



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Análisis del efecto de la hiperglucemia embriofetal
sobre el desarrollo del miocardio ventricular y
expresión de moléculas marcadoras de daño
miocárdico”**

TESIS

Para obtener el grado de:
Doctor en Biología Experimental

PRESENTA:

M. en C. Ricardo Jaime Cruz

Matricula: 2163802044

ORCID: 0000-0002-0403-537X

Correo: ricardo.jaime.cruz@gmail.com

Comité tutorial:

Tutor Interno: Dr. Mario García Lorenzana
Tutor Externo: Dra. Marcela Salazar García
Asesor: Dr. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Secretario: Dr. Horacio Márquez González
Vocal 1: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana
Vocal 2: Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Iztapalapa, Ciudad de México a 18 de marzo de 2024.

Miembros del comité tutorial de la tesis “Análisis del efecto de la hiperglucemia embriofetal sobre el desarrollo del miocardio ventricular y expresión de moléculas marcadoras de daño miocárdico.”

Tutor Interno: Dr. Mario García Lorenzana

Área de Neurociencias

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Tutor Externo: Dra. Marcela Salazar García

Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental

Unidad de Investigación en Malformaciones Congénitas

Hospital Infantil de México, Federico Gómez

Asesor: Dr. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

RESUMEN

La hiperglucemia durante la gestación puede alterar el desarrollo del corazón fetal, aumentando el riesgo de enfermedades cardiovasculares posnatales. Es importante identificar marcadores tempranos de daño cardíaco fetal inducido por un desarrollo en un ambiente hiperglucémico y dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes. Las investigaciones clínicas de adultos diabéticos con disfunción cardíaca y estudios con ratones transgénicos han revelado que la sobreexpresión de TNNI3K puede contribuir al desarrollo de insuficiencia cardíaca, remodelaciones anómalas e hipertrofia ventricular. La función cardíaca óptima también depende de la organización adecuada de los tejidos contráctiles y excitables regulados por uniones intercelulares ocluyentes, adherentes y comunicantes. Las cardiopatías congénitas al ser la principal causa de muerte neonatal en el mundo resultan de gran importancia comprender su posible origen. El objetivo de este trabajo evaluar los cambios en el desarrollo del corazón embrionario y los niveles de expresión de proteínas sarcoméricas (troponina I, desmina y TNNI3K), proteínas de uniones, Glut-1 y Ki-67 en condiciones de hiperglucemia fetal. Se utilizaron embriones de *Gallus gallus domesticus* en estadio 22HH, se formaron dos grupos: el grupo hiperglucémico (HG) al cuál se le administró sobre la membrana corioalantoidea 400 µl solución de glucosa al 30 mmol/L cada 24 horas durante 10 días. El otro grupo de embriones fue el no tratado (NT), se les administró 400 µl de solución salina fisiológica, en la misma zona cada 24 h durante 10 días (etapa 36HH). Durante el periodo de inducción se midió la glucosa en sangre, el eje coronilla rabadilla y el peso de los embriones, así como el tamaño del corazón, el análisis histopatológico y una estimación de expresión de proteínas sarcoméricas y uniones celulares mediante western blot e inmunofluorescencia por microscopia confocal. Los embriones HG mostraron retrasos en maduración cardíaca y el análisis histopatológico reveló una reducción del espesor de la pared ventricular izquierda y derecha. Los niveles de inmunoexpresión de TNNI3K y troponina I aumentaron (37% y 39%, respectivamente) y la intensidad de fluorescencia de desmina se redujo, así como la proliferación en los embriones HG. La hiperglucemia embriofetal puede desencadenar un aumento en los niveles de expresión de TNNI3K y troponina I, así como una disfunción de las uniones ocluyentes y adherentes, induciendo un desarrollo cardíaco anormal.

ABSTRACT

Hyperglycemia during gestation can disrupt fetal heart development and increase postnatal cardiovascular disease risk. It is therefore imperative to identify early biomarkers of hyperglycemia during gestation-induced fetal heart damage and elucidate the underlying molecular pathomechanisms. Clinical investigations of diabetic adults with heart dysfunction and transgenic mouse studies have revealed that overexpression or increased expression of TNNI3K, a heart-specific kinase that binds troponin cardiac I, may contribute to abnormal cardiac remodeling, ventricular hypertrophy, and heart failure. Optimal heart function also depends on the precise organization of contractile and excitable tissues conferred by intercellular occlusive, adherent, and communicating junctions. The current study evaluated changes in embryonic heart development and the expression levels of sarcomeric proteins (troponin I, desmin, and TNNI3K), junctional proteins, glucose transporter-1, and Ki-67 under fetal hyperglycemia. Stage 22HH *Gallus gallus domesticus* embryos were randomly divided into two groups: a hyperglycemia (HG) group, in which individual embryos were injected with 30 mmol/L glucose solution every 24 h for 10 days, and a no-treatment (NT) control group, in which individual embryos were injected with physiological saline every 24 h for 10 days (stage 36HH). Embryonic blood glucose, height, and weight, as well as heart size, were measured periodically during treatment, followed by histopathological analysis and estimation of sarcomeric and junctional protein expression by western blotting and immunostaining. Hyperglycemic embryos demonstrated delayed heart maturation, with histopathological analysis revealing reduced left and right ventricular wall thickness (-39% and -35% vs. NT). Immunoexpression levels of TNNI3K and troponin I increased (by 37% and 39%, respectively), and desmin immunofluorescence reduced (by 23%). Embryo-fetal hyperglycemia may trigger an increase in the expression levels of TNNI3K and troponin I, as well as dysfunction of occlusive and adherent junctions, ultimately inducing abnormal cardiac remodeling.

INDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS.....	6
1.INTRODUCCION.....	7
1.1 Diabetes mellitus	7
1.1.1 Clasificación de la DM	8
1.1.2 Diabetes durante la gestación.....	11
1.1.3 Efectos de la hiperglucemia durante la gestación.....	12
1.2 El corazón.....	13
1.2.1 Características anatómicas e histológicas del corazón.....	13
1.2.2 Desarrollo del corazón.....	14
1.2.3 Cardiopatías congénitas y miocardiopatías.....	16
1.3 Transportadores de glucosa en el corazón.....	18
1.4 Proteínas marcadoras de daño al miocardio.....	20
1.4.1 Cinasa interactuante con troponina I (TNNI3K)	21
1.4.2 Troponina I.....	21
1.4.3 Desmina.....	22
1.5 Proteínas de uniones celulares en el corazón.....	23
1.5.1 Conexinas (Cx).....	24
1.5.2 Cadherinas.....	25
1.5.3 ZO-1.....	25
1.6 Proliferación en el desarrollo embrio-fetal.....	27
1.7 Ventajas del modelo de <i>Gallus gallus</i>	27
2. ANTECEDENTES.....	30
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	34
5. HIPÓTESIS.....	34
6. OBJETIVO GENERAL.....	35
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	35
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
8.1 Inducción de hiperglucemia embrionaria.....	36
8.2 Peso y crecimiento corporal.....	37

8.3 Procedimiento histológico.....	37
8.4 Análisis estructural de microscopia electrónica de barrido.....	38
8.5 Inmunofluorescencia por microscopia confocal.....	38
8.6 Análisis de la expresión de proteínas por western blot.....	39
8.7 Análisis estadístico.....	40
9. RESULTADOS.....	40
9.1 Inducción de hiperglucemia.....	40
9.2 Peso y desarrollo corporal.....	42
9.3 Análisis morfométricos e histológicos del corazón embrionario.....	43
9.4 Inmunodetección de biomarcadores de daño miocárdico.....	48
9.5 Evaluación de proteínas de unión celular.....	50
9.6 Evaluación de la proliferación celular.....	53
10. DISCUSIÓN.....	57
10.1 Importancia del modelo de hiperglucemia de embriones de pollo.....	58
10.2 Efectos de la hiperglucemia sobre la morfología e histología cardíacas.....	59
10.3 Patrones de expresión alterados de proteínas sarcoméricas asociadas con daño miocárdico.....	62
10.4 Efectos de la hiperglucemia embrionaria sobre el transporte de glucosa en el corazón.....	67
11. CONCLUSIONES.....	70
12. PERSPECTIVAS.....	70
13. BIBLIOGRAFÍA.....	71
14. ANEXOS.....	86
14.1 Paraformaldehido.....	86
14.2 Tinción Hematoxilina-Eosina.....	86
14.3 Tinción Sirius Red.....	87
15. LOGROS DURANTE EL DOCTORADO.....	89
15.1 Artículos en Revistas científicas.....	89
15.2 Tesis dirigidas.....	89
15.3 Servicios sociales dirigidos.....	90
15.4 Conferencias impartidas.....	91
15.5 Congresos.....	91

ABREVIATURAS

DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM 2	Diabetes mellitus tipo 2
ADA	American Diabetes Association
IDF	International Diabetes Federation
OMS	Organización Mundial de la Salud
GNE	Glucosilación no enzimática
VI	Ventrículo izquierdo
VD	Ventrículo derecho
PVD	Pared ventricular derecha
PVI	Pared ventricular izquierda
TIV	Tabique interventricular
TNNI3K	Cinasa interactuante con troponina I
HG	Embriones tratados con glucosa (hiperglucémicos)
NT	Embriones no tratados con glucosa (normoglucémicos)
PBS	Buffer de fosfatos
Cx43	Conexina 43
Glut 1	Transportador de glucosa 1
Glut 4	Transportador de glucosa 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una afección crónica que se caracteriza por hiperglucemia con valores $>126\text{mg/dL}$, (IDF, 2021; OMS, 2016). Dicha enfermedad es un importante problema de salud pública en todo el mundo por ser cada vez más frecuente y por la severidad y diversidad de sus complicaciones crónicas (Zhao et al. 2013; Harrison, 2006). La federación internacional de diabetes (IDF) ha informado que alrededor de 463 millones de los adultos de 20 a 79 años la padecen. En el caso de México, en 2017 se informó que se presentaron alrededor de 12 millones de casos, ocupando así el 6o. lugar mundial en número de individuos con DM, en 2022 se reportó que la prevalencia de prediabetes en nuestro país fue de 22.1%, y de diabetes diagnosticada y no diagnosticada de 12.6 y 5.8%, respectivamente, lo que resulta en una prevalencia de DM total de 18.3% (Ensanut, 2023).

La glucosa es la molécula energética necesaria para que las células cumplan sus funciones metabólicas y la insulina sintetizada y secretada por el páncreas, es una hormona esencial, necesaria para el transporte de glucosa desde la circulación sanguínea hacia las células (ADA, 2019). La DM se desarrolla cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no la utiliza eficazmente. La falta de insulina o la incapacidad de las células de responder a su estímulo provocan hiperglucemia (OMS, 2016).

1.1.1 Clasificación de la DM

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA) esta enfermedad puede ser clasificada en las siguientes categorías:

- Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), ocasionado por la destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas y generalmente conduce a la deficiencia de insulina.
- Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), debida a una pérdida progresiva de secreción de insulina de las células β -pancreáticas, con frecuencia se presenta resistencia a la insulina.
- Diabetes mellitus gestacional, diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no fue diagnosticada antes de la gestación.
- Tipos específicos de diabetes debido a otras causas, como la diabetes monogénica (diabetes mellitus neonatal y la diabetes del adulto en jóvenes (MODY, por sus siglas en inglés) enfermedades del páncreas exocrino (cistifibrosis y pancreatitis), y diabetes inducida por medicamentos o productos químicos (glucocorticoides, tratamiento del VIH/SIDA o después del trasplante de órganos).

La progresión de la DM1 y la DM2 puede variar considerablemente. En todos los tipos se presenta pérdida de función de los islotes pancreáticos que por lo general lleva a la deficiencia de insulina. Las personas con DM1 necesitan la administración diaria de insulina, a fin de mantener el nivel de glucosa dentro del intervalo adecuado. Sin esta

hormona no serían capaces de sobrevivir. En la DM2 predomina la pérdida progresiva de la secreción de insulina y la incapacidad del organismo de responder plenamente a dicha hormona, efecto que se define como resistencia a la insulina. La DM2 es la forma más frecuente de diabetes, y representa alrededor del 90% del total de casos. En cambio, la incidencia de DM1 se encuentra en aumento en todo el mundo, pero hay una gran variación en lo reportado en cada país, con algunas regiones del mundo que presentan una incidencia más alta que otras (IDF, 2021).

La hiperglucemia es uno de los factores de riesgo reconocidos para la aparición y progresión de las complicaciones de la DM. La elevación mantenida en las concentraciones de glucosa provoca cambios en las proteínas plasmáticas y tisulares con efectos indeseables sobre la salud del paciente diabético, de no controlarse, puede provocar daños a largo plazo en varios órganos del cuerpo, que conllevan al desarrollo de complicaciones sanitarias discapacitantes y peligrosas para la supervivencia como: ceguera, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, amputación de miembros inferiores, problemas cardiovasculares, etc. (IDF, 2021).

Se han descrito al menos dos mecanismos por los cuales la hiperglucemia daña a las células:

- ❖ Estrés oxidante. El modo preciso de cómo el estrés oxidante puede acelerar el desarrollo de complicaciones en ambientes hiperglucémicos aún no ha sido dilucidado. Estudios experimentales y clínicos informan que el estrés oxidante derivado de la hiperglucemia promueve la producción de radicales libres;

deteriora el sistema de defensa antioxidante endógeno de las células como las vitaminas A, C y E, glutatión (GSH) y las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Matough et al. 2012). Incluso, el estrés oxidativo en mujeres gestantes con hiperglucemia puede afectar desfavorablemente el desarrollo embrio-fetal (Wender et al. 2004).

- ❖ Glicosilación no enzimática (GNE). La glucosa forma uniones covalentes con las proteínas del plasma sanguíneo a través de un proceso no enzimático conocido como glicosilación, además se ha descrito que la glucosa en exceso puede unirse con algunas otras biomoléculas endógenas celulares importantes como los lípidos y ácidos nucleicos. La GNE ocurre en condiciones fisiológicas, pero en ambientes hiperglucémicos está patológicamente acelerada, sobre todo en períodos de descompensación metabólica natural como sucede durante la gestación. La glicosilación provoca modificaciones bioquímicas, fisicoquímicas y funcionales de las biomoléculas nativas. El grado de glicosilación depende de la concentración de glucosa en el medio extracelular y del tiempo de vida media de las biomoléculas. Estudios recientes sugieren que los productos finales de glicación proteínica avanzada interactúan con receptores de membrana y modifican la señalización intracelular, la expresión génica, la liberación de moléculas proinflamatorias y/o radicales libres. Alternativamente se activan las vías de señalización intracelular para la generación de citocinas proinflamatorias y proscleróticas que conducen al desarrollo y progresión de complicaciones cardiovasculares diabéticas (Singh et al. 2014).

1.1.2 Diabetes durante la gestación

El periodo gestacional provoca grandes cambios fisiológicos, que trascurren hasta el momento del parto, caracterizados entre otros por la presencia de niveles séricos elevados de glucosa. La prevalencia de hiperglucemia durante la gestación según la ADA se presenta en un 9.2% de la población (ADA, 2019; DeSisto et al. 2014). Según la ADA cuando los niveles de la curva de tolerancia de glucosa en ayunas sobrepasan 92mg/dL, después de una hora los 180 mg/dL y al cabo de dos horas los 153 mg/dL, (con previa carga de glucosa vía oral) entre el segundo y tercer trimestre del embarazo (24-28 semanas), se trata de una DM gestacional (DMG), que tiene una incidencia de entre 75–90% de los casos. En el resto de las mujeres gestantes diabéticas, la hiperglucemia se diagnostica durante el primer trimestre, pero en la mayoría de estos casos, es probable que la DM1 o DM2, con un valor mayor o igual a 126mg/dL ya estuviese presente antes de la concepción (ADA 2019). A este tipo de diabetes en mujeres gestantes se le conoce como DM pregestacional (OMS, 2016).

La IDF estimó que el 16.2% de las mujeres que dieron a luz niños vivos en 2017 sufrieron alguna forma de hiperglucemia durante el embarazo. Se estima que el 86.4% de estos casos se debieron a DMG, el 6.2% a diabetes detectada antes del embarazo y el 7,4% a otros tipos de diabetes detectadas por primera vez en el embarazo (IDF, 2021). En general el embarazo diabético cursa con niveles altos de glucosa, caracterizado por resistencia a la insulina, hiperinsulinemia o alteración en las

hormonas producidas por la placenta. Esto provoca retrasos en el desarrollo embrionario y contribuye de manera significativa a la morbilidad y mortalidad de la descendencia de madres diabéticas (Tkáč, 2013).

1.1.3 Efectos de la hiperglucemia durante la gestación

Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la hiperglucemia en mujeres gestantes puede tener efectos en la progenie a corto, mediano y largo plazo. A corto plazo, la hiperglucemia se relaciona con defectos congénitos de diversos órganos entre los que destaca el corazón, siendo una de las principales causas de muerte intrauterina y perinatal.

Adicionalmente, diversos trabajos de investigación, señalan que la hiperglucemia materna y el estilo de vida durante la gestación afectan el desarrollo pre y posnatal de la progenie (OMS, 2016; Wentzel et al. 2005) y se relaciona con el desarrollo en la progenie de DM, obesidad y de particular importancia las enfermedades cardiovasculares, las cuales pueden manifestarse desde edades tempranas o en la vida adulta (Zhao et al. 2013; Wentzel et al. 2005). A pesar de la relevancia de estos estudios, los mecanismos celulares y moleculares que conducen al desarrollo de todas estas enfermedades, en particular de las cardiovasculares que conducen a defectos morfológicos y funcionales del corazón no han sido completamente dilucidados.

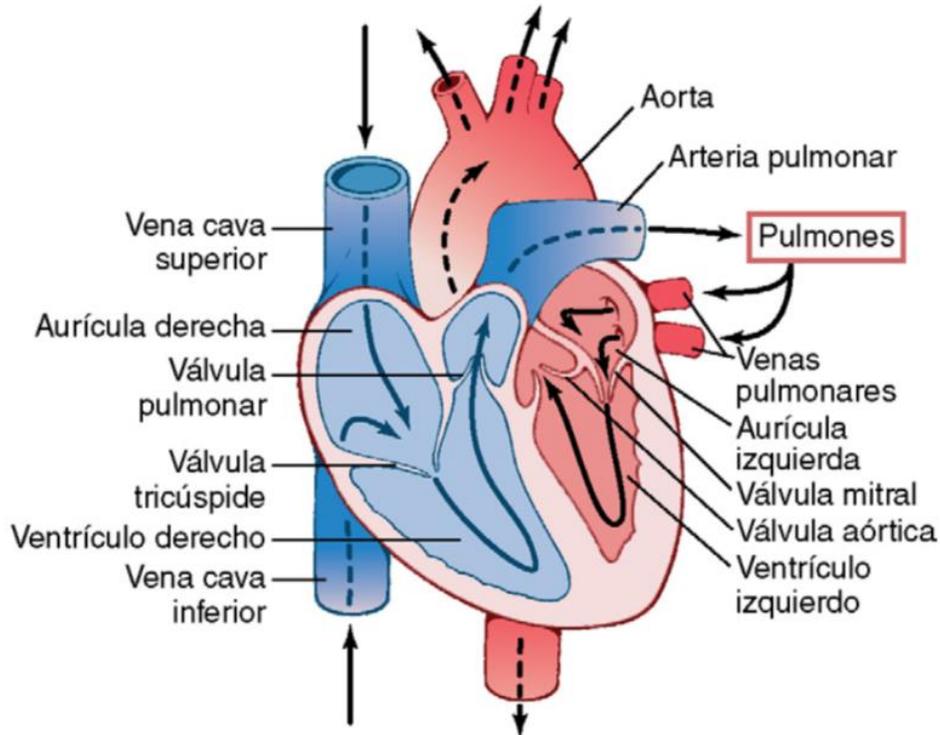
1.2 El corazón.

1.2.1 Características anatómicas e histológicas del corazón

El corazón es el órgano central y más importante en todos los vertebrados, consta de cuatro cavidades contralaterales, un atrio izquierdo y un atrio derecho, así como un ventrículo izquierdo (VI) y un ventrículo derecho (VD), separados por el tabique interventricular que evita que se mezcle la sangre venosa y la arterial (Villavicencio et al 2023, Romero et al. 2023). Este tabique consta de tres regiones bien definidas: 1. Interatrial, que separa a un atrio de otro. 2. Atrioventricular, que separa el atrio derecho del ventrículo izquierdo y viceversa. 3. Interventricular, que separa al VD del VI (Gongora et al 2018; Baño et al. 1986). Los atrios conforman el segmento atrial, el derecho recoge sangre de la circulación sistémica y el izquierdo de la circulación pulmonar. El VD impulsa la sangre venosa a la circulación arterial pulmonar para su oxigenación y el ventrículo izquierdo impulsa la sangre una vez oxigenada (arterial) a la circulación sistémica (Anderson et al. 1980).

El segmento ventricular gracias a su función contráctil aporta la fuerza del bombeo que impulsa la sangre. Ambos ventrículos son diferentes en morfología, ciclo de presiones y resistencias. Anatómicamente el ventrículo derecho presenta una capa muscular moderadamente gruesa, compuesta por miofibrillas de diámetro intermedio. En contraste el VI que comúnmente se describe como la cavidad más grande y fuerte del corazón, presenta una pared más gruesa y sus miofibrillas son de mayor diámetro, dándole la fuerza suficiente para impeler la sangre a través de la válvula aórtica hacia

el resto del cuerpo (Hall, 2011; Ham, 1967). Es necesario destacar que la labor de bombeo que ejerce el miocardio ventricular es fundamental para la función cardiaca. (Góngora et al. 2018).



Esquema 1. Estructura del corazón y trayecto del flujo sanguíneo a través de las cavidades cardíacas y de las válvulas cardíacas, tomado de Guyton & Hall, 2021.

1.2.2 Desarrollo del corazón

El corazón es el primer órgano que funciona durante el desarrollo embrionario. Está formado principalmente por la contribución de dos progenitores cardíacos superpuestos espacial y temporalmente que surgen de la capa esplácnica del mesoderma lateral anterior que forma el primer campo cardíaco y segundo campo cardíaco (el mesoderma esplácnico faríngeo) (Villavicencio et al, 2020).

El desarrollo del corazón es un proceso dinámico, secuencial, ordenado morfológicamente y regulado genética y epigenéticamente que suele dividirse en cuatro etapas superpuestas en el tiempo:

- **Cardiogénesis temprana:** ocurre durante la etapa premorfo genética o presomítica del embrión (días 8 a 18 de desarrollo). La cardiogénesis temprana comienza con la organización de las áreas cardíacas y de la media luna mediante la gastrulación y finaliza con la formación de dos tubos endocárdicos que están recubiertos externamente por células del linaje miocárdico.
- **Etapa morfo genética:** esta etapa ocurre durante las semanas 4 a 8 del desarrollo embrionario. Comienza con la formación del tubo cardíaco recto, derivado del primer campo cardíaco, y finaliza tras la integración de los primordios de todas las estructuras que componen el corazón de cuatro cámaras.
- **Septación y remodelación de las cámaras del corazón:** esta etapa comienza durante la mitad del desarrollo embrionario (estadio 30 Carnegie). Los primordios sufren procesos diferenciales de crecimiento y remodelación. Se forman las válvulas y el tabique y, al mismo tiempo, las cavidades auricular y ventricular adquieren sus identidades morfológicas.

- Maduración e histodiferenciación: ocurre durante el período fetal (semanas 16 a 38) e implica la maduración histológica del miocardio ventricular y auricular y la diferenciación histológica de los sistemas valvulares ventriculoarterial y auriculoventricular, incluidos los cordones tendinosos y los músculos papilares. Al mismo tiempo, se desarrollan el sistema de conducción y los vasos coronarios (Villavicencio et al. 2023).

El desarrollo del corazón depende de eventos previos como la especificación del mesodermo en mesodermo esplácnico, después en el mesodermo cardiogénico y posteriormente la morfogénesis de las cámaras cardíacas embrionarias que en la etapa fetal se remodelan hasta formar un corazón maduro de cuatro cavidades (Salazar, et al. 2006). El crecimiento y desarrollo ventricular en mamíferos durante el periodo fetal y neonatal es dependiente en gran medida de cambios que ocurren en la población de cardiomiocitos (Engelmann y Boehm, 1992). En modelos animales como pollo y rata, la proliferación miocárdica, se detiene poco después del nacimiento, sin embargo, se reporta un incremento del tamaño celular (Sedmera, et al. 2011). Fallas durante la cardiogénesis de algún proceso morfogenéticos o en la expresión de genes responsables del desarrollo y/o función cardíaca pueden conducir a diversos defectos morfológicos y funcionales del órgano.

1.2.3 Cardiopatías congénitas y miocardiopatías

Las cardiopatías congénitas son anomalías estructurales presentes desde el nacimiento y pueden tener un impacto significativo en la salud y el bienestar de un

individuo (Villavicencio, et al. 2023). Aproximadamente el 1% de los nacimientos en los Estados Unidos se ven afectados por defectos congénitos, aunque este número puede variar en otros países. Las causas de los defectos son multifactoriales, debido a diversos orígenes: genéticos, medioambientales y al estilo de vida de las madres. Las cardiopatías congénitas son los tipos más común de defectos de nacimiento en América latina, seguidos de los defectos del tubo neural y síndrome de Down (CDC, 2019; OPS, 2022).

Las cardiopatías congénitas afectan a casi el 1% de los recién nacidos vivos, con una mayor incidencia en nacimientos prematuros, en comparación con el número total de nacimientos (ACHA, 2013). La comunicación interventricular (VSD, por sus siglas en inglés) es un tipo frecuente de defecto cardíaco. En los Estados Unidos, aproximadamente 16,800 neonatos nacen cada año con VSD, lo que representa alrededor del 0.42% de todos los nacimientos. Alrededor del 75% de los VSD son en la región membranosa y los restantes se ubican en la región muscular del tabique interventricular (Penny, 2011).

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos de los vasos sanguíneos y el corazón. Dentro de las afecciones cardiovasculares con mayor incidencia causadas por la hiperglucemia, destacan las miocardiopatías (Kraker et al. 2016; Elliott et al. 2008). Estas enfermedades son un grupo de afecciones anatómicas y funcionales, específicas del miocardio de uno o ambos ventrículos asociadas con la disfunción mecánica y/o eléctrica y desarreglos en la organización y/o estructura de

los cardiomiocitos. Sus causas pueden ser genéticas o adquiridas y pueden conducir a fallas en la contracción y bombeo de la sangre (Pons, 1986). Es común que en las miocardiopatías el miocardio ventricular esté dilatado lo que a menudo contribuye a desarrollar insuficiencia cardíaca progresiva e inclusive muerte súbita (Kraker et al. 2016). Los tres tipos principales de miocardiopatías que afectan al ventrículo izquierdo son la miocardiopatía dilatada, la miocardiopatía restrictiva y la miocardiopatía hipertrófica (Elliott et al. 2008). La miocardiopatía hipertrófica se caracteriza por un tabique interventricular con miocitos anormalmente grandes y desalineados, ventrículo engrosado y rígido con fibrosis, que conduce a una reducción del gasto cardíaco que contribuye a la insuficiencia diastólica (Kraker et al. 2016).

Aunque actualmente se ha identificado una correlación positiva en la presencia de diabetes y miocardiopatías en personas adultas, así como en niños y fetos descendientes de mujeres diabéticas (Hufnagel et al. 2022; Sánchez et al. 2022; Dong et al. 2013), no se conocen a fondo los procesos morfogenéticos que afectan el desarrollo cardíaco, que pueden conducir al desarrollo de las miocardiopatías. Las redes moleculares que actúan en estos procesos también siguen sin ser del todo claras.

1.3 Transportadores de Glucosa en el Corazón

El corazón en los mamíferos está adaptado para utilizar diversos sustratos para satisfacer su alta demanda energética, predominantemente utiliza los ácidos grasos, seguido de la glucosa que representa alrededor del 25% de la producción de ATP en el miocardio. En el corazón, los transportadores de glucosa más abundantes son el

transportador de glucosa 1 (GLUT1) y el transportador de glucosa 4 (GLUT4) (Solano et al. 2019).

GLUT1 se localiza principalmente en la membrana plasmática y es responsable de la captación basal de glucosa cardíaca. Por otro lado, GLUT4 está presente principalmente en las vesículas intracelulares en etapas de reposo, y se transloca a la membrana plasmática tras la estimulación de la insulina. El GLUT1 es el transportador de glucosa predominante en el corazón embrionario, fetal y neonatal, debido a que en estas etapas su expresión es constitutiva. Posterior al nacimiento la expresión del GLUT4 aumenta paulatinamente, sustituyendo al GLUT 1, dando como resultado que el GLUT4 se convierta en el principal transportador de glucosa en el corazón adulto, en la adultez la expresión del GLUT1 está determinada solo la activación de la transcripción del gen GLUT1 en la mayoría de los casos por diversos estímulos (Shao et al. 2011; Montessuit et al. 1999).

Los factores transcripcionales Sp1 y Sp3 se han caracterizado como reguladores de la expresión de GLUT1 en el corazón embrionario (Montessuit et al. 1999). Básicamente Sp1 estimula la transcripción durante la vida intrauterina. La regulación a la baja de Sp1 se observa durante la vida neonatal temprana y su mínima expresión es durante la edad adulta. En cambio, Sp3 es un represor de la expresión de GLUT1 en el corazón (Santalucia et al. 2003). De manera interesante, se ha validado que en el corazón la expresión de GLUT1 está regulada por múltiples estímulos fisiológicos y que la hipoxia promueve un incremento en la expresión de GLUT1; adicionalmente en

el corazón adulto en pacientes con diabetes, se ha demostrado el aumento de apoptosis de los cardiomiocitos ventriculares (Shao et al. 2011).

Fallas en el transporte de la glucosa a nivel miocárdico puede conducir a eventos de glucotoxicidad, lo cual se puede presentar por una disminución en el uso y la oxidación de glucosa, lo cual clásicamente va acompañado de un decremento en la expresión principalmente de los GLUT 1 y 4, lo cual genera un cambio alternativo en la producción de energía a partir de la β -oxidación de los ácidos grasos libres, la disminución en el consumo de glucosa disminuye la síntesis de piruvato provocando menor oxidación (Wang et al. 2016).

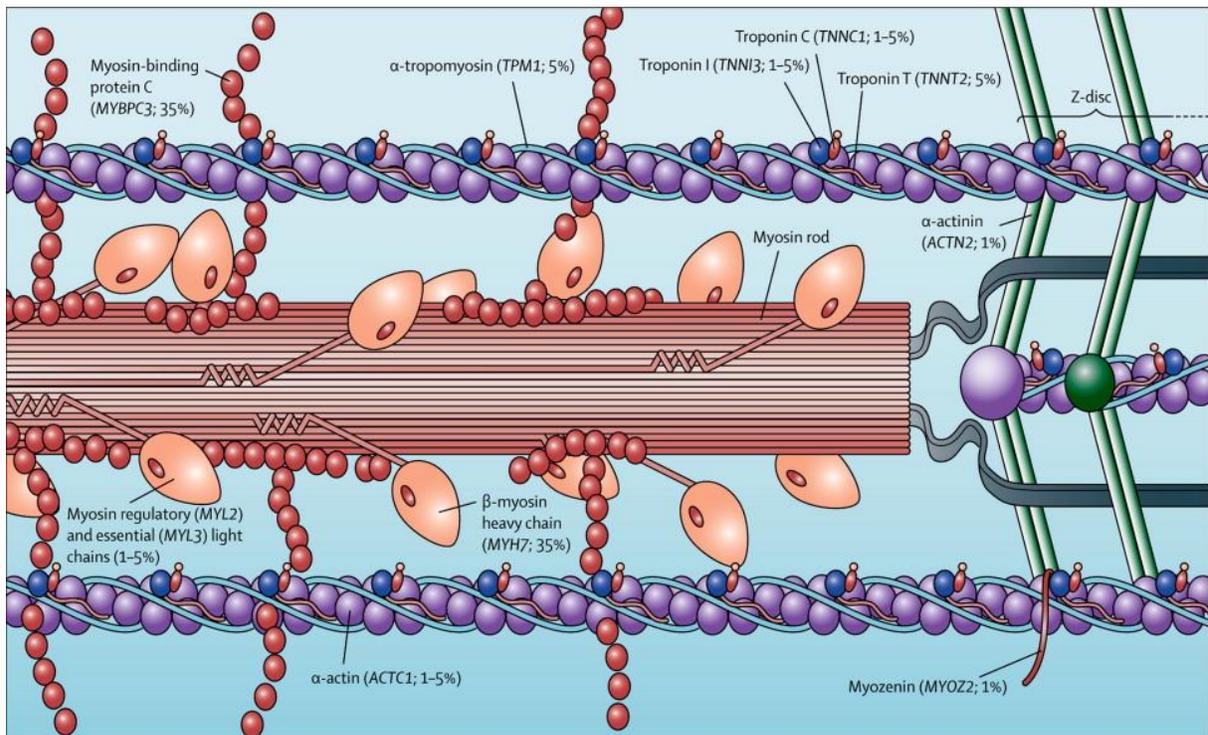
1.4 Proteínas marcadoras de daño al miocardio.

Los miocardiocitos son las células con actividad contráctil que componen las paredes ventriculares y el tabique interventricular del corazón, cada miocardiocito contiene miofibrillas ordenadas en sarcómeros compuestos por diversas proteínas entre las que destacan además de la actina y la miosina, la troponina I, la desmina y la cinasa interactuante con troponina I (TNNI3K). Los sarcómeros son considerados las unidades morfológicas y funcionales de los miocardiocitos. Además, se ha señalado que cuando está modificada la expresión o función de las proteínas sarcoméricas se pueden manifestar daños al miocardio y remodelaciones anómalas como la hipertrofia cardíaca, algunas proteínas de interés para esta investigación son:

- **1.4.1 Cinasa interactuante con troponina I (TNNI3K):** la cinasa interactuante con troponina I es una proteína específica del corazón, codificada por el gen TNNI3K. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas quinasas MAP cinasa cinasa (MAPKKK) que desempeña un papel importante en la fisiología cardíaca y adicionalmente promueve la diferenciación de células madre embrionarias. Es activada por mitógenos MAPK y en modelos de ratas se ha observado que su sobreexpresión acelera la hipertrofia de miocardiocitos provocando insuficiencia cardíaca (Tang, et al. 2013). Es un mediador de la fosforilación de troponina I en la Ser 22 y Ser 23 que estimula un cambio conformacional de la troponina I, contribuyendo en la regulación de la función de contracción del miocardio. Se ha constatado en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, que la sobreexpresión de TNNI3K acelera en gran medida la disfunción cardíaca en modelos de cardiomiopatía en ratones, lo que indica un papel importante de TNNI3K en la modulación de la progresión de la enfermedad cardíaca (Wang et al. 2011; Wang et al. 2013).
- **1.4.2 Troponina I:** La troponina I es una proteína del músculo esquelético y cardíaco. En el caso del corazón, se presenta mediante una única isoforma de peso molecular de 23,9 kDa. Consta de 209 residuos de aminoácidos. Es una proteína globular de gran tamaño. Consta de tres subunidades polipeptídicas: troponina C (fijadora de calcio), troponina I (inhibidora) y troponina T (fijadora de tropomiosina). Sirve como acopladora para la miosina y la actina, además de regular al Ca^{2+} para lograr una adecuada contracción. Tiene gran

importancia en la regulación de la contracción del músculo cardíaco. Durante el infarto al miocardio, suele perderse la integridad de la membrana del cardiomiocito y la troponina I es liberada al torrente sanguíneo. Esta situación permite que la troponina I plasmática sea considerada un marcador de daño al miocardio (Wang et al. 2015; Díaz et al., 2002).

- **1.4.3 Desmina:** Es una proteína de 52 kD que conforma un tipo de filamento intermedio y es propia del citoesqueleto de las células musculares estriadas. Los filamentos de desmina se localizan a lo largo de todo el sarcómero y suele anclarse a los discos intercalares, organelos membranosos y envoltura nuclear (Goldfarb et al. 2009). Refuerza la organización de los discos intercalares y ejerce una función de interconexión y de andamio para que se mantenga la integridad estructural y la arquitectura del cardiomiocito (Brodehl et al. 2018). La desmina, es altamente expresada en el músculo cardíaco, además, es un componente esencial en las células del sistema de conducción miocárdica, especializado en regular la contracción rítmica y coordinada de las cavidades cardíacas (Bazoukis y col. 2018). La desmina disminuye paulatinamente su expresión y se desorganiza en los procesos de adelgazamiento de las paredes ventriculares e insuficiencia cardíaca, que suelen conducir a una disminución del bombeo y fuerza mecánica ventricular. Estas características determinan que la desmina sea considerada un buen marcador de posibles daños al miocardio (Goldfarb et al. 2009).



Esquema 2. Imagen representativa de las principales proteínas de miocardiocitos, tomada de Makavos et al 2019.

1.5 Proteínas de uniones celulares en el corazón

A nivel cardiovascular, la comunicación célula a célula es indispensable en condiciones normales, para la embriogénesis cardíaca, la transmisión del impulso eléctrico, la sincronización de la actividad contráctil del miocardio, la transmisión de señales reflejas vasculares, entre otras funciones biológicas. Existen proteínas indispensables en procesos de comunicación normal entre los cardiomiocitos, que cuando se modifican a causa de mutaciones genéticas heredadas o en condiciones adquiridas conducen a condiciones patológicas. Estudios de seguimiento clínico y experimentales en modelos murinos y porcinos han documentado cómo las deficiencias o incrementos de estas proteínas, pueden conducir al desarrollo de miocardiopatías congénitas,

arritmogénesis, isquemia miocárdica, hipertensión arterial y remodelaciones anómalas del miocardio (Sorgen et al. 2018; Gonzalez et al. 2018; Qin et al. 2003). De hecho, estas proteínas han llegado a considerarse posibles blancos terapéuticos en el tratamiento de las distintas miocardiopatías en las que la comunicación intercelular tiene un papel fisiopatológico importante (Suárez et al. Bravo, 2006). En este sentido, destacan los siguientes ejemplos.

- **1.5.1 Conexinas (Cx).** Las uniones GAP (UG) son canales que permiten el acoplamiento eléctrico entre cardiomiocitos adyacentes. Estas estructuras están formadas por conexinas (Cx), siendo la isoforma 43 (Cx43) la más abundante en el tejido cardíaco embrionario y adulto (Lucero et al. 2020). Las Cx también forman hemicanales, que permiten el intercambio de iones y pequeños metabolitos de bajo peso molecular entre el interior del cardiomiocito y el medio extracelular (Nielsen et al. 2012).

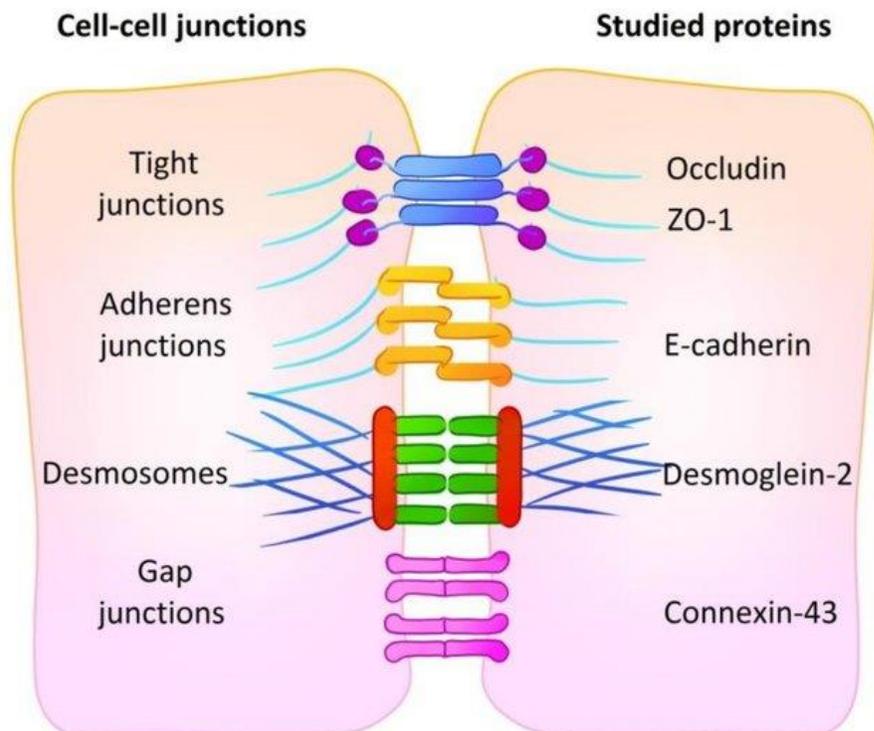
Las alteraciones en la función, expresión, estados de fosforilación y localización de Cx43 están presentes en varias miocardiopatías humanas y están fuertemente correlacionadas con la incidencia de arritmias cardíacas, disfunción cardíaca y en etapa post infartos (Kalcheva et al. 2007; Severs et al. 2004). En el miocardio ventricular adulto predomina la Cx43, localizada principalmente a nivel de los discos intercalares (DI). En los vertebrados superiores en el corazón, la disposición geométrica de los DI así como el tamaño y el número de

las UG parecen ser determinantes del sistema de conducción del miocardio (Sorgen et al. 2018; Gonzalez et al. 2018).

- **1.5.2 Cadherinas.** Componentes transmembrana de las uniones adherentes (AJ) y representan la principal familia de proteínas que se asocian con proteínas citoplásmicas, llamadas cateninas, que a su vez se unen a los componentes del citoesqueleto, como los filamentos de actina y los microtúbulos (Meng et al. 2009). En el corazón las AJ son responsables de acoplar mecánicamente los miocardiocitos y se encuentran estrechamente relacionadas con las placas de unión gap en los discos intercalares (Gutstein et al. 2003). La función correcta del músculo cardíaco depende de una cadherina clásica, denominada N-cadherina, la cual es altamente expresada en el miocardio en desarrollo y maduro, donde se encuentra predominantemente en la fascia adherente de la región transversal de los DI y en las regiones de contacto entre los miocitos vecinos (Craig et al. 2010). En modelos murinos se ha documentado, cómo la pérdida de la N-cadherina en el miocardio embrionario da como resultado la letalidad embrionaria aproximadamente a la mitad de la gestación, acompañada de múltiples anomalías embrionarias, resaltando defectos cardiovasculares graves (Kostetskii et al, 2005), pudiendo así resaltar la importancia de N-cadherina para el óptimo desarrollo y funcionamiento del corazón.

- **1.5.3 ZO-1.** Componentes de las uniones estrechas (TJ) que se han relacionado con arritmias tanto en pacientes humanos como en modelos animales.

Modificaciones en la expresión de estas proteínas, pueden llevar a la disfunción de TJ, sello distintivo de la arritmia cardíaca que puede ser el resultado de diversas formas de padecimientos cardiacos (Lisewski et al. 2008). Además, de ser crucial en funciones de permeabilidad y comunicación, se ha demostrado que ZO-1 se une a múltiples proteínas del DI como conexinas, cateninas y vinculinas (Zhang et al. 2020). Y en modelo murino se ha comprobado cómo la pérdida de ZO-1 en los cardiomiocitos interrumpen la función cardíaca (Dai et al. 2020).



Esquema 3. Imagen representativa de las uniones celulares, tomada de Kutova et al 2020.

1.6 Proliferación en el desarrollo embrio-fetal

Dentro de los diversos procesos morfogénéticos que ocurren en el corazón en etapas embrio-fetales la proliferación de los miocardiocitos resulta de gran importancia, debido a que el corazón a lo largo de su formación recibe paulatinamente a diversas poblaciones celulares migrantes que posteriormente constituirán sus estructuras maduras, dichas células son altamente proliferantes y su actividad mitótica es crucial para que el corazón aumente en tamaño, así como para la formación de estructuras cardiacas (Villavicencio et al 2020). Particularmente en las paredes ventriculares la proliferación resulta de suma importancia, para que pueda ocurrir el paulatino engrosamiento de paredes ventriculares cardiacas en los miocardiocitos que presentan estados proliferativos (Genead et al. 2010).

En los miocardiocitos que constituyen las paredes ventriculares tanto en etapas fetales y postnatales se distinguen por expresar valores constantes de la proteína nuclear Ki-67, que está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y M) (Young et al. 2022) y sus bajos valores en el miocardio en formación se han asociado a procesos de formaciones anómalas de estructuras cardiacas (Liu et al. 2021).

1.7 Ventajas del modelo de *Gallus gallus*

Diversas investigaciones mediante marcaje selectivo *in ovo* del corazón embrionario de *Gallus gallus domesticus* describen el desarrollo de elementos embriológicos y su destino en estructuras del corazón maduro (Villavicencio et al. 2020; Wittig et al. 2016), lo que ha permitido especular el origen de los defectos congénitos del corazón y la

etapa embrionaria en que ocurren las anomalías, esto debido a que el desarrollo cardíaco humano es comparable al del pollo (Lazzarini et al, 2018). En contraste, la mayoría de los trabajos experimentales que abordan el efecto de la hiperglucemia materna durante el desarrollo cardíaco, se han llevado a cabo en modelos murinos utilizando comúnmente estreptozotocina como inductor de Diabetes (Revilla et al. 2023; Salazar y et al. 2015). En cambio, el modelo de embrión *Gallus gallus domesticus* permite analizar el efecto exclusivo de la hiperglucemia materna sin la interferencia de otros factores maternos, permitiendo además visualizar detalladamente el desarrollo del embrión a lo largo de la gestación (Davey et al. 2007).

Además, el embrión de pollo es un modelo abordable y económico que permite imitar algunas condiciones microambientales que se presenta el tejido cardíaco (Lazzarini et al. 2015). Entre otras ventajas, el modelo permite manejar un mayor número de datos experimentales en un solo proceso de incubación. Incluso el embrión de *Gallus gallus domesticus* se ha utilizado como modelo que permite investigar algunos efectos sobre el feto como: la hipoxia y el estrés oxidativo de manera independiente de la nutrición y la fisiología materna (Itani et al. 2016).



Esquema 3. Beneficios de utilizar el embrión de pollo en investigaciones experimentales (Vilches, 2019).

Por lo que algunas investigaciones recientes utilizan el modelo de embrión de *Gallus gallus domesticus* para investigar cambios en los mecanismos moleculares inducidos por la hiperglucemia durante el desarrollo (Zhang et al. 2016) como son: desarrollo anómalo de ojos, de la cresta neural, misma que puede dar lugar a: malformaciones congénitas, defectos del septo atrioventricular, persistencia del conducto arterioso y Tetralogía de Fallot, entre otros (Wang et al. 2015).

2. ANTECEDENTES

Estudios clínicos han permitido comprobar que las cardiopatías del tipo de comunicaciones interauriculares, interventriculares y la miocardiopatía hipertrófica resultantes en los neonatos son los padecimientos más comunes producto de la hiperglucemia pregestacional, presentándose en más del 5% de los neonatos hijos de madres con algún tipo de diabetes pregestacional. En cambio, en la DMG estos cambios estructurales son menos comunes, aunque es más común observar problemas de disfunción cardíaca (Pauliks et al. 2015). Evidencias clínicas y experimentales señalan que la hiperglucemia en mujeres gestantes y el estilo de vida durante el embarazo afectan el desarrollo pre y posnatal de la progenie (Hufnagel et al. 2022; OPS, 2015). El ambiente hiperglucémico puede provocar modificaciones moleculares y morfológicas en las estructuras embrio-fetales debidas a cambios sutiles en la economía energética materna y programar un mayor riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares desde la infancia en individuos sin defectos aparentes (Sánchez et al. 2022; Dong et al. 2013).

La hiperglucemia durante la gestación es considerada un agente teratogénico que interfiere en el desarrollo embrio-fetal (OMS, 2016; Herrera et al. 2005). Por esta razón diversos autores han desarrollado estudios con la finalidad de conocer los procesos moleculares y mecanismos celulares que afecta. En un estudio publicado por Russell y colaboradores en el 2008 reclutaron veintiséis mujeres con DM pregestacional y se les practicó un ecocardiograma fetal en las semanas 13, 20 y 36 de gestación para

evaluar la estructura y función cardíacas. En fetos de embarazo con diabetes pregestacional encontraron cambios estructurales y funcionales del corazón, comparados con fetos controles de mujeres sanas en cada edad gestacional. Estos hallazgos sugieren que la disfunción cardíaca puede estar precedida por los cambios estructurales cardíacos en fetos de embarazo diabético.

Por su parte, Sánchez y colaboradores (2016), realizaron un análisis transversal donde incluyeron 104 pacientes gestantes, cursando con un diagnóstico de DM pregestacional o gestacional y se les realizó un ecocardiograma fetal con el fin de determinar la presencia de cardiomiopatía hipertrófica fetal. En el 53% de las pacientes se observó una correlación positiva entre los valores elevados de hemoglobina glucosilada materna y la presencia de cardiomiopatía hipertrófica fetal. Adicionalmente se ha demostrado que el grado de hiperglucemia materna durante la gestación tiene un gran impacto en el tipo de miocardiopatía que se manifiesta en el recién nacido. La hiperglucemia moderada, produce hipertrofia del corazón neonatal (Tkáč, 2013; Hufnagel et al 2022). Casos de seguimiento clínico han documentado que cuando la hiperglucemia está mal controlada e impacta la nutrición materno-fetal se puede producir diversos grados de daño desde muy benigna hasta miocardiopatía dilatada (Tkáč, 2013).

Por su parte, TNNI3K es una MAP cinasa específica de corazón que se une y fosforila a la troponina cardíaca I y juega un papel clave en la regulación de la contracción del miocardio ventricular (Wang et al. 2013). En recientes investigaciones Wang y

colaboradores (2015) señalan una relación positiva en la expresión del miR-223 y la proteína TNNI3K en corazones con hipertrofia (Lu et al. 2010). Adicionalmente, se ha identificado que la expresión excesiva de TNNI3K es importante en la progresión de las miocardiopatías (Tang et al. 2013). Estos antecedentes generan el interés de investigar más a fondo el papel del miR-223 y la proteína TNNI3K en las enfermedades del corazón de pacientes diabéticos y su posible relación en el desarrollo de miocardiopatías en condiciones de hiperglucemia gestacional.

3. JUSTIFICACIÓN

Estadísticas de la Organización Mundial de la Salud y de la IDF indican que los niveles crecientes de obesidad a nivel mundial conducirán un aumento en la prevalencia de todos los tipos de diabetes (IDF, 2021; OMS, 2016; Huidobro et al., 2004; DeSisto et al. 2014). Evidencias clínicas y experimentales sugieren que los niveles elevados de glucosa en sangre, como ocurre en la diabetes en mujeres gestantes pueden tener efectos a corto, mediano y largo plazo en la progeñie. A corto plazo puede provocar muerte embrionaria o fetal y el desarrollo de enfermedades congénitas de diversos órganos. A mediano y largo plazo, la prevalencia de hiperglucemia se considera un factor de riesgo para el desarrollo en la progeñie de obesidad, enfermedades metabólicas y cardiovasculares entre las que destaca las miocardiopatías.

Expuesto lo anterior diversos estudios que han tratado explorar los posibles mecanismos responsables de los cambios moleculares y morfológicos causados por la DMG y su impacto en la morfofisiología y homeostasis cardiaca de la descendencia,

pero los resultados han sido limitados. Es probable a que se deba en parte a las múltiples variables incontrolables (dieta, factores socioeconómicos, nutrición y factores genéticos) que pueden alterar y complementar los efectos nocivos del ambiente intrauterino hiperglucémico.

Por esta razón en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, de la Unidad de Investigación en Malformaciones Congénitas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez establecimos un modelo de hiperglucemia en embriones de *Gallus gallus domesticus* para estudiar su efecto en el desarrollo cardíaco embrio-fetal.

El modelo de embrión de *Gallus gallus domesticus* además de permitir la visualización directa del desarrollo a lo largo del periodo embrio-fetal (Lazzarini et al. 2015), evita el riesgo de muerte materna, y reduce los factores placentarios, es un modelo económico que permite imitar algunas condiciones microambientales que se presentan en diversas condiciones humanas (Davey et al. 2007). Entre otras ventajas, el modelo permite manejar un mayor número de datos experimentales en un solo proceso de incubación. Incluso se ha utilizado como modelo que permite investigar el efecto de la hipoxia sobre el feto de manera independiente de la nutrición y la fisiología materna (Itani et al. 2016).

Esta información previamente mencionada apoya la idea de que un ambiente hiperglucémico afecta la maduración morfológica del embrión, por lo tanto esta investigación busca aportar información para analizar con una nueva perspectiva las

posibles afecciones en la progenie de madres que cursaron el embarazo con hiperglucemia gestacional o DM incentivando así que se fomenten nuevos abordajes y estrategias pertinentes que permitan sugerir mejores diagnósticos prenatales y a su vez la información obtenida resultará de utilidad en la exploración de marcadores de daño al miocardio y para sugerir estrategias para la búsqueda dirigida en pacientes diabéticos. Esto con la finalidad de que en el futuro los potenciales marcadores mencionados en esta tesis, puedan ser empleados como tratamiento en alguna terapia génica. Adicionalmente se aportará información que podría ayudar a incentivar políticas públicas que motiven la reducción de la ingesta de alimentos con altos contenidos de azúcares. Con base en estos antecedentes planteamos la siguiente pregunta.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El ambiente hiperglucémico *in ovo* desregulará la formación de uniones celulares, transportadores de glucosa, así como la proliferación celular y la compactación del desarrollo del miocardio ventricular embrionario?

5. HIPÓTESIS

El ambiente hiperglucémico *in ovo* durante el desarrollo embrionario afectará la morfología e histología de las paredes ventriculares y modificará el patrón de expresión de proteínas de uniones celulares, transportadores de glucosa y la proliferación celular.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar el desarrollo embrionario del miocardio ventricular morfológica e histológicamente bajo condiciones de hiperglucemia inducida *in ovo*, así como las afectaciones en las proteínas constituyentes de las uniones celulares, los transportadores de glucosa y los posibles cambios en la proliferación celular.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

En corazones desarrollados en un ambiente normo e hiperglucémico:

- Analizar comparativamente la morfometría y la histopatología.
- Determinar con microscopia electrónica de barrido los procesos de formación de trabéculas y el engrosamiento de paredes ventriculares.
- Cuantificar la expresión de las proteínas de daño al miocardio (TNNI3K, troponina I y desmina) por medio de inmunofluorescencia y western blot.
- Cuantificar la expresión de las uniones ocluyentes (ZO-1 y claudina 1) en los corazones de embriones desarrollados en un ambiente normo e hiperglucémico mediante inmunofluorescencia.
- Cuantificar la expresión de las uniones adherentes (N-cadherina y B-catenina) mediante inmunofluorescencia.
- Cuantificar la expresión de las uniones comunicantes (Cx43) mediante inmunofluorescencia.

- Comparar las posibles diferencias en la expresión del GLUT1 por inmunofluorescencia.
- Evaluar los posibles cambios en el patrón de expresión de la proliferación celular (Ki-67) mediante inmunofluorescencia
- Evaluar los posibles eventos fibrogénicos mediante la tinción de Sirius Red.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Inducción de hiperglucemia embrionaria

Se emplearon huevos fértiles de gallina (*Gallus gallus domesticus*), libres de patógenos específicos, adquiridos en la granja ALPES S.A. (Tehuacán, Puebla). Los huevos se separaron en dos grupos de estudio: Grupo hiperglucémico (HG). Y grupo normoglucémico sin tratamiento (NT). Los huevos de ambos grupos se incubaron a 37°C y 60% de humedad por 3 - 3.5 días de incubación hasta alcanzar el estadio 22HH con base en la clasificación de Hamburger y Hamilton (1952) que relaciona la morfología embrionaria con el tiempo de incubación. Pasado ese tiempo, se abrió una ventana de aproximadamente 1 cm² en el lado romo del cascarón. En el grupo HG para inducir hiperglucemia, los embriones se manipularon realizando una ventana del cascaron y con la ayuda de una jeringa de 1 ml, se administraron diariamente 400 µL de solución de glucosa al 30 mmol/L, diluida en solución salina (NaCl 0.9%) desde el estadio 22HH, hasta un máximo de 10 días de incubación (estadio 36HH). Para el grupo de los embriones NT fueron tratados con una dosis diaria de 400 µL de solución

salina fisiológica. Para verificar la inducción de hiperglucemia, a partir del día 4 de incubación se obtuvieron embriones HG y NT cada 24 horas (n = 30 de cada grupo en 36HH). Se separaron del vitelo, se decapitaron y se tomó una muestra de sangre para registrar el nivel de glucemia, empleando tiras reactivas y un glucómetro. Los datos se registraron en una tabla y se elaboró una gráfica.

8.2 Peso y crecimiento corporal

Para evaluar el desarrollo corporal se empleó un microscopio estereoscópico de epifluorescencia (Zeiss, Alemania). las imágenes fueron capturadas usando el programa Axiovision LE. Una vez que los embriones fueron fotografiados, se pesaron en una balanza analítica y se les extrajo el corazón. Los datos se registraron en tablas y se elaboraron gráficas.

8.3 Procedimiento Histológico.

Los corazones fijados en paraformaldehído (anexo 1) de 12 a 24 hrs, se emplearon para evaluar el desarrollo del miocardio. Después de la evaluación anatómica, se eliminó el exceso del fijador y se deshidrataron en alcohol etílico a concentraciones graduales ascendentes (30-100%), se transparentaron en Xilol y se incluyeron en parafina. Se elaboraron cortes seriados de 6 μ m en el plano transversal a la altura de los músculos papilares y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina y Eosina (anexo 2). Los cortes histológicos se emplearon para medir el diámetro y circunferencia cardiaca, así como el conteo de miocitos en 3 áreas de estudio; pared ventricular izquierda (PVI), pared ventricular derecha (PVD) y tabique Interventricular (TIV) con la ayuda de un

Scanner Digital Aperio (Leica, EU) y con el software ImageScope. Así como para evaluar los posibles eventos fibrogénicos en las 3 zonas de estudio en ambos grupos mediante la tinción de Sirius red (Anexo 4).

8.4 Análisis estructural de microscopia electrónica de barrido.

Se utilizaron 20 corazones (10 de cada grupo), y se realizaron disecciones transversales, se fijaron en una solución de glutaraldehído (0.1%) en PBS (0.1M) pH 7.4 (anexo 3) y se deshidrataron en alcoholes graduales, para ser llevados a punto crítico, posteriormente fueron montados en platinas de cobre para posteriormente ser recubiertos por pulverización catódica con oro de 350 nm en un aparato Denton Vacuum Desk 1A (Cherry Hill Industrial Center, NJ, EE. UU.). Las fotografías se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5300 (JEOL, Tokio, Japón) a 15 kV en los corazones de ambos grupos, para comparar cambios en el proceso de trabeculación y delaminación en los corazones de ambos grupos.

8.5 Inmunofluorescencia por microscopia confocal

Para poder determinar la expresión de las proteínas de de daño al miocardio se emplearon cortes histológicos del corazón (6 μ m) que fueron montados en portaobjetos cubiertos con poli-L lisina al 1%. Las laminillas se rehidrataron y se hizo recuperación de antígenos con búfer de citratos (BioGenex, USA) en autoclave a 15 lb de presión por 5 min y, finalmente, se adicionó anticuerpos TNNI3K (Santacruz, EU), Troponina I

(Santacruz, EU), Desmina (Santacruz, EU), ZO-1, TNNI3K (Santacruz, EU), Troponina I (Santacruz, EU), Desmina (Santacruz, EU), Cx43 (Novus, EU; NB11039113), N-Cadherina (Santacruz, EU), β -Catenina (Santacruz, EU), Glut-1 (Novus, EU; NB1008167) y Ki-67 (Santacruz EU), en concentración 1/200, las muestras se incubaron toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación. las muestras se trataron con anticuerpo secundario anti-rabbit (Santa Cruz, USA; SC2359) por 4 horas a temperatura ambiente, los núcleos celulares se tiñeron con RedDot (Biotium, USA) diluidos 1/150. Por último, las muestras se montaron en solución de montaje PBS/glicerol 1:1 y se observaron en un microscopio confocal (Carl Zeiss, Alemania). Se obtuvieron microfotografías a la altura de los músculos papilares, en las 3 zonas de interés con aumento de 10X, 40X y 60X (software, ZEN 2010). Los promedios de las densidades ópticas obtenidas para la expresión de cada proteína se reportarán como porcentaje del control que será el 100% de la expresión \pm la desviación estándar.

8.6 Análisis de la expresión de proteínas por Western Blot.

El tejido ventricular de los corazones en estadio 36 HH HG y NT fue colocado en tubos eppendorf en solución de lisis Tris-HCl con inhibidor de proteasas para homogenizar, centrifugar y cuantificar proteínas a 280nm, con un nanodrop (Fisher Scientific, USA). Se separaron las proteínas utilizando una cámara de electroforesis (Fisher Scientific, USA). Y se utilizó Precision Plus Protein como marcador de peso molecular. Después

de la transferencia de proteínas a la membrana en el Trans-Blot, (Fisher Scientific, USA), se emplearon anticuerpos primarios para la proteína TNNI3K, Troponina I y desmina (todos de Santa Cruz Biotechnology) seguido de una cuantificación por quimioluminiscencia, empleando actina como control de carga. Los promedios de las densidades ópticas obtenidas para la expresión de cada proteína se reportaron como porcentaje del control que fue el 100% de la expresión \pm la desviación estándar.

8.7 Análisis Estadístico

Para evaluar la normalidad de las mediciones de peso, la talla (con el eje coronilla-rabadilla), glucosa en sangre, parámetros morfométricos y resultados de inmunomarcaje mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se expresaron como media \pm DE. Las medidas morfométricas se compararon entre grupos mediante una prueba t de Student de dos colas. Una $p < 0,05$ se consideró significativa para todas las pruebas. Las mediciones morfométricas se compararon entre grupos mediante ANOVA unidireccional y la prueba t de Student para muestras independientes. Una $p < 0,05$ (bilateral) se consideró significativa para todas las pruebas.

9. RESULTADOS

9.1 Inducción de hiperglucemia

Al finalizar los 10 días de incubación, y tratamiento en los embriones del grupo HG, los niveles de glucosa en sangre aumentaron progresivamente ($p = 0,0029$), superando el

valor medio los 350 mmol/dL en el día 10, mientras que los embriones NT mantuvieron un concentración de glucosa media de 198 mmol/dL (Fig. 1A).

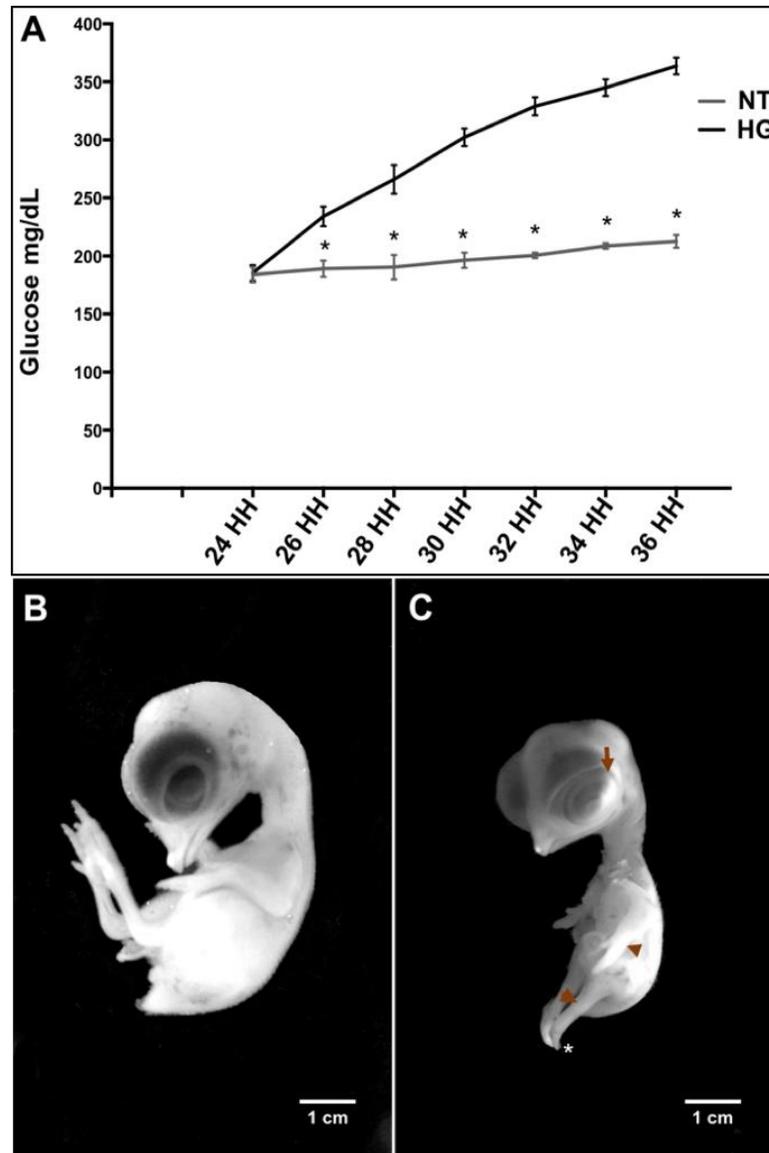
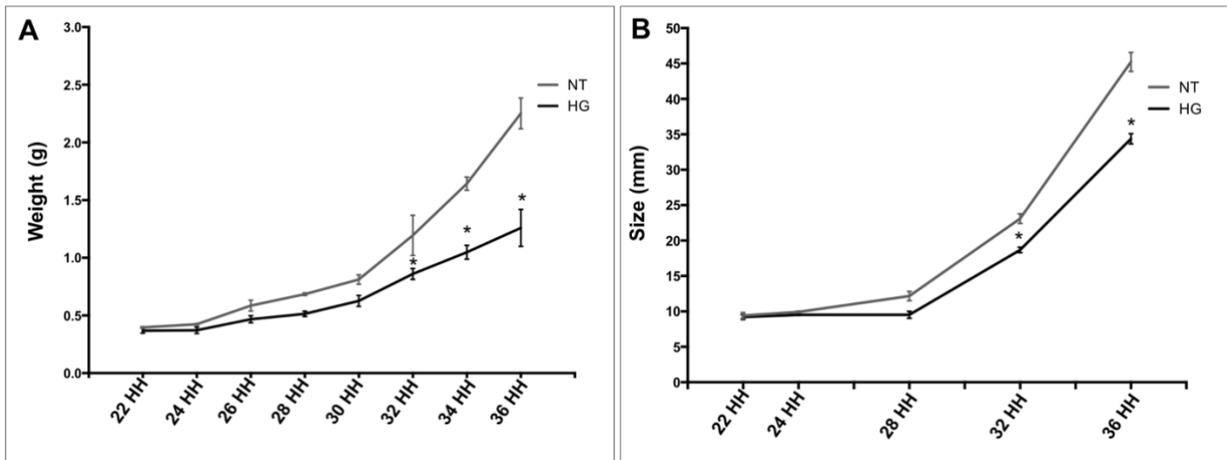


Figura 1. Maduración retrasada de embriones HG en comparación con embriones NT. (A) Monitoreo de los niveles de glucosa en sangre después de inyecciones diarias de solución salina de 30 mmol/L con glucosa en el grupo HG e inyecciones diarias de solución salina sin glucosa en el grupo NT. (B) Embrión NT incubado durante 10 días (n = 32). (C) Embrión de HG incubados durante 10 días, que muestran un retraso en la maduración. Observe el retraso en la maduración de las extremidades (punta de flecha), flecha, retraso en la maduración del párpado (flecha); y defectos en las falanges de las piernas (asterisco) en comparación de los fetos del grupo NT, (barra de escala = 1 cm).

9.2 Peso y desarrollo corporal.

Los embriones del grupo HG mostraron un peso y talla promedio significativamente reducidos, así como un retraso general en el crecimiento y un proceso alentado de maduración, en comparación con los embriones del grupo NT. Al transcurrir los 10 días los embriones NT alcanzaron la etapa 36HH, mientras que los embriones HG presentaron características morfológicas similares a la etapa ± 33 HH. Además, los embriones HG exhibieron retraso en la maduración de las extremidades y los párpados, así como defectos en las falanges de las extremidades inferiores (Fig. 1B y 1C).

El peso corporal (Gráfica 1A) y la talla (Gráfica 1B) aumentaron exponencialmente en ambos grupos durante el desarrollo embrionario, pero el peso corporal promedio de los embriones HG del día 10 se redujo en un 34% en comparación con los embriones NT del día 10 ($p=0.034$); el peso medio de los embriones HG fue de 1.35 g frente al peso medio de los embriones NT de 2.11 g. La longitud corporal media se redujo en un 14% en comparación con los embriones del grupo NT ($p=0.041$), la longitud corporal media de los embriones HG fue de 35.6 mm, frente a la media de los embriones NT de 43.4 mm.



Gráfica 1. La hiperglucemia retrasa el crecimiento embrionario. (A) El peso corporal promedio de embriones HG vs NT después de 10 de incubación. (B) El tamaño corporal medio de los embriones HG vs NT después de 10 días de incubación. Los gráficos representan media ± DE de n = 23 HG y n = 25 embriones NT. (*) p < 0.05.

9.3 Análisis morfométricos e histológicos del corazón embrionario.

El análisis morfométrico de los embriones del día 10 reveló que todo el corazón era más pequeño en los embriones HG ($p=0.023$) (Figura 2B y D) que en los embriones NT (Figura 2 A y C). Las secciones transversales del corazón (Figura 2 F,G) también revelaron una ligera disminución en el diámetro ventricular entre los embriones del grupo HG ($p=0.038$) (Figura 2F) en comparación con los embriones del grupo NT, (Figura 2E) además de una pequeña reducción en la circunferencia cardíaca, aunque no estadísticamente significativa (Figura 2H).

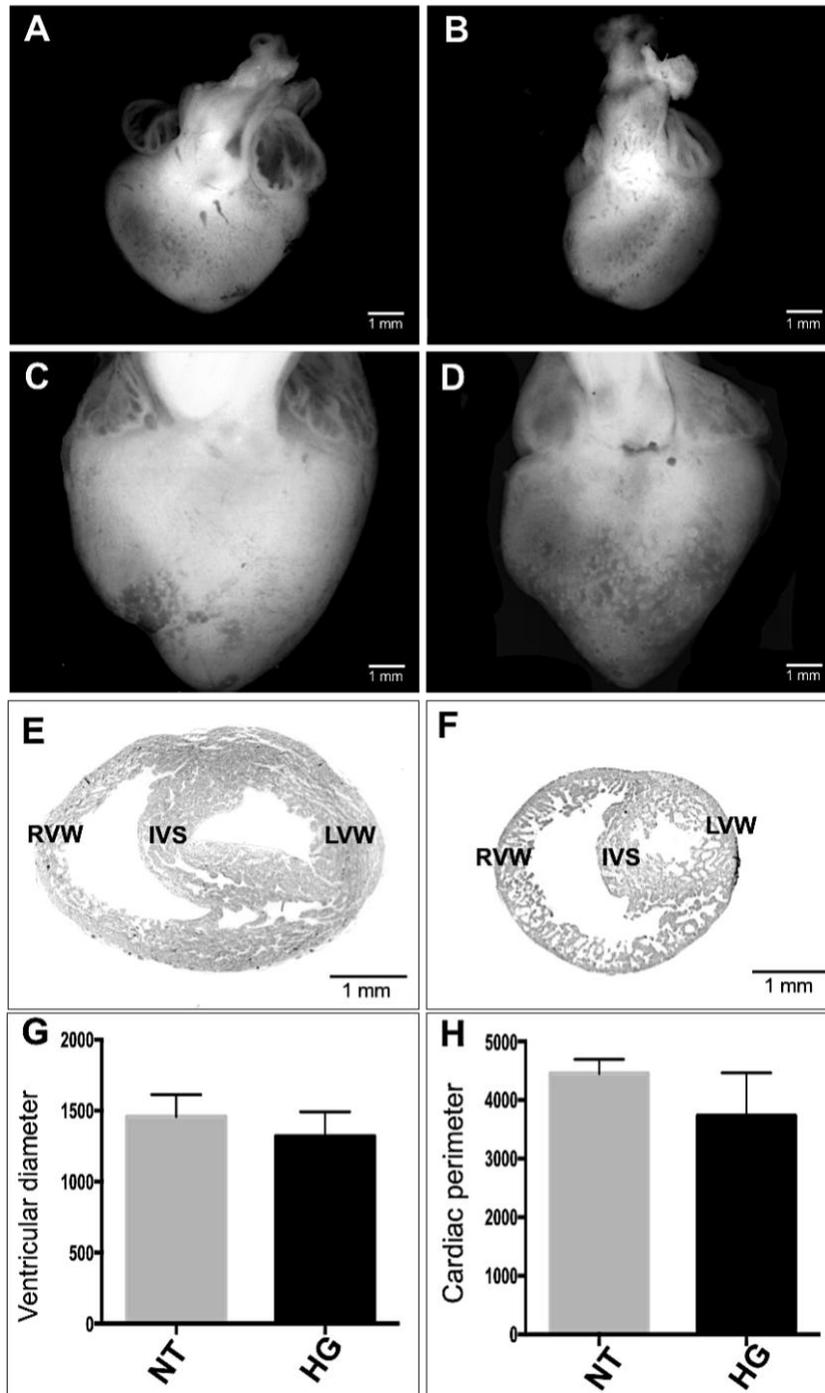


Figura 2. Retraso en el desarrollo del corazón en los embriones HG en comparación con los embriones del grupo NT. (A) Corazones NT en etapa 32HH, (B) Corazón HG en etapa 32HH, (C) Corazón NT en etapa 36HH y (D) Corazón HG en etapa 36HH (todos con un aumento de 25x). Barra de escala = 1 mm. (E,F) Cortes transversales representativos teñidos con hematoxilina y eosina. (E) Corazón NT en estadio 36HH. (F) Corazón embrionario HG en el estadio 36HH. La barra de escala representa 1 mm. (G) Diámetro ventricular promedio de los corazones embrionarios HG y NT. (H) Circunferencia promedio de los corazones embrionarios HG y NT (HG, n = 8 y NT, n = 9). Barra de escala = 1 mm. RVW = Pared Ventricular Derecha, IVS = Pared Interventricular, LVW = Pared Ventricular Izquierda.

Además, el tamaño de la pared de miocardio fue significativamente menor en el grupo HG que en el grupo NT en el estadio 36HH, con una reducción del 40% en el espesor de la pared del ventrículo izquierdo ($p=0.0002$), una reducción del 35% en el espesor de la pared del ventrículo derecho ($p=0.0008$) y una reducción del 38% en el espesor del tabique interventricular ($p=0.0006$) (Figura 3C-I).

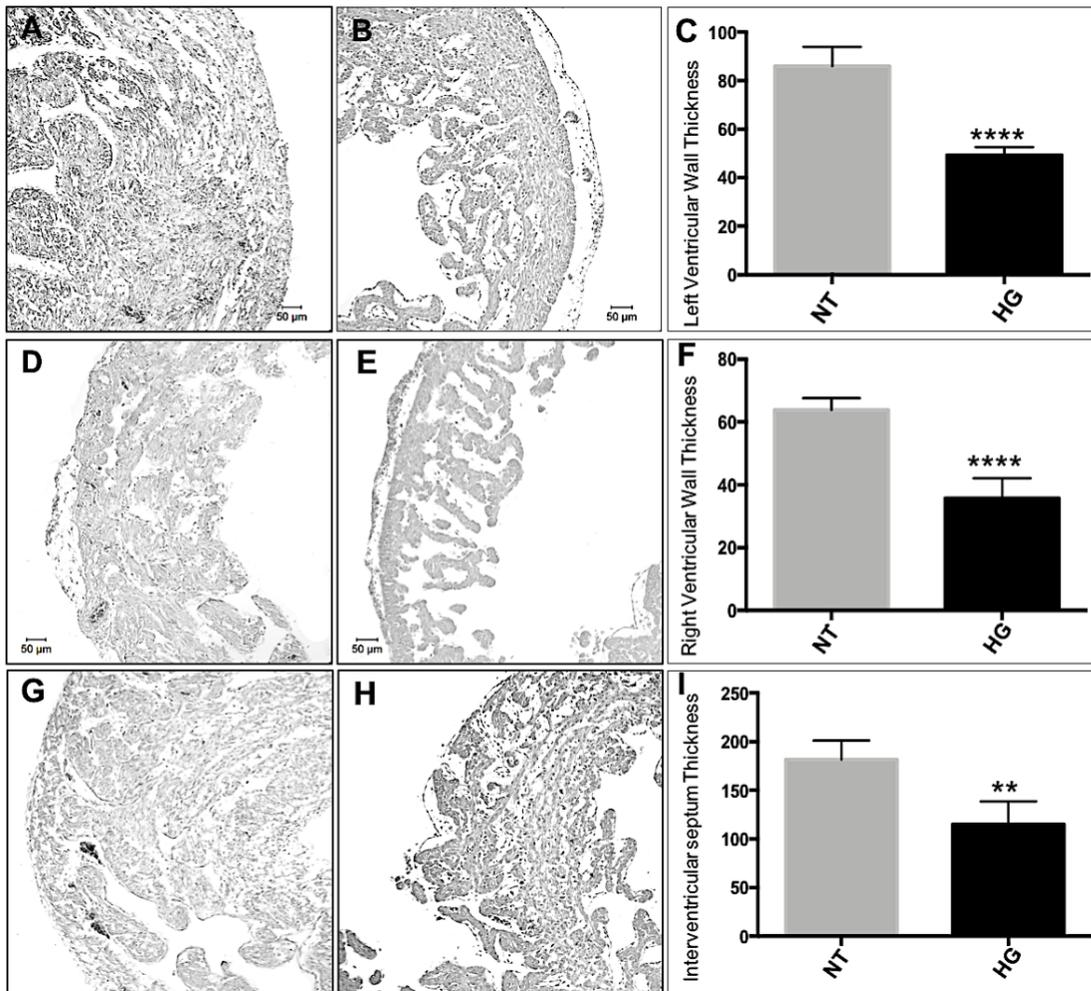
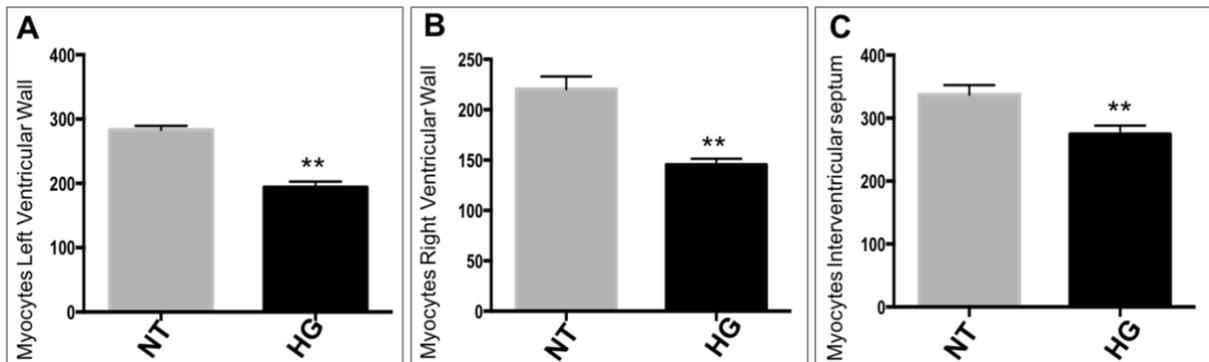


Figura 3. Cambios en el grosor de las paredes ventriculares de cortes transversales de corazones de embriones de *Gallus gallus* teñidos con HE incubados por 10 días (evidenciando anomalías morfométricas). (A) PVI de embrión NT. (B) PVI de embrión HG. (C) Promedio del grosor de la PVI de embriones HG y NT. (D) PVD de embrión NT. (E) PVD de embrión HG. (F) Promedio del grosor de la PVD de embriones HG y NT. (G) TIV de embrión NT. (H) TIV de embrión HG. (I) Promedio del grosor del TIV de los embriones HG y NT. Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento total de $\times 40$ (barra de escala = $50 \mu\text{m}$). (**) $p < 0,01$, (****) $p < 0,0001$.

Además de los retrasos en la maduración y en la morfología macroscópica de los corazones del grupo HG también mostraron una reducción del 34% y 32% en el número de miocitos por campo microscópico en las paredes de los ventrículos derecho e izquierdo respectivamente ($p = 0,006$) y una reducción del 19% en el tabique interventricular ($p = 0,004$), como se muestra en la gráfica 2, para esto se procedió a realizar conteos de núcleos de miocitos en las 3 zonas de estudio (PVI, PVI y TIV) en micrografías en un aumento de 60x.



Gráfica 2. Promedio del número de miocitos por área los corazones HG y NT (60x). (A) Pared del ventrículo izquierdo. (B) Pared del ventrículo derecho. (C) Tabique interventricular. (**) $p < 0,01$.

Mediante el análisis de microscopía electrónica de barrido se buscó observar la organización del miocardio de las paredes ventriculares de ambos grupos, se realizaron disecciones de corazones disecados longitudinalmente y se reveló un retraso en el desarrollo y engrosamiento de las paredes ventriculares en el grupo HG (Figura 4). Además, se observó un retraso en la delaminación y compactación de las trabéculas en los corazones HG en comparación con los corazones NT, lo que sugiere que el retraso en la formación de los componentes estructurales del corazón condujo a un menor nivel de compactación en las paredes ventriculares y a una pared

interventricular más delgada, persistiendo el retraso en la formación de las estructuras que forman el corazón, además de encontrar notorias afecciones en el tabique interventricular de los embriones HG.

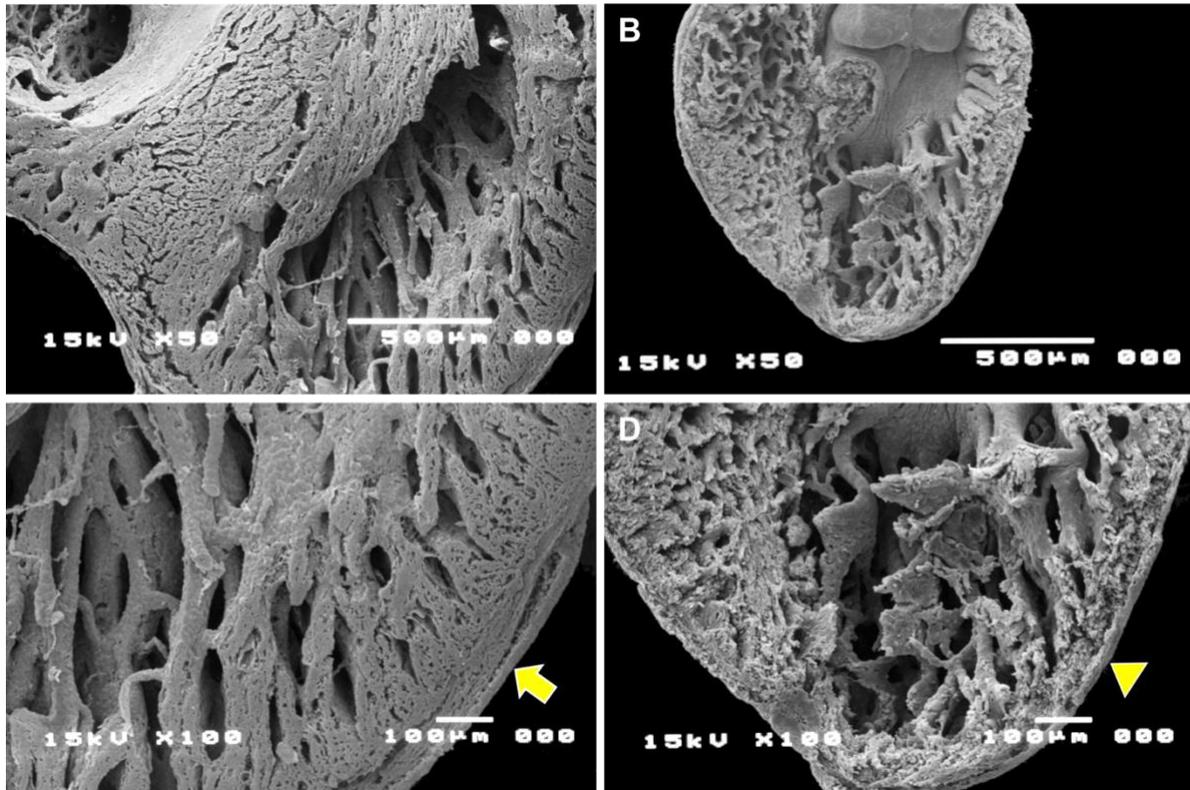


Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido de secciones longitudinales del corazón embrionario de Gallus en el estadio 36HH que muestran retraso en la delaminación y compactación de las trabéculas en condiciones de hiperglucemia. (A) Corazón NT (x50), (B) Corazón HG (x50), (C) Corazón NT (x100) y (D) Corazón HG (x100). La flecha indica el grosor normal de las paredes cardíacas en embriones NT, la cabeza de flecha indica el grosor disminuido de las paredes ventriculares de embriones HG.

9.4 Inmunodetección de biomarcadores de daño miocárdico

Para investigar el efecto de la hiperglucemia sobre los marcadores de daño miocárdico, comparamos la expresión de TNNI3K, una cinasa de la cascada de señalización MAPK implicada en las miocardiopatías, entre los grupos NT y HG mediante inmunofluorescencia. Después de la exposición a la hiperglucemia, la expresión de TNNI3K aumentó en un 30% en la PVD ($p = 0.003$), un 37% en la PVI ($p = 0.002$) y un 34% en el TIV ($p = 0.002$) del HG grupo en comparación con los tejidos correspondientes del grupo NT.

Además, la inmunodetección reveló proteínas sarcoméricas atípicamente dispersas en el citoplasma en lugar de la forma fibrilar habitual (Figura 5A, B). De manera similar, la troponina I, compañera de unión de TNNI3K, aumento en un 39% en la pared ventricular izquierda ($p = 0.02$), un 24% en la pared ventricular derecha ($p = 0.02$) (Figura 5D-F) y un 41% en el tabique interventricular. ($p = 0.002$) en comparación con los tejidos correspondientes de embriones NT (Figura 5F). Nuevamente, esta proteína no se detectó en el patrón fibrilar lineal clásico sino más bien en los puntos distribuidos en los cardiomiocitos del grupo HG. Por el contrario, la expresión de desmina se redujo en un 23% en la pared del ventrículo izquierdo del corazón HG en comparación con el corazón NT ($p = 0.003$) (Figura 5G-I).

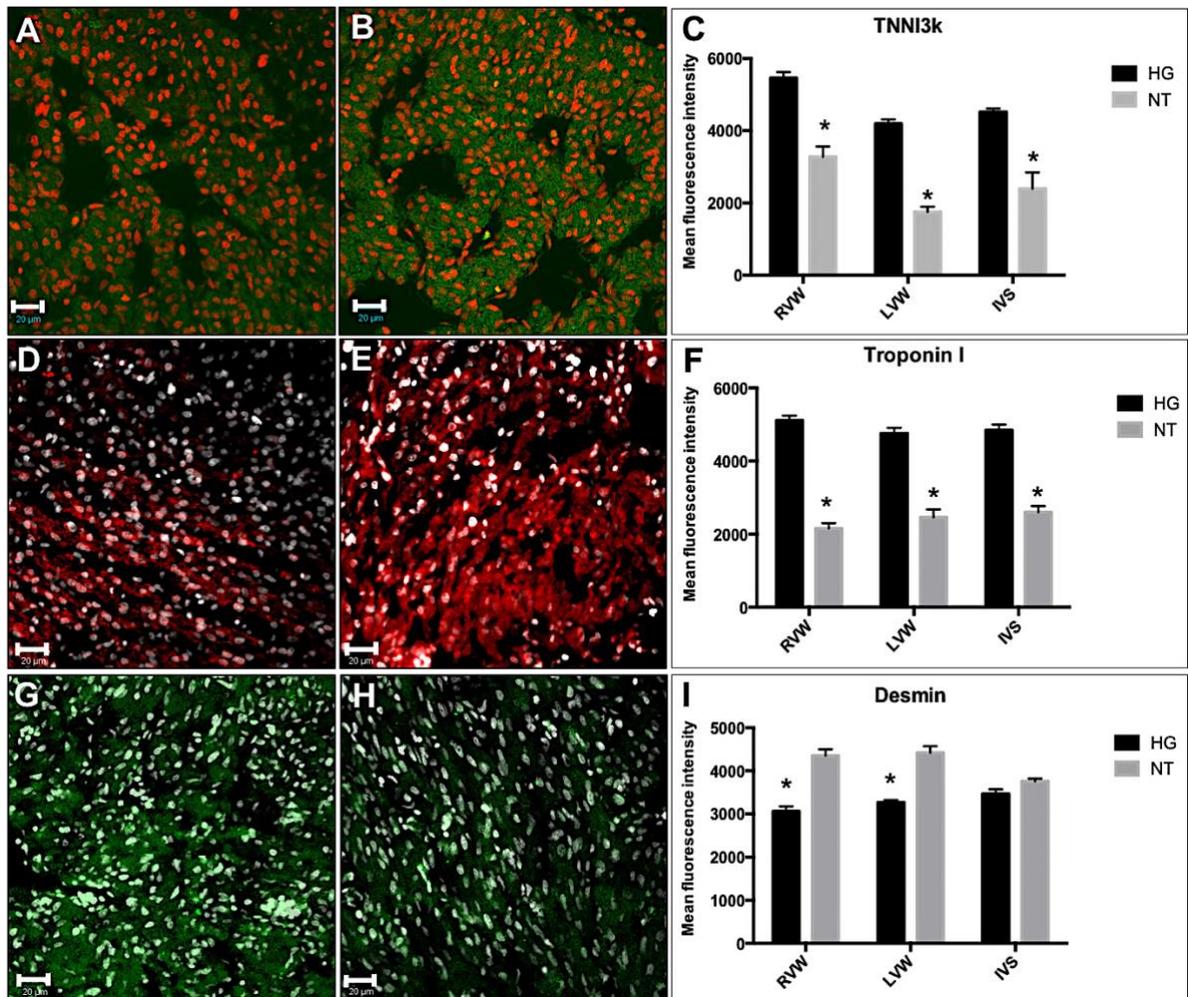


Figura 5. Expresión alterada de proteínas sarcoméricas en cortes representativos de corazones de ambos grupos. (A) Corte de la PVI inmunoteñida para TNNI3K en un embrión NT. (B) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para TNNI3K en un embrión HG. (C) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de TNNI3K en los embriones HG y NT (verde = TNNI3K, rojo = marcador nuclear). (D) Corte transversal representativo de la PVI inmunoteñido para troponina I en un embrión NT. (E) Corte transversal de la PVI inmunoteñido para troponina I en un embrión HG. (F) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de troponina I en los embriones HG y NT (rojo = troponina, blanco = marcador nuclear). (G) Corte transversal de la PVI inmunoteñido para desmina en embrión NT. (H) Corte transversal PVI inmunoteñida para desmina en embrión HG. (I) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de desmina (verde = desmina, blanco = marcador nuclear). Todas las imágenes se adquirieron con un aumento de $\times 40$ ($n = 9$ corazones HG y $n = 10$ corazones NT). Barra de escala = $20 \mu\text{m}$, (*) $p < 0.05$.

Para respaldar los resultados de las inmunofluorescencias se evaluó por medio de western blot la expresión de las proteínas sarcoméricas y revelaron cambios cualitativamente similares, ya que la densidad de la banda TNNI3K aumentó en un 62 % ($p = 0.003$) y la densidad de troponina I aumentó en un 54 % ($p = 0.004$) en los

corazones cardíacos de los embriones del grupo HG en comparación con los del grupo NT. Además, la densidad de la banda de desmina se redujo en un 23% ($p = 0.003$) (Figura 6).

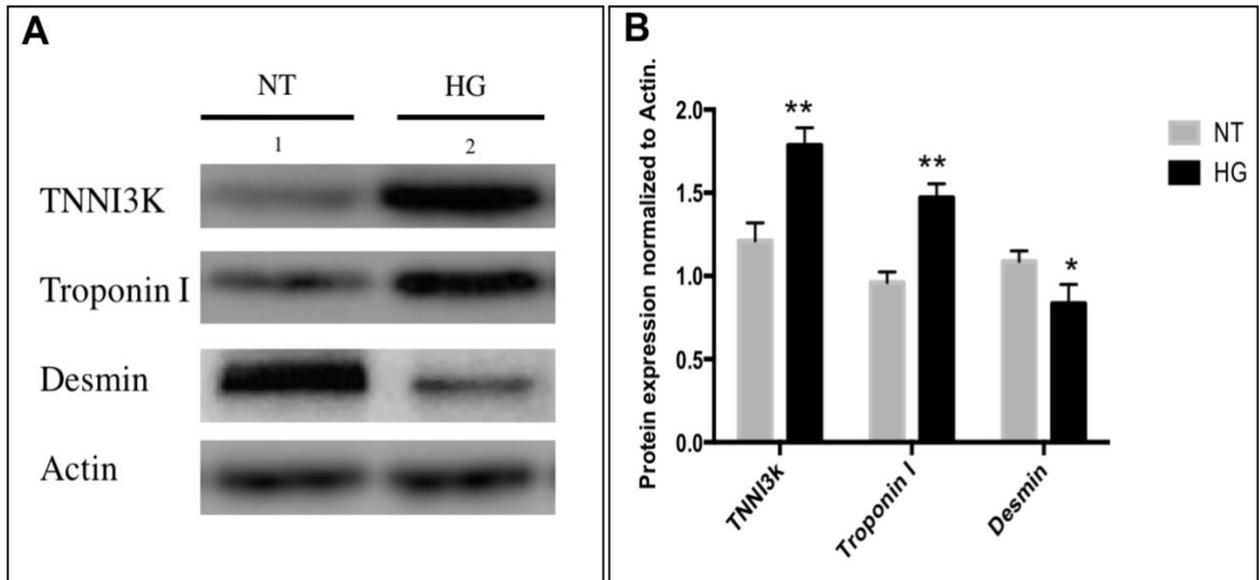


Figura 6. Evaluación de la expresión alterada de las 3 proteínas sarcoméricas por medio de western blot en corazones de embriones de *Gallus gallus*. (A) Western blots representativos de proteínas sarcoméricas. (B) Densitometría de proteínas sarcoméricas. Se utilizó α -actina como control de carga de gel. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$. Observe como las proteínas en los grupos HG se desregularón.

9.5 Evaluación de proteínas de unión celular

La comunicación entre células es esencial para la cardiogénesis, la adecuada distribución espaciotemporal de la excitación, contracción y la transmisión de señales, entre otras funciones biológicas. La comunicación intercelular está mediada por un grupo de proteínas de uniones; ocluyentes, adherentes y comunicantes entre los cardiomiocitos, las deficiencias o aumentos de estas proteínas pueden conducir al desarrollo de miocardiopatías congénitas, arritmogénesis, isquemia miocárdica, hipertensión arterial y remodelación anormal del miocardio (Suarez, 2006).

Para analizar los cambios en las uniones ocluyentes bajo hiperglucemia, medimos los niveles de expresión de ZO-1 y claudina-1 mediante inmunodetección confocal. La expresión de ZO-1 se redujo en un 66% en el tabique interventricular (Figura 7A-C) del corazón HG en comparación con el corazón NT, mientras que la expresión de claudina-1 se redujo en un 22% en la pared ventricular derecha y un 28% en el tabique interventricular de los corazones HG (Figura 7D-F).

De manera similar, el análisis de inmunodetección de las proteínas de uniones adherentes revelaron que para el caso de β -catenina hubo reducciones del 41 % en la pared del ventrículo izquierdo, del 38 % en el tabique interventricular y del 45 % en la pared del ventrículo derecho de los corazones de los embriones HG (Figura 7G-I), mientras que la inmunoexpresión de N-cadherina se redujo en un 71 % en la pared del ventrículo izquierdo, un 74 % en el tabique interventricular y un 81 % en la pared del ventrículo derecho (Figura 7J-L). Por el contrario, no hubo diferencias significativas en la expresión de uniones comunicantes (Figura 7M-O).

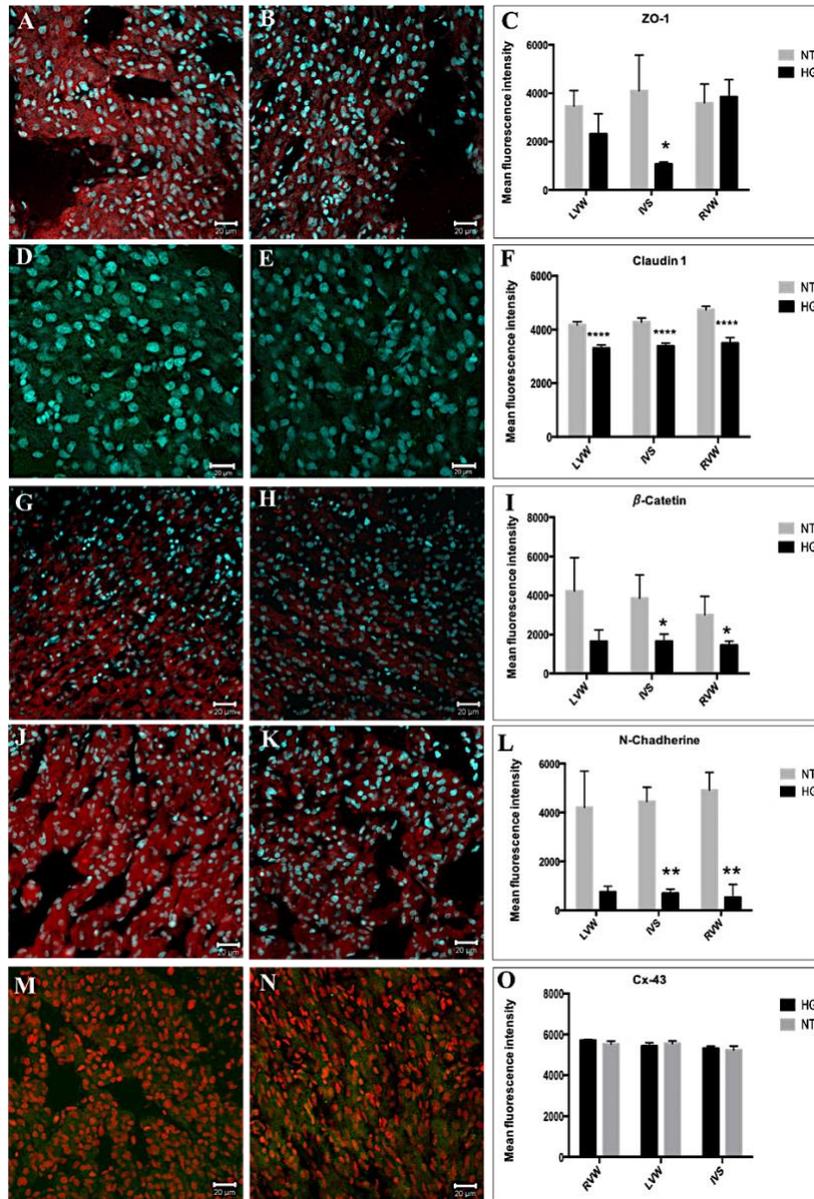


Figura 7. Imágenes representativas de los niveles de expresión de proteínas de uniones celulares en el tejido miocárdico de los embriones del grupo NT y HG. (A) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para ZO-1 (unión ocluyente) en embrión NT. (B) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para ZO-1 en embrión HG. (C) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de ZO-1 en los embriones HG y NT (rojo = ZO-1, blanco = marcador nuclear). (D) Corte transversal de la PVI inmunoteñidas para claudina-1 (unión ocluyente) en un embrión NT. (E) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para claudina-1 en un embrión HG. (F) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de claudina 1 en los embriones HG y NT (verde = claudina-1, blanco = marcador nuclear). (G) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para β-catenina (unión adherente) en un embrión HG. (H) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para β-catenina en un embrión NT. (I) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de β-catenina en los embriones HG y NT (rojo = β-catenina, blanco = marcador nuclear). (J) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para N-cadherina (unión adherente) en un embrión NT. (K) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para N-cadherina en un embrión HG. (L) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de N-cadherina en los embriones HG y NT (rojo = N-cadherina, blanco = marcador nuclear). (M) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para la proteína Cx-43 (unión comunicante) en un embrión NT. (N) Corte transversal de la PVI inmunoteñida para Cx-43 en un embrión HG. (O) Gráfica que representma la intensidad media de fluorescencia de Cx-43 en los embriones HG y NT (verde = Cx43, rojo = marcador nuclear). Todas las imágenes se adquirieron con un aumento de x40 (n = 9 HG y n = 10 corazones NT), barra de escala = 20 μm. (*) p < 0,05, (**) p < 0,01, (****) p < 0,0001.

Posteriormente procedimos analizar los posibles cambios en la expresión del transportador de glucosa regulado por insulina “GLUT1”, debido a que es el principal transportador de glucosa durante el desarrollo embrionario y fetal en el tejido cardiaco. La inmunodetección reveló una disminución del 14% ($P=0.004$) en la pared del ventrículo izquierdo y una disminución del 11% ($P=0.003$) en la pared del ventrículo derecho de los embriones HG en comparación con los embriones NT, mientras que no hubo diferencias en la expresión entre el tabique interventricular HG y NT (Figura 8).

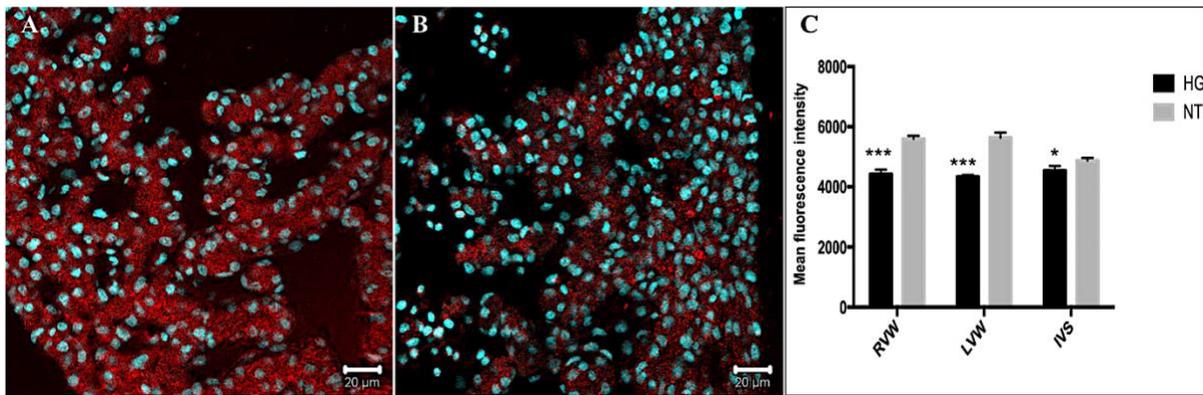


Figura 8. Inmunodetección en cortes histológicos transversales del transportador de glucosa fetal GLUT1. (A) Imagen representativa de la pared del ventrículo izquierdo en un embrión NT. (B) Imagen representativa de la pared ventricular izquierda en un embrión HG (ambos $\times 40$; rojo = Glut 1 y blanco = marcador nuclear). (C) Intensidad de inmunofluorescencia de GLUT1 (barra de escala = 20 m). (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$.

9.6 Evaluación de la proliferación celular

Ki-67 es una proteína nuclear asociada con la proliferación celular. Durante la interfase, Ki-67 se detecta exclusivamente dentro del núcleo celular, mientras que en la mitosis se traslada principalmente a las superficies de los cromosomas (Bullwinkel

et al. 2006). En condiciones normales, el desarrollo cardíaco embrionario se caracteriza por altas tasas de proliferación celular. Debido las remodelaciones anómalas y la menor densidad de cardiomiocitos del tejido cardíaco del grupo HG, examinamos la expresión de Ki-67 como un índice de la tasa de proliferación.

De acuerdo con las inmunofluorescencias de los corazones y la menor densidad celular observada, los tejidos cardíacos de los embriones HG mostraron una reducción del 19% en los núcleos positivos para Ki-67 dentro de la PVI y una reducción del 16 % en la PVD, mientras que no hubo diferencia en el tabique interventricular entre los grupos NT y HG (Figura 9)

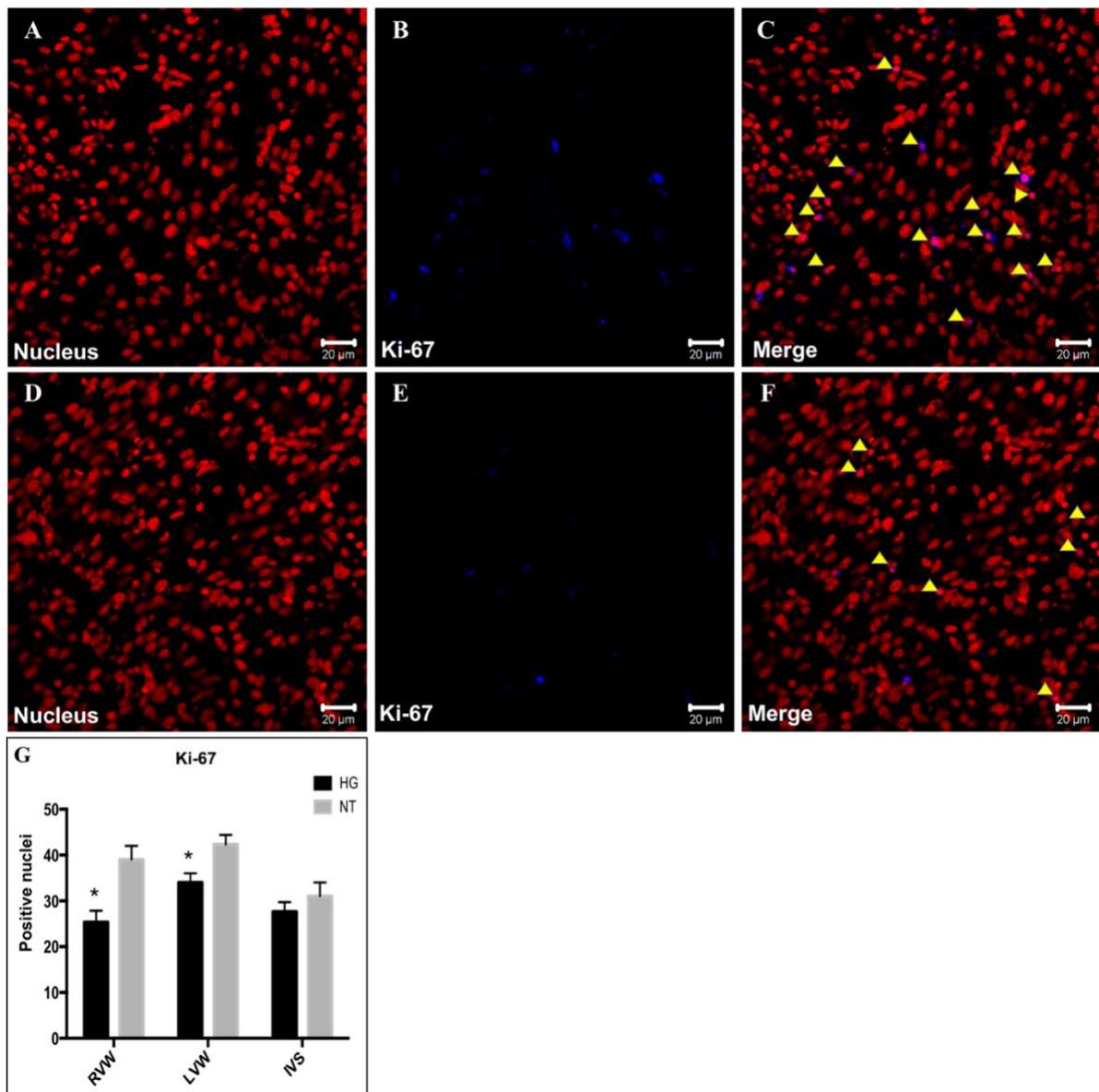


Figura 9. Proliferación de cardiomiocitos fetales, inmunoteñidos para Ki-67, en cortes histológicos transversales de corazones de embriones de NT y HG incubados durante 10 días. (A) Núcleos de embriones NT. (B) Señal Ki-67 de un embrión NT. (C) Colocalización de núcleos positivos para Ki-67 en embriones NT. (D) Núcleos de embriones HG. (E) Señal Ki-67 de embriones HG. (F) Colocalización de núcleos positivos para Ki-67 en embriones HG. (G) Número de células positivas para Ki-67 (fotos a $\times 40$; rojo = marcador nuclear, azul = Ki67 y rosa = merge, marcado con flechas amarillas) Barra de escala = 20 μm , (*) $p < 0.05$.

Las miocardiopatías y en particular la miocardiopatía diabética se caracteriza en sus primeras etapas por alteraciones de la relajación diastólica, esto por el desarreglo de las fibras de miocardio en los ventrículos y posteriormente por insuficiencia cardíaca.

Los factores fisiopatológicos de la que impulsan el desarrollo de la miocardiopatía incluyen anomalías provocados por estrés oxidante, inflamación y además de fibrosis intersticial del tejido cardíaco, la rigidez cardíaca/disfunción diastólica y, posteriormente, la disfunción sistólica (Jia et al. 2018). Por los que por medio de la tinción histológica de Sirius Red buscamos evaluar la presencia fibrogénesis por medio de depósitos anómalos de colágeno en las tres áreas de estudio de ambos grupos. Sin embargo, como lo muestra la Figura 10 no encontramos cambios significativos en ningún área, es destacable mencionar que la tinción permitió observar que la organización del miocardio es escasa sin formar fibras clásicas y presenta poca compactación del tabique interventricular en los corazones HG.

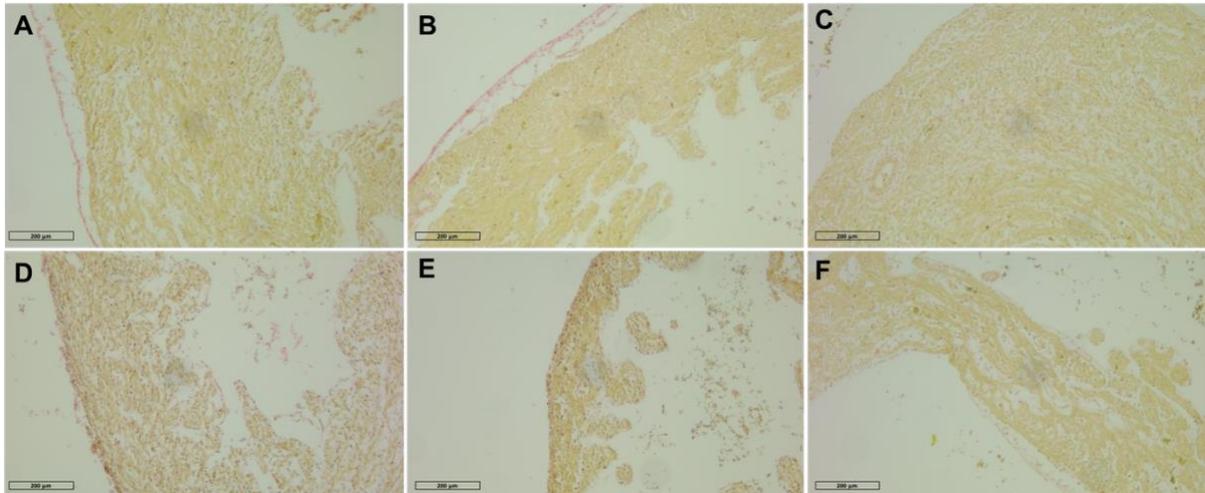


Figura 10. Tinciones histológicas de cortes transversales de corazones teñidos con Sirius Red observadas a 40x. (A) Pared ventricular izquierda corazón NT. (B) Pared ventricular derecha corazón NT (C) Tabique interventricular de corazón NT. (D) Pared ventricular izquierda corazón HG. (E) Pared ventricular derecha corazón HG. (F) Tabique interventricular de corazón HG. (Barra de escala= 200 µm, fotos a x40). No se encontró ningún cambio aparente.

10. DISCUSIÓN

El número de mujeres diabéticas en edad reproductiva continúa aumentando en todo el mundo, lo que lleva a un aumento paralelo en el número de fetos y neonatos con defectos cardíacos congénitos (Liu et al. 2019). Tanto la evidencia clínica como experimental sugiere que los niveles elevados de glucosa durante el embarazo pueden causar muerte embrionaria o fetal, así como enfermedades congénitas que conducen a la muerte prenatal (Helle et al. 2020). Además, cada vez hay más pruebas de que la DM materna puede aumentar los riesgos de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la edad adulta como consecuencia directa del entorno intrauterino hiperglucémico (Dervisoglu et al. 2018). Una proporción sustancial de estos casos puede prevenirse mejorando el control de la glucosa durante el embarazo (Simeone et al. 2015).

Teniendo en cuenta investigaciones previas, nuestro objetivo fue distinguir los efectos de un ambiente hiperglucémico en el modelo experimental de pollo, en comparativa de los efectos en el corazón humano. Primero establecimos las similitudes del desarrollo embrionario en un ambiente hiperglucémico en nuestro modelo embrionario con la hiperglucemia materna, como el ralentizar en el desarrollo embrionario, así como miocardiopatías fetales y neonatales, para así obtener nueva información sobre los riesgos que la hiperglucemia gestacional puede representar para la descendencia (Elizabeth et al. 2018; Jean-Baptiste et al. 2020; Tam et al. 2017).

En este estudio, encontramos que las deficiencias en el crecimiento y maduración estructural cardíaca en el modelo de embrión de *Gallus gallus* fueron similares a la diabetes gestacional en modelos de roedores y humanos. Otro punto importante es que a diferencia de lo que clásicamente ocurre, no observamos macrosomía, esto pudiera ser debido a factores como la nutrición materna y la disposición de oxígeno para el desarrollo embriofetal, así como los factores de crecimiento de origen materno y placentario, no están involucrados en el actual modelo de estudio.

A pesar de lo anterior y las crecientes estadísticas mundiales, los mecanismos moleculares subyacentes siguen siendo en gran medida desconocidos. Presentamos evidencia de que la hiperglucemia embrionaria podría inducir microsomía y retrasos en el desarrollo cardíaco, independientemente del estado de glucosa materna, posiblemente al inducir la sobreexpresión de TNNI3K, estudios previos en ratones transgénicos han demostrado que la sobreexpresión de TNNI3K reduce la longitud del sarcómero, lo que lleva a miocardiopatías progresivas e insuficiencia cardíaca (Salazar et al. 2015; Wang et al. 2015; Duran et al, 2014).

10.1 Importancia del modelo de hiperglucemia de embriones de pollo

La investigación experimental con embriones humanos está limitada por consideraciones éticas, mientras que los modelos murinos no hacen posible el análisis de la hiperglucemia fetal independientemente de la hiperglucemia materna. Como alternativa, el embrión de pollo permite un control preciso de la glucosa fetal y la

recolección a gran escala de tejido cardíaco para análisis moleculares. Además, los resultados presentados son concordantes con investigaciones clínicas y epidemiológicas en humanos, así como estudios experimentales en mamíferos. La hiperglucemia provocó un retraso en el desarrollo tanto del embrión en su conjunto como del corazón en comparación con los controles (Figura 1 y Gráfica 1). De manera similar, los estudios han informado que la hiperglucemia en mujeres embarazadas frena el crecimiento fetal y el desarrollo prenatal, lo que lleva a la microsomía (Duran et al. 2014; Elizabeth et al. 2018; Jean-Baptiste et al. 2020; Tam et al. 2017). Además, investigaciones recientes han sugerido que la hiperglucemia en el útero puede afectar las funciones sistólica y diastólica, provocando insuficiencia cardíaca (Basu et al. 2018). En ratas, se ha informado previamente de microsomía y fetal embrionaria después de una hiperglucemia causada por diabetes gestacional inducida por la administración de estreptozotocina en el día 5 de gestación (Salazar et al. 2015). Por tanto, el embrión de *Gallus gallus* parece ser un modelo preclínico adecuado para estudiar las bases moleculares de los defectos cardíacos congénitos debidos a la hiperglucemia embrionaria.

10.2 Efectos de la hiperglucemia sobre la morfología e histología cardíacas.

Un retraso en la maduración morfológica y funcional del corazón puede provocar una remodelación desadaptativa e incluso una hipertrofia de los cardiomiocitos (Wang et al. 2015; Tang et al. 2013). Las trabéculas carnosas son estructuras musculares

irregulares que se adhieren a la pared ventricular y proporcionan resistencia para aumentar la fuerza de contracción. El retraso o la falla de la delaminación y compactación trabecular se asocia con déficits de contracción y arritmias (Icardo et al, 1987). Se evidenció que el tamaño del corazón se redujo por la hiperglucemia (Figura 2), mientras que la delaminación trabecular se retrasó y la compactación del miocardio fue menor (Figura 5 y Figura 6), lo que indica que los efectos de la hiperglucemia en la morfología del corazón (Figura 2 y Figura 3) pueden tener repercusiones perjudiciales a nivel molecular y funcional.

La organización adecuada de las miofibrillas es fundamental para una contracción miocárdica óptima. Estudios experimentales han encontrado diferencias en las características histológicas del corazón en E18 entre las crías de ratones hembra diabéticos en comparación con los controles (Dowling et al. 2014). De acuerdo con nuestros hallazgos, encontramos que la cantidad de núcleos de miocitos en las paredes ventriculares se redujo notablemente en los corazones del grupo HG (Gráfica 2) esto respaldado, por la cantidad de núcleos inmunopositivos para el marcador mitótico Ki-67, que se redujo sustancialmente (Figura 9). Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que la hiperglucemia disminuyó el tamaño ventricular en parte al reducir la tasa de proliferación de cardiomiocitos.

TNNI3K es una quinasa MAPK específica del corazón que regula la contracción del miocardio uniéndose y fosforilando la troponina I cardíaca (Wang et al 2015; Wang et al. 2013; Wang y Yang, 2015). La expresión excesiva de TNNI3K está fuertemente implicada en la progresión de las miocardiopatías (Wang et al. 2015; Tang et al. 2013).

Además, un estudio previo *in vivo* informó miocardiopatía e insuficiencia cardíaca en ratones transgénicos que sobre expresaban TNNI3K (Wang et al. 2013). Posteriormente, otra investigación informó que, además de la miocardiopatía, los ratones transgénicos que sobre expresan TNNI3K tienen niveles plasmáticos elevados de troponina I y un mayor número de ataques cardíacos (Vagnozzi et al. 2013). Además, demostraron que una mayor expresión de TNNI3K reducía la longitud del sarcómero y promovía cambios en la composición de la proteína titina, lo que indica remodelación cardíaca. También encontraron que TNNI3K estaba ubicado en los discos intercalares y del sarcómero. De acuerdo con los informes mencionados anteriormente, este estudio enfatiza la relación entre el aumento de la expresión de TNNI3K y las miocardiopatías debido a la expresión de TNNI3K fue significativamente elevada en embriones del grupo HG (Figura 5) y exhibió anomalías tanto en la morfología macroscópica del corazón como en la estructura histológica (Figura 3 y 4). Además, la sobreexpresión de TNNI3K se asoció con una expresión alterada de otras proteínas sarcoméricas, la troponina I y desmina, como lo demuestran los análisis de inmunofluorescencia y western blot (Figura 5 y 6).

10.3 Patrones de expresión alterados de proteínas sarcoméricas asociadas con daño miocárdico

Los cardiomiocitos contienen conjuntos lineales de sarcómeros alineados en paralelo con el eje longitudinal de la célula, la alteración de esta conformación estructural se asocia con hipertrofia cardíaca (Landstrom et al. 2012). También hay evidencia de que la remodelación anormal del corazón posnatal es causada por la activación de cascadas de proteína cinasa que convergen en MAPK, lo que resulta en la fosforilación de varios factores de crecimiento y diferenciación celular. Se sabe que la sobreexpresión de TNNI3K acelera la disfunción cardíaca en ratones al inducir la remodelación cardíaca a nivel molecular, incluida una reducción en la longitud del sarcómero y cambios en la composición de la isoforma de titina (Tang et al. 2013).

La troponina I promueve el acoplamiento actina-miosina durante la contracción cardíaca, y se ha detectado una mayor sensibilidad a la troponina I después de una lesión o infarto de miocardio (Sundström et al. 2009). La troponina I y TNNI3K se colocalizan en el sarcómero de las células cardíacas y actúan como efectores en el acoplamiento de miosina y actina durante la contracción (Tang et al. 2013). La sobreexpresión de estas proteínas se considera un indicador de daño miocárdico y un predictor de infarto (Vagnozzi et al. 2009; Pham et al. 2021). Asimismo, se ha informado una expresión elevada de troponina I en tejido de autopsia de humanos adultos con diabetes y deficiencia en la función cardíaca.

Además, la troponina I se asoció con una remodelación cardíaca anormal en un modelo de miocardiopatía en ratas (Shah et al. 2017; Goldfarb et al. 2009), lo que nos permitió especular que la expresión elevada de troponina I, una proteína específica del corazón, también podría estar elevada en la circulación sanguínea. Con base en estos informes, especulamos que los niveles elevados de expresión de TNNI3K (Figura 6A-C) y troponina I en el grupo HG (Figura 8) observados en este estudio pueden ser indicativos de daño miocárdico y una consiguiente reducción de la fuerza contráctil. Para respaldar aún más esta hipótesis, en este estudio, los niveles de expresión de TNNI3K y troponina I aumentaron y se dispusieron en un patrón puntiforme en corazones hiperglucémicos en lugar del estilo clásico fibrilar generalmente observadas en tejidos sanos del grupo NT (Figura 5A-F).

La desmina es un componente integral de los filamentos intermedios que se encuentran en el aparato contráctil, los DI, el núcleo y otros orgánulos celulares, y la subexpresión se ha implicado en anomalías mecánicas y estructurales del citoesqueleto que subyacen a los déficits de contracción; la subexpresión también se asocia con la propagación anormal de señales eléctricas entre las células del músculo cardíaco (Goldfarb et al. 2009). Encontramos que la desmina se expresaba en un patrón difuso después de la hiperglucemia (Figura 5) y era indetectable en los discos intercalares, en contraste con algunas muestras del grupo NT. Además, la expresión general se redujo significativamente en el grupo HG en comparación con el grupo NT (Figura 5G-I).

La evidencia emergente sugiere que las mutaciones en el gen DES causan diferentes trastornos musculoesqueléticos y miocardiopatías. Los fenotipos clínicos asociados con las mutaciones del DES son heterogéneos y algunas de estas mutaciones son dañinas. Investigaciones clínicas y experimentales han informado que mutaciones en el gen DES, como p.A120D, una variante de desmina, causan una formación defectuosa de filamentos intermedios en los cardiomiocitos ventriculares, lo que conduce al desarrollo de arritmias o miocardiopatías (Brodehl et al. 2013).

Esto también está respaldado por estudios en embriones de pez cebra, donde la eliminación de la desmina condujo a la formación de músculos cardíacos desorganizados, biomecánica cardíaca defectuosa y trastornos en la señalización de Ca^{2+} (Brodehl et al. 2018). En conjunto, estos informes y el presente estudio resaltan la importancia de los bajos niveles de desmina en nuestro modelo.

La comunicación entre células es esencial para la embriogénesis cardíaca normal, la transmisión de impulsos eléctricos, la sincronización de la actividad contráctil del miocardio y la transmisión de señales reflejas vasculares, entre otras funciones biológicas (Sorgen et al. 2018). Por tanto, la interrupción de la comunicación entre los cardiomiocitos, ya sea por mutaciones genéticas o por condiciones adquiridas, puede provocar una patología cardíaca. Tanto las investigaciones clínicas como los estudios experimentales en modelos murinos y porcinos han informado que los niveles anormales de expresión de las proteínas de unión responsables de la comunicación entre células conducen al desarrollo de miocardiopatías, arritmogénesis, isquemia miocárdica, hipertensión arterial y remodelación anormal del miocardio (Suarez et al.

2006). De hecho, estas proteínas se consideran ampliamente objetivos terapéuticos prometedores para el tratamiento de las miocardiopatías (Molica et al. 2018).

En nuestro modelo la formación de discos intercalares se realizó de manera incompleta durante el desarrollo embrionario del corazón; por lo tanto, las proteínas que son componentes de las uniones celulares se encontraron predominantemente en el citoplasma. Por ejemplo, la expresión anormal de componentes proteicos que forman uniones estrechas o uniones oclusivas se ha asociado con arritmias tanto en pacientes humanos como en modelos animales (Lisewski et al. 2008). Además, se ha demostrado que la principal proteína de unión oclusiva ZO-1 se une a múltiples proteínas del disco intercalar, como conexinas, cateninas y cadherinas (Zhang et al. 2020).

Los embriones HG demostraron una reducción sustancial en la expresión de ZO-1 dentro del TIV (Figura 7A-C), concomitante con las anomalías morfológicas e histológicas antes mencionadas, de acuerdo con investigaciones que han reportado la pérdida de ZO-1 en los cardiomiocitos afecta la función cardíaca en ratones. (Dai et al. 2020). Las claudinas también son proteínas de unión esenciales, ya que la pérdida se asocia con un desarrollo morfológico anormal, remodelación y disfunción miocárdica (Simard et al. 2006; Meng et al. 2009). Encontramos que la expresión de claudina-1 se redujo en la PVD, la pared del PVD y el TIV de los corazones del grupo HG (Figura 7D-F), lo que puede ser la base de las anomalías morfológicas observadas. Además, un acoplamiento reducido entre células podría predisponer a mayores defectos funcionales a largo plazo.

Las uniones adherentes (AJ) están compuestas de proteínas que forman asociaciones indirectas con filamentos de actina y microtúbulos del citoesqueleto (Meng et al. 2009). Las deficiencias o aumentos en la expresión de estas proteínas pueden conducir al desarrollo de miocardiopatías congénitas, arritmogénesis, isquemia miocárdica, hipertensión arterial y remodelado anormal del miocardio (Li et al. 2012). En el corazón, las AJ son responsables del acoplamiento mecánico de los cardiomiocitos y están estrechamente asociadas con las placas de unión en los discos intercalares (Gutstein et al. 2003).

La función mecánica correcta del músculo cardíaco depende del componente AJ N-cadherina, que se expresa altamente tanto en el miocardio en desarrollo como en el maduro, donde se encuentra predominantemente en la región transversal de los discos intercalados y en las regiones de contacto entre miocitos vecinos (Craig et al. 2010). En modelos murinos, la pérdida de N-cadherina en el miocardio embrionario resultó en letalidad embrionaria en la mitad de la gestación, acompañada de múltiples anomalías embrionarias, incluidos defectos cardiovasculares (Kostetskii et al. 2005) lo que destaca la importancia de la N-cadherina para el desarrollo y la función óptima del corazón. Por lo tanto, los niveles reducidos de expresión de N-cadherina y β -catenina, otra proteína AJ, en la PVD, PVI y el TIV (Figura 7) probablemente también contribuyeron a las anomalías morfológicas observadas.

Finalmente, las uniones comunicantes son conjuntos de canales iónicos transmembrana que permiten el paso de iones para el acoplamiento eléctrico, así como de pequeñas moléculas para el acoplamiento metabólico de cardiomiocitos

adyacentes. Estas estructuras están formadas por conexinas (Cx), siendo la isoforma 43 (Cx43) la más abundante en el tejido cardíaco embrionario y adulto (Lucero et al. 2020). Las conexinas también forman hemicanales, lo que permite el intercambio de iones y pequeños metabolitos de bajo peso molecular entre el citoplasma y el entorno extracelular, lo cual es crucial para la comunicación entre cardiomiocitos más distantes (Nielsen, et al 2012). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la expresión entre embriones hiperglucémicos y normoglucémicos (Figura 7M-O), posiblemente debido a que, durante el período de estudio, el acoplamiento intercelular a través de uniones comunicantes no está completamente desarrollado.

10.4 Efectos de la hiperglucemia embrionaria sobre el transporte de glucosa en el corazón

El corazón de los mamíferos está adaptado para utilizar múltiples sustratos para obtener energía. El combustible predominante son los ácidos grasos, seguidos de la glucosa, que representa alrededor del 25% de la producción de ATP en el miocardio. En el corazón, los transportadores de glucosa más abundantes son GLUT1 y GLUT4 (Solano, et al. 2019). GLUT1 se localiza principalmente en la membrana plasmática y es responsable de la captación de glucosa cardíaca basal, mientras que GLUT4 está presente principalmente en vesículas intracelulares en reposo, pero se transloca a la membrana plasmática en respuesta a la estimulación de la insulina (Shao et al. 2008). GLUT1 es el transportador de glucosa predominante en corazones embrionarios,

fetales y neonatales, su expresión es constitutiva. No obstante, el nivel de expresión está regulado por múltiples estímulos fisiológicos y patológicos. Por ejemplo, la hipoxia promueve un aumento en la expresión de GLUT1, la tasa de apoptosis de los cardiomiocitos ventriculares es más elevada en pacientes diabéticos adultos (Wang et al. 2016), posiblemente debido a un transporte insuficiente de glucosa a través de GLUT1 y GLUT4. Esto requiere la producción de energía alternativa mediante la beta oxidación de ácidos grasos libres y da como resultado una síntesis reducida de piruvato (Joyner y Smoak, 2004).

En nuestro modelo la expresión de GLUT1 se redujo en ambas paredes del corazón embrionario hiperglucémico (Figura 8), lo que, como se informó anteriormente, paradójicamente podría reducir la disponibilidad de glucosa e impedir el desarrollo (Hufnagel et al. 2022; Joyner et al. 2004). En nuestro modelo, tanto la compactación como el engrosamiento de las paredes ventriculares se retrasaron, potencialmente debido a una tasa de proliferación reducida en las paredes ventriculares, como lo demuestra la tinción con Ki-67 (Figura 9). A medio y largo plazo, estas deficiencias podrían inducir malformaciones o remodelaciones anómalas y déficits funcionales en otros tejidos por un suministro insuficiente de oxígeno y de glucosa.

Toda la información antes mencionada resalta la importancia de cómo la hiperglucemia, como en el caso de la diabetes gestacional, donde la glucosa puede atravesar la placenta libremente, resulta en la exposición del feto a altos niveles de glucosa, generando así múltiples complicaciones en el desarrollo embrio-fetal; como defectos en la formación de los sistemas nervioso y circulatorio.

Por lo tanto, estos cambios podrían aumentar la susceptibilidad de la descendencia a desarrollar enfermedades cardiometabólicas más adelante en la vida debido a cambios epigenéticos durante el desarrollo fetal (Sanchez et al. 2022; Hufnagel et al. 2022). Sumado a lo anterior, se ha demostrado que la lipotoxicidad resultante de la obesidad materna es capaz de activar una serie de cascadas de estrés oxidante y señales proinflamatorias que pueden exacerbar las complicaciones cardiovasculares inducidas por la hiperglucemia gestacional o la obesidad materna en los hijos durante su vida adulta (Dong et al. 2013). Este tipo de resultados son de gran importancia para que ayuden a esclarecer los mecanismos patológicos en torno a las complicaciones derivadas del desarrollo en un ambiente teratogénico de la progeñie.

11. CONCLUSIONES

La hiperglucemia retrasó el desarrollo de los corazones fetales y alteró la organización normal de los elementos celulares y moleculares. Además, la hiperglucemia redujo la proliferación de cardiomiocitos. Estas anomalías se asociaron con niveles elevados de expresión de las proteínas sarcoméricas TNNI3K y troponina I, así como con la regulación disminuida de múltiples proteínas de unión celular, lo que sugiere que las anomalías observadas en la morfología macroscópica vienen acompañadas con posibles fallas en el acoplamiento mecánico celular, electrofisiológico y metabólico entre los miocardiocitos. Además, el corazón hiperglucémico exhibió una regulación negativa del principal transportador de glucosa fetal, GLUT1, lo que nos permitiría intuir paradójicamente habría un déficit dentro de las células en el metabolismo de la glucosa. Además los hallazgos resaltan la utilidad del embrión de *Gallus gallus* como modelo para investigar la patogénesis de defectos cardíacos congénitos debidos a la hiperglucemia gestacional, así como los riesgos asociados con un control deficiente de la glucosa durante el embarazo.

12. PERSPECTIVAS

Pretenderemos evaluar la expresión de miRNAs asociados a diversos padecimientos cardíacos de los cuales no existen reportes en estado embrionario, ni bajo ambientes hiperglucémico, y las posibles relaciones que podría guardar con los cambios en los transportadores de glucosa en el corazón embrionario y proteínas estructurales y de comunicación intercelular en el miocardio.

13. BIBLIOGRAFÍA

ADA American Diabetes Association. (2019). Standards of medical care in diabetes. USA: *J. Diabetes*.

ACHA. Adult congenital heart association. Ventricular septal defect [Internet]. [cited 2023 Feb 12]. Available from: <https://www.achaheart.org/your-heart/educational-qas/types-of-heart-defects/ventricular-septal-defect/>

Anderson, R. y Becker, A. (1980). Cardiac anatomy. An integrated text and colour atlas. UK: London.

Andrew, M., King, M. J., Adams, E. B. y Elliot J., L. (2012). Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. U. S. A.: Elsevier Academic.

Baño, R. M., Quero, J. M., y Antúnez, J. M. (1986). Anatomía Cardíaca. *Cardiol. Pediatric*, 4, 32-56.

Basu, M.; Garg, V. (2018) Maternal hyperglycemia and fetal cardiac development: Clinical impact and underlying mechanisms. *Birth Defects Res*, 110, 1504–1516.

Brodehl, A.; Dieding, M.; Klauke, B.; Dec, E.; Madaan, S.; Huang, T.; Gargus, J.; Fatima, A.; Saric, T.; Cakar, H. (2013) The novel desmin mutant p. A120D impairs filament formation, prevents intercalated disk localization, and causes sudden cardiac death. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6, 615–623.

Brodehl, A.; Gaertner-Rommel, A.; Milting, H. Molecular insights into cardiomyopathies associated with desmin (DES) mutations. (2018) *Biophys Rev.* 10, 983–1006.

Bullwinkel, J.; Baron-Lühr, B.; Lüdemann, A.; Wohlenberg, C.; Gerdes, J.; Scholzen, T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell Physiol.* 2006, 206, 624–635.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention and Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Data and statistics on congenital heart defects. *Cent. Dis. Control Prev.* <https://www.cdc.gov/ncbddd/heartdefects/data.html>. Accessed, 30.

Craig, M. A., McBride, M. W., Smith, G., George, S. J. y Baker, A. (2010). Dysregulation of cadherins in the intercalated disc of the spontaneously hypertensive stroke-prone rat. *J Mol Cell Cardiol*, 48(6), 1121-1128.

Dai, W., Nadadur, R. D., Brennan, J. A., Smith, H. L., Shen, K. M., Gadek, M., y Weber, C. R. (2020). ZO-1 regulates intercalated disc composition and atrioventricular node conduction. *Circ. Res.*, 127(2), e28-e43.

Damasceno, D., Sinzato, Y., Bueno, A., Netto, A., Dallaqua, B., Gallego, F., Marini, G. (2013). Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J. Diabetes Res.*, 47-57.

Davey, M. y Tickle, C. (2007). The chicken as a model for embryonic development. *Cytogenet Genome Res*, 117, 231-239.

Dervisoglu, P.; Kosecik, M.; Kumbasar, S. (2018) Effects of gestational and pregestational diabetes mellitus on the foetal heart: A cross-sectional study. *J. Obstet Gynaecol.* 38, 408–412.

DeSisto, C., Kim, S. y Sharma, A. (2014). Prevalence estimates of gestational diabetes mellitus in the United States, pregnancy risk assessment monitoring system (PRAMS), 2007–2010. *Prev Chronic Dis*, 11(13).

Dong, M.; Zheng, Q.; Ford, S.P.; Nathanielsz, P.W.; Ren, J. (2013) Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 55, 111–116.

Dowling, D.; Corrigan, N.; Horgan, S.; Watson, C.J.; Baugh, J.; Downey, P.; McAuliffe, F.M. (2014) Cardiomyopathy in Offspring of pregestational diabetic mouse pregnancy. *J. Diabetes Res*, 1–6.

Duran, A.; Sáenz, S.; Torrejón, M.J.; Bordiú, E.; del Valle, L.; Galindo, M.; Perez, N.; Herraiz, M.A.; Izquierdo, N.; Rubio, M.A. (2014) Introduction of IADPSG criteria for the screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus results in improved pregnancy outcomes at a lower cost in a large cohort of pregnant women: The St. Carlos Gestational Diabetes Study. *Diabetes Care*, 37, 2442–2450

Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F. y Charron, P. (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.*, 29, 270–276.

Elizabeth, K.E.; Ashwin, D.A.; Sobhakumar, S.; Sujatha, T.L. (2018) Outcome of large- and small-for-gestational-age babies born to mothers with pre-pregnancy and gestational diabetes mellitus versus without diabetes mellitus. *Indian J. Child Health*, 5, 592–596.

ENSANUT, Basto-Abreu, A., López-Olmedo, N., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Moreno-Banda, G. L., Carnalla, M. y Barrientos-Gutierrez, T. (2023). Prevalencia de prediabetes y diabetes en México: *Ensanut 2022*. *Salud Pública de México*, 1-6.

Garcia-Vargas, L., Addison, S., Nistala, R., Kurukulasuriya, D. y Sowers, J. (2012). Gestational diabetes and the offspring: Implications in the development of the cardiorenal metabolic syndrome in offspring. *Cardiorenal Med.* 2(2), 134-142.

Genead, R., Danielsson, C., Wårdell, E., Kjaeldgaard, A., Westgren, M., Sundström, E. y Grinnemo, K. H. (2010). Early first trimester human embryonic cardiac Islet-1 progenitor cells and cardiomyocytes: Immunohistochemical and electrophysiological characterization. *Stem Cell Research*, 4(1), 69-76.

Goldfarb, L.G.; Dalakas, M.C. (2009) Tragedy in a heartbeat: Malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J. Clin. Investig.* 119, 1806–1813.

Gongora, G. F. D., Angel, G. C., & Reyes, N. S. (2018). *Cardiología pediátrica*.

Gonzalez, J., Ramachandran, J., Himelman, E., Badr, M., K. C., Nouet, J. y Fraidenaich, D. (2018). Normalization of connexin 43 protein levels prevents cellular and functional signs of dystrophic cardiomyopathy in mice. *Sci Rep.* 28(4), 361-372.

Gutstein, D., Liu, F., Meyers, M., Choo, A., y Fishman, G. (2003). The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J. Cell Sci.*, 116(5), 875-885.

Hall, J. E. (2011). Guyton y Hall, Tratado de fisiología médica. En J. E. Hall, Tratado de fisiología médica (pág. 1112). *Elsevier Health Sciences*.

Ham, A. (1967). Tratado de Histología. México: Interamericana.

Harrison. (2006). Harrison Principios de Medicina Interna (16 ed). Mc-Graw-Hill.

Helle, E.; Priest, J.R. (2020). Maternal obesity and diabetes mellitus as risk factors for congenital heart disease in the offspring. *J. Am. Heart Assoc*, 9, e011541.

Herrera, J. N., Huidobro, M. G., y Ovalle, L. C. (2005). Congenital malformations among offspring of diabetic women. *Rev Med Chile*. 133(5), 547-554.

Huidobro, M., Andrea, F., y Carrasco, E. (2004). Incidencia de diabetes gestacional y su relación con obesidad en embarazadas. *Rev Med Chile.*, 132(8), 931-938.

Hufnagel, A.; Dearden, L.; Fernandez-Twinn, D.S.; E Ozanne, S. Programming of cardiometabolic health: (2022) The role of maternal and fetal hyperinsulinaemia. *J. Endocrinol.* 253, R47–R63.

IDF, Ogurtsova, K., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. y Makaroff, L. (2021). Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. International Diabetes Federation. Diabetes research and clinical practice.

Icardo, J.M.; Fernandez-Terán, A. Morphologic study of ventricular trabeculation in the Embryonic Chick Heart. *Acta Anat* 1987, 130, 264–274

Itani, N., Skeffington, K. L., Beck, C. y Giussani, D. (12 de 2016). Sildenafil therapy for fetal cardiovascular dysfunction during hypoxic development: studies in the chick embryo. *Physiol. J.*, 12, 1-11.

Jean-Baptiste, A.; Simeoni, U. (2020) Offspring of mothers with hyperglycemia in pregnancy: Short-term consequences for newborns and infants. *Diabetes Res Clin Pract.*, 145. 194–200.

Jia, G., Whaley-Connell, A., y Sowers, J. R. (2018). Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia-and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetology*, 61(1), 21-28.

Joyner, N.T.; Smoak, I.W. (2004) In vivo hyperglycemia and its effect on Glut-1 expression in the embryonic heart. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.*, 70, 438–448.

Katherine, E. Y., y Kirby, L. M. (2002). Wherefore Heart Thou? Embryonic Origins of Cardiogenic Mesoderm. *Dev. Dynamics*, 223, 307–320.

Kalcheva, N. et al. (2007). Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis in a murine model of oculodentodigital dysplasia. *Proc Natl Acad Sci.* 104, 20512–20516, <https://doi.org/10.1073/pnas.0705472105>

Kostetskii, I., Li, J., Xiong, Y., Zhou, R., Ferrari, V. A., Patel, V. y Radice, G. L. (2005). Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ. Res*, 96(3), 346-354.

Kraker, J., Viswanathan, S. K., Knöll, R., y Sadayappan, O. (2016). Recent advances in the molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Front. Physio.*, 7, 499-511.

Kutova, O. M., Sencha, L. M., Pospelov, A. D., Dobrynina, O. E., Brilkina, A. A., Cherkasova, E. I. y Balalaeva, I. V. (2020). Comparative analysis of cell–cell contact abundance in ovarian carcinoma cells cultured in two-and three-dimensional in vitro models. *Biology*, 9(12), 446.

Landstrom, A.P.; Ackerman, M.J. (2012) Beyond the Cardiac Myofilament: Hypertrophic Cardiomyopathy- Associated mutations in genes that encode calcium-handling proteins. *Curr. Mol. Med.* 12, 507–518.

Lazzarini R, Gómez-Quiroz LE, González-Márquez H, Villavicencio-Guzmán L, Salazar-García M, Sánchez-Gómez C. (2018) The proximal segment of the embryonic outflow (conus) does not participate in aortic vestibule development. *PLoS One*. 13(12): e0209930. doi: 10.1371/journal.pone.0209930. PMID: 30596770; PMCID: PMC6312233.

Lazzarini, R., Alcántar, O., Jaime, R., García, E. G., y Gómez, L. E. (2015). Las nanopartículas de oro de 20 nm inhiben la proliferación e invasión de células de carcinoma mamario humano MCF7, in vivo. *Mundo Nano*, 8(15).

Lisewski, U., Shi, Y., Wrackmeyer, U., Fischer, R., Chen, C., Schirdewan, A. y Gotthardt, M. (2008). The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell–cell communication. *J. Exp. Med.*, 205(10), 2369-2379.

Li, J.; Goossens, S.; van Hengel, J.; Gao, E.; Cheng, L.; Tyberghein, K.; Shang, X.; De Rycke, R.; van Roy, F.; Radice, G.L. Loss of α -catenin alters the hybrid adhering junctions in the heart and leads to dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmia following acute ischemia. *J. Cell Sci.* 2012, 125, 1058–1067

Liu, Y.; Chen, S.; Zühlke, L. Black, G.C.; Choy, M.K.; Li, N.; Keavney, B.D. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970–2017: Updated systematic review and meta-analysis of 260 studies (2019). *Int. J. Epidemiol*, 48, 455–463.

Liu, X., Pu, W., He, L., Li, Y., Zhao, H., Li, y Zhou, B. (2021). Cell proliferation fate mapping reveals regional cardiomyocyte cell-cycle activity in subendocardial muscle of left ventricle. *Nat. Commun.*, 12(1), 5784.

Lu, H., Buchan, R. y Cook, S. (2010). MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Circ. Res*, 410-420.

Lucero, C.M., Andrade, D.C., Toledo, C. Cardiac remodeling and arrhythmogenesis are ameliorated by administration of Cx43 mimetic peptide Gap27 in heart failure rats. *Sci Rep* 10, 6878 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63336-6>

Makavos, G., Kairis, C., Tselegkidi, M. E., Karamitsos, T., Rigopoulos, A. G., Noutsias, M., y Ikonomidis, I. (2019). Hypertrophic cardiomyopathy: an updated review on diagnosis, prognosis, and treatment. *Heart Fail. Rev.*, 24, 439-459.

Meng, W. & Takeichi, M. (2009). Adherens Junction: Molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb.*, 1(6).

Molica, F.; Figueroa, X.F.; Kwak, B.R.; Isakson, B.E.; Gibbins, J.M. (2018) Connexins and pannexins in vascular function and disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 1663.

Montessuit, C. y Thorburn, A. (1999). Transcriptional activation of the glucose transporter GLUT1 in ventricular cardiac myocytes by hypertrophic agonists. *Biol Chem.* 274, 9006-9012.

Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. (2012) Gap junctions. *Compar. Physio.* 2(3):1981-2035. doi: 10.1002/cphy.c110051. PMID: 23723031; PMCID: PMC3821273.

OMS. (2016). Informe mundial sobre la diabetes. Resumen de Orientación. OMS, World Health Organization.

OPS. Día Mundial de los Defectos Congénitos: OPS pide asegurar la prevención y el tratamiento oportuno de las anomalías congénitas en las Américas - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2022 [cited 2022 Dec 10]. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2022-dia-mundial-defectos-congenitos-ops-pide-asegurar-prevencion-tratamiento-oportuno>.

OPS. Hiperglucemia y embarazo en las américas (2015). Informe final de la Conferencia Panamericana sobre Diabetes y Embarazo. Organización Mundial de la Salud.

Pham, C.; Muñoz-Martín, N.; Lodder, E. (2021) The Diverse Roles of TNNI3K in Cardiac Disease and Potential for Treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 6422.

Pauliks, L. B. (2015). The effect of pregestational diabetes on fetal heart function. *Expert Rev. of Card. Therap.*, 13(1), 67-74.

Penny, D. J., & Vick, G. W. (2011). Ventricular septal defect. *Lancet*, 377(9771), 1103-1112.

Pons, G. (1986). Enfermedades del miocardio. *Gac Méd Caracas*. 109(4) 497-507

Qin, M., Zeng, Z., Zheng, J., Shah, P. K., Schwartz, S. M., Adams, L. D. y Sharifi, B. G. (2003). Suppression subtractive hybridization identifies distinctive expression markers for coronary and internal mammary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(3), 425–433. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000059303.94760.5C>

Revilla Monsalve C, Morán Zanabria L, Salazar García M, Altamirano Bustamante Myriam, Gallardo Hernández. (2023) Effects of in Utero Severe Hyperglycemia on the development and function of the endocrine pancreas: Repercussions on postnatal life of rats. *Res & Rev Health Care Open Acc J*. 8(4). 972-985 DOI: 10.32474/RRHOAJ.2023.08.000292.

Romero Flores, Brenda G., Villavicencio Guzmán, Laura, Salazar García, Marcela, y Lazzarini, Roberto. (2023). Normal development of the heart: a review of new findings. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex*, 80(2), 79-93. <https://doi.org/10.24875/bmhim.22000138>

Russell, E., Foley, M., Kinsley, B., Firth, R., Coffey, M. y McAuliffe, F. (2008). Effect of pregestational diabetes mellitus on fetal cardiac function and structure. *Am J Obstet Gynecol.*, 312(2), 1-7.

Salazar-García, M., Reyes, E., Revilla, M., Villavicencio-Guzmán, L., Reyes, A. y Sánchez-Gómez, C. (2015). Importance of Maternal Diabetes on the Chronological Deregulation of the Intrauterine Development: An Experimental Study in Rat. *Journal of Diabetes Research*, 10, 1-10.

Salazar, M., Revilla, C., Palomino, M., Arteaga, M., Díaz, S., De La Rosa-Santander, P. y Roque, B. (2012). Chronological and morphological study of heart development in the rat. *Anat Rec*, 295, 1267–1290.

Salazar, M., Sánchez-Gómez, C., Contreras, A., Carrillo, B., & Revilla, C. (2006). Los segmentos cardíacos primitivos su implicación en la cardiogénesis normal aplicada a la cardiología pediátrica. *Arch Cardiol Mex*, 76(5), 46-51.

Sánchez-Soriano, C.; Pearson, E.R.; Reynolds, R.M. (2022) The role of genetics in fetal programming of adult cardiometabolic disease. *J. Dev. Orig. Health Dis*, 13, 292–299.

Sánchez, L., Oseguera, L. Á. y Nuño, J. (2016). Relación entre el nivel de hemoglobina glucosilada materna y cardiomiopatía hipertrófica fetal. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 54(3), 260-269.

Shah, A.S.V.; Ferry, A.V.; Mills, N.L. (2017) Cardiac biomarkers and the diagnosis of myocardial infarction in women. *Curr. Cardiol. Rep.* 19, 1–10.

Santalucia, T., Christmann, M., Yacoub, M. y Brand, N. (2003). Hypertrophic agonists induce the binding of c-Fos to an AP-1 site in cardiac myocytes: Implications for the expression of GLUT1. *Cardiov. Res.*, 59(639-648).

Sedmera, D. y Thompson, R. (2011). Myocyte Proliferation in the Developing Heart. *Develop. Dynam* (240), 1322-1334.

Severs, N. J. et al. (2004). Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1662, 138–148, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.019>

Shao, D. y Tian, R. (2011). Glucose transporters in cardiac metabolism and hypertrophy. *Compr. Physiol.*, 6(1), 331-351.

Simard, A.; Di Pietro, E.; Young, C.R.; Plaza, S.; Ryan, A.K. (2006) Alterations in heart looping induced by overexpression of the tight junction protein Claudin-1 are dependent on its C-terminal cytoplasmic tail. *Mech. Dev.* 123, 210–227

Simeone, R.M.; Devine, O.J.; Marcinkevage, J.A.; Gilboa, S.M.; Razzaghi, H.; Bardenheier, B.H.; Sharma, A.J.; Honein, M.A. (2015) Diabetes and congenital heart defects: A systematic review, meta-analysis, and modeling project. *Am. J. Prev. Med.*, 48, 195–204.

Singh, V., Bali, A., Singh, N., & Singh, J. (2014). Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J. Physiol Pharmacol.* 18(1), 1-14.

Solano, J. N., & Fornieri, M. V. (2019). Cardiomiopatía diabética: entidad poco conocida y el impacto terapéutico de los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 en el miocardio diabético. *Rev. Clin. EMUCR.* 9(1), 11-27.

Sorgen, P. L., Trease, A. J., Spagnol, G., Delmar, M. y Nielsen, M. S. (2018). Protein-Protein Interactions with Connexin 43: Regulation and Function. *International journal of molecular Sciences*, 19(5), 1428. <https://doi.org/10.3390/ijms19051428>

Stalberg, H., & De Haan, R. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol*, 19, 128-159.

Suárez, J., & Bravo, A. (2006). Conexinas y sistema cardiovascular. *Rev Fed Arg Cardiol*, 74(2), 149-156.

Sundström, J.; Ingelsson, E.; Berglund, L.; Zethelius, B.; Lind, L.; Venge, P.; Ärnlöv, J. (2009) Cardiac troponin-I and risk of heart failure: A community-based cohort study. *Eur. Heart J.* 30, 773–781.

Takaya, T., & Ono, K. (2009). MicroRNA-1 and microRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circ. J.*, 73, 1492–1497.

Tam, W.H.; Ma, R.C.W.; Ozaki, R.; Li, A.M.; Chan, M.H.M.; Yuen, L.Y.; Lao, T.T.H.; Yang, X.; Ho, C.S.; Tutino, G.E.; et al. (2017) In Utero Exposure to Maternal Hyperglycemia Increases Childhood Cardiometabolic Risk in Offspring. *Diabetes Care*, 40, 679–686.

Tang, H., Xiao, K., Mao, L., Rockman, H., & Marchuk, D. (2013). Overexpression of TNNI3K, a cardiac specific MAPKKK, promotes cardiac dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 52, 101-111.

Tkáč, I. (2013). Cardiovascular Importance of Hyperglycemia and Hypoglycemia. *Diabetes Care*, 36(2), 267-277.

Vagnozzi, R.J.; Gatto, G.J.; Kallander, L.S.; Hoffman, N.E.; Mallilankaraman, K.; Ballard, V.L.T.; Lawhorn, B.G.; Stoy, P.; Philp, J.; Graves, A.P.; et al. (2013) Inhibition of the Cardiomyocyte-Specific Kinase TNNI3K Limits Oxidative Stress, Injury, and Adverse Remodeling in the Ischemic Heart. *Sci. Transl. Med.* 5, 207ra14

Vilches-Moure, J. G. (2019). Embryonic chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a model of cardiac biology and development. *Comp. Med.*, 69(3), 184-203.

Villavicencio-Guzmán, L, Salazar-García, M, Jaime-Cruz, R, Toledano, F., Sánchez Gómez C. (2020) Incorporation of the first and second heart fields and prospective fate of the straight heart tube via in vivo labeling of chicken embryos. *PLoS One.* 10;15(7): e0234069. doi: 10.1371/journal.pone.0234069.

Villavicencio-Guzmán, L.; Sánchez-Gómez, C.; Jaime-Cruz, R.; Ramírez-Fuentes, T.C.; Patiño-Morales, C.C.; Salazar-García, M. (2023) Human Heart Morphogenesis: A New Vision Based on In Vivo Labeling and Cell Tracking. *Life.* 13 (165) <https://doi.org/10.3390/life13010165>

Wagner, M., y Siddiqui, M. (2007). Signal Transduction in Early Heart Development Cardiogenic Induction and Heart Tube Formation. *Exp. Biol. Med.* 232. 852-865.

Wang C, Hess C, Hiatt W, Goldfine A. (2016) Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus – Mechanisms, Management, and Clinical Considerations. *Circulation.*; 133:2459–2502.

Wang, H., Wang, L., Song, L., Zhang, Y. J., Xu, R. y Meng, X. (2013). TNNI3K is a novel mediator of myofilament function and phosphorylates cardiac troponin I. *Braz J Med Biol Res.*, 46(2), 128-137.

Wang, X., Li, S., Wang, G., Ma, Z., Chuai, M., Cao, L., y Yang, X. (2015). High glucose environment inhibits cranial neural crest survival by activating excessive autophagy in the chick embryo. *Sci. Rep.* (5), 1-16.

Wang, Y. S., Zhou, J., Hong, K., Cheng, X., y Li, Y. (2015). MicroRNA-223 Displays a Protective Role Against Cardiomyocyte Hypertrophy by Targeting Cardiac Troponin I-Interacting Kinase. *Cell Physiol Biochem*, 35(4), 1546-1556.

Wender, E., Koslik, J., Biczysko, R., y Ozegowsky, S. (2004). Changes of oxidative stress parameters in diabetic pregnancy. *Free Radic Res.* 38(8), 795-803.

Wentzel, P., Gäreskog, M. y Eriksson, U. (2005). Folic acid supplementation diminishes diabetes- and glucose-induced dysmorphogenesis in rat embryos in vivo and in vitro. *Diabetes*, 54, 546–553.

Wittig, J. y Münsterberg, A. (2016). The Early Stages of Heart Development: Insights. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, 3(12), 1-15.

Young, Alexander, Leigh A. Bradley, and Matthew J. Wolf. (2022). In Vivo Methods to Monitor Cardiomyocyte Proliferation" *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 9(3): 73. <https://doi.org/10.3390/jcdd9030073>

Zhang, J., Vincent, K. P., Peter, A. K., Klos, M., Cheng, H., Huang, S. M., y Ross, R. S. (2020). Cardiomyocyte expression of ZO-1 is essential for normal atrioventricular conduction but does not alter ventricular function. *Circ. Res.*, 127(2), 284-297.

Zhang, S., Li, Y., Tan, R., Tsoi, B., Huang, W., Huang, Y., y He, R. (2016). A new gestational diabetes mellitus model: hyperglycemia-induced eye malformation via inhibition of Pax6 in the chick embryo. *Dis Model Mech.* 9(2), 177-186.

Zhao, Z., & Reece, A. (2013). New concepts in diabetic embryopathy. *Lab. Med. Clin.*, 33(2), 207–23.

Zhu, H., & Leung, S. (2015). Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis of controlled profiling studies. *Diabetology*, 58(5), 900-911.

14. ANEXOS

14.1 Paraformaldehido

Preparación. Para 100 ml.

- a) Calentar 60-70 ml de agua a 60 ° C en un matraz con un agitador magnético.
- b) Añadir 4 g de paraformaldehído.
- c) Añadir dos o tres gotas de hidróxido sódico 10 N.
- d) Esperar a que la solución se vuelva transparente.
- e) Filtrar.
- f) Añadir 25 ml de tampón fosfato 0.4 M, pH 7.4
- g) Enrasar con agua destilada hasta 100 ml.
- h) Enfriar a 4-10 °C antes de usar.

14.2 Tinción Hematoxilina-Eosina

- a) Des-parafinado. Los tejidos se colocaron en estufa para histología antes descrita a 60 C por 4 horas, a fin de eliminar el exceso de paraplast. Una vez transcurrido el tiempo, los tejidos fueron sumergidos en 3 cambios de Xilol por 5 minutos c/u.
- b) Hidratación. Los tejidos fueron sumergidos en series graduales de alcohol por 5 minutos desde 100 hasta 30% y finalmente en agua bidestilada.

- c) Tinción Hematoxilina. Los tejidos fueron bañados por 3 minutos con Hematoxilina de Harris, el exceso de colorante fue lavado con agua destilada por 3 minutos. Se pasaron en un cambio rápido en solución de alcohol al 70% con 5 gotas de HCl, después con agua amoniacal (1:1000) por 3 minutos.
- d) Tinción Eosina. A fin de contrastar el núcleo celular los tejidos fueron sumergidos por 1 minuto en Eosina. Posteriormente los cortes fueron deshidratados rápidamente con alcohol al 96% y dos más de alcohol 100%.
- e) Montaje. Los tejidos se pasan por Xileno e inmediatamente fueron montados en resina Entellan New®.

14.3 Tinción Sirius Red

- a) Desparafinar tejidos
- b) Hidratación de tejidos xilol, posteriormente pasar por alcohol 100% hasta alcohol 70% para llegar a agua destilada.
- c) Poner en hematoxilina durante 8 minutos
- d) Enjuagar y dejar en agua durante 10 minutos.
- e) Poner en Direct Red 80 por una hora
- f) Hacer 2 enjuagues de H₂O acidificada
- g) Deshidratar en 3 cambios de alcohol absoluto
- h) Pase a xilol y montar muestras.

15. LOGROS DURANTE EL DOCTORADO

15.1 Artículos en Revistas científicas: (6)

1. Patiño-Morales, C. C., **Jaime-Cruz, R.**, Ramírez-Fuentes, T. C., Villavicencio-Guzmán, L., & Salazar-García, M. **(2023)**. TECHNICAL IMPLICATIONS OF THE CHICKEN EMBRYO CHORIOALLANTOIC MEMBRANE ASSAY TO ELUCIDATE NEUROBLASTOMA BIOLOGY. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14744.
2. Patiño-Morales, C. C., **Jaime-Cruz, R.** & Salazar-García, M. **(2023)** EMBRIONES DE POLLO PARA ESTUDIAR EL CÁNCER. *Revista - Divulgación de Ciencia y Educación*. Vol. 1, No. 2.
3. **Jaime-Cruz, R.**; Sánchez- Gomez, C.; Villavicencio-Guzmán, L.; Lazzarini-Lechuga, R.; Patiño- Morales, C.C.; García-Lorenzana, M.; Ramírez-Fuentes, T.C.; Salazar-García, **(2023)** M. EMBRYONIC HYPERGLYCEMIA DISRUPTS MYOCARDIAL GROWTH, MORPHOLOGICAL DEVELOPMENT, AND CELLULAR ORGANIZATION: AN IN VIVO EXPERIMENTAL STUDY. *Life* 2023, 13, 768. <https://doi.org/10.3390/life13030768>
4. Villavicencio-Guzmán, L.; Sánchez-Gómez, C.; **Jaime-Cruz, R.**; Ramírez-Fuentes, T.C.; Patiño-Morales, C.C.; Salazar-García, **(2023)** M. HUMAN HEART MORPHOGENESIS: A NEW VISION BASED ON IN VIVO LABELING AND CELL TRACKING. *Life*, 13, 165. <https://doi.org/10.3390/life13010165>

5. Patiño-Morales CC, **Jaime-Cruz R.**, Sánchez-Gómez C, Corona JC, Hernández-Cruz EY, Kalinova-Jelezova I, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Silva-Islas CA, Salazar-García M. **(2021)** ANTITUMORAL EFFECTS OF NATURAL COMPOUNDS DERIVED FROM ALLIUM SATIVUM ON NEUROBLASTOMA: AN OVERVIEW. ANTIOXIDANTS (BASEL). 27;11(1):48. doi: 10.3390/antiox11010048.
6. Villavicencio Guzman Laura, Salazar Garcia Marcela, **Jaime Cruz Ricardo**, Lazzarini Roberto, Toledano Toledano Filiberto, Sanchez-Gomez Concepcion. **(2020)** INCORPORATION OF THE FIRST AND SECOND HEART FIELDS AND PROSPECTIVE FATE OF THE STRAIGHT HEART TUBE VIA IN VIVO LABELING OF CHICKEN EMBRYOS. PloS one, 15(7), e0234069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234069>

15.2 Tesis dirigidas: (2)

(2023) Alumna: Lesly Quezada Hernández, “Evaluación de la expresión del factor de crecimiento endotelial en el desarrollo del miocardio ventricular bajo un ambiente hiperglucémico.” Tesis de la licenciatura en Biología Molecular, Universidad Autónoma Metropolitana, Cuajimalpa (Concluida).

(2023) Alumno: Carrillo Antonio Daniel, “Papel de p53 y la isoforma Delta40p53 en el desarrollo del corazón embrionario en el modelo *Gallus gallus domesticus*” Tesis de la licenciatura en Biología Molecular, Universidad Autónoma Metropolitana, Cuajimalpa (Concluida).

15.3 Servicios sociales dirigidos:

(2023) Médico pasante en servicio social: Diana Cruz Sandoval, “Análisis de la expresión del receptor de insulina alfa durante el desarrollo embrionario cardiaco bajo un ambiente hiperglucémico”. Licenciatura en Medicina de la Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

(2023) Médico pasante en servicio social: Esther Osorio Rodriguez, “Análisis de la expresión del receptor de insulina beta durante el desarrollo embrionario cardiaco bajo un ambiente hiperglucémico”. Licenciatura en Medicina de la Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

(2021) Pasante en servicio social: Claudia Meza Cortez, Evaluación de la expresión de uniones ocluyentes durante el desarrollo embrionario cardiaco bajo un ambiente hiperglucémico”. Licenciatura en Biomedicina, Universidad Autónoma de Sinaloa.

(2021) Pasante en servicio social: Gualberto Lopez Contreras, Evaluación de la expresión de uniones adherentes durante el desarrollo embrionario cardiaco bajo un ambiente hiperglucémico”. Licenciatura en Biomedicina, Universidad Autónoma de Sinaloa.

15.4 Conferencias impartidas:

(2022) “Biología de los MicroRNAs”. Impartida a alumnos de la licenciatura en Biología Molecular de la División en Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM Unidad Cuajimalpa.

(2021) “Mitos y verdades en torno a la Diabetes Mellitus” Impartida a alumnos de la licenciatura en Biología Molecular y de la Ingeniería Biológica de la División en Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM unidad Cuajimalpa.

15.5 Congresos:

- i. (2023) Reunión de Investigación Pediátrica. Trabajo: El tracto de salida del corazón embrionario y su integración al tabique interventricular definitivo. (Coautor)
- ii. (2023) Reunión Anual de Investigación HIMFG 2023. Trabajo: Análisis histológico del efecto de la hiperglucemia materna en el desarrollo embriofetal de los tractos de salida ventriculares. (Coautor, ganador del tercer lugar).
- iii. (2023) Reunión Anual de Investigación HIMFG 2023. Trabajo: El tracto de salida del corazón embrionario y su integración al tabique interventricular definitivo (Coautor, ganador del segundo lugar).

- iv. (2023) Reunión anual de Investigación HIMFG 2023. Trabajo: Evaluación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el desarrollo del miocardio ventricular en condiciones de hiperglucemia (Autor Correspondiente).
- v. (2022) IX International Congress of Histology and Tissue Engineering, XXI Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular y VII Congreso Iberoamericano de Histología. Trabajo: Analysis of the effect of embryonic hyperglycemia on the development of the ventricular myocardium and the expression of molecules marking damage to the myocardium. (Autor principal)
- vi. (2022) XXIX Congreso Nacional de Anatomía, de la Sociedad Mexicana de Anatomía A.C. Trabajo: Análisis experimental del desarrollo del vestíbulo aórtico. (coautor)
- vii. (2022) XXIV Reunión de Investigación Pediátrica de los Institutos Nacionales de Salud. Trabajo: Análisis del efecto de la hiperglucemia materna en el desarrollo embrionario de los tractos de salida ventriculares y grandes arterias. (coautor)
- viii. (2020) VII Congreso Iberoamericano de Histología y XL Congreso Mexicano de Histología. Trabajo: Análisis del efecto de la hiperglucemia embrionaria en el desarrollo del miocardio ventricular y expresión de moléculas marcadoras de daño al miocardio. (autor principal)

- ix. (2019) XXXI Congreso Mexicano de Cardiología y 2º Congreso Iberoamericano de Falla Cardíaca e Hipertensión Pulmonar. Trabajo: Análisis del efecto de la hiperglucemia embrionaria en el desarrollo del miocardio ventricular y expresión de moléculas marcadoras de daño al miocardio. (*Autor principal*)
- x. (2019) Jornada Sinaloense del Conocimiento. Trabajo: “Efecto de la hiperglicemia en la expresión de N-Cadherina, B-Catenina y ZO-1 en el miocardio ventricular. Estudio experimental en embriones de pollo” (*Coautor*).
- xi. (2019) VI Congreso Nacional de Embriología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Medicina. Trabajo: Los tractos de salida ventriculares se originan de primordios embrionarios distintos, estudio experimental en embrión de pollo. (*Coautor*). Ganadores del primer lugar.
- xii. (2019) XXXIX Congreso Nacional de Histología. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. Trabajo: Importancia del miRNA-223 en el desarrollo del corazón en condiciones de hiperglucemia estudio experimental en embrión de pollo. (*Autor principal*).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00153

Matrícula: 2163802044

Análisis del efecto de la hiperglucemia embriofetal sobre el desarrollo del miocardio ventricular y expresión de moléculas marcadoras de daño miocárdico.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de marzo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DR. HORACIO MARQUEZ GONZALEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

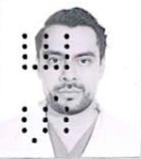
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: RICARDO JAIME CRUZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



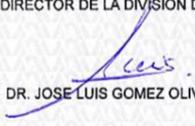

RICARDO JAIME CRUZ
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL



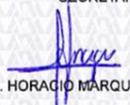
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL



DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

SECRETARIO



DR. HORACIO MARQUEZ GONZALEZ