las reservas de lípidos y proteínas para obtener glucosa aumentando la hiperglucemia [28].

Otros tejidos como las células del hígado, los riñones, la mucosa del intestino y glóbulos rojos, no requieren de la insulina para el transporte de la glucosa del

medio extracelular hacia el citoplasma, por ello la hiperglucemia crónica tiene efectos a largo plazo sobre éstas células dañando a diferentes órganos especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos [6, 9] causando enfermedades como retinopatía con posible pérdida de visión, nefropatías, inclusive falla renal [6].

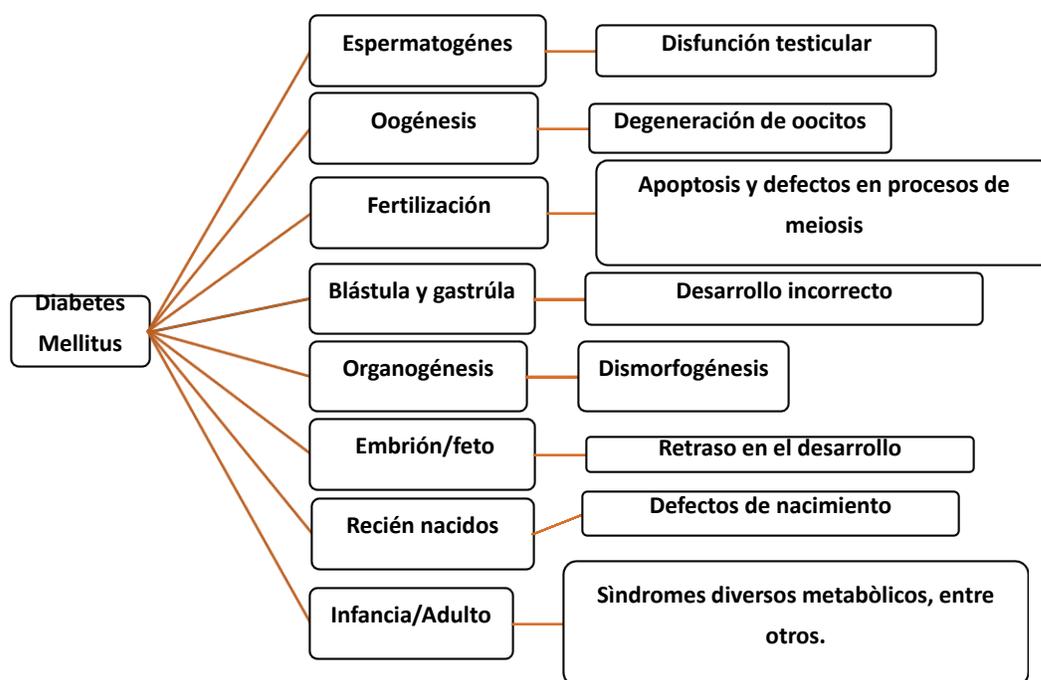
### **Diabetes mellitus durante la gestación**

Por último, el grupo de DM gestacional. La DM gestacional se define como la baja tolerancia a la glucosa en mujeres, diagnosticada por primera vez durante el embarazo [4]. Esta baja tolerancia se debe principalmente a la resistencia a la insulina, característica que comparte con la DM 2 [9].

Existen controversias para esta clasificación de la DM, pues en ocasiones cuando la madre da a luz, la DM gestacional termina, en otras ocasiones no es así, en realidad la madre continua con DM desarrollando DM 2, la interrogante que surge es si no se trataba de un caso de DM 2 no diagnosticado a tiempo [29]. No obstante, esta definición se aplica si la condición persiste o no después del parto y no excluye la posibilidad de la intolerancia a la glucosa no reconocida previamente o que inclusive comenzó al mismo tiempo que el embarazo, la función del término DMG ha facilitado la aplicación de una estrategia uniforme para su control y tratamiento [6].

Actualmente la DM (DM1 y DM2) es un padecimiento muy común en todos los grupos de edad que va desde infantes hasta adultos mayores [1]. La incidencia aumenta año con año de forma alarmante, inclusive se ha pronosticado que para el año 2030 la diabetes podría ser la séptima causa de muerte a nivel mundial [30]. Esto tiene repercusiones en uno de esos sectores: las mujeres en edad reproductiva o en estado gestante, pues se sabe que un gran número de estas mujeres presentan obesidad y/o diabetes [1], afectando su salud y algunos procesos previos al embarazo de diferentes maneras como se muestra en la Ilustración 4. De acuerdo al Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades los análisis que fueron realizados en el año 2014, se calcula que la prevalencia de DM gestacional es de 9.2% [31].

Este grupo ha focalizado la atención del Sector Salud puesto que en las mujeres gestantes, se ha observado que su condición se relaciona con un mayor riesgo de resultados perinatales adversos [32, 33], al parecer la DM es un riesgo significativo para el feto [34], debido a que la glucosa cruza la placenta y así aumenta las concentraciones de glucosa para el feto [35], y esto está asociado a diversas patologías como obesidad o diabetes en la progeñie de estas madres que se presenta a corto plazo como lo son algunas enfermedades congénitas o largo y mediano plazo como lo son algunas enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad [36, 37].



**Ilustración 4. Efectos de la DM (pregestacional y gestacional) en diferentes etapas del desarrollo y reproducción (Modificado de Ahmed; 2011).**

Si bien durante el periodo del embarazo la glucosa en sangre de la madre aumenta progresivamente, puesto que representa una fuente nutricional requerida por el feto para su crecimiento [38], la DM gestacional es el resultado de la intolerancia a la glucosa, de severidad variable que inicia durante el embarazo [39] y se debe principalmente al decremento a la sensibilidad de la insulina [29], incluye alteración en la respuesta de la insulina, decremento en la supresión

hepática de la producción de glucosa durante la fusión de insulina con su receptor y disminución en la toma de glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético [40].

Otro aspecto importante en el estudio de esta enfermedad es el tiempo en que se desarrolla la enfermedad, aun cuando en la clasificación oficial de la DM no existe una subdivisión de esta, se han observado diferentes efectos en la progenie dependiente de este factor. A partir de las consecuencias y algunos síntomas que varían en los pacientes se identifican dos subtipos de diabetes materna: a) DM pregestacional y b) DM gestacional, ambas presentan diferentes efectos en el desarrollo intrauterino [41].

En el caso particular de la DM gestacional se manifiesta hacia el tercer trimestre del embarazo y muestra niveles de glucosa en sangre de  $\geq 126$  mg/dL. No obstante no es causa de enfermedades congénitas severas, pero se ha observado no solo en modelo animal de DMG, sino también en humanos y está relacionado con problemas como macrosomía, bajo peso al nacer, problemas respiratorios y defectos endocrinológicos. En cambio la DM pregestacional se presenta antes del embarazo, es decir antes de la concepción, los niveles de glucosa en sangre de la madre aumentan aún más, los valores son  $\geq 200$ mg/dL y las consecuencias en la progenie son mayores pues afectan a la organogénesis [41].

### **Programación *in útero***

Este término hace referencia a las adaptaciones fisiológicas o metabólicas que adquiere el feto en respuesta a un microambiente adverso (referente a la disposición de nutrimentos y oxígeno) en una etapa crítica del desarrollo estructural o funcional de ciertos órganos, lo cual tendrá repercusiones en la vida extrauterina [10]. Se ha sugerido que los eventos implicados en el desarrollo fetal normal como los cambios metabólicos *in útero*, tienen efectos a largo plazo e influyen en patrones fisiológicos y estructurales, proponiendo que son estos los que “programan” la salud durante la vida adulta [42-44], como lo establece la “Hipótesis de Barker”, la cual se conoce como el origen de la salud y la enfermedad durante el desarrollo intrauterino [45, 46].

Los resultados obtenidos de experimentos con animales, así como las observaciones realizadas en humanos, apuntan a que la nutrición que es obtenida en el medio intrauterino modula la función de varios órganos como aquellos que presentan actividad metabólica en la vida posnatal [47, 48].

### **Efectos a corto plazo (defectos congénitos)**

La diabetes es un factor perjudicial importante durante el embarazo. A pesar que cualquier tipo de diabetes resulta en efectos adversos en la progenie, la DM pregestacional (sin importar que sea tipo 1 o 2), tiene efectos más serios y es responsable de una gran cantidad de embarazos cuya descendencia presenta defectos congénitos [49].

En las mujeres diabéticas, el ambiente en el que el embrión y el feto se desarrollan se convierte en un lugar hostil, pues las condiciones son negativas. Estas condiciones dan lugar a una serie de adaptaciones fisiológicas del embrión que le permita sobrevivir, pero son precisamente estas adaptaciones las que suelen resultar en defectos congénitos o bien a partir de las cuales se desarrollan ciertas anomalías [50]. La DM pregestacional mal controlada se ha asociado a una mayor incidencia de defectos congénitos en un 5-10% de los embarazos y 15-20% de abortos espontáneos [51]. Sin embargo, a pesar de los cuidados obstétricos y la mejora en el manejo de la hiperglucemia materna en los últimos años, se ha observado que los índices de mortalidad perinatal y las anomalías congénitas aún permanecen altos en comparación con la población sana [52, 53].

Las anomalías que se presentan mayormente en la descendencia de madres diabéticas se muestran en la tabla 1.

Los elementos presentes en el medio intrauterino de la madre diabética considerados factores teratogénicos son: insulina, hiperglucemia, cuerpos cetónicos, productos residuales de glucólisis, déficit de ácido araquidónico y carencia de la somatomedina [54]. De estos elementos los niveles de glucosa elevados que son observados durante períodos críticos de la morfogénesis parecen ser el mayor elemento teratogénico, inclusive se observó que la hiperglucemia derivada de las diabetes materna induce hipoxia [55]. En algunos

experimentos realizados en modelos animales donde se induce DM gestacional se ha demostrado que la hiperglucemia induce estrés oxidativo tanto en condiciones de cultivo *in vitro*, como en tejidos del embrión y feto [55-60].

**Tabla 1. Enfermedades congénitas comunes en los hijos de madres diabéticas, (Ornoy, Reece; 2015)1 y (Nazer, García; 2005)2**

<i>Sistema nervioso Central</i> <sup>1</sup>	<i>Sistema Cardiovascular</i> <sup>1</sup>	<i>Estructuras Craneofaciales</i> <sup>1</sup>	<i>Otros</i> <sup>2</sup>
<b>Anencefalia</b>	Hipoplasia izquierda o derecha del corazón	Macrosomia Hemifacial	Malformaciones esqueléticas múltiples
<b>Acrania</b>	AVSD y VSD	Hendidura de labio/paladar	Síndrome de Down
<b>Meningoiocele</b>	Atresia de la tricúspide y atresia mitral	Microtia	Malformaciones renales
<b>Arrinencefalia</b>	Doble entrada en el ventrículo izquierdo	Micrognatia	Atresia de duodeno
<b>Microcefalia</b>	Doble salida en ventrículo derecha	Macrooftalmia	Síndrome de Pierre Robin
<b>Exencefalia</b>	Transposición de grandes arterias	Displasia frontal nasal	Quiste branquial
<b>Holoprosencefalia</b>	Tetralogía de Fallot	Opacidad en lente ocular	
<b>Espina bífida</b>			

Una vez que aumenta la concentración de glucosa en el embrión o feto, también incrementan las especies reactivas de oxígeno (ROS), dicho evento provoca un desequilibrio, puesto que la capacidad antioxidante natural de las células embrionarias y fetales no es suficiente, dando paso a 3 eventos: 1) alteraciones en las membranas celulares, 2) función inadecuada de las mitocondrias y 3) apoptosis [55, 61, 62].

Es frecuente que los hijos de madres diabéticas presenten alteraciones del crecimiento fetal, que al nacimiento puede conducir a malformaciones congénitas o provocar asfixia, hipoglucemia, inclusive trastornos metabólicos como hipocalcemia, hipomagnesemia e hiperbilirrubinemia, entre otros [54].

Las tasas altas de mortalidad y morbilidad en este sector de niños y modelos experimentales se deben principalmente a malformaciones congénitas graves que causan problemas en el funcionamiento correcto de los órganos inclusive la falta de algún órgano como el cerebro en el caso de anencefalia [51, 62, 63].

### **Efecto de la diabetes materna en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la vida posnatal en humanos.**

Evidencias clínicas y epidemiológicas señalan que las enfermedades coronarias, y otras enfermedades cardiovasculares crónicas comunes en la infancia y la vida adulta tienen sus orígenes en la vida fetal [46, 64]; siendo la más común la cardiomiopatía hipertrófica [65]. Actualmente se acepta que las enfermedades cardiovasculares se adquieren mediante un proceso denominado programación fetal [50]. Este proceso consiste en una serie de cambios epigenéticos en el genoma embrionario promovidos por el ambiente intrauterino hiperglucémico debido a la DM durante la gestación que en los hijos de madres diabéticas incrementan la susceptibilidad para contraer enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la vida adulta [64]. Se ha encontrado una correlación entre los niveles del perfil lipídico en el segundo y tercer trimestre del embarazo en la mujer gestante y el aumento de la presión arterial sistólica de la prole en la adolescencia; sin embargo no se conocen los mecanismos que permiten que esto suceda, de acuerdo a lo observado, existe una alteración del metabolismo secundario del feto en presencia de una alta concentración de ácidos grasos y de beta-hidroxibutirato en la madre [66].

Diversos estudios en humanos son concordantes con esta idea, por ejemplo recién nacidos macrosómicos de mujeres diabéticas mostraron la masa ventricular izquierda aumentada y mayor grosor de la capa íntima aórtica, así como altos índices de en el perfil lipídico (HDL y LDL) en comparación con recién nacidos

macrosómicos y normales de mujeres no diabéticas [67]. Además, los mortinatos aparentemente normales de mujeres diabéticas al ser comparados con mortinatos de madres no diabéticas tuvieron corazón de mayor peso con pared ventricular más delgada [68]. Así mismo el análisis retrospectivo para evaluar el riesgo de desarrollo de defectos congénitos y/o hipertrofia ventricular patológica PVH en embarazos diabéticos (diabetes pregestacional tipo 1 y tipo 2 y diabetes gestacional) mostró que la mortalidad debida a PVH en la población estudiada es relativamente alta (1/6 pacientes con PHV). El mayor riesgo de PHV estuvo presente para los recién nacidos de madres con DMG. También se descubrió que en los embarazos de mujeres con diabetes tipo 1 o 2 el porcentaje de recién nacidos que sufren PHV asciende a 33%, valor muy superior al 12% de cardiopatías congénitas en la progenie de madres diabéticas [34]. Estos hallazgos indican un efecto diferencial a lo largo de la gestación de la diabetes materna: durante el primer trimestre del embarazo, la diabetes tiene un efecto teratogénico en la cardiogénesis alterando la expresión de genes involucrados en la morfogénesis del corazón, en tanto que al final del segundo trimestre o principios del tercer trimestre, el feto puede verse afectado por cardiomiopatía hipertrófica [69].

No obstante las enfermedades cardiovasculares no son las únicas que llegan a presentar los hijos de madres diabéticas, además de enfermedades congénitas o malformaciones, se han observado ciertos efectos en su metabolismo [70]. Al momento del nacimiento algunos recién nacidos presentan aumento en la concentración de lípidos, apolipoproteína pro-arteriosclerótica A-I y B-100, así como lipoproteínas en comparación con la descendencia de madres no diabéticas [71]. Aún se requiere de más estudio acerca de los efectos de estos niveles elevados de lípidos, a pesar de ello, se puede aseverar que al persistir este tipo de dislipidemias en los niños y jóvenes los predispone a desarrollar síndromes metabólicos en la vida adulta [70].

Como se ha visto, el efecto de la DM gestacional sobre el corazón es contraproducente. Sin embargo, por la imposibilidad científica y ética de analizar en los humanos el papel de la diabetes materna en la homeostasis y función del

corazón posnatal y comprender los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, distinguiendo el momento en que se manifiesta la enfermedad materna y el nivel de glucemia, se ha recurrido al empleo de modelos animales como la rata y el ratón en los que es posible controlar un mayor número de variables. La inducción de la diabetes materna mediante estreptozotocina es una estrategia ampliamente usada.

### Inducción de Diabetes Materna

La estreptozotocina (STZ, 2-deoxi-2-(3(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos), es sintetizada por una actinobacteria llamada *Streptomyces achromogenes*. La dosis requerida para inducir DM en rata por administración vía intraperitoneal suele estar en el rango de 40-60 mg/kg de peso corporal [72].

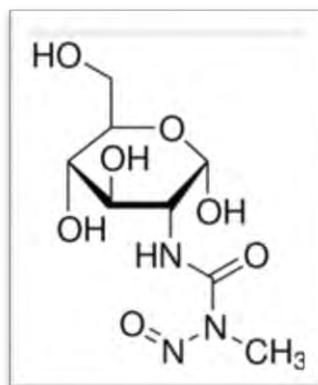


Ilustración 5 Estructura de Estreptozotocina (*Sigma-aldrich; 2015*)[73].

El primer evento en el proceso patológico es la fijación de esta molécula a la membrana celular, su toxicidad se debe principalmente por el reconocimiento específico de receptores de glucosa GLUT2 por las células  $\beta$  [74].

La acción de la STZ en la células  $\beta$  pancreáticas provoca alteraciones en las concentraciones de glucosa e insulina en sangre. Se ha observado que tan solo dos horas después de la administración de este químico hay un aumento en la glucosa en sangre y una baja en la concentración de insulina, cerca de seis horas después se manifiesta hipoglucemia y un aumento en los niveles de insulina. Más tarde se desarrolla la hiperglucemia y los niveles de insulina decrecen [75]. Dichos cambios en la concentración de glucosa en sangre, perjudican la función correcta

de las células  $\beta$  del páncreas, ya que la STZ no permite la oxidación de glucosa [76], y afectan la biosíntesis y secreción de insulina [77, 78].

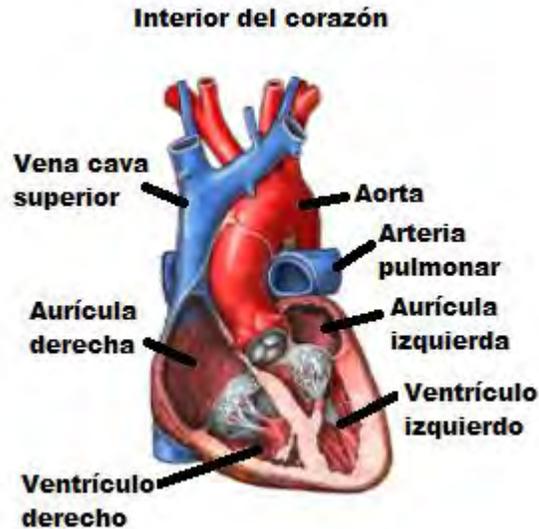
La entrada de STZ a las células  $\beta$  pancreáticas sucede a través del transportador de glucosa GLUT2 [79, 80]. STZ al ser metabolizada dentro de las células  $\beta$  además de generar especies reactivas de oxígeno, muestra propiedades de óxido nítrico ejerciendo un efecto citotóxico en las células [81, 82]. Dicho efecto se caracteriza por promover un incremento en la actividad guanilil ciclasa y la formación de cGMP [82] contribuyendo a la fragmentación [83, 84], y daño al DNA (81, 84) que da paso a otros cambios deletéreos en las células [76, 85]. Si bien NO y las especies reactivas de oxígeno pueden causar daños de manera separada, también pueden formar un peroxinitrato altamente tóxico [86].

El daño causado por STZ al DNA también activa la poliADP-ribosilación [87], dicho proceso conduce a escasas de NAD<sup>+</sup> y reducción de ATP [88] que resulta en la inhibición de la síntesis y secreción de insulina [78]. La poli ADP-ribosilación es el mayor efecto de la diabetogénia promovida por STZ comparado con la generación de radicales libres y el consiguiente daño al DNA [86].

### **Anatomía del corazón.**

El corazón se encuentra localizado en el centro de la cavidad torácica, descansa sobre el diafragma que es el músculo que separa a las cavidades torácica y abdominal. Se encuentra dentro de un saco fibroso llamado pericardio en el cual encontramos fluido pericárdico, dicho fluido tiene la función de lubricar la superficie del corazón y permite el movimiento libre durante su función normal [89].

La forma externa del corazón se asemeja a un cono irregular invertido como se muestra en la figura 6. Este órgano está formado por 4 cámaras: las dos cámaras superiores se llaman aurículas, las dos cámaras inferiores se llaman ventrículos, las cuatro cámaras se dividen en derechas e izquierdas dependiendo de su posición respecto a una pared muscular o septo que divide en 2 porciones principales al corazón [90].



**Ilustración 6. Corazón en corte sagital, mostrando las cuatro cámaras (Modificado de ADAM; 2010).**

La región del septo que divide a los ventrículos derecho e izquierdo se llama tabique interventricular. Entre ambos ventrículos encontramos que el ventrículo izquierdo es más grande y tiene una pared más gruesa y fuerte que el derecho, debido a su función durante el bombeo de sangre ya que requiere de una mayor presión para poder llevar la sangre a todo el cuerpo. Las aurículas se encuentran separadas por el tabique interauricular, aquí encontramos una zona delgada sin músculo llamada fosa oval que se encuentra cubierta por una lámina de tejido membranoso mesenquimal. Durante la etapa fetal se mantiene la comunicación interatrial que finalmente se cierra poco después del nacimiento [91].

La unión de la aurícula derecha con el ventrículo derecho está protegida por la válvula tricúspide, la cual permite el paso de sangre de la aurícula al ventrículo, pero no en sentido contrario. El ventrículo derecho de forma triangular muestra músculos en su superficie interna, llamados músculos papilares, los cuales sirven de anclaje para dicha válvula. En la región izquierda del corazón, se encuentra la aurícula izquierda y el ventrículo izquierdo, ambas regiones se comunican a través de la válvula mitral, que solo permite el flujo de sangre en una sola dirección. El ventrículo izquierdo es más largo y estrecho que el derecho, es decir que la punta del corazón está formada por completo por dicho ventrículo. El ventrículo izquierdo

también presentan 2 grupos de músculos papilares: anterior y posterior, que sirven de anclaje a la válvula mitral [91].

Existen otras válvulas relacionadas con la salida de sangre al corazón llamadas sigmoideas de la pulmonar y la aórtica. Estas válvulas difieren significativamente en estructura respecto a las válvulas aurículo-ventriculares. Las válvulas sigmoideas no presentan músculos papilares y son denominadas semilunares debido a su forma de cúspide creciente tienen 3 cúspides que se abren una vez que el ventrículo se contrae y se cierran cuando este se relaja. Las válvulas aurículo-ventriculares aparte de tener cúspides, cuentan con cuerdas tendinosas, delgadas y fuertes, las cuales mantienen a las válvulas unidas con las paredes de los ventrículos. Los elementos encargados de controlar la apertura y cierre de dichas válvulas son los músculos papilares que funcionan de guía empujando las cuerdas tendinosas [92].

El corazón se contrae rítmicamente para bombear la sangre en el siguiente orden: en el ápice del corazón encontramos a los vasos sanguíneos que se encargan de dirigir la sangre al corazón (venas cava superior e inferior y las venas pulmonares) o bien del corazón al resto del cuerpo (arteria pulmonar y aorta). La sangre regresa del cuerpo al corazón por medio del sistema venoso, la vena cava superior entra por la parte posterior y superior del corazón al atrio derecho; la vena cava inferior entra por la parte inferior. La sangre que recibe el atrio derecho está desoxigenada. Una vez que la sangre ha sido colectada en esta cámara es bombeada al ventrículo derecho a través de la válvula tricúspide que al cerrarse evita la regurgitación desde el ventrículo derecho a la aurícula derecha. El flujo de sangre dentro del ventrículo derecho es suave, después se dirige hacia la arteria pulmonar y de ahí a los pulmones donde la sangre es oxigenada. Después las venas pulmonares vacían la sangre ya oxigenada en la aurícula izquierda. En seguida la sangre pasa al ventrículo izquierdo que la bombea a la arteria aorta desde donde a través de es distribuida por todo el cuerpo [92].

La arquitectura del corazón es complementada por el sistema coronario y el de conducción. El primero está encargado de llevar irrigación propia al corazón,

iniciándose con la emergencia de arterias coronarias tanto derecha como izquierda, las cuales provienen de la aorta a nivel de la válvula aórtica; las venas coronarias terminan convergiendo en el seno coronario que se ubica en el atrio derecho. Por su parte, el sistema de conducción se encarga de llevar de forma eficiente los impulsos eléctricos que permiten la contracción muscular cardíaca; estos impulsos son generados en el nodo sinusal, que se ubica en la unión que hay entre la vena cava superior y el atrio derecho, y desde esa posición se propagan al nodo atrioventricular, al haz penetrante atrioventricular (haz de His), a las ramas derecha e izquierda y por último a las fibras de Purkinje [93].

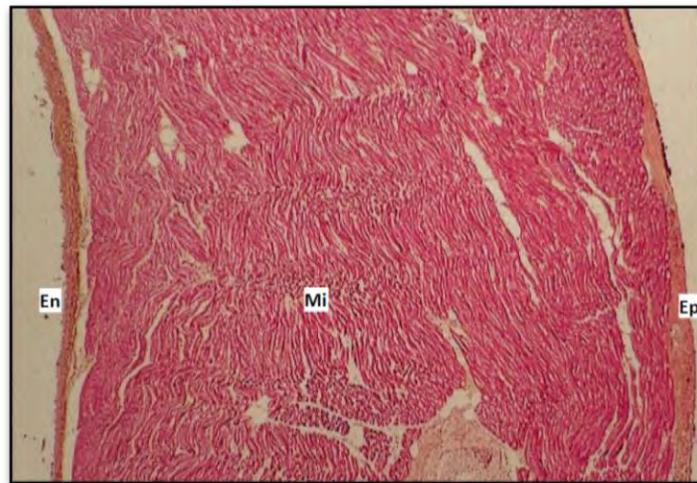
Es importante recordar que el corazón es el primer órgano en formarse y de forma inmediata inicia su función, evidentemente debe mantener su función en niveles óptimos, más que cualquier otro órgano a través de la vida de un organismo, iniciando como un corazón primitivo en forma de tubo hasta la formación de un corazón de 4 cámaras [94]. Es decir que el desarrollo de éste órgano implica una sucesión de eventos complejos y ordenados que determinan el funcionamiento del corazón, lo cual significa que un pequeño desajuste podría resultar en una enfermedad cardiovascular al momento del nacimiento, afectando a largo plazo a un individuo.

### **Histología del corazón**

La formación del corazón parte del mesoderma esplácnico al inicio de la tercera semana de gestación en los humanos y a los 9 días + 15 horas en la rata, su formación culmina en la séptima semana de embarazo en humano y el día 16 en la rata. Sin embargo, el desarrollo de este órgano no culmina durante el periodo gestacional. La división mitótica de los mioblastos continúa hasta poco antes del nacimiento, después el corazón crece a partir del aumento del tamaño de las células por hiperplasia, aumentando de igual forma el número de mitocondrias por célula [95].

La pared del corazón está formada por tres capas: el endocardio, miocardio y epicardio como se muestra en la Ilustración 7.

**El endocardio** consiste de una membrana que recubre la superficie interna de las cavidades cardíacas [96]. Presenta 3 capas; el endotelio, el cual es un fino epitelio escamoso, plano y simple que recubre el interior del corazón por lo que entra en contacto directo con la sangre. El subendotelio formado de tejido fibroelástico compone a la segunda capa, está representado por tejido conjuntivo elástico y colágeno, nervios y vasos sanguíneos. Por último, la capa subendocárdica adyacente al miocardio que consta de tejido conectivo laxo [96, 97].

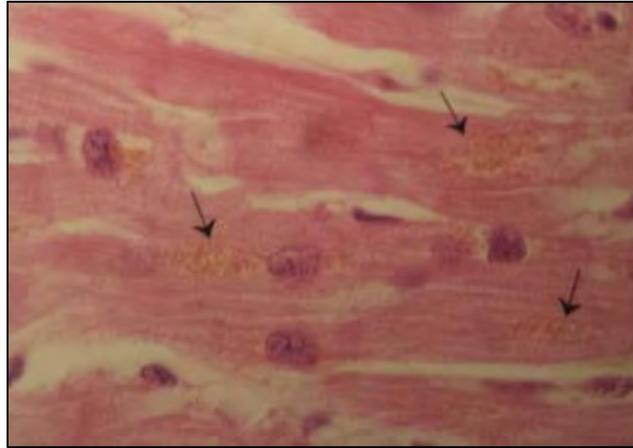


**Ilustración 7.** Corte transversal de la pared cardíaca. Se observan 3 capas, En: endocardio, Mi: miocardio y Epi: epicardio, Hematoxilina y Eosina 40X, (Modificado de *Boya; 1995*).

**El miocardio** es el tejido muscular cardíaco. representa la capa más desarrollada y de mayor grosor de la pared cardíaca [97], se encuentran distribuido en espirales alrededor de las cavidades del corazón y consiste de fibras y células individuales conectadas en una red espacial. Esta capa tiene un tipo especial de tejido cardíaco estriado con 2 líneas celulares: contráctiles (miocitos cardíacos que forman las fibras cardíacas musculares) y células especializadas entre las que destacan células secretoras, endocrinas y generadoras o conductoras de impulsos [96].

Los miocitos cardíacos son células ramificadas que presentan un núcleo central oval, grande con abundante cromatina laxa. En cuanto a la membrana plasmática, muestra características similares al músculo esquelético, no obstante la estriación no es densa puesto que las miofibrillas contráctiles (actina y miosina) están

ubicadas en posición paralela a las mitocondrias y al retículo sarcoplásmico. El sarcoplasma además contiene muchas mitocondrias, glucógeno y lisosomas con pigmento de lipofucsina [95].



**Ilustración 8. Miocitos cardíacos, se observan lipofucsina señalada con flechas y núcleos. También se puede apreciar con detalle la organización miofibrilar (Modificada de *Boya; 1995*).**

Los miocitos cardíacos se unen a través de uniones especializadas complejas denominadas discos intercalares que son observables como gruesas líneas transversales, atraviesan todo el ancho de la fibra, pero su distribución suele estar dada en varias porciones longitudinales que están desplazadas, por ello su aspecto asemeja a una escalera. Los discos intercalares presentan una porción transversa con uniones intercelulares adherentes (fascia adherens y desmosomas) y uniones de comunicación llamadas nexos que permiten el paso de iones desde el citoplasma de una célula a la célula vecina y posibilitan el acoplamiento eléctrico entre las fibras musculares cardíacas y se contraigan en forma conjunta como si formaran parte de un gran sincisio eléctrico [98]. Las fibras correspondientes a células contráctiles suelen medir un promedio de 100  $\mu\text{m}$  de longitud y hasta 30  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas fibras se ramifican y se entrelazan en dirección diagonal alrededor del corazón, formando una red auricular y una red ventricular.



**Ilustración 9. Fibras musculares cardíacas (Netter; 1969) [99]**

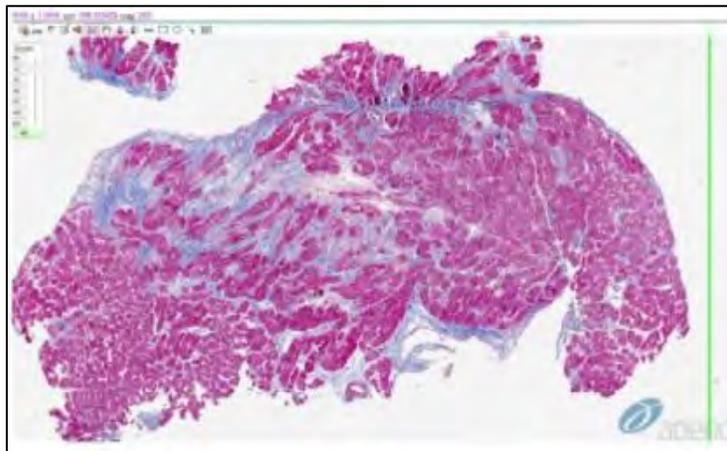
El miocardio ventricular tiene tres capas que se entrelazan mutuamente para formar un sistema común. Las paredes del ventrículo derecho están cubiertas por trabéculas más gruesas y cortas que las trabéculas del ventrículo izquierdo que son delgadas y muy alargadas [98].

**El pericardio** es la tercera capa de la pared cardíaca, es un saco que recubre externamente al corazón y se encuentra desdoblado en dos hojas o dos capas: Una de ellas es la hoja visceral o también llamada epicardio que es un mesotelio que recubre al corazón, se encuentra unida al miocardio y está formada de un tejido conjuntivo vascularizado, así como lobulillos adiposos. En las raíces de los vasos que entran y salen del corazón, el pericardio visceral se hace continuo con el pericardio parietal, el cual es la segunda hoja. El pericardio fibroso o parietal, el cual recubre hasta los grandes vasos (aorta, tronco pulmonar, una porción de la vena cava superior). Ésta capa está formada por tejido conjuntivo con muchas fibras de colágeno y revestido por un mesotelio (epitelio escamoso simple) orientado hacia la cavidad pericárdica [96].

## **Fibrosis cardíaca**

Es un fenómeno anómalo que se da a nivel tisular afectando a través de la deposición anormal y excesiva de matriz extracelular (Ver Ilustración 10). Este término abarca diversos procesos que incluyen proliferación de fibroblastos, síntesis y degradación de colágeno, también la conversión de fibroblastos en miofibroblastos contráctiles.

La fibrosis parece jugar un papel muy importante en el desarrollo de patologías como dilatación ventricular y la falla cardíaca. Sin embargo, el efecto total de la fibrosis cardíaca es una modificación global en la fisiología cardíaca que se relaciona con el incremento de rigidez en el tejido, la contracción no pareada debido a la separación de los miocitos, la interrupción de la conectividad electrotónica y la hipoxia tisular [100].



**Ilustración 10. Tejido miocárdico que muestra evidencia de fibrosis (Daunoravicius; 2014).**

## **Histología de las coronarias**

Los vasos sanguíneos inician y terminan de vuelta en el corazón, es decir, el sistema circulatorio es un circuito cerrado y los tres tipos básicos de vasos sanguíneos son [101]:

1. Arterias: Son los conductos por los que se transporta la sangre oxigenada, una vez que el corazón se contrae con fuerza. A partir de ahí la sangre se

dirige a arterias menores para que al final pueda llegar a las ramas más delgadas o arteriolas que son las que alimentan a los vasos pequeños o lechos capilares que se encuentran al interior de los órganos del cuerpo.

2. Capilares: Se trata de los vasos diminutos y muy finos (8-12 $\mu$ ), son los únicos que tienen contacto estrecho con las células de los tejidos. Están formados por una capa de células endoteliales, una lámina basal y algunas fibras reticulares. En estas estructuras se lleva a cabo los intercambios de gases de líquido nutriente y de productos de desecho metabólico. Estos ramifican a partir de las arteriolas y convergen en las venas más pequeñas llamadas vénulas.
3. Venas: Las vénulas convergen a venas que son más grandes y son los vasos encargados de verter la sangre que regresa de la circulación dentro de las aurículas del corazón. Este sistema colector de sangre es de baja presión; suelen estar en mayor número que la o las arterias de las que proviene el flujo que transportan. La pared de las venas es muy delgada.

A excepción de los capilares, los vasos sanguíneos presentan 3 capas de tejido que conforman su pared. Estas capas son más evidentes en las arterias que en las venas. Las capas celulares llevan los siguientes nombres [102]:

1. Túnica íntima o interna. El epitelio que forma a esta capa es muy fino escamoso y simple y no solo recubre al interior de los vasos sanguíneos, también al interior del corazón, lo que permite que esté en contacto directo con la sangre. El endotelio se encuentra sobre una lámina basal. En seguida, por debajo del endotelio, se encuentra la capa subendotelial, la cual está formada por tejido conjuntivo laxo y algunas células de músculo liso, cuya orientación es longitudinal. Finalmente esta capa muestra debajo de la capa subendotelial a la lámina elástica interna (especialmente en arterias musculares). Separa la túnica íntima de la media y está compuesta por fibras elásticas.
2. Túnica media, la cual está formada por tejido conectivo y músculo liso concéntrico helicoidal. Entre las capas de músculo liso se encuentran fibras

de tejido conectivo: colágenas, reticulares y elásticas. Esta capa es de suma importancia en la dinámica reguladora de la circulación. La túnica media constituye la parte más gruesa de las arterias para que estas cumplan el rol de reguladoras de dos aspectos básicos de su función: Presión y dirección de flujo de sangre.

3. Túnica adventicia externa, la cual corresponde a tejido conectivo fibroelástico de revestimiento, el cual se continúa con el tejido que rodea al vaso sanguíneo. Está compuesta en su mayor parte por fibras holgadas y onduladas de colágena I y fibras elásticas, lo cual refuerza el anclaje del vaso a la estructura que le rodea. Las venas con frecuencia tienen la túnica adventicia más prominente.

Las diferencias entre venas y arterias son sumamente importantes:

**Tabla 2. Principales diferencias entre venas y arterias (Eynard; 2008 & Welsch; 2008)**

<b>Venas</b>	<b>Arterias</b>
Diámetros y luz total mayor	Diámetros y luz total menor
Paredes delgadas	Paredes gruesas
Capilares linfáticos en sus paredes	Sin capilares linfáticos en las capas internas
Túnica íntima es delgada	Túnica íntima gruesa
Túnica media es una capa muscular delgada	Túnica media es relativamente gruesa
Lámina elástica interna y externa poco desarrolladas	Lámina elástica interna y externa desarrolladas
Adventicia: capa más gruesa, compuesta por fibras	Adventicia tiene la mitad del grosor de la media. Rica en fibras elásticas y colágenas
Estructura poco constante	Estructura constante

## ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

El efecto a largo plazo de la diabetes y otros factores maternos en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares de la progenie juvenil y adulta se ha evidenciado de manera fehaciente en modelos murinos. En un trabajo pionero se determinó que la diabetes materna inducida en ratas con STZ el primer día de la gestación afecta la presión sanguínea, frecuencia cardíaca y reactividad vascular de pequeñas arterias *in vitro* [103]. También se ha demostrado que el suministro de una dieta hipoproteica a ratas gestantes además de provocar restricción del crecimiento intrauterino (IUGR por sus siglas en inglés) disminuye el número de miocitos y conduce a un bajo peso del corazón en comparación con las crías de rata con una dieta normal [104]. Esta situación en la vida adulta se refleja en fibrosis cardíaca asociada a disfunción diastólica y escasa recuperación después de isquemia [105, 106].

Además en un estudio realizado por Dowling y cols (2014) en un modelo de diabetes pregestacional en ratón, encontraron diferencias en las características histológicas del corazón de fetos de 18 días obtenidos de hembras diabéticas respecto a fetos de la misma edad de madres control. Las diferencias más significativas fueron el tamaño del núcleo de los miocitos cardíacos, en el caso de los hijos de madres diabéticas, los núcleos eran significativamente más pequeños que los del grupo no diabético; otro hallazgo fue el incremento en el número de núcleos en el grupo diabético. De igual forma analizaron la deposición de colágeno, y se encontró que existía un volumen mayor en la descendencia de madres diabéticas. Estos datos en conjunto sugieren que la DM altera el desarrollo de los miocitos cardíacos de la progenie, aumentando su proliferación y de igual forma la actividad sintética de los fibroblastos cardíacos [69].

En estudios realizados en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez, se investigó si la diabetes inducida en ratas gestantes, previo a la implantación del embrión, tiene un efecto que interfiere en el desarrollo correcto mediante la desregulación de algún proceso primordialmente durante la organogénesis. Dentro

de esta investigación se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley a las cuales se les indujo la diabetes materna por medio de la administración intra-peritoneal de estreptozotocina el quinto día de la gestación y se encontraron diferentes efectos en la progenie. En esta investigación fueron seleccionados dos grupos de trabajo, un control (RC: madres no diabéticas), y otro experimental (RD: madres diabéticas). En el grupo RC se observó que el tiempo de gestación duraba alrededor de 21 días, sin embargo en el caso del grupo RD, el tiempo se vio alterado, alargándose hasta 1.7 días en promedio, por lo que el parto de estas ratas tenía lugar el día 23 postcoito. El grupo RD en cuanto a la camada, tuvo menos crías así como un mayor número de reabsorciones y muertes intrauterinas comparadas con las correspondientes al grupo RC [41].

De acuerdo a otras investigaciones, se ha sugerido que probablemente los cambios que se dan a razón de la hiperglicemia durante el embarazo alteran la duración de la gestación a partir de la modificación de la energía de balance del embrión [107-109].

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes materna se presenta como un factor perjudicial sobre la salud de la prole, principalmente representando un riesgo latente y potencial de enfermedades cardiovasculares además de otras como DM 1, dislipidemias y obesidad. En investigaciones previas se observó una desregulación cronológica del desarrollo que prolongó el período de gestación de las ratas diabéticas hasta un total de 23 días en comparación con las ratas no diabéticas cuya gestación culminaba el día 21. La morfología externa de las crías de ratas diabéticas al día 21 era prematura y mostraban características de crías de tan solo 18 días de gestación. Existen diversos estudios realizados sobre la influencia y efectos que tiene la Diabetes materna sobre la embriogénesis, sin embargo no se ha investigado si el desfasamiento de la cronología del periodo de gestacional, provocado por la diabetes materna afecta las características morfológicas e histológicas del corazón en el periodo perinatal, como sucede en las estructuras maxilofaciales. Esta información es indispensable para entender los mecanismos de acción de la hiperglucemia materna en el corazón durante el desarrollo intrauterino que condicionan cambios en la homeostasis y función del órgano desde etapas tempranas de la vida y para crear estrategias metodológicas para investigar los cambios epigenéticos y redes moleculares involucradas. La pregunta planteada en este trabajo de tesis es: **¿Existe una relación entre la exposición a un ambiente hiperglucémico durante la embriogénesis y las alteraciones morfo-histológicas del corazón en la etapa perinatal?**

## OBJETIVOS

**Objetivo general:** Investigar los cambios anatómicos e histológicos en el corazón de crías perinatales obtenidas de rata con diabetes inducida antes de la implantación del embrión.

**Objetivos particulares:**

1. Analizar las características histológicas del miocardio ventricular, trabéculas y vasos coronarios
2. Determinar la posible existencia de hipertrofia y/o fibrosis en cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina y Tricrómica de Masson de crías de 21 días de gestación y recién nacidas

## **HIPÓTESIS**

El ambiente intrauterino hiperglucémico provoca una desregulación cronológica del desarrollo, promoviendo cambios en la morfometría e histología del corazón de la progenie en el periodo perinatal

## JUSTIFICACIÓN

Se ha observado un elevado número de casos en los que la progenie de madres diabéticas (en modelos experimentales como en humanos), presenta daños producidos al miocardio o hipertrofia cardíaca, el estudio de los procesos implicados en la desregulación cronológica del desarrollo intrauterino es necesario para lograr entender cómo influyen directamente en la morfohistología cardíaca. La investigación realizada es un antecedente para su detección y tratamiento adecuado disminuyendo la tasa de mortalidad de la progenie.

Los estudios de investigación en humanos son limitados y parciales. La razón por la que son estudios limitados se debe principalmente a que no es posible controlar las variables que cambian el ambiente intrauterino así como el estudio de los efectos directos sobre las etapas embrionarias, puesto que no está permitido por razones bioéticas. Debido a esto dentro de la realización del proyecto de tesis se utilizó al modelo biológico de rata, en este caso la cepa Sprague Dawley, a razón de la similitud de las características embrionarias, anatómicas y fisiológicas con las de los humanos [110]. Otros aspectos considerados fueron: a) la diabetes puede ser inducida en este organismo y fácilmente controlada [111] y b) el ciclo de vida así como el de gestación son períodos relativamente cortos facilitando la observación. La información obtenida en este trabajo es indispensable para entender los mecanismos de acción de la hiperglucemia materna en el corazón durante el desarrollo intrauterino que condicionan cambios en la homeostasis y función del órgano desde etapas tempranas de la vida y para crear estrategias metodológicas para investigar los cambio epigenéticos y redes moleculares involucradas.

## MATERIALES

### Material biológico

Ratas cepa Sprague Dawley adultas (Machos y hembras)	Ratas madres diabéticas a los 21 días de gestación	Ratas madres no diabéticas a los 21 días de gestación
Ratas madres diabéticas a término (final del día 23)	Madres no diabéticas en a término (final del día 21)	Corazones de fetos de 21 días y crías recién nacidas

### Material de laboratorio

<b>Soluciones</b>	<b>Manejo de Animales en Bioterio</b>
Amortiguador de acetatos (ver anexo 1)	Cajas para animales acondicionado con cama, rejilla, bebedero
Azul de toluidina 0.05% (ver anexo 1)	Canastilla para animales
Bouin (ver anexo 1)	Nutricubos y agua <i>ad libitum</i>
Solución salina	Glucómetro y tiras reactivas
PBS (ver anexo 1)	Hisopos estériles
<b>Dispositivos</b>	Lancetas
Balanza analítica	Portaobjetos
Microscopio estereoscópico con cámara	<b>Obtención de muestras biológicas</b>
Microscopio óptico	Cajas petri
Lámpara de fibra óptica	Estuche de disección
Estufa	Guillotina
<b>Fármaco</b>	Gasas
Estreptozotocina (50mg/kg de peso) disuelta en amortiguador de acetatos	Jeringas de 3 mL, 5mL e insulina
<b>Software</b>	
Programa Axio Vision AC	

<b>Material de Tinción</b>	
Carro para tinción	
<b>Hematoxilina-Eosina</b>	<b>Tricrómica de Masson</b>
Xilol	Xilol
Alcohol absoluto y al 96%	Alcohol absoluto y alcohol al 96%
Agua destilada	Agua destilada
Hematoxilina de Harris (ver anexo 1)	Solución Bouin (ver anexo 1)
Agua de la llave	Agua de la llave
Alcohol acidulado (ver anexo 1)	Hematoxilina de Weigerts (ver anexo 1)
Agua amoniacal (ver anexo 1)	Agua amoniacal (ver anexo 1)
Eosina de Carnegie (ver anexo 1)	Escarlata de Biebrich-Fucsina ácida
Entellan (ver anexo 1)	Solución ácido fosfotungstico - fosfomolibdico al 5% (ver anexo 1)
Cubreobjetos	Solución de azul de anilina (ver anexo 1)
	Agua acética (ver anexo 1)
	Entellan (ver anexo 1)
	Cubreobjetos

## METODOLOGÍA

### **Control materno**

Se utilizaron ratas cepa Sprague-Dawley, seleccionando a las hembras de acuerdo al peso máximo de 250 a 300 g. Una vez seleccionadas se determinó la etapa del ciclo estral en la que se encontraban. La determinación se realizó mediante un frotis vaginal teñido con azul de toluidina al 0.5%. Después de la tinción las preparaciones se observaron en un microscopio óptico a 10X y 40X. Únicamente las ratas que se encontraron en la etapa proestro y estro se separaron del resto.

Para promover el apareamiento, 3 hembras en la etapa de proestro o estro y un macho se colocaron en una caja donde permanecieron desde las 6 pm y toda la noche.

A las 7 am del día siguiente se retiró al macho y enseguida se realizó un frotis vaginal, que se tiñó con azul de toluidina al 0.5%. En este segundo frotis se analizó la presencia o ausencia de espermatozoides. Este dato junto con la identificación de un tapón vaginal mucoso sirvió para identificar a las ratas que habían quedado gestantes. El día en que se realizó este procedimiento se cuantificó como el día 0 de la gestación

### **Inducción de DM materna**

Las ratas gestantes fueron separadas aleatoriamente en dos grupos. El primer grupo denominado A fue el control y el segundo grupo denominado B fue el grupo experimental. A las ratas experimentales se les indujo la diabetes el 5° día de gestación mediante la administración intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) disuelta en amortiguador de acetatos en una dosis única de 50 mg/kg de peso. Al grupo A (control) se le administró únicamente amortiguador de acetatos 0.1 M con pH 4.3.

Setenta y dos horas después de la administración de STZ se midió la glucemia en sangre a ambos grupos de ratas gestantes mediante el uso de un glucómetro para confirmar la inducción de la diabetes en el grupo experimental y descartar la

enfermedad en los controles. Para ello se realizó una punción en la punta de la cola de cada una de las ratas, una vez obtenida la sangre se colocaba en las tiras reactivas en el glucómetro y se anotaban los datos. En este caso solo se incluyeron a las ratas con valores de glucemia  $\geq 200$  mg/dL. A partir de ese momento se mantuvo un monitoreo de la glucemia y peso corporal a lo largo del período de gestación para ambos grupos en los días 0, 3, 5, 8, 11, 14, 17, 21 y 23.

Todos los animales fueron manipulados con apego a los lineamientos nacionales e internacionales en materia de manutención y manejo de animales para experimentación NOM-062-200-1999 [112]

### **Obtención de crías.**

Se establecieron los grupos de estudio para analizar la morfohistología del corazón de las crías de las madres pertenecientes a ambos grupos A y B. Para ello fue necesario monitorear el número de días transcurridos de gestación. Los grupos resultantes fueron los siguientes:

- Grupo 1: Fetos de 21 días de gestación de madres control (n=42)
- Grupo 2: Fetos de 21 días de gestación de madres experimentales(n=42)
- Grupo 3: Crías recién nacidas de madres control (n=36)
- Grupo 4: Crías recién nacidas de madres experimentales (n=36)

Los fetos del grupo 1 y 2 se obtuvieron mediante cesárea, y las crías del grupo 3 y 4 fueron obtenidas a través de parto espontáneo y mantenidas vivas un máximo de 12 horas. Se registró el número de crías por camada de cada rata gestante utilizada.

### **Obtención de corazones y fijación**

Previo al sacrificio de las crías por decapitación con una guillotina, se les registró el peso y la talla (longitud cráneo-rabadilla). De forma inmediata en cada caso se realizó una incisión en la caja torácica y se ubicó al corazón. Se realizó un corte en la aorta descendente para después perfundir a través del seno venoso solución salina 0.09% o buffer de fosfatos (PBS), con la intención de eluir los eritrocitos. Una vez perfundidos los corazones se colocaron en frascos individuales con

formol al 3.8% disuelto en PBS o solución fijadora de Bouin alcohólico etiquetados con el número de madre, grupo al que pertenecía la madre, número de cría y fecha de sacrificio.

La selección del fijador depende siempre del objetivo de la investigación, en este caso se utilizaron dos diferentes fijadores. El formaldehído preserva la estructura general de la célula así como sus componentes extracelulares, por ello se utilizó para aquellos corazones que serían teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina. El Bouin se utilizó para fijar los corazones que fueron teñidos con la técnica Tricrómica de Masson para la diferenciación de tejido muscular y conectivo.

### **Análisis morfométrico del corazón completo.**

Todos los corazones que fueron fijados con formol al 3.8% en PBS se fotografiaron utilizando un microscopio estereoscópico Lumar V12 que cuenta con cámara digital Axiocam MRc ambos de la marca Zeiss. Los corazones se colocaron de manera individual en una caja Petri que contenía solución salina. Con la ayuda de la lámpara de fibra óptica y la cámara del microscopio estereoscópico, se tomaron fotografías En las imágenes mediante el programa Axio Vision 4.4 AC se midieron los ejes horizontal y vertical del corazón. La primera medición se realizó a la altura de los tractos de entrada ventriculares (surco atrio ventricular), mientras que para el eje vertical se trazó una línea media desde el anillo de inserción de las sigmoideas pulmonares hasta el ápice ventricular.

### **Previo al análisis histológico**

Se realizó una incisión en la región ventricular, a la altura de los músculos papilares de las válvulas atrioventriculares, para facilitar la penetración de los solventes que se emplean para la inclusión.

### **Inclusión del material biológico**

Este proceso consistió en embeber el tejido en un medio firme como la parafina que permita realizar los cortes histológicos seriados. Con este propósito, se retiró

el fijador; las muestras fijadas en formal se lavaron con agua o PBS en intervalos de 5 a 10 minutos hasta eliminar los restos de fijador. Los especímenes fijados en Bouin alcohólico, fueron lavados en alcohol al 70% en lapsos de 3 minutos hasta lograr que el alcohol saliera totalmente libre de restos amarillos del fijador.

La deshidratación consistió en una serie de pasos por alcoholes en concentración gradual creciente. En el caso de las muestras fijadas en formol, la deshidratación inició con alcohol 30% y continuó con 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 2 cambios de alcohol absoluto. En contraste, las muestras que habían sido fijadas en Bouin alcohólico, fueron deshidratadas con alcohol 70% siguiendo con 90%, 96% y 2 cambios de alcohol absoluto. **Los tiempos se registran en el Anexo 2.**

El aclaramiento se realizó con aceite de cedro. Primero las muestras, tanto las que habían sido fijadas en formol como en Bouin se trataron con una mezcla de alcohol absoluto:aceite de cedro (1:1). Después las muestras permanecieron 12 horas en aceite de cedro puro. Inmediatamente los tejidos fueron lavados con una mezcla (1:1) de aceite de cedro y cloroformo y después únicamente con cloroformo en lapsos de 10 minutos, hasta que el solvente quedaba libre de aceite de cedro. **Los tiempos se especifican en el Anexo 2.**

Después los tejidos fueron gradualmente impregnados con parafina Paraplast (VIP Sakura Finetek, Torrance, Ca, USA). Primero las muestras se trataron con una mezcla (1:1) de cloroformo:parafina fundida. Luego se dieron tres baños sucesivos en parafina pura fundida hasta lograr que el cloroformo se eliminara. Estos procedimientos se realizaron en una estufa de inclusión que se encontraba a una temperatura de 62°C.

La inclusión consistió en colocar el corazón en el fondo de un molde de plástico correctamente etiquetado y lleno de parafina líquida. Una vez orientado el corazón para obtener cortes en el plano transversal o coronal, la parafina se dejó enfriar para que solidificara.

### **Cortes histológicos en micrótomo**

Se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor que se colocaban en la superficie del agua de un baño María a temperatura de 40-43°C con gelatina para que el tejido se estirara para montarlo en portaobjetos limpios, libres de grasa y polvo. Las preparaciones se dejaron secar y se guardaron cubriéndolas del polvo para después seguir el proceso de tinción.

### **Desparafinar y rehidratar**

Las preparaciones se colocaron en la estufa de inclusión a 67°C mínimo durante 2 horas. Luego se trataron con dos cambios de xilol por 5 minutos cada uno para retirar los restos de parafina.

Los tejidos se rehidrataron con lavados sucesivos en alcohol de graduación descendente: 2 cambios de alcohol absoluto por 5 minutos cada uno, 2 cambios de alcohol al 96 por 5 minutos cada uno y agua destilada por 5 minutos.

### **Tinciones**

Las preparaciones resultantes de las muestras fijadas en Formol se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) para analizar las características histológicas generales del miocardio ventricular (ver Anexo 3). Por su parte las preparaciones obtenidas de las muestras fijadas con Bouin se tiñeron con la técnica Tricrómica de Masson para distinguir la posible acumulación de colágeno y/o presencia de fibrosis (Ver Anexo 3).

### **Análisis morfométrico e histológico de cortes seriados**

Se seleccionaron 7 laminillas con 8 cortes transversales de cada corazón a nivel de la inserción de los músculos papilares teñidos con la técnica de H&E y se fotografiaron con el microscopio estereoscópico utilizado anteriormente en el análisis morfológico del corazón. En las fotografías, se midió el grosor de la pared de ambos ventrículos así como del tabique interventricular en las fotografías de los cortes seriados del corazón.

Los datos de 28 corazones del grupo 1 y 2, así como 26 corazones para los grupos 3 y 4, fueron registrados en bases de datos.

Las preparaciones histológicas más representativas de cada grupo teñidas con la técnica H&E o Tricrómica de Masson previamente estudiadas en los análisis morfométricos fueron observadas en un microscopio Olympus BH2-RFCA 1.25X para determinar las características del miocardio ventricular con especial atención en el grado de diferenciación de los miocitos cardíacos, la posible presencia de tejido fibroso y las propiedades de los vasos coronarios.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis de resultados, los datos obtenidos en **Control materno** como peso y glucemia se obtuvieron promedio, desviación estándar y el modelo lineal general para medidas repetidas. Para el caso del número de crías obtenidas en la camada, se realizó únicamente promedio y desviación estándar.

Los **resultados en la progenie** fueron peso y talla (cráneo-rabadilla), glucemia, análisis morfométrico del corazón y estudios histológicos. Para los datos de peso, talla y glucemia, se obtuvieron media y desviación estándar.

En el caso del **análisis morfométrico del corazón** se midió el grosor de las paredes ventriculares y el tabique interventricular en los cortes histológicos, obteniendo el promedio y la desviación estándar.

En seguida se realizó una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov para cada variable PVD, TI y PVI. A partir de este análisis se clasificaron a las variables de acuerdo a las pruebas estadísticas que requerían dependiendo si eran paramétricas (T-student) o no paramétricas (prueba U de Mann Whitney).

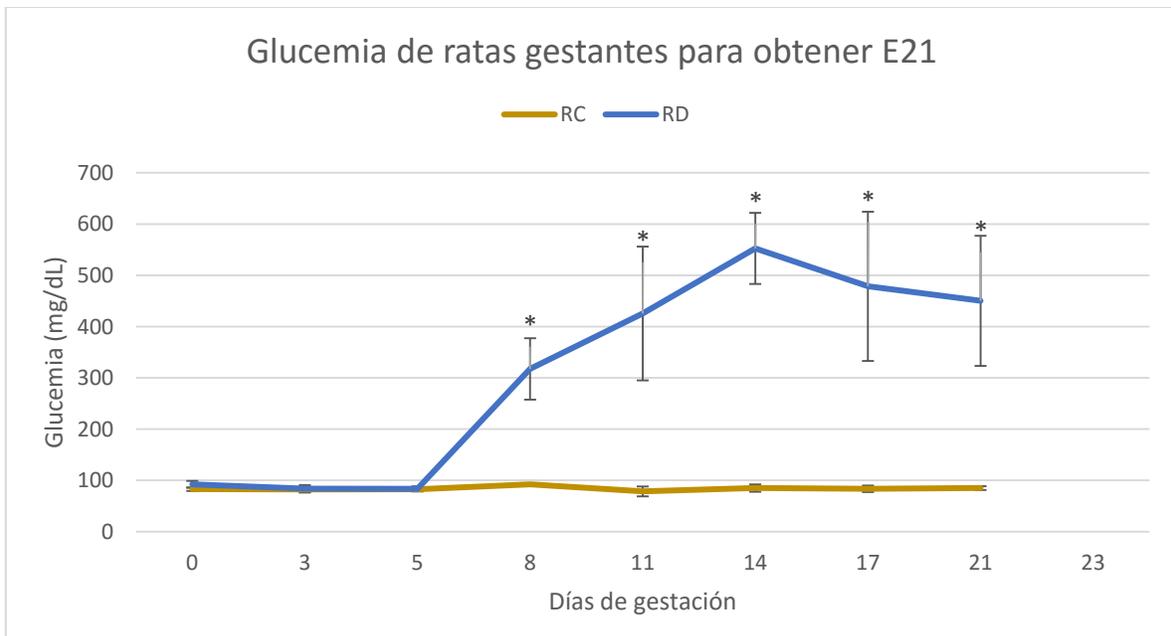
Todos los cálculos se realizaron en el programa IBM SPSS Statistics 22 y las gráficas en Excel 2013 y Graphpad prism 7 Trial.

# RESULTADOS

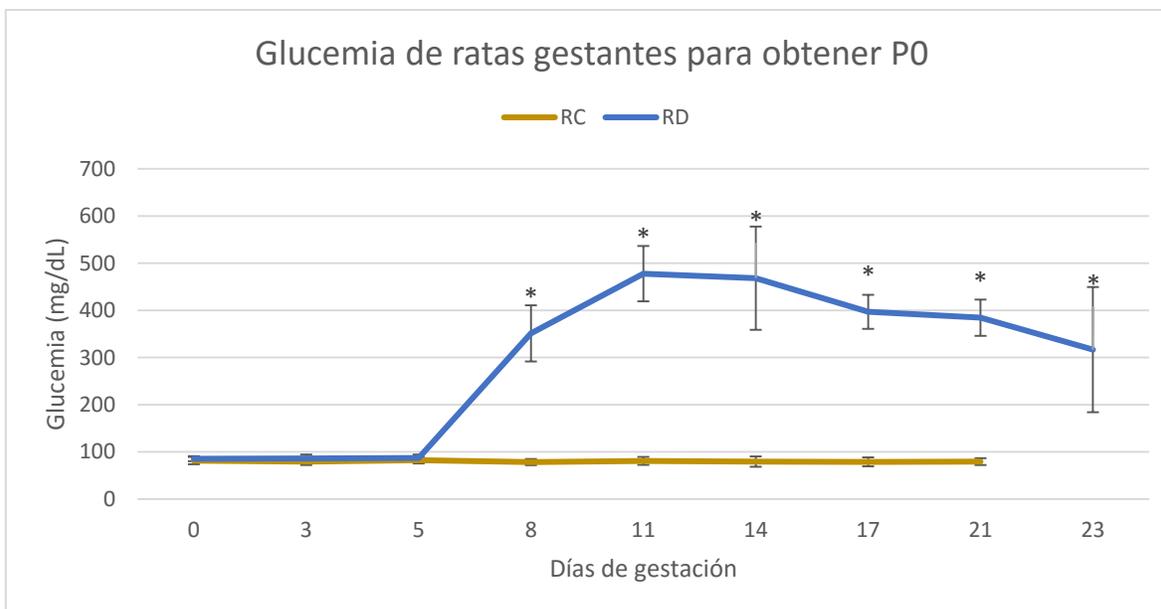
## Control materno

### Glucemia

Todas las ratas empleadas en este diseño experimental, al inicio de la gestación presentaron niveles normales de glucosa en sangre ( $\geq 100$ mg/dL), condición metabólica que persistió en el grupo de RC hasta el final de la gestación. Por su parte las ratas que aleatoriamente se distribuyeron para el grupo experimental, una vez que se les administró la estreptozotocina, se observó un incremento súbito en los niveles de glucemia (Gráficas 3 y 4) y descendió ligeramente acercándose el día del parto (Gráfica 4). Como resultado se observó que las ratas presentaron una diabetes grave con valores  $>300$  mg/dL, dichos valores continuaron aumentando hasta el día 14.



Gráfica 1. Concentración de glucemia de RC y RD para obtener fetos a término (E21). Observe que una vez inducida la diabetes en el grupo experimental la hiperglucemia se mantuvo durante toda la gestación. Media  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$  en comparación grupos RC y RD,  $n=4$ .



Gráfica 2. Concentración de glucosa en sangre de RC y RD para obtener crías PO. Note que la inducción de diabetes con STZ fue exitosa al persistir estos niveles de hiperglucemia durante la gestación. Media± SD, \*P < 0.05 para las comparaciones RC vs RD, n=4.

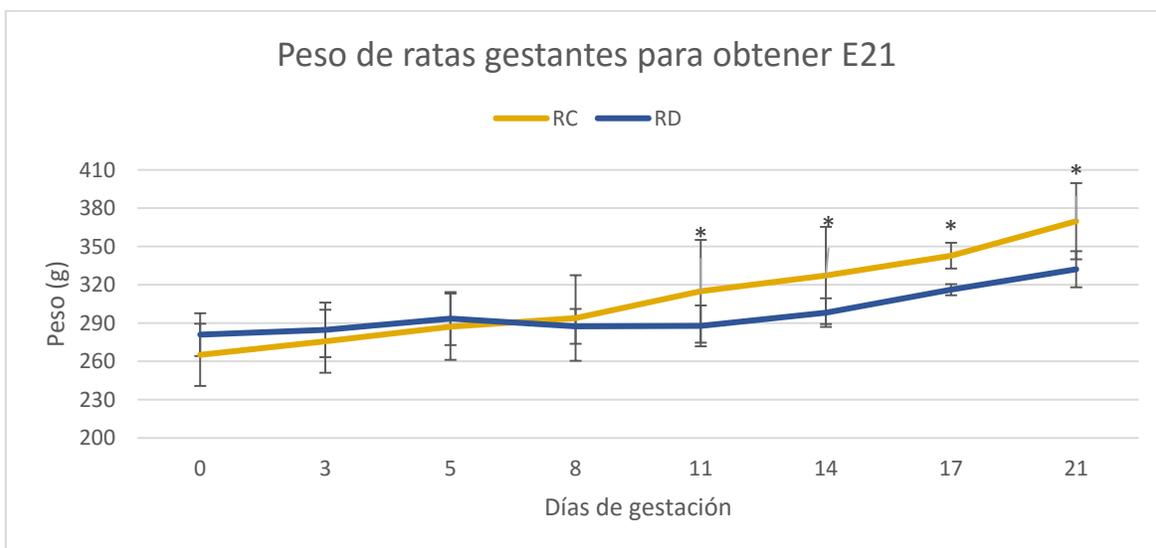
Es importante mencionar que se presentaron diferencias en la duración del periodo gestacional entre las RC y RD. El grupo control tuvo un periodo gestacional de 21 días, mientras que en el grupo diabético la gestación se alargó dos días más, es decir parieron el día 23 (Ver gráficas 2 y 4).

Adicionalmente el monitoreo del peso y glucemia realizado a las ratas gestantes, mostró que la actividad locomotora y características físicas de las RC fueron acordes a las que presentan los roedores, mientras que las RD presentaron actividad física disminuida y su pelaje sufrió un cambio de coloración de un tono blanco a sepia, luciendo áspero.

### **Peso corporal**

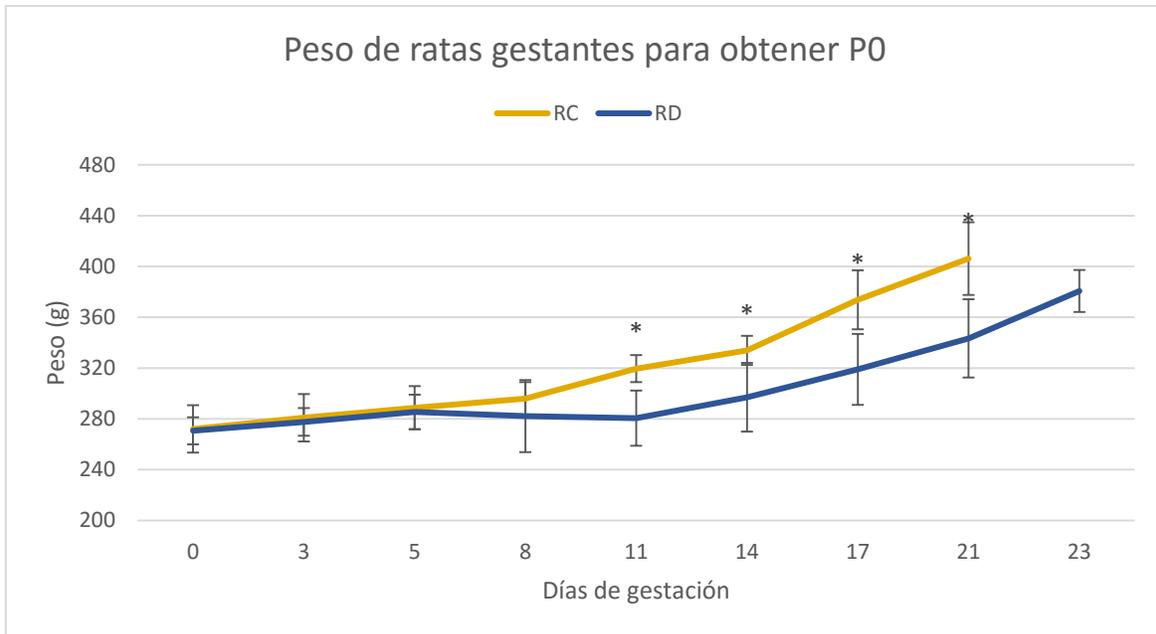
Las ratas con diabetes inducida (RD) que se emplearon para obtener fetos a término (E21) tuvieron menor ganancia de peso corporal a lo largo de la gestación en comparación con el grupo control (RC). En el 8º día presentaron una ligera disminución de peso y en el día 11 esta tendencia fue estadísticamente significativa (D0: 265.12±24.33/ 280.93±16.78; D3: 275.74±24.7/ 284.65±21.38; D5: 287.16±25.93/ 293.5±20.72; D8: 293.94±33.56/ 287.38±13.66; D11:

314.88±40.26/ 287.78±16.05; D14: 327.32±38.06/ 298.15±11.22; D17: 342.78±10.06/ 316.13±4.37; D21: 369.75±29.85/ 332.13±14.09) (Ver Gráfica 1).



Gráfica3. . Peso corporal de las RC y RD utilizadas para la obtención de fetos de 21 días. El eje de las abscisas denota los días de gestación y el eje de las ordenadas el promedio de los pesos de ambos grupos. Media± SD. \*P < 0.05 para la comparación de los grupos de RC y RD, n=4.

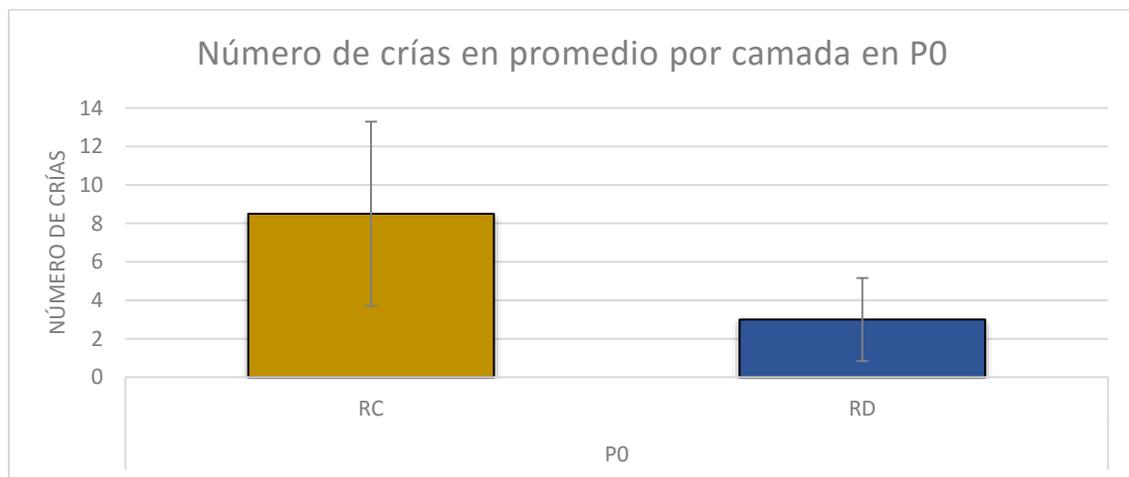
Con respecto a las ratas empleadas para la obtención de crías recién nacidas por parto espontáneo, la ganancia de peso durante la gestación en ambos grupos de estudio fue prácticamente el mismo (D0: 272.1±18.62/ 270.63±10.62; D3: 280.9±18.63/ 277.6±10.89; D5: 288.75±17.06/ 285.5±13.53; D8: 296±12.92/ 282.23±28.38; D11: 319.55±10.65/ 280.6±21.74; D14: 333.93±11.48/ 297±27.06; D17: 373.73±23.27/ 319±27.93; D21: 406.23±28.60/ 343.35±30.82; D23: 0/380.68±16.56) (Ver Gráfica 2).



Gráfica 4. Peso corporal de las RC y RD utilizadas para la obtención de crías recién nacidas (P0). Note la menor ganancia de peso corporal y la mayor duración del periodo gestacional en las RD en comparación con las RC. Media± SD. \*p<0.05. n=4.

### Crías por camada

Además de que el período de gestión se incrementó cerca de dos días en las ratas diabéticas (Gráfica 4), mostraron un menor número de crías RN comparadas con las ratas control (Gráfica 5).

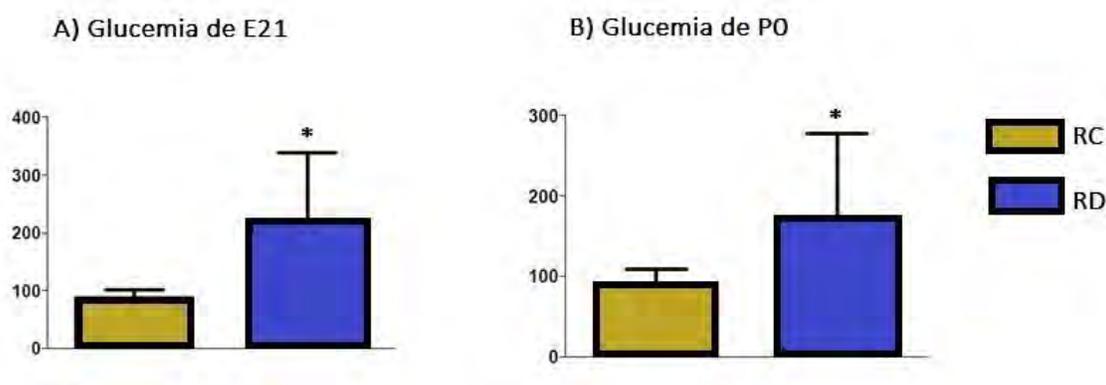


Gráfica 11. Se muestra el número promedio de crías obtenidas en las camadas de las ratas gestantes que fueron utilizadas para obtener P0. Media± SD.

## Resultados en la progenie

### Glucemia

Los valores obtenidos de glucosa en sangre en E21 y P0 de los grupos RD fueron significativamente mayores al compararlos con las crías E21 y P0 de RC, respectivamente. (E21:  $86.762 \pm 9.4069/ 217.895 \pm 120.93$ ; P0:  $88.846 \pm 15.55/ 166.86 \pm 103.7$ ), (Ver Gráfica 5).



Gráfica 6. Glucemia en E21 y P0 de grupos RC y RD. \*P < 0.05 en comparación grupos RC y RD de cada edad, n de E21= 42 y n de P0= 36. Media ± SD.

### Peso y talla

Los datos mostrados en la Tabla 2, revelan que los E21 de RD fueron de menor peso que los E21 de RC, sin embargo la talla (longitud cráneo-rabadilla) de dichos fetos, fue similar entre ambos grupos. En contraste, los valores promedio del peso y talla corporal de las crías RN obtenidas de madres diabéticas, fueron significativamente más pequeños en comparación con el grupo control (Tabla 3).

**Tabla 3. Somatometría de la progenie de ratas control y diabéticas.** Los datos se expresan en promedio (± desviación estándar) de peso y talla de fetos a término (E21) y crías recién nacidas (P0) obtenidas de ratas control (RC) y ratas diabéticas (RD). C-R: Cráneo-Rabadilla. Media ± SD. \*P < 0.05 en comparación grupos RC y RD de cada edad, n de E21= 42 y n de P0= 36.

Grupo	E21		RN	
	RC	RD	RC	RD
C-R (mm)	42.23 (±2.57)	42.33 (± 4.67)	48.27 (± 4.17)	43.8 (± 4.80)*
Peso corporal (g)	5.93 (± 0.77)	4.59 (± 0.52)*	7.30 (± 1.76)*	6.51 (± 0.38)*

### **Análisis morfométrico del corazón**

Para los grupos E21 y P0 las medias y las desviaciones estándar de las medidas obtenidas al medir el eje horizontal (EH) del corazón son similares entre ellos, por lo que no son significativamente distintos. Respecto a la morfometría, a pesar del comportamiento similar en el eje horizontal (EH), se observó que el eje vertical del corazón del grupo diabético en la edad E21 fue menor que en el control con una diferencia estadísticamente significativa (Ver tabla 4).

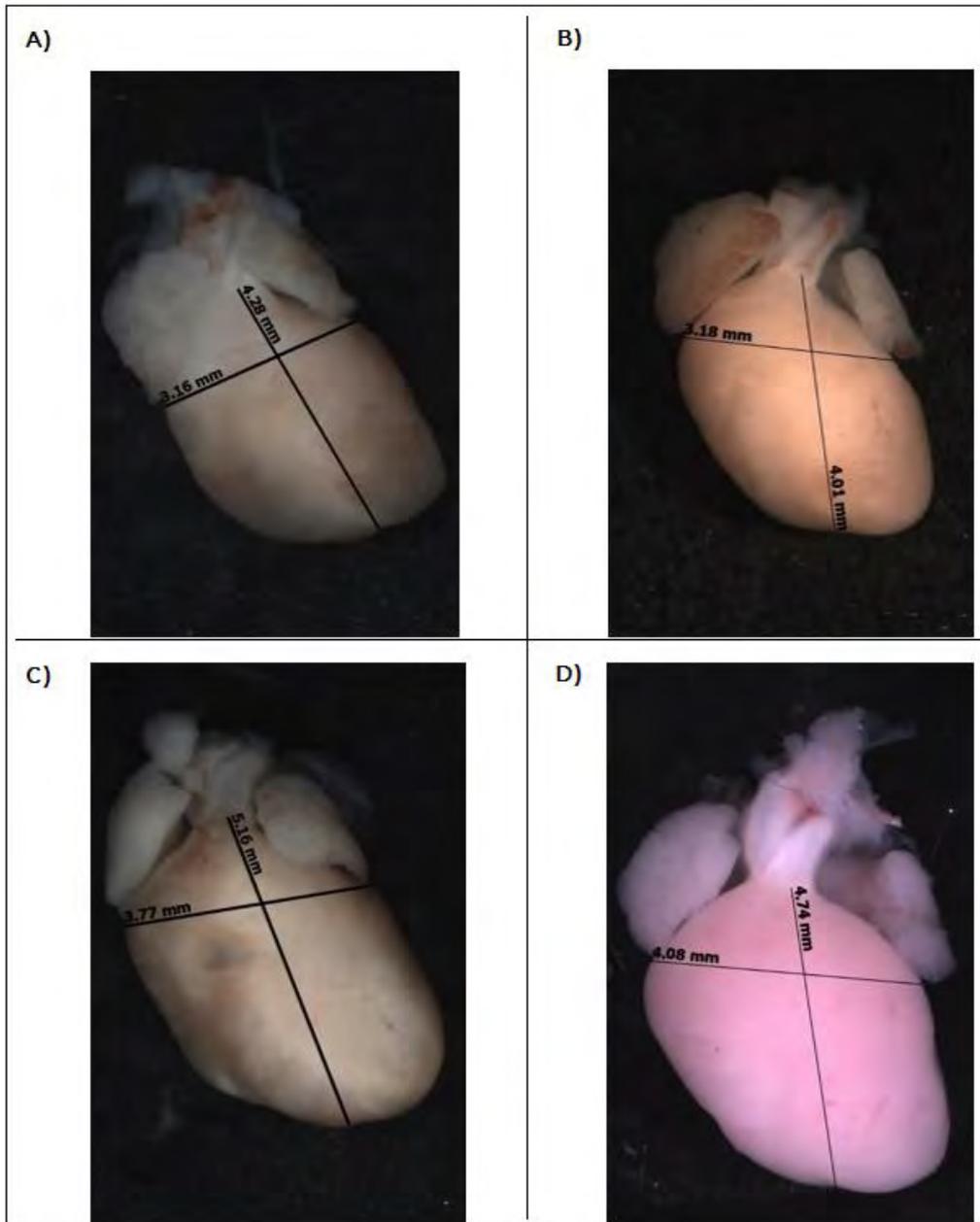
**Tabla 4. Valores de los ejes horizontal y vertical (mm) del corazón completo de crías de rata control (RC) y rata diabética (RD).** Los datos se expresan en promedio ( $\pm$ desviación estándar) de 2 parámetros morfométricos del corazón perteneciente a crías de ratas control (RC) y ratas diabéticas (RD); EH (Eje Horizontal) y EV (Eje Vertical). Media $\pm$  SD. \*P < 0.05 en comparación grupos RC y RD de cada edad, n de E21= 42 y n de P0= 36. ®P< 0.05 en comparación E21 y P0 del grupo RC

Ejes	E21		P0	
	RC	RD	RC	RD
EH	3.38 ( $\pm$ 0.21) <sup>®</sup>	3.39 ( $\pm$ 0.20)	3.96 ( $\pm$ 0.32) <sup>®</sup>	3.99 ( $\pm$ 0.34)
EV	3.99 ( $\pm$ 0.34) <sup>*®</sup>	3.76 ( $\pm$ 0.39) <sup>*</sup>	4.79 ( $\pm$ 0.57) <sup>®</sup>	4.61 ( $\pm$ 0.51)

El corazón de los fetos de 21 días (E21) y crías recién nacidas (P0) de ratas diabéticas y control tuvo una morfología normal característica de la especie (Ver Figura 1).

En cuanto a los valores obtenidos en la medición del grosor de las paredes del corazón: Pared ventricular derecha (PVD); tabique interventricular (TIV) y Pared ventricular izquierda (PVI) (Ver figura 2), una vez elaborado el análisis estadístico descriptivo con el programa IBM SPSS Statistics 22, se realizó una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov, donde se encontró que PVD en la edad P0 y PVI de E21 requerían de la prueba paramétrica de T-student. El resto de las variables no son paramétricas y se analizaron con la prueba de U de Mann Whitney.

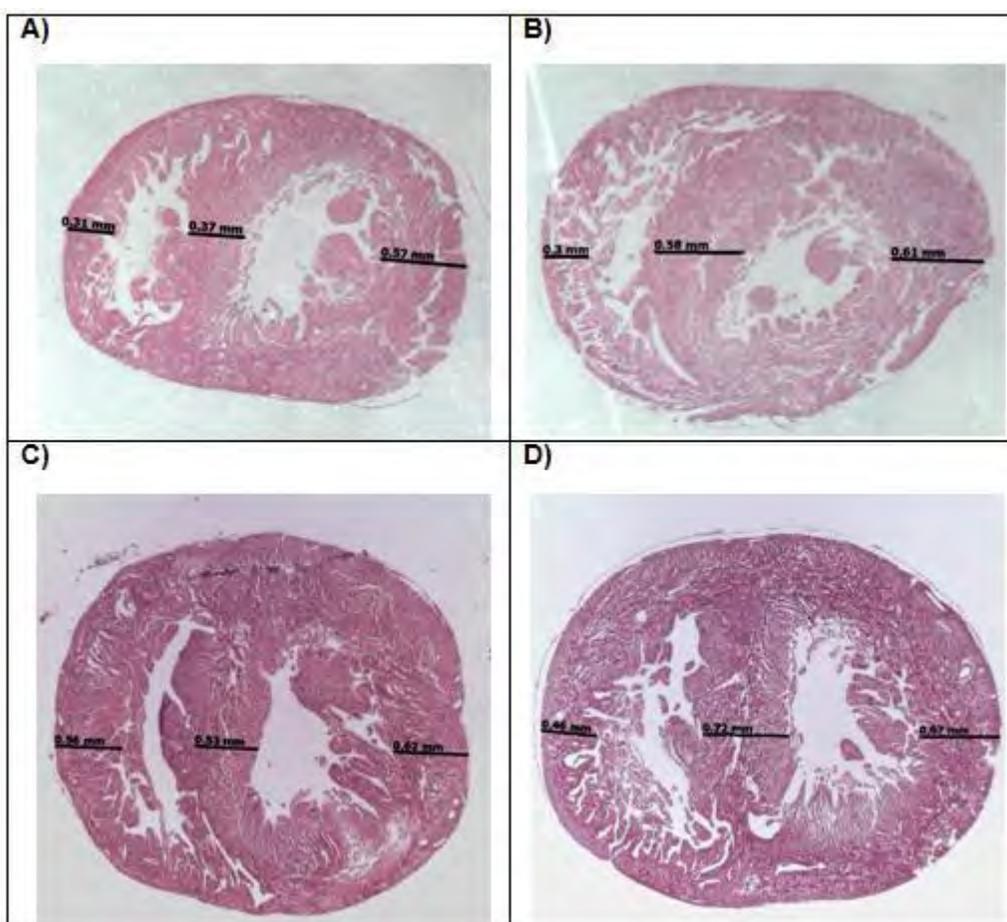
De acuerdo a los resultados obtenidos ninguno de los casos mostró diferencias significativas entre los grupos de RC y RD, los datos se comportan de manera uniforme y no muestran medias o desviaciones estándares que muestren diferencias



**Figura 1.** Se observan corazones obtenidos de cada grupo, a los cuales se les realizaron mediciones en dos ejes: vertical y horizontal en 6.4X. A y B pertenecen a E21 y corresponden a los grupos RC y RD, respectivamente; C y D son corazones de P0 de los grupos RC y RD.

**Tabla 5. Análisis morfométrico de cortes histológicos del corazón de crías (mm).** Los datos se expresan en promedio ( $\pm$ desviación estándar) de crías de ratas control (RC) y ratas diabéticas (RD). Los valores corresponden a PVD: Pared del Ventrículo Derecho; TIV: Tabique Interventricular y PVI: Pared Ventrículo Izquierdo, n de E21= 28 y n de P0= 26. Media $\pm$  SD. <sup>®</sup>P< 0.05 en comparación E21 y P0 del grupo RC.

Grupo	E21		P0	
	RC	RD	RC	RD
PVD	0.43 ( $\pm$ 0.13) <sup>®</sup>	0.40 ( $\pm$ 0.14)	0.56 ( $\pm$ 0.15) <sup>®</sup>	0.64 ( $\pm$ 0.27)
TIV	0.66 ( $\pm$ 0.15) <sup>®</sup>	0.63 ( $\pm$ 0.14)	0.75 ( $\pm$ 0.22) <sup>®</sup>	0.91 ( $\pm$ 0.5)
PVI	0.55 ( $\pm$ 0.14) <sup>®</sup>	0.55 ( $\pm$ 0.13)	0.73 ( $\pm$ 0.25) <sup>®</sup>	0.71 ( $\pm$ 0.32)

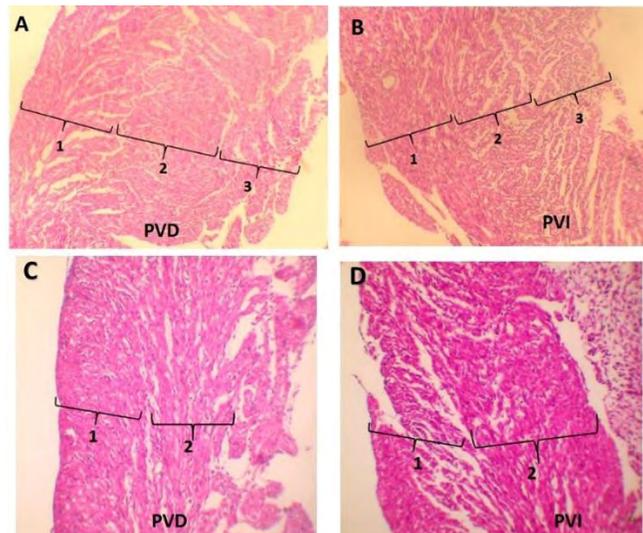


**Figura 2. Imágenes representativas de cortes histológicos transversales de la región ventricular del corazón de crías de ratas control (RC) y ratas diabéticas (RD).** A y B E21, de los grupos RC y RD respectivamente en 32X. C y D de la edad P0 de los grupos RC y RD en 35X.

## Estudios histológicos

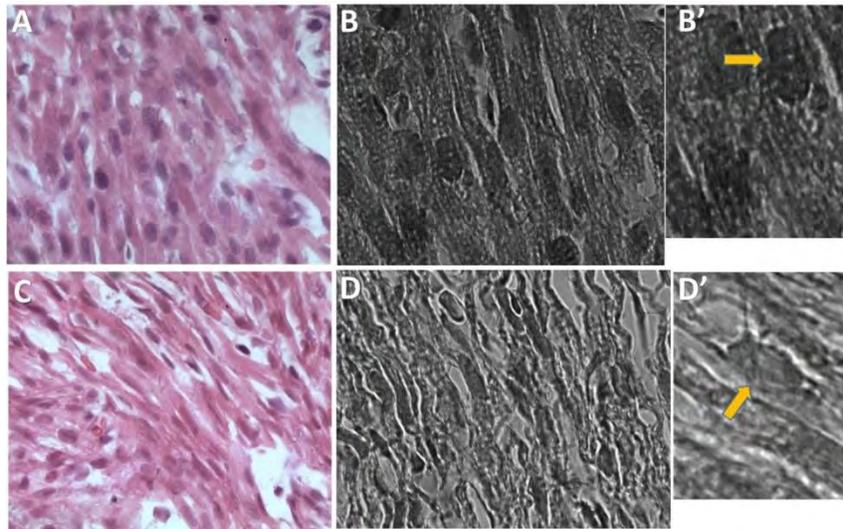
Los cortes histológicos de los corazones de las crías de ratas control y diabéticas teñidos con las técnicas H&E y Tricrómica de Masson observados en una baja amplificación permitieron distinguir la organización y grado de compactación del miocardio ventricular. Para un análisis histológico más detallado, los cortes del corazón se observaron a mayor amplificación. En aumento de 40X se identificaron los núcleos celulares, la organización fibrilar de los miocitos ventriculares y las características de los vasos coronarios. En tanto que con el objetivo de 100X se observaron detalles de la disposición de la cromatina laxa y la compacta en los núcleo celulares y la organización de las miofibrillas en el sarcoplasma de los miocitoscardiacos.

**Crías recién nacidas (P0).** En cuanto a las vistas panorámicas de los cortes histológicos de los corazones de las crías P0 de RC y RD se observó que el miocardio tanto de las paredes ventriculares como del tabique interventricular está organizado en capas, las cuales se distinguen a partir de la orientación y el arreglo que presentan los miocitos. En las crías RC se evidencian 3 capas (Fig. 3A, B), mientras que en el grupo RD se observan dos capas (Fig. 3C, D).



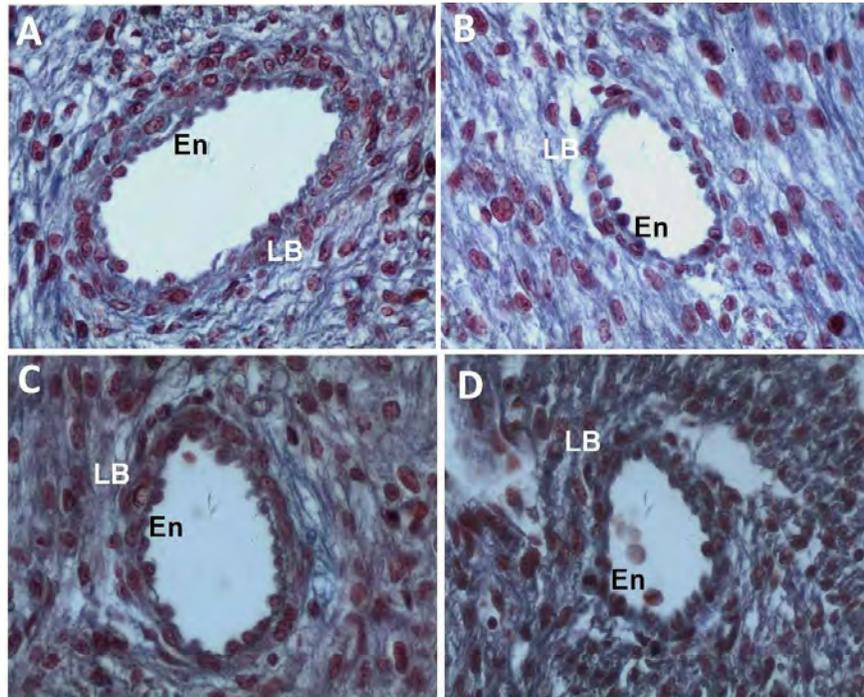
**Fig. 3. Vistas panorámicas de las paredes del corazón de crías recién nacidas de ratas controles (A, B) y diabéticas (C, D) teñidos con H & E. A, B.** Observe en los controles las tres capas celulares que conforman el miocardio de la pared del ventrículo derecho (PVD) y del ventrículo izquierdo (PVI). **C, D.** Grupo diabético. Note que el miocardio de la pared del ventrículo derecho (PVD) y del ventrículo izquierdo (PVI) solo presenta dos capas celulares. Imágenes tomadas a 10X.

A diferencia de lo que sucede en el miocardio del corazón adulto altamente compactado, donde los miocitos están muy cercanos entre sí (ilustración tal), en las crías P0 de RC y RD los miocitos están separados por espacios estrechos en las crías RC (Fig 4A) y más amplios en crías RD (Fig. 4C). En ambos grupos se observó que el miocardio no estaba completamente histodiferenciado; el miocardio de las crías P0 de RD mostró mayor signo de inmadurez comparado con el miocardio de las crías del grupo control (Fig. 4). En crías RC los miocitos muestran miofibrillas ordenadas regularmente, formando líneas transversales paralelas claras y oscuras, los núcleos tienen forma ovalada con varios agregados relativamente grandes de cromatina compacta, tanto en la periferia en contacto con la cubierta nuclear como en la parte central nuclear (Fig. 4A,B). En cambio en el grupo RD el citoplasma de los miocitos tiene una organización más bien granular que fibrilar y los núcleos también ovalados muestran algunos agregados de cromatina compacta inmersos en abundante cromatina laxa (Fig. 4C, D).



**Fig. 4. Organización del miocardio ventricular del corazón de crías recién nacidas de ratas controles (A, B, B') y diabéticas (C, D, D') teñidos con H & E. A, B,** En el grupo control los miocitos están separados por espacios estrechos y presentan miofibrillas paralelas muy ordenadas. **B'.** El núcleo tiene forma oval y contiene cromatina compacta adyacente a la cubierta nuclear y en el nucleoplasma. **C, D.** En el grupo experimental la separación de los miocitos es mayor y su citoplasma tiene un aspecto más bien granular que fibrilar, en un miocito se pueden observar zonas con miofibrillas y zonas de aspecto fibrilar. **D'.** El núcleo (flecha) prácticamente carece de cromatina compacta. A, B, C, D. Imágenes tomadas a 40X, B', D'. Imágenes tomadas a 100X.

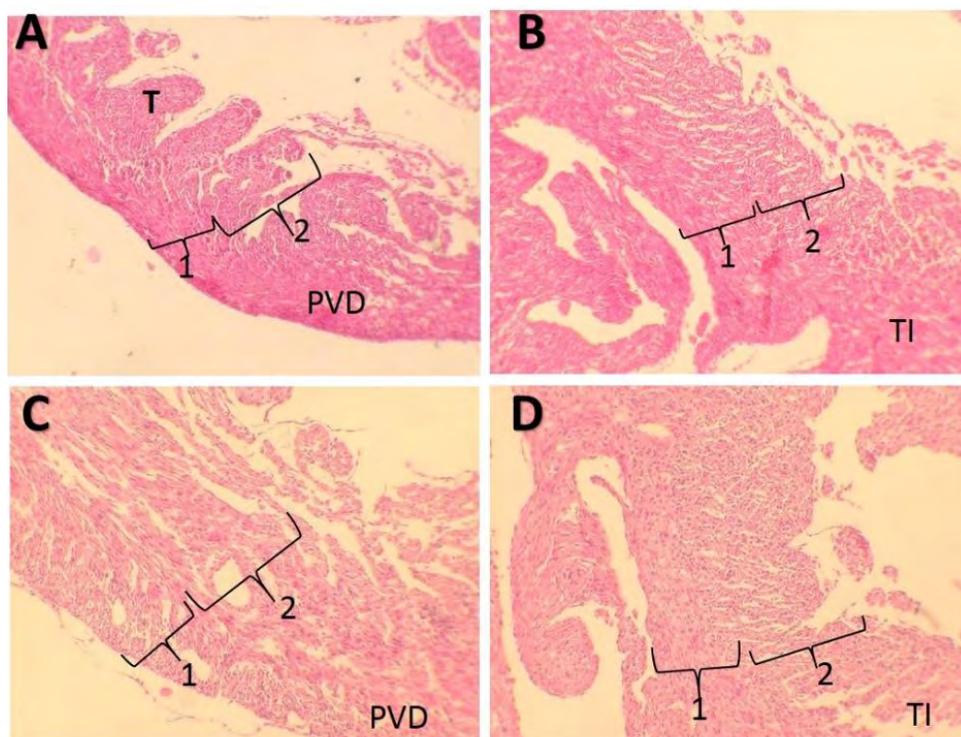
En el grupo **RC** los cortes teñidos con la técnica de Tricrómica de Masson, no muestran signos de depósitos de colágeno en el miocardio ventricular; donde sí se evidencian fibras de colágeno con una tonalidad azul es entre los miocitos del grupo **P0 RD** (Fig. 5).



**Fig. 5. Cortes histológicos del corazón de crías de ratas controles (A, B) y diabéticas (C, D) teñidos con la técnica Tricrómica de Masson** mostrando la organización de los vasos coronarios, poco diferenciados. En= Endotelio; LB= Lámina Basal. Imágenes tomadas a 40X.

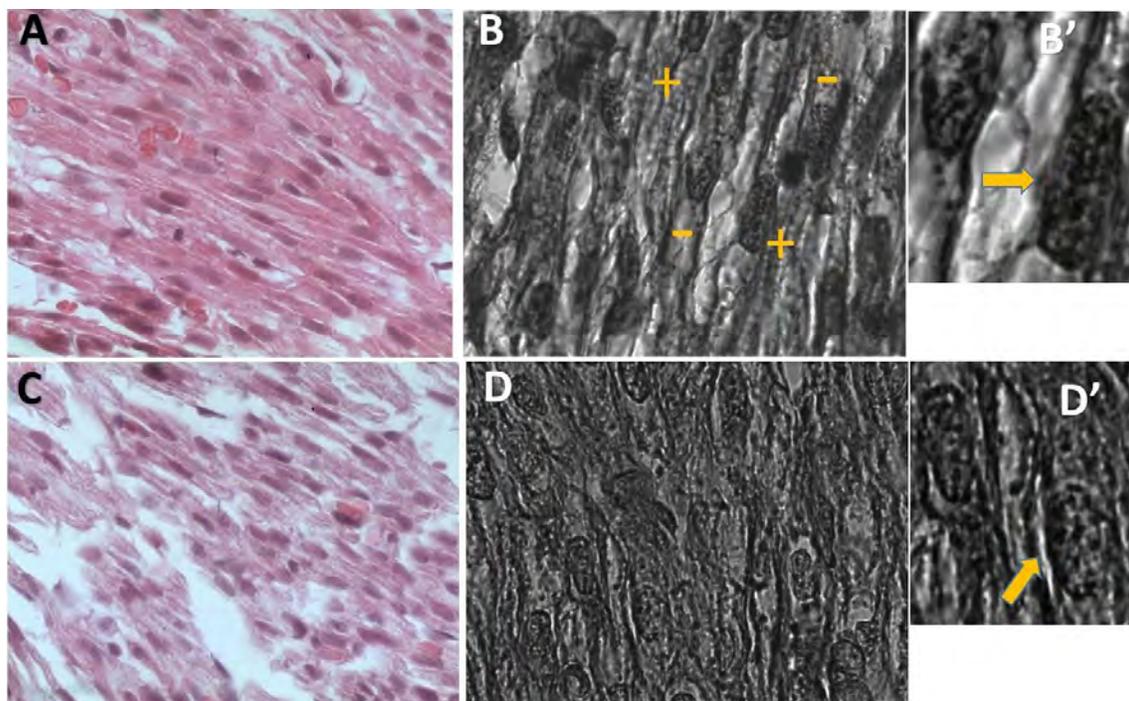
Los vasos coronarios tanto en el grupo RC como en el RD también estaban histológicamente muy inmaduros, recubiertos internamente por un endotelio casi cúbico. Además no se observaron depósitos de colágeno alrededor de las paredes de los vasos coronarios que indiquen fibrosis. En **RC** endotelio era menos alto, presentaban una membrana basal rica en delgadas fibras de colágeno mejor evidenciadas con la técnica Tricrómica de Masson. Los vasos coronarios aunque inmaduros comienzan a mostrar diferencias que permiten distinguir entre las venas y las arterias (Fig. 5A, B) En cambio en el grupo RD el endotelio que recubría los vasos coronarios era prácticamente cúbico, la delgada membrana basal mostraba muy poco o nulo colágeno más bien dispersa, características que dificultan la distinción histológica entre arterias y venas (Fig. 5 C, D).

**Fetos de 21 días de gestación (E21).** Las vistas panorámicas de las paredes y tabique ventricular mostraron características de baja histodiferenciación, en general fue menor a la observada en las crías P0. Como se aprecia en la figura 6, en ambos grupos RC (Fig. 6 A y B) y RD (Fig. 6 C, D) solo se observaron 2 capas en el miocardio, distinguibles por la orientación y arreglo de las trabéculas y miocitos, tanto en la pared de los ventrículos como en el tabique interventricular. Además se observa, poca compactación en el tejido y menor en el grupo **RD** que en el grupo **RC**. A mayor amplificación (Fig. 8) se puede observar que los miocitos del grupo **RC** se encuentran separados por espacios angostos en las crías **RC** y por espacios más grandes en las crías de **RD**. Los miocitos de **RC** presentan una organización miofibrilar menor a la de los miocitos pertenecientes a los corazones adultos y es similar al grupo **P0 RC (compare Fig. 4A, B con 7A, B)**. En cuanto a los núcleos, los miocitos del grupo RC muestran cromatina compacta adherida a la cubierta nuclear y grumos de diferentes tamaños en el nucleoplasma (Figura 7B'). En el grupo **RD** los miocitos muestran miofibrillas delgadas y desordenadas, en algunos miocitos el citoplasma tiene una apariencia granular. Los núcleos presentan cromatina laxa en menores cantidades comparado con el grupo RC (Figura 7B').



**Fig. 6. Vistas panorámicas de las paredes del corazón de fetos de 21 días de ratas controles (A, B) y diabéticas (C, D) teñidos con H & E mostrando la organización del miocardio en dos capas. A.** Observe en los controles que la pared del ventrículo derecho (PVD) muestra una capa compacta (1) relativamente bien definida y distinguible de la zona trabecular (2) y el tabique interventricular (TI) está formado por dos capas de miocardio no muy compactas. **C, D.** Grupo diabético. Note que el miocardio de la pared del ventrículo derecho (PVD) y del tabique interventricular (TI) es menos compacto que en el grupo control. Imágenes tomadas a 10X.

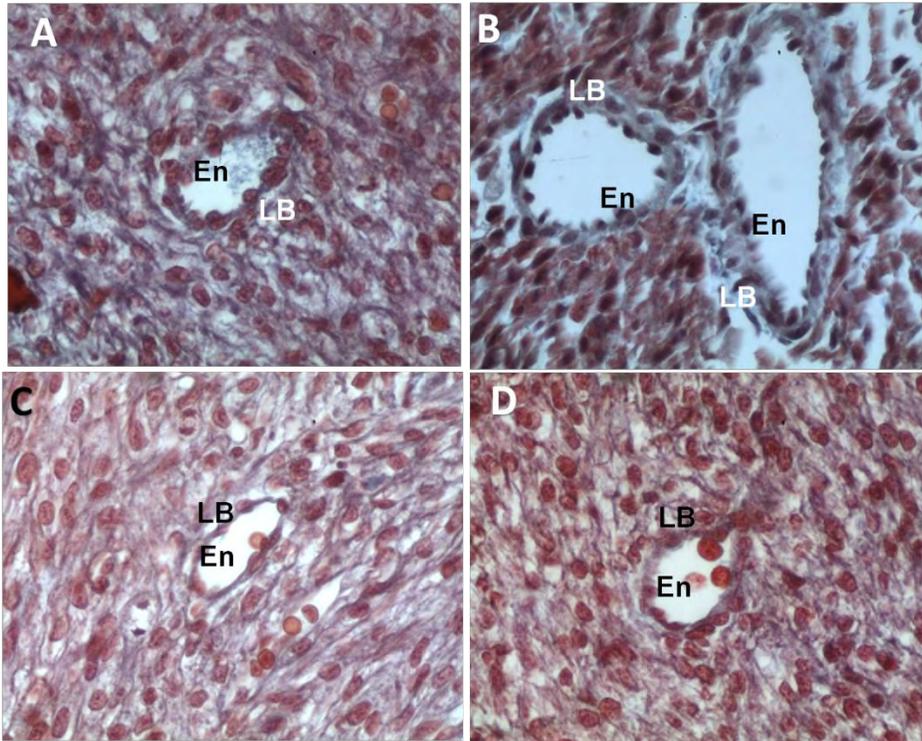
Al observar a los miocitos del grupo **RC** se encuentran separados por espacios angostos en las crías **RC** y por espacios más grandes en las crías de **RD**. Los miocitos de **RC** presentan una organización miofibrilar menor a la de los miocitos pertenecientes a los corazones adultos y es similar al grupo **P0 RC**, con miofibrillas formando líneas paralelas claras y oscuras (Figura 7A y B). En cuanto a sus núcleos, los miocitos muestran grumos de cromatina compacta distribuidos en el nucleoplasma (Fig. 7B, B'). Para el grupo **RD** los miocitos muestran miofibrillas desordenadas, el citoplasma muestra una apariencia granular en lugar de mostrar fibrillas (Fig. 7C, D). Los núcleos presentan grumos de cromatina compacta inmersos en la cromatina laxa (Fig. 7D').



**Fig. 7. Organización del miocardio ventricular del corazón de fetos de 21 días de ratas controles (A, B, B') y diabéticas (C, D, D') teñidos con H & E. A, B,** En el grupo control los el miocardio está parcialmente diferenciado, presenta miocitos separados por espacios estrechos, algunos con miofibrillas paralelas (+) menos ordenadas que en los recién nacidos controles, en otros miocitos el citoplasma es liso o granular (-). **B'**. El núcleo ovalado contiene cantidades similares de cromatina compacta y laxa. **C, D.** En el grupo experimental la separación de los miocitos es muy amplia y su citoplasma tiene un aspecto liso o granular. **D'**. El núcleo (flecha) tiene menos cromatina compacta que el control. A, B, C, D. Imágenes tomadas a 40X, B', D'. Imágenes tomadas a 100X.

En ningún grupo los cortes teñidos con la técnica de Tricrómica de Masson, muestran signos de depósitos de colágeno en el miocardio ventricular que puedan indicar una posible fibrosis. En ambos grupos el endocardio es inmaduro, delgado y muestra poco colágeno

Los vasos coronarios mostraron escasa histodiferenciación en ambos grupos RC y RD, aún no se observan características que permitan distinguir entre venas y arterias Las coronarias solo muestran una capa de células endoteliales, lo que demuestra que se trata de tejido inmaduro. En la mayoría de las preparaciones teñidas con Tricrómica de Masson la tinción azul característica de la colágena no mostraba una organización fibrilar (Fig. 8).



**Fig. 5. Cortes histológicos del corazón de crías de ratas controles (A, B) y diabéticas (C, D) teñidos con la técnica Tricrómica de Masson.** Observe que en ambos grupos los vasos coronarios están poco diferenciados, los más diferenciados son los del grupo control. En= Endotelio; LB= Lámina Basal. Imágenes tomadas a 40X.

## DISCUSIÓN

Existe un sinnúmero de fuentes en la literatura que establecen una posible relación entre la diabetes durante la gestación y las afecciones cardíacas de los jóvenes y adultos. A pesar de ello en humanos las investigaciones están limitadas debido a razones bioéticas ya que no se pueden realizar estudios en las diferentes etapas embrionarias por lo que la documentación completa del desarrollo intrauterino es difícil de obtener, lo mismo sucede con los efectos de la condición materna además de la diabetes y la función de la placenta. La información que proporcionan los estudios en humanos está únicamente relacionada con enfermedades que los hijos de madres diabéticas llegan a presentar como consecuencia directa de un ambiente intrauterino desfavorable como son las enfermedades congénitas, fácilmente observables; la DM tipo 2 y enfermedad coronaria que aunque no sean observadas en la etapa perinatal suelen manifestarse en jóvenes adultos. El papel de las investigaciones en modelos biológicos para abordar estos temas es de suma importancia pues se pueden controlar las variables necesarias y realizar observaciones a lo largo del periodo gestacional y en cualquier etapa de la vida posnatal.

En la actualidad, no se han realizado estudios que analicen los efectos de la diabetes materna sobre la morfohistología cardíaca en fetos de edad muy avanzada o a término comparándolos con los recién nacidos y tampoco se han abordado los mecanismos que posiblemente estén íntimamente relacionados con dichas enfermedades. Esta información permitiría saber cómo afecta el ambiente intrauterino hiperglucémico a la función normal del corazón en la etapa infantil, juvenil y adulta en los hijos de madres diabéticas para tratar de prevenir sus consecuencias que lleven al deterioro de la salud de los individuos.

En la realización de este trabajo se estudió el efecto de la diabetes materna inducida en ratas desde un momento previo a la implantación del embrión sobre la morfohistología cardíaca, buscando diferencias a nivel histológico entre fetos de 21 días obtenidas por operación cesárea, comparadas con crías recién nacidas obtenidas por parto espontáneo de madres diabéticas y crías de madres para

establecer si existe algún efecto directo del ambiente intrauterino hiperglucémico sobre el corazón. Se observó que algunas características tisulares como la compactación del tejido miocárdico ventricular, el ordenamiento de las miofibrillas y el estado de la cromatina en los núcleos de los miocitos cambian entre grupos control y diabéticos; otro hallazgo es el cambio en el grosor de las paredes ventriculares y del tabique interventricular que existe entre fetos de 21 días que nacieron por cesárea comparado con crías RN obtenidas por parto natural, ambas del grupo control.

El protocolo inició con la inducción de diabetes materna en ratas de la cepa Sprague-Dawley el día 5 de la gestación, utilizando STZ (50 mg/kg). Los valores resultantes de glucemia fueron  $> 300$  mg/dL, similares a los reportados en por otros autores que indujeron diabetes leve y severa con este fármaco [113]. En el caso de las madres gestantes sanas empleadas para obtener crías de ambas edades mantuvieron su concentración normal de glucosa  $\leq 100$  mg/dL (Gráficas 1 y 2) lo que indica que las características metabólicas de la cepa de ratas empleada es conveniente para el estudio. La hiperglucemia inducida está íntimamente relacionada con la menor ganancia de peso de las ratas gestantes del grupo diabético a lo largo del embarazo a partir del día 8 comparado con las ratas del grupo control (Gráfica 3 y 4). Esto concuerda con las observaciones realizadas por Kiss y colaboradores [114], quien utilizó un modelo animal similar, donde encontraron que las ratas diabéticas a pesar de una ingesta mayor de alimento no aumentaron de peso en la misma proporción que las ratas control. Suponemos que estos resultados podría deberse al cambio hormonal propio del embarazo aunado al desbalance metabólico que presentan las madres gestantes con hiperglucemia no controlada [115]. Adicional a lo anterior, las ratas diabéticas al tener un número menor de crías por camada (Gráfica 5), ganaron menos peso, como lo reportaron también Salazar y colaboradores [41].

Al relacionar los parámetros de salud de las madres gestantes (glucosa y peso corporal) con la duración del periodo de gestación y las condiciones metabólicas y antropométricas de las crías se observó que el ambiente hiperglucémico afectó la

glucosa, peso y talla de las crías. La glucemia en las crías de las edades E21 y P0 del grupo diabético fue el doble respecto al de las crías de madres sanas (Gráfica 6). Este hallazgo es similar al observado por Kiss y colaboradores, en P0 de ratas con diabetes inducida el día 5 de la gestación, encontraron que en condiciones como una diabetes materna severa, las crías presentaban niveles de glucosa en sangre elevados, afirmando que existe una correlación positiva entre la glucemia materna y fetal en los grupos experimentales [114]. Nuestros resultados concuerdan también con evidencias en diferentes estudios que establecen que la prole de madres diabéticas presenta niveles de glucosa elevados debido a que hay una menor secreción de insulina de las crías, en otros casos se observa una importante resistencia a la insulina [116].

El peso corporal y la talla, también mostraron diferencias en ambas edades entre grupos, siendo menos pesadas y más pequeñas las crías de madres diabéticas que las crías de madres sanas. Cabe mencionar que la mayor parte de estudios realizados en ratas con diabetes inducida con STZ reportan que el ambiente intrauterino hiperglucémico, estimula la actividad endocrina del páncreas lo que lleva a una hiperinsulinemia, acelerando el metabolismo, y conduciendo a macrosomía. No obstante, nuestros resultados no son concordantes con estos hallazgos, nosotros observamos que las crías P0 de ratas diabéticas, presentaron un crecimiento restringido, suponemos al igual que Kervran y colaboradores (1978) que esto puede deberse al funcionamiento prematuro de las células  $\beta$  pancreáticas del feto, dañándolas y conduciendo a una hipoinsulinemia que causa microsomía. Kervran y colaboradores (1978) tampoco encontraron crías con macrosomía, su trabajo sugiere que existen diferencias que deben ser consideradas entre el modelo biológico de la rata y el humano, las cuales son: duración de la gestación; localización del tejido adiposo en los fetos de rata y finalmente el peso adquirido por la especie humana durante el período gestacional [117].

En cuanto a la duración de la gestación de las crías P0 de ratas diabéticas, el periodo de gestación culminó 2 días después del grupo control (gráficas 2 y 4).

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados en 2015 por Salazar y colaboradores que afirma que el ambiente intrauterino hiperglucémico provoca una desregulación cronológica del desarrollo alargando el periodo gestacional [41].

Una vez obtenidas las crías se extrajeron los corazones, se midieron los ejes horizontal y vertical del órgano completo y en cortes histológicos transversales se midió el grosor de las paredes ventriculares y del tabique interventricular. Al medir los ejes horizontal (EH) y vertical (EV) del corazón, observamos que únicamente hubo una menor longitud en el EV de las crías E21, siendo de menor tamaño del corazón del grupo de crías de madres diabéticas respecto a las crías de madres sanas. A su vez, esto se relaciona con la menor talla de los E21 y la menor longitud del corazón de crías de madres diabéticas. Las crías de madres diabéticas a pesar de su menor peso y talla, presentaron corazones de tamaño similar y las paredes ventriculares y el tabique interventricular mostraron prácticamente del mismo grosor que los controles. Estos resultados aunados al hecho de haber encontrado que el miocardio ventricular de las crías perinatales de ratas diabéticas mostraron mayor cantidad de espacios intercelulares con depósitos de matriz extracelular de color azul en los cortes teñidos con la técnica de Masson podrían ser indicativos de la presencia de cierto grado de hipertrofia cardiaca en las crías de madres diabéticas como lo sugirió Meneses en el 2001 en un modelo de diabetes inducida con STZ en rata similar al nuestro evaluando exclusivamente fetos [118].

En relación a las características histológicas presentadas en los cortes teñidos con H&E se encontraron diferencias en la histodiferenciación entre las crías P0 de madres diabéticas y sanas. En los corazones de P0 de madres sanas el miocardio de las paredes ventriculares y del tabique interventricular estaba ordenado en 3 capas diferenciadas por la orientación de los miocitos. También se pudo apreciar el endocardio, y epicardio. El mismo patrón de ordenamiento del miocardio se observó en las crías E21, aunque en el último caso tanto las paredes como el tabique interventricular mostraron una histología menos diferenciada, solo se apreciaban dos capas de miocitos mientras que el endocardio y epicardio aún no

se han diferenciado por completo. Estas diferencias en la longitud de ambos ejes del corazón (EH y EV, Tabla 4) así como diferencias significativas en el grosor de sus paredes en crías E21 y P0 del grupo control (Tabla 3) resultan datos interesantes de analizar. El grupo E21 de madres sanas se trata de fetos obtenidos por cesárea, antes del inicio del trabajo de parto, en cambio las crías P0, son ratas adquiridas por parto espontáneo y sacrificadas aproximadamente entre 6 a 12 horas después para confirmar su viabilidad. No se esperaba encontrar diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto al grosor de las paredes ventriculares y el tabique interventricular, puesto que se trata de una diferencia de edad de máximo 18 horas. Una explicación posible son los cambios hemodinámicos en la función cardíaca debidos al inicio de la respiración pulmonar al momento del nacimiento lo que acelera el desarrollo de las paredes miocárdicas de los ventrículos [119] y el posible efecto del paso por el canal del parto escasamente conocido.

Se sabe que la organización de las miofibrillas tienen un papel sumamente importante en la contracción del miocardio [120]. En este aspecto, Dowling y colaboradores (2014) encontraron diferencias en las características histológicas del corazón de fetos de 18 días obtenidos de hembras diabéticas respecto a los de madres control, dichas diferencias fueron el tamaño reducido del núcleo y mayor número de núcleos en el miocardio en hijos de madres diabéticas. La información obtenida por estos autores apunta a que DM altera el desarrollo de los miocitos cardíacos de la progeie tanto en proliferación como en la actividad de los fibroblastos [69]. En concordancia con estos hallazgos nosotros al observar las preparaciones histológicas de crías E21 y P0 de ratas diabéticas y controles a mayor amplificación hallamos que en el corazón de crías de madres diabéticas los miocitos muestran escasa histodiferenciación, su sarcoplasma presentaba miofibrillas poco organizadas dando un aspecto de baja o nula estriación, los miocitos con escasa o nula estriación mostraron además núcleos celulares con menor proporción de cromatina compacta (Figs. 4, 7) todas estas propiedades son típicas de inmadurez histológica [95, 119]. Estos hallazgos histológicos permiten suponer que la los miocitos poco diferenciados de las crías perinatales de ratas

con diabetes inducida muestran deficiencias en la propagación correcta de la actividad de contracción y conducción de las señales eléctricas.

## **CONCLUSIONES**

De acuerdo a lo observado los efectos de la hiperglucemia materna inducida antes de la implantación del embrión en la progenie en edad perinatal son:

1. Desregulación cronológica del desarrollo intrauterino que alarga la duración de la gestación
2. Disminución de la talla y peso de la progenie
3. Desorganización en la citoarquitectura del miocardio ventricular
4. Mayor grado de inmadurez del tejido miocárdico y vasculatura coronaria

## PERSPECTIVAS

Una vez realizada esta tesis surgen más dudas acerca de los daños que el ambiente hiperglucémico intrauterino puede provocar en la progenie. Como resultado las perspectivas resultantes son:

1. ¿La hiperglucemia es el único factor que provoca una desregulación del desarrollo correcto del miocardio?
2. ¿Cuál es el efecto directo de la desregulación del desarrollo del miocardio sobre la función del corazón?
3. Complementar la información obtenida con estudios moleculares.
4. A partir de los resultados, ¿Podría ser la hiperglucemia considerada un factor teratogénico?
5. En etapas posteriores al nacimiento, ¿existe algún factor que normalice los cambios observados?
6. ¿Existen o no y qué factores, a parte del ambiente hiperglucémico, son los que aumentan los riesgos de contraer enfermedades cardiovasculares en la vida adulta?

## REFERENCIAS

1. Vrachnis N, Antonakopoulos N, Iliodromiti Z, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, Deligeoroglou E, Vitoratos N: **Impact of maternal diabetes on epigenetic modifications leading to diseases in the offspring.** *Experimental diabetes research* 2012, **2012**:538474.
2. **Diabetes Programme** [<http://www.who.int/diabetes/en/>]
3. **Atlas de Diabetes** [<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012.>]
4. Kerner W, Bruckel J: **Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus.** *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 2014, **122**(7):384-386.
5. Mendoza PN: **Medical Pharmacology.** México; 2008.
6. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** *Diabetes care* 2014, **37 Suppl 1**:S81-90.
7. Tébar Masso F, Escobar Jiménez F: **La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica.** España; 2009.
8. Kleinwechter H, Schafer-Graf U, Buhner C, Hoesli I, Kainer F, Kautzky-Willer A, Pawlowski B, Schunck K, Somville T, Sorger M: **Gestational diabetes mellitus (GDM) diagnosis, therapy and follow-up care: Practice Guideline of the German Diabetes Association(DDG) and the German Association for Gynaecologyand Obstetrics (DGGG).** *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 2014, **122**(7):395-405.
9. Dean L, J M: **The Genetic Landscape of Diabetes [Internet].** Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004.
10. Garibay-Nieto N, Miranda-Lora AL: **Impacto de la programación fetal y la nutrición durante el primer año de vida en el desarrollo de obesidad y sus complicaciones.** *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 2008, **65**:451-467.
11. Valdés Amador L, Santana Bacallao O, Rodríguez Anzardo B, Santurio Gil A, Márquez Guillén A: **La adolescente diabética embarazada.** *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología* 2011, **37**:172-181.
12. Nazer Herrera J, García Huidobro M, Cifuentes Ovalle L: **Malformaciones congénitas en hijos de madres con diabetes gestacional.** *Revista medica de Chile* 2005, **133**:547-554.
13. Meyer BA, Palmer SM: **Pregestational diabetes.** *Seminars in perinatology* 1990, **14**(1):12-23.
14. Pedersen J, Molsted-Pedersen LM: **Congenital malformations: the possible role of diabetes care outside pregnancy.** *Ciba Foundation symposium* 1978(63):265-271.
15. Gabbe SG: **Congenital malformations in infants of diabetic mothers.** *Obstetrical & gynecological survey* 1977, **32**(3):125-132.
16. **Qué es la diabetes** [[http://www.who.int/diabetes/action\\_online/basics/es/](http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/)]
17. **Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.** *Diabetes care* 2003, **26 Suppl 1**:S5-20.
18. Torres Cruz I: **Ciencia, esencial para el combate a la diabetes.** In: *Forum Noticias del foro consultivo.* vol. 9. México: Foro Consultivo Científico y Tecnológico AC; 2016: 40-45.
19. **Atender la diabetes absorbe 7% del presupuesto de salud en México** [<http://alianzasalud.org.mx/2012/11/atender-la-diabetes-absorbe-7-del-presupuesto-de-salud-en-mexico/>]
20. Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N: **Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia.** In: *Salud Pública.* vol. 55 (sup2). México; 2013: 129-136.

21. **Diabetes en México** [[http://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2014/10/Infografia\\_DiabetesMexico\\_ok.jpg](http://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2014/10/Infografia_DiabetesMexico_ok.jpg)]
22. **OECD.: Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care:** OECD Publishing.
23. Bermúdez V, Bermúdez F, Arraiz N, Leal E, Linares S, Mengual E, Valdelamar L, Rodríguez M, Seyfi H, Amell A *et al*: **Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución.** *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2007, **26**(2):76-86.
24. Lee J, Pilch PF: **The insulin receptor: structure, function, and signaling.** *The American journal of physiology* 1994, **266**(2 Pt 1):C319-334.
25. Taylor R: **Insulin action 1991.** *Clinical endocrinology* 1991, **34**(2):159-171.
26. James P, McFadden R: **Understanding the processes behind the regulation of blood glucose.** *Nursing times* 2004, **100**(16):56-58.
27. Mendoza C K, Márquez O R, Donado A, Echenique O, Méndez M DL, Pérez C M, Macías V V: **Fundamentos Moleculares de la Diabetes Mellitus.** *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud* 2005, **2**(2):135-142.
28. Olivares Reyes JA, Arellano Plancarte A: **Bases Moleculares de las acciones de la insulina.** *Revista de Educación Bioquímica* 2008, **27**(1):9-18.
29. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J: **Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus.** *The Journal of nutrition* 2003, **133**(5 Suppl 2):1674S-1683S.
30. Mathers CD, Loncar D: **Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030.** *PLoS medicine* 2006, **3**(11):e442.
31. **¿Qué es la diabetes gestacional?** [<http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/diabetes-gestacional/que-es-la-diabetes-gestacional.html>]
32. Kjos SL, Buchanan TA: **Gestational diabetes mellitus.** *The New England journal of medicine* 1999, **341**(23):1749-1756.
33. Jovanovic L, Pettitt DJ: **Gestational diabetes mellitus.** *Jama* 2001, **286**(20):2516-2518.
34. Ullmo S, Vial Y, Di Bernardo S, Roth-Kleiner M, Mivelaz Y, Sekarski N, Ruiz J, Meijboom EJ: **Pathologic ventricular hypertrophy in the offspring of diabetic mothers: a retrospective study.** *European heart journal* 2007, **28**(11):1319-1325.
35. Ahmed RG: **Evolutionary interactions between diabetes and development.** *Diabetes research and clinical practice* 2011, **92**(2):153-167.
36. Donovan LE, Cundy T: **Does exposure to hyperglycaemia in utero increase the risk of obesity and diabetes in the offspring? A critical reappraisal.** *Diabetic Medicine* 2015, **32**(3):295-304.
37. García-Patterson A, Erdozain L, Ginovart G, Adelantado JM, Cubero JM, Gallo G, de Leiva A, Corcoy R: **In human gestational diabetes mellitus congenital malformations are related to pre-pregnancy body mass index and to severity of diabetes.** *Diabetologia* 2004, **47**(3):509-514.
38. Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, Iliodromiti Z: **Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus and previous gestational diabetes mellitus.** *International journal of endocrinology* 2012, **2012**:549748.
39. Metzger BE, Coustan DR: **Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee.** *Diabetes care* 1998, **21** Suppl 2:B161-167.

40. Catalano PM: **Trying to understand gestational diabetes.** *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2014, **31**(3):273-281.
41. Salazar Garcia M, Reyes Maldonado E, Revilla Monsalve MC, Villavicencio Guzman L, Reyes Lopez A, Sanchez-Gomez C: **Importance of maternal diabetes on the chronological deregulation of the intrauterine development: an experimental study in rat.** *Journal of diabetes research* 2015, **2015**:354265.
42. Vieau D: **Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease.** *World journal of diabetes* 2011, **2**(9):133-136.
43. Hall JG: **The importance of the fetal origins of adult disease for geneticists.** *Clinical Genetics* 2007, **72**(2):67-73.
44. Bloomfield FH: **Epigenetic modifications may play a role in the developmental consequences of early life events.** *Journal of neurodevelopmental disorders* 2011, **3**(4):348-355.
45. Baker JL, Olsen LW, Sorensen TI: **Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood.** *The New England journal of medicine* 2007, **357**(23):2329-2337.
46. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ: **Weight in infancy and death from ischaemic heart disease.** *Lancet* 1989, **2**(8663):577-580.
47. Ramírez-Vélez R: **Programación Fetal *in utero* y su impacto en la salud del adulto.** *Endocrinología y Nutrición* 2012, **59**(06):383-393.
48. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR: **Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus.** *Pediatrics* 2005, **115**(3):e290-296.
49. Higgins M, Galvin D, McAuliffe F, Coffey M, Firth R, Daly S, Coleman E, Kinsley B, Geary M, Byrne M *et al*: **Pregnancy in women with Type 1 and Type 2 diabetes in Dublin.** *Irish journal of medical science* 2011, **180**(2):469-473.
50. Warner MJ, Ozanne SE: **Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease.** *The Biochemical journal* 2010, **427**(3):333-347.
51. Reece EA: **Diabetes-induced birth defects: what do we know? What can we do?** *Current diabetes reports* 2012, **12**(1):24-32.
52. Al-Agha R, Firth RG, Byrne M, Murray S, Daly S, Foley M, Smith SC, Kinsley BT: **Outcome of pregnancy in type 1 diabetes mellitus (T1DM): results from combined diabetes-obstetrical clinics in Dublin in three university teaching hospitals (1995-2006).** *Irish journal of medical science* 2012, **181**(1):105-109.
53. McCance DR: **Pregnancy and diabetes.** *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 2011, **25**(6):945-958.
54. Uvena-Celebrezze J, Catalano PM: **The infant of the woman with gestational diabetes mellitus.** *Clinical obstetrics and gynecology* 2000, **43**(1):127-139.
55. Ornoy A, Avgil Tsadok M, Yaffe P, Zangen SW: **The Cohen diabetic rat as a model for fetal growth restriction: Vitamins C and E reduce fetal oxidative stress but do not restore normal growth.** *Reproductive Toxicology* 2009, **28**(4):521-529.
56. Morgan SC, Relaix F, Sandell LL, Loeken MR: **Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects.** *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 2008, **82**(6):453-463.
57. Cao Y, Zhao Z, Eckert RL, Reece EA: **The essential role of protein kinase Cdelta in diabetes-induced neural tube defects.** *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia*

- and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet 2012, **25**(10):2020-2024.
58. Zhao Z, Yang P, Eckert RL, Reece EA: **Caspase-8: a key role in the pathogenesis of diabetic embryopathy.** *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology* 2009, **86**(1):72-77.
  59. Zhao Z, Eckert RL, Reece EA: **Reduction in embryonic malformations and alleviation of endoplasmic reticulum stress by nitric oxide synthase inhibition in diabetic embryopathy.** *Reprod Sci* 2012, **19**(8):823-831.
  60. Yang P, Reece EA: **Role of HIF-1alpha in maternal hyperglycemia-induced embryonic vasculopathy.** *American journal of obstetrics and gynecology* 2011, **204**(4):332 e331-337.
  61. Dhanasekaran N, Wu YK, Reece EA: **Signaling pathways and diabetic embryopathy.** *Seminars in reproductive endocrinology* 1999, **17**(2):167-174.
  62. Reece EA, Ma XD, Wu YK, Dhanasekaran D: **Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy. I. Membrane signalling.** *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 2002, **11**(4):249-253.
  63. Schaefer-Graf UM, Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL: **Clinical predictors for a high risk for the development of diabetes mellitus in the early puerperium in women with recent gestational diabetes mellitus.** *American journal of obstetrics and gynecology* 2002, **186**(4):751-756.
  64. Manderson JG, Mullan B, Patterson CC, Hadden DR, Traub AI, McCance DR: **Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy.** *Diabetologia* 2002, **45**(7):991-996.
  65. Louey S, Jonker SS, Giraud GD, Thornburg KL: **Placental insufficiency decreases cell cycle activity and terminal maturation in fetal sheep cardiomyocytes.** *The Journal of physiology* 2007, **580**(Pt. 2):639-648.
  66. Arizmendi J, Pertuz VC, Colmenares A, Hoyos DG, Palomo T: **Diabetes gestacional y complicaciones neonatales.** *Universidad Militar Nueva Granada, Colombia* 2012, **20**(2).
  67. Akcakus M, Koklu E, Baykan A, Yikilmaz A, Coskun A, Gunes T, Kurtoglu S, Narin N: **Macroscopic newborns of diabetic mothers are associated with increased aortic intima-media thickness and lipid concentrations.** *Hormone research* 2007, **67**(6):277-283.
  68. Russell NE, Holloway P, Quinn S, Foley M, Kelehan P, McAuliffe FM: **Cardiomyopathy and cardiomegaly in stillborn infants of diabetic mothers.** *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 2008, **11**(1):10-14.
  69. Dowling D, Corrigan N, Horgan S, Watson CJ, Baugh J, Downey P, McAuliffe FM: **Cardiomyopathy in offspring of pregestational diabetic mouse pregnancy.** *Journal of diabetes research* 2014, **2014**:624939.
  70. Marco LJ, McCloskey K, Vuillermin PJ, Burgner D, Said J, Ponsonby AL: **Cardiovascular disease risk in the offspring of diabetic women: the impact of the intrauterine environment.** *Experimental diabetes research* 2012, **2012**:565160.
  71. Merzouk H, Madani S, Prost J, Loukidi B, Meghelli-Bouchenak M, Belleville J: **Changes in serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions at birth and after 1 month of life in macrosomic infants of insulin-dependent diabetic mothers.** *European journal of pediatrics* 1999, **158**(9):750-756.
  72. Ganda OP, Rossini AA, Like AA: **Studies on streptozotocin diabetes.** *Diabetes* 1976, **25**(7):595-603.

73. **Estructura Molecular de estreptozotocina**  
[\[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s0130?lang=es&region=MX\]](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s0130?lang=es&region=MX)
74. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MR: **Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)**. *Cancer chemotherapy reports Part 1* 1963, **29**:91-98.
75. West E, Simon O, Morrison E: **Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats**. *West Indian Med J* 1996, **45**:60-62.
76. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M: **N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets**. *Experientia* 1996, **52**(4):344-347.
77. Bolaffi JL, Nagamatsu S, Harris J, Grodsky GM: **Protection by thymidine, an inhibitor of polyadenosine diphosphate ribosylation, of streptozotocin inhibition of insulin secretion**. *Endocrinology* 1987, **120**(5):2117-2122.
78. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J: **Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity**. *The Journal of endocrinology* 1990, **127**(1):161-165.
79. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB: **STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells**. *Diabetes* 1994, **43**(11):1326-1333.
80. Thulesen J, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS: **Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats**. *Endocrinology* 1997, **138**(1):62-68.
81. Kroncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V: **Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage**. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1995, **376**(3):179-185.
82. Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML: **Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets**. *Biochemical and biophysical research communications* 1993, **197**(3):1458-1464.
83. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H: **Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets**. *Nature* 1981, **294**(5838):284-286.
84. Morgan NG, Cable HC, Newcombe NR, Williams GT: **Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis**. *Bioscience reports* 1994, **14**(5):243-250.
85. Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T: **Streptozocin- and alloxan-induced H2O2 generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H2O2 as mediator for DNA fragmentation**. *Diabetes* 1991, **40**(9):1141-1145.
86. Szkudelski T: **The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas**. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2001, **50**(6):537-546.
87. Sandler S, Swenne I: **Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro**. *Diabetologia* 1983, **25**(5):444-447.
88. Heller B, Burkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Muller M, Burkart V, Kolb H: **Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level**. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1994, **375**(9):597-602.
89. Laiizo PA: **Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices**. USA; 2015.
90. **Heart Anatomy** [\[http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy/anatomy2.cfm\]](http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy/anatomy2.cfm)
91. Ballesteros PA: **Anatomía del corazón**. In: *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA*: 2009. Fundación BBVA: 35-40.
92. Cabin HS: **The heart and circulation**.

93. Arteaga Martínez SM, García Peláez MI: **Desarrollo del sistema cardiovascular**. In: *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. Edited by Panamericana EM; 2014.
94. Liu N, Olson EN: **MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development**. *Developmental cell* 2010, **18**(4):510-525.
95. Geneser F: **Histología. Sobre bases biomoleculares**, 3 edn. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
96. Gartner LP, Hiatt JL: **Histología. Texto y atlas**, 2° edn. USA: McGraw-Hill Interamericana; 1995.
97. Boya Vegue J: **Aparato Circulatorio**. In: *Atlas de Histología y Organografía microscópica*. España: Editorial Médica Panamericana; 1996: 129-150.
98. Gutiérrez Guerra G: **Sistema circulatorio**. In: *Texto de histología*. Departamento académico de ciencias morfológicas 2008.
99. Netter FH: **The heart. Anatomy**. Ardsley, New Jersey: CIBA Pharmaceutical Co.; 1969.
100. Daunoravicius D, Besusparis J, Zurauskas E, Laurinaviciene A, Bironaite D, Pankuweit S, Plancoulaine B, Herlin P, Bogomolovas J, Grabauskiene V *et al*: **Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology**. *Diagnostic Pathology* 2014, **9**:114-114.
101. Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA: **Histología y embriología del ser humano**, 4 edn. Buenos Aires, Argentina; 2008.
102. Welsch U: **Histología**, 2 edn. España: Editorial Médica Panamericana; 2008.
103. Holemans K, Gerber RT, Meurrens K, De Clerck F, Poston L, Van Assche FA: **Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring**. *Diabetologia* 1999, **42**(1):81-89.
104. Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, Wreford NG, Black MJ: **Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts**. *Pediatric research* 2005, **57**(6):796-800.
105. Xu Y, Williams SJ, O'Brien D, Davidge ST: **Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring**. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006, **20**(8):1251-1253.
106. Elmes MJ, Gardner DS, Langley-Evans SC: **Fetal exposure to a maternal low-protein diet is associated with altered left ventricular pressure response to ischaemia-reperfusion injury**. *The British journal of nutrition* 2007, **98**(1):93-100.
107. Amri K, Freund N, Vilar J, Merlet-Benichou C, Lelievre-Pegorier M: **Adverse effects of hyperglycemia on kidney development in rats: in vivo and in vitro studies**. *Diabetes* 1999, **48**(11):2240-2245.
108. Rodriguez RR, Renauld A, Celener D, Perez RL, Susemihl MC: **Offspring of streptozotocin diabetic rats: size changes in Langerhans islets with time after birth**. *Diabetes research and clinical practice* 1998, **41**(2):95-100.
109. Uriu-Hare JY, Stern JS, Reaven GM, Keen CL: **The effect of maternal diabetes on trace element status and fetal development in the rat**. *Diabetes* 1985, **34**(10):1031-1040.
110. Seki Y, Williams L, Vuguin PM, Charron MJ: **Minireview: Epigenetic programming of diabetes and obesity: animal models**. *Endocrinology* 2012, **153**(3):1031-1038.
111. Jawerbaum A, White V: **Animal models in diabetes and pregnancy**. *Endocrine reviews* 2010, **31**(5):680-701.
112. **Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio**. In., vol. NOM-062-200-1999. Diario Oficial de la Federación; 2001.

113. Kim HB, Jang MH, Shin MC, Lim BV, Kim YP, Kim KJ, Kim EH, Kim CJ: **Treadmill exercise increases cell proliferation in dentate gyrus of rats with streptozotocin-induced diabetes.** *Journal of diabetes and its complications* 2003, **17**(1):29-33.
114. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, Damasceno DC: **Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes.** *Diabetology & metabolic syndrome* 2009, **1**(1):21.
115. Damasceno DC, Volpato GT, Calderon Ide M, Aguilar R, Rudge MV: **Effect of Bauhinia forficata extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions.** *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2004, **11**(2-3):196-201.
116. Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dorner G: **Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes.** *Diabetologia* 1997, **40**(9):1094-1100.
117. Kervran A, Guillaume M, Jost A: **The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat.** *Diabetologia* 1978, **15**(5):387-393.
118. Aman J, Hansson U, Ostlund I, Wall K, Persson B: **Increased fat mass and cardiac septal hypertrophy in newborn infants of mothers with well-controlled diabetes during pregnancy.** *Neonatology* 2011, **100**(2):147-154.
119. Cortés Herrera AA: **Características epidemiológicas de las cardiopatías congénitas en la UMAE No. 189.** Universidad Veracruzana 2013.
120. Ehler E: **Cardiac cytoarchitecture - why the "hardware" is important for heart function!** *Biochimica et biophysica acta* 2016, **1863**(7 Pt B):1857-1863.

## ANEXO 1: PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### I Soluciones salinas y buffers

#### ❖ Solución PBS 1X pH 7.4

Fosfato de sodio dibásico	7.45 g
Fosfato de sodio monobásico	0.86 g
Cloruro de Sodio	14.4 g
Agua bidestilada	Aforar a 1L

✚ Mezclar bien y ajustar pH a 7.22-7.4 con ayuda de potenciómetro

✚ Guardar a 4°C

#### ❖ Buffer de acetatos

Agua desionizada	10 mL
Acetato de sodio	0.361 g
Ácido acético glacial	Ajuste de pH a 4.3

### II Fijadores

#### ❖ Formaldehído tamponado 3.8%

Formaldehído (solución comercial al 38%)	10 ml
PBS 1X	90 ml

✚ Mezclar bien y guardar a 4°C

#### ❖ Solución de Bouin

Solución saturada de ácido pícrico (solución acuosa)	75 mL
Formol al 37-40%	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

### III Fármacos

#### ❖ Estreptozotocina

Buffer de acetatos	5 mL
Estreptozotocina	0.25 g

✚ Se lleva a refrigeración de 4°C

### IV Colorantes y soluciones para tinción

#### ❖ Solución Hematoxilina de Harris

Hematoxilina en Cristales	2.5 g
Alcohol al 96%	25 mL
Alumbre de amonio y potasio	50 g
Óxido rojo de mercurio	1.25 g
Agua	500 mL

 Procedimiento:

1. Disolver hematoxilina en alcohol, calentando ligeramente y separando el recipiente.
2. Disolver el alumbre en 100 mL de agua destilada, calentando ligeramente
3. Mezclar ambas soluciones y lavar ambos recipientes con los restantes 100 mL de agua
4. Hervir rápidamente, al iniciar el hervor retirar del fuego.
5. Añadir óxido de rojo de mercurio y seguir calentando a fuego lento hasta que la solución adquiera un color rojo púrpura.
6. Enfriar rápidamente con agua corriente.
7. Filtrar 10 veces para eliminar residuos de amonio
8. A cada 100 mL de solución de hematoxilina añadir de 4 a 5 mL de ácido acético glacial, la mitad al hacer el colorante y la otra mitad al usarlo.

❖ **Eosina de Carnegie**

Eosina amarillenta o azulosa	4g
Alcohol etílico 96%	100 mL
Agua destilada	300 mL

 Procedimiento:

1. Disolver la eosina en agua
2. Añadir alcohol
3. Dejar madurar durante 3 semanas a la luz y en frasco claro
4. Guardar en el mismo frasco.

 Nota: Si se utiliza Eosina amarillenta, para lograr una tinción adecuada, añadir 3 gotas de ácido acético glacial por cada 10 mL de colorante.

❖ **Alcohol acidulado**

Etanol 70%	200 mL
Ácido clorhídrico concentrado	2-5 gotas

 Agregar ácido clorhídrico concentrado al alcohol y homogenice

❖ **Agua amoniacal (1:1000)**

Hidróxido de amonio	200 µL
Agua de la llave	200 mL

❖ **Entellan**

Entellan	50 mL
----------	-------

Xilol

El necesario

- Colocar al Entellan en un frasco gotero y adicionar unas gotas de Xilol para obtener una solución ligeramente viscosa, que se pueda adicionar al portaobjetos a través de goteo.
- Esta resina se debe preparar un día antes de montar para evitar la formación de burbujas.

#### ❖ Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina	1g
Alcohol 95% o 96%	100 mL

Solución B

Solución cloruro-férrico al 29 %	4 mL
Agua destilada	95 mL
Ácido clorhídrico	1 mL

Solución de Trabajo

Solución A	
Solución B	1:1

#### ❖ Escarlata de Biebrich-Fuschina Ácida

Biebrich Escarlata acuoso al 1%	90 mL
Solución acuosa fuscina ácida al 1%	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

#### ❖ Azul de anilina

Azul de anilina	2.5 g
Ácido glacial	2 mL
Agua destilada	100 mL

- Se agita la solución con magneto hasta disolver al azul de anilina por completo

#### ❖ Solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico al 5%

Ácido fosfomolibdico	5 g
Ácido fosfotúngstico	5 g
Agua destilada	200 mL

## ANEXO 2: TRATAMIENTO PREVIO A LA INCLUSIÓN

### ❖ Corazones fijados en formol F21 y RN

Lavado de muestras:

1. Lavado con agua o PBS intervalos de 5 a 10 minutos (3 lavados)

Deshidratación de muestra:

2. Alcohol al 30% durante..... 30 minutos

3. Alcohol al 40%, 50%, 60% y 70% durante .....30 minutos

4. Alcohol al 80%, 90% y 96% .....30 minutos

5. Alcohol absoluto 2 cambios..... 30 minutos

6. Aceite de cedro:alcohol absoluto 1:1..... 45 minutos

Transparentado y/o aclaramiento:

7. Aceite de cedro toda la noche

8. Lavados aceite de cedro-cloroformo 1:1..... 45 minutos

9. Cloroformo hasta que el cloroformo quede limpio (Cambios rápidos de 10 minutos)

Inclusión

10. Cloroformo:Parafina 1:1..... 45 minutos

11. Lavados con parafina hasta que salga el olor a cloroformo...20 minutos

12. Orientar para cortar.

### ❖ Corazones fijados en Bouin F21 y RN

En este caso los lavados inician con alcohol al 70% hasta que el alcohol quede limpio y se continúa con el mismo proceso.

### ANEXO 3: TIEMPOS DE TINCIÓN

Los tiempos para los corazones de los 4 grupos fueron los mismos:

#### **El protocolo de la técnica H&E:**

- Agua destilada 2 cambios por 5 minutos
- Hematoxilina de Harris
- Agua de la llave (pase rápido)
- Agua destilada (pase rápido)
- Alcohol acidulado (pase rápido)
- Agua amoniacal por 3 minutos
- Eosina de Carnegie
- Alcohol al 96% (2 cambios) pase rápido
- Alcohol absoluto (2 cambios) pase rápido
- Xilol (2 cambios) pase rápido
- Montar las preparaciones con Entellan

#### **Protocolo de la técnica de Tricrómica de Masson:**

- Lavado con agua de la llave por 5 minutos
- Solución de Bouin por 24 horas a temperatura ambiente.
- Lavado con agua de la llave hasta limpiar la muestra.
- Lavado con agua destilada
- Hematoxilina de Weighert
- Azular con hidróxido de amonio al 1%
- Lavado con agua corriente por 10 minutos
- Lavado con agua destilada
- Escarlata de Briebrich-Fucshina ácida por 14 segundos
- Lavar con agua destilada hasta limpiar el colorante anterior
- Ácido Fosfotungstico-Fosfomolibdico al 5% durante 1 minuto.
- Azul de anilina
- Agua acética al 1% pase rápido
- Alcohol al 96 % 2 pases rápidos

- Alcohol absoluto 2 pases rápidos
- Xilol pase rápido
- Xilol durante 5 minutos
- Montar preparaciones con entellan

## ANEXO 4: RESULTADOS NUMÉRICOS DE GRÁFICAS

**Tabla 6 Peso corporal de ratas gestantes (en gramos)**

Día	Peso de ratas gestantes para obtener F21		Peso de ratas gestantes para obtener RN	
	RC (n=5)	RD (n=4)	RC (n=4)	RD(n=4)
0	265.120 (24.33)	280.93 (16.78)	272.1 (18.62)	270.63 (10.62)
3	275.74 (24.70)	284.65 (21.38)	280.9 (18.63)	277.6 (10.89)
5	287.16 (25.93)	293.5 (20.72)	288.75 (17.06)	285.5 (13.53)
8	293.94 (33.56)	287.38 (13.66)	296 (12.92)	282.23 (28.38)
11	314.88 (40.27)	287.78 (16.05)	319.55 (10.65)	280.6 (21.74)
14	327.320 (38.06)	298.15 (11.22)	333.93 (11.48)	297 (27.06.08)
17	342.78 (10.06)	316.13 (4.37)	373.73 (23.27)	319 (27.93)
21	369.75 (29.85)	332.13 (14.09)	406.23 (28.60)	343.35 (30.82)
23				380.68 (16.56)

Los datos expresados en la tabla corresponden al promedio (Desviación estándar) de las ratas control (RC) y ratas diabéticas (RD).

**Tabla 7 Glucemia durante el embarazo en ratas (mg/dL)**

Día	Glucemia en ratas gestantes para obtener F21		Glucemia en ratas gestantes para obtener RN	
	RC (n=5)	RD (n=4)	RC (n=4)	RD (n=4)
0	82.800 (3.4928)	92.25 (6.70)	81.5 (7.68)	85.5 (5.45)
3	82.200 (5.8907)	83.75 (6.95)	79.25 (7.09)	86 (8.2)
5	82.600 (4.2778)	83.5 (4.80)	82.5 (7.14)	87.250 (7.04)
8	92.200 (1.7889)	317.5 (59.95)	78.25 (6.5)	351.25 (59.54)
11	78.400 (9.7108)	425.5 (130.51)	80.75 (8.42)	477.75 (58.64)
14	85.000 (7.1764)	552.5 (69.30)	79.25 (10.1)	468.25 (109.47)
17	83.500 (6.4550)	478.5 (145.45)	78.75 (9.47)	397 (36.04)
21	85.000 (3.7417)	450.25 (126.94)	79.25 (7.27)	384.5 (38.41)
23				316.75 (132.62)

Los datos se expresan en promedio (desviación estándar) de las ratas control (RC) y ratas diabéticas (RD).

**Tabla 8 Peso (g) y Glucosa (mg/dL) de crías de F21 y RN**

Grupo	F21		RN	
	RC	RD	RC	RD
Peso (g)	5.93 (0.77)	4.59 (0.52)*	7.30 (1.76)	6.51 (0.38)*
Glucosa (mg/dL)	86.76 (9.41)	217.90 (120.92)*	88.85 (15.55)	166.86 (103.71)*

Los datos se expresan en promedio (desviación estándar) de crías de ratas control (RC) y ratas diabéticas (RD),