

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa Abierta al Tiempo

**EMBRIOTOXICIDAD POR DIABETES MELLITUS
EN RATA. PREVENCIÓN POR L-ARGININA Y
POLIAMINAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

MARTÍN PALOMAR MORALES,

Diciembre de 1998

10/11/93

**EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ EN
EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL
CONACYT Y ADEMÁS CUENTA CON APOYO DEL
MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO NUM. PFP-200-93**

SECRETARÍA DE AME M. S.
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN



El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las

Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

MARTIN PALOMAR MORALES

El día 15 de diciembre del año de 1998

Comité Tutorial:

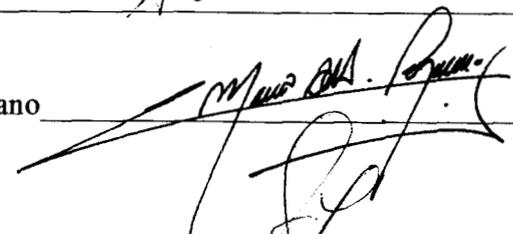
Tutor: Dr. José Domingo Méndez Francisco



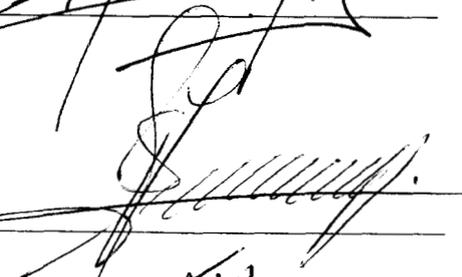
Asesor: Dr. Rubén Román Ramos



Asesor: Dr. Mario Altamirano Lozano



Sinodal: Dr. Jorge Antonio Sosa Melgarejo



Sinodal: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman



IT 300 p. 60 10/10

PARA LA REALIZACION DE ESTE PROYECTO SE TUVO APOYO ECONOMICO DEL CONACYT (PROYECTO 0889P-M9506), Y SE GOZÓ DE BECA-CREDITO COMPLEMENTARIA (REGISTRO 94156), DESDE OCTUBRE DE 1995 HASTA DICIEMBRE DE 1998.

A DIOS, POR PERMITIRME VIVIR

A MI ESPOSA, GLADYS: MI RAZÓN DE SER

A MI HIJO, GIBRÁN: MI FUENTE DIARIA DE INSPIRACIÓN

A MIS PADRES, ERNESTO Y ENGRACIA, CON TODO MI RESPETO

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana el haberme permitido ser parte de ella

Agradezco al Doctor José Domingo Méndez, por su amistad y su asesoría.

Agradezco a los Doctores Rubén Román Ramos y Mario Altamirano Lozano el tiempo y paciencia dedicados durante la elaboración de esta Tesis.

Agradezco a los Doctores Jorge Antonio Sosa Melgarejo y Luis Arturo Baiza Gutman sus valiosos consejos y sugerencias.

Finalmente, agradezco a todas las personas que confiaron en mi y me apoyaron.

"Yes, I get high with a little help of my friends"

Lennon-McCartney

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS

AA	Ácido Araquidónico
ARG	Grupo diabético tratado con Arginina
CAT	Catalasa
Da	Daltones
DFMO	DL- α -difluorometil-ornitina (DFMO)
DIAB	Grupo diabético
dL	deciLitro
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GIP	Siglas en inglés para péptido gastroinhibitorio
GLUT-1	Transportador de glucosa 1
GPx	Glutación peroxidasa
h	hora(s)
Hb	Hemoglobina
HDL	Siglas en inglés para Lipoproteínas de alta densidad
hGH	Siglas en inglés para Hormona de Crecimiento humana
IGFBP	Siglas en inglés para Proteína tipo 1 enlazadora de factores de crecimiento tipo insulina
IGF-I (-II)	Siglas en inglés para Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (o tipo II)
INS	Grupo diabético tratado con insulina
Kg	Kilogramo(s)
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
mM	miliMolar
μ M	microMolar
NAD	Siglas en inglés para el dinucleótido de adenosina y nicotinamida

NMD	Neonato(s) de madre(s) diabética(s)
NMMA	<i>N</i> ^G -monometil-L-arginina
NO	Óxido nítrico
NOD	Cepa de ratones diabéticos no obesos
NPH	Tipo de insulina
PEG	Neonatos pequeños para su edad gestacional
PG(s)	Prostaglandina(s)
PUT	Grupo diabético tratado con putrescina
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
SCU	Sangre de cordón umbilical
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SPD	Grupo diabético tratado con espermidina
SPM	Grupo diabético tratado con espermina
STZ	Estreptozotocina
TES	Grupo testigo
TNF α	Siglas en inglés para el factor necrosante de tumores tipo α
UI	Unidad(es) Internacional(es)

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3

INTRODUCCIÓN	5
CAMBIOS METABÓLICOS DURANTE EL EMBARAZO	6
DIABETES MELLITUS	8
DIABETES Y EMBARAZO	9
TERATOGENÉISIS	10
ESTUDIOS CLÍNICOS	12
EL EMBARAZO DIABÉTICO COMO EXPERIMENTO NATURAL	14
DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL	17
MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA DIABETES MELLITUS DURANTE LA GESTACION	18
PAPEL TERATOGENÉTICO DE LA HIPERGLUCEMIA	22
Alteración del metabolismo del <i>mio</i> -inositol	26
Alteración del metabolismo del ácido araquidónico	27
Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno	28
PAPEL TERATOGENÉTICO DE LA HIPOGLUCEMIA	31
PAPEL TERATOGENÉTICO DE LOS CUERPOS CETÓNICOS	35
"INHIBIDORES DE LAS SOMATOMEDINAS"	37
PROTECCIÓN	38
POLIAMINAS	40

SÍNTESIS DE POLIAMINAS	41
L-ARGININA	42
METABOLISMO DE LA L-ARGININA	43
<hr/>	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
OBJETIVOS	46
<hr/>	
METODOLOGIA	47
Reactivos	47
Animales	47
Apareamiento	47
Efecto de la aloxana sobre la implantación embrionaria	48
Efecto de la aloxana sobre el desarrollo embrionario	48
Efecto de la aloxana en los niveles sanguíneos de glucosa y el desarrollo fetal	49
Inducción de diabetes en distintas fases de la gestación	49
Determinaciones bioquímicas	50
Efecto de la L-arginina y las poliaminas sobre las alteraciones del desarrollo causadas por la diabetes	50
Análisis estadístico	51
<hr/>	
RESULTADOS	53
Sitios de implantación	53
Desarrollo embrionario	52
Desarrollo fetal	58

Efecto del tiempo de inducción diabética sobre el desarrollo fetal	64
Efecto de L-arginina y poliaminas sobre el retraso de desarrollo y la embriotoxicidad causada por la inducción diabética	64
<hr/>	
DISCUSION	81
Modelo para el estudio de la interacción entre diabetes y gestación	81
Prevención de la embriotoxicidad y retraso de desarrollo producidos por diabetes química, por la L-arginina y las poliaminas	87
CONCLUSIONES	95
<hr/>	
REFERENCIAS	97
PUBLICACIÓN GENERADA EN ESTA TESIS	124

RESUMEN

La asociación entre la diabetes mellitus tipo 1 con la gestación en el ser humano es causa de muerte materna o embrionaria, de retraso del desarrollo intrauterino, de aparición de factores de riesgo neonatal y de teratogénesis. En modelos animales, se han podido reproducir estas condiciones, si bien diversos autores reportan resultados diferentes y a menudo contradictorios

En este trabajo se describe primero la implementación de un modelo animal de diabetes tipo 1 complicado con gestación, que origine la aparición de alteraciones en el desarrollo embrionario o fetal. También se describe la prevención del efecto adverso de la diabetes tipo 1.

Para implementar este modelo experimental, se utilizaron dosis de aloxana de 80 a 150 mg/Kg, el día cero de la gestación, y se evaluó el desarrollo embrionario y fetal a distintos tiempos. Se encontró que a dosis de 110 mg/Kg y mayores, se induce diabetes mellitus severa y sostenida, lo que origina pérdida embrionaria (embriotoxicidad), y en algunos casos, muerte materna; y que la inducción de diabetes mellitus ligera, transitoria, a dosis de aloxana menores a 110 mg/Kg el día cero, no afecta en modo alguno al desarrollo. Sin embargo, a ninguna de las dosis administradas, y a ningún tiempo de evaluación, se encontró daño teratogénico.

La inducción de diabetes mellitus con aloxana a dosis de 110 mg/Kg de peso el día cuatro de gestación provoca retraso del desarrollo y aparición de reabsorciones, que han sido descritas como embriotoxicidad más que como teratogénesis. Se tomó este esquema como modelo para el estudio de la acción de L-arginina y las poliaminas. En este modelo, la

aplicación de insulina humana NPH a dosis de 1-5 U/organismo desde el día siguiente a la inducción diabética previene la embriotoxicidad y el retraso del desarrollo. De igual manera, la aplicación de 1.0 ml de L-arginina (10 mM), putrescina, espermidina o espermina (10 μ M) previenen, aunque de manera parcial, los efectos adversos de la diabetes mellitus severa sobre los *concepti*, pero no causan una normalización completa de los parámetros séricos y sanguíneos evaluados.

Aún cuando no se pudo establecer un modelo de diabetes mellitus tipo 1 complicada con gestación que origine teratogénesis, se logró causar retraso del desarrollo y embriotoxicidad, y se pudo prevenir el fenómeno por administración de arginina y poliaminas, lo que apoya la hipótesis de que los mecanismos por los cuales la arginina manifiesta sus efectos citoprotectores sobre las células β pancreáticas, son mediados por síntesis de poliaminas.

ABSTRACT

Diabetes mellitus and pregnancy association in human species is the cause of maternal and embryonic death, growth delay, apparition of neonatal risk factors and teratogenesis. In animal models, this could be reproduced, although different authors report distinct and often contradictory results.

In this work, first is described the efforts for the adaptation, of an animal model of diabetes mellitus type 1 complicated with pregnancy, that origines alterations in embryo or fetal development. Also it is described the reversion of the adverse effect of diabetes mellitus type 1.

In order to adapt this animal model, alloxan doses of 80 to 150 mg/Kg, at zero day of pregnancy was administered, and the embryo or fetal development was evaluated. Alloxan doses of 110 mg/Kg and higher causes induction of diabetes melitus, severe and continue; with doses lower than 110 mg/Kg at zero day, does not affect the embryo or fetal development. However, teratogenic damage was no found at no one doses administered or at no one time of evaluation.

Diabetic induction with alloxan at dose of 110 mg/Kg at day four of gestation causes developmental delay and resorptions, that has been described as embryotoxicity rather than teratogenesis. This scheme was taken as a model in order to study of effect of L-arginine and polyamines. In this model, human insulin (NPH) at dose of 1-5 U/organism from the day following to diabetic induction prevents the embryotoxicity and developmental delay. In the same way, aplication of 1.0 mL of L-arginine (10 mM), putrescine, spermidine or spermine

(10 μ M) prevents, although of parcial manner, the adverse effects of severe diabetes, but there is not a whole normalization of the serum and blood parameters evaluated.

Altough we could not establish an animal model of diabetes mellitus type 1 complicated with gestation that causes teratogenesis, we could cause developmental delay and embryotoxicity, and we could prevent these anomalies with arginine or polyamines. This findings support the hypothesis that the mechanisms of β -cell protection for arginine are mediated by polyamine synthesis.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es la expresión clínica de una deficiencia relativa o absoluta de insulina, que afecta a millones de personas en el mundo. Este síndrome metabólico de diversa etiología se caracteriza por anomalías del metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas. Aunque la deficiencia de insulina puede ser mejorada por la dieta, la insulina y los hipoglucemiantes orales, el tratamiento estándar no ha evitado el desarrollo de las complicaciones crónicas que afectan a los ojos, riñones, nervios y arterias. (The Expert Committee, 1997)

El efecto de este estado de deficiencia relativa y/o absoluta de la insulina es potenciado durante la gestación por las hormonas placentarias, que muestran efectos antagónicos a la insulina. Se sabe que la coexistencia del embarazo y la diabetes mellitus es causa de malformaciones congénitas, de la aparición de factores de riesgo neonatal, del retraso del desarrollo y de la muerte fetal y/o materna (Buchanan y Kitzmiller, 1994)

A partir de la introducción de la insulina en la terapéutica médica, los índices de mortalidad y morbilidad en mujeres diabéticas gestantes han disminuido casi a los valores de la población general. Sin embargo, el pronóstico de la incidencia de malformaciones y del retraso en desarrollo no ha cambiado, a pesar del control metabólico estricto de las mujeres diabéticas gestantes (Lesser y Carpenter, 1994)

La incidencia de tales malformaciones es de tres a cuatro veces más común que en la descendencia de madres no diabéticas y constituye un factor importante en la muerte perinatal. La causa precisa de las malformaciones y del retraso del desarrollo no es conocida, y se ha propuesto que la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, los episodios hipoglucémicos y

la hipercetonemia maternas puedan tener efectos sobre la frecuencia y tipo de malformaciones (Reece y Eriksson, 1996).

En animales con diabetes inducida químicamente, así como en embriones de roedor en cultivo se han podido reproducir algunas de las malformaciones, así como el retraso del desarrollo, y se ha tratado de dilucidar el mecanismo mediante el cual ocurren ambas alteraciones. Además, se han empleado tratamientos experimentales con el fin de reducir la frecuencia de anomalías, o de prevenir el retraso del desarrollo.

CAMBIOS METABÓLICOS DURANTE EL EMBARAZO

Durante el embarazo normal, los niveles sanguíneos de la glucosa preprandial son entre 10 y 15 mg/dL menores que en las mujeres no gestantes (Lesser y Carpenter, 1994). Se ha postulado que esta disminución puede ser causada por un aumento en el uso de la glucosa por parte del músculo, y por el depósito adiposo. En la gestación avanzada, una concentración muy baja de glucosa en ayuno puede estar relacionada con un aumento en el volumen de distribución (Felig y Coustan, 1991). Si el ayuno es más prolongado, los niveles de la glucosa materna disminuyen aún más, lo que ocasiona disminución de las concentraciones circulantes de la insulina y aminoácidos, y un aumento en los niveles de los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos libres. La producción hepática de glucosa permite un aporte continuo del azúcar al feto. Durante la gestación, la producción hepática de glucosa aumenta hasta en un 30% (Lesser y Carpenter, 1994).

Se ha demostrado que durante la gestación normal, hay hiperplasia de las células β pancreáticas, y se propuso que se debe a un efecto directo de los estrógenos y la

progesterona. Hay un aumento progresivo en los niveles de insulina basal y postprandial a lo largo de la gestación. La cantidad de glucosa producida en un periodo de 24 h durante el tercer periodo de gestación es casi el doble de la producida por mujeres no embarazadas. La hiperglucemia e hiperinsulinemia relativas que se observan en el embarazo, sugieren resistencia a la acción de la insulina, lo que ha caracterizado a la gestación como un estado diabetógeno (Lesser y Carpenter, 1994).

Durante el embarazo, los requerimientos de insulina aumentan de manera normal, a causa de lo que se ha denominado resistencia periférica a la insulina, debido a la acción de hormonas placentarias tales como los estrógenos, el cortisol, la progesterona, el lactógeno placentario, la hormona del crecimiento, así como la prolactina hipofisiaria (Buchanan y Kitzmiller, 1994, Lesser y Carpenter, 1994; Reece y cols, 1994; Zárata y cols, 1978).

Por otra parte, se han observado cambios en el metabolismo de los tejidos hepático y adiposo durante la gestación, que causan alteración de los niveles séricos de los triacilglicéridos, los ácidos grasos, el colesterol y los fosfolípidos. Hay un aumento de la capacidad de utilización de los lípidos como fuente de energía por parte de la madre, reservando para el feto los aminoácidos y la glucosa; se promueve la lipólisis y se aumentan los niveles circulantes de los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos (Buchanan y Kitzmiller, 1994, Lesser y Carpenter, 1994; Reece y cols, 1994).

Las concentraciones maternas de los aminoácidos plasmáticos en general son bajas durante el embarazo. La causa de esta situación es desconocida pero podría ser debida a un aumento en el volumen de su distribución durante el embarazo; aumento del transporte; alteraciones en la digestión de proteínas; la absorción intestinal o la excreción renal; y

aumento en la capacidad de gluconeogénesis (Buchanan y Kitzmiller, 1994, Lesser y Carpenter, 1994; Reece y cols, 1994).

DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es un síndrome metabólico caracterizado por hiperglucemia. Su etiología es diversa, y además de presentar alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, se alteran también el metabolismo de los lípidos y las proteínas. La diabetes mellitus ha sido reclasificada (The Expert Committee, 1997) en varios tipos:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (antes llamada tipo I o insulino-dependiente), caracterizada por deficiencia en la producción de insulina, puede tener origen genético, puede o no presentar anticuerpos anti-insulina.
2. Diabetes mellitus tipo 2 (antes llamada tipo II o insulino-independiente), que incluye desde la resistencia a la insulina hasta alteraciones del metabolismo de glucosa. Esta forma no es causada por defecto en la producción de insulina, sino por una respuesta anormal a la hormona.
3. Otros tipos específicos. Grupo heterogéneo que incluye deficiencias cromosómicas, endocrinopatías, enfermedades del páncreas, etc.
4. Diabetes mellitus gestacional (DMG), aquella que se presenta por vez primera durante el embarazo, y que desaparece al término de la gestación.

DIABETES Y EMBARAZO

La asociación de la diabetes mellitus tipo 1 y el embarazo es una causa potente de fallas en el desarrollo embrionario y fetal, que pueden causar malformaciones congénitas, muerte intrauterina y retraso del desarrollo, así como un elevado índice de mortalidad perinatal. En contraste, la diabetes mellitus gestacional produce neonatos grandes para su edad gestacional, (Freinkel, 1980; Freinkel y cols, 1985).

Antes de la introducción de la insulina en la terapéutica médica, la coexistencia del embarazo y la diabetes mellitus, cuando ocurría, era causa frecuente de mortalidad materna, la que se redujo por el tratamiento profiláctico con insulina a partir de los años 20. Sin embargo, la morbilidad y mortalidad perinatales se mantuvieron elevados. Las causas de esta gran mortalidad y morbilidad perinatales asociadas con la diabetes mellitus involucran traumatismo neonatal, malformaciones congénitas, defectos de membrana hialina e hipoglucemia, entre otras (Freinkel, 1980). En los últimos años, un mejor manejo con dieta e insulina, previo a la concepción, ha logrado disminuir la morbilidad y la mortalidad perinatal a valores cercanos a los de la población general (Freinkel y cols, 1985; Ferris y Reece, 1994; Gabbe, 1985).

En el embarazo de mujeres diabéticas, se presenta un aumento de los requerimientos de insulina, tanto para las mujeres diabéticas tipo 1 (Steel y cols, 1994), como para las de tipo 2 (Moore y cols, 1987) y las que presentan DMG (Langer y cols, 1987). En mujeres con DMG recientemente se encontró que el metabolismo de carbohidratos se altera profundamente durante el embarazo (Catalano y cols, 1993). En mujeres diabéticas tipo 1 se

demonstró que el tratamiento con insulina normaliza, además de la glucemia, las concentraciones de los ácidos grasos y los lípidos circulantes (Reece y cols, 1991).

Se ha reportado que en las mujeres diabéticas tipo 1 gestantes, se reduce la necesidad de insulina en las etapas finales del embarazo, mientras que en las mujeres con DMG que requieren insulina, se incrementa la necesidad de la hormona (McManus y Ryan, 1992).

TERATOGENESIS

El desarrollo de un organismo es un orquestamiento complejo de división, migración, interacción, diferenciación y muerte celular, regulados genéticamente. Cualquier factor que interfiera con estos procesos puede causar malformaciones en el embrión, algunas de las cuales pueden causar la muerte embrionaria temprana, o impedir la implantación. Otras veces el embrión se implanta pero es incapaz de llevar a cabo el desarrollo normal, lo que desencadena en aborto temprano y microaborto (desprendimiento del *conceptus* al tiempo de la menstruación), de manera que la mujer muchas veces no se entera de que estuvo embarazada. Otras veces, cuando el embrión se implanta y su desarrollo progresa, muestra al nacer o ser abortado, alguna anomalía física, o malformación congénita. El estudio de las malformaciones congénitas es llamado teratología (gr. *teratos*, monstruo), y los agentes responsables de causar malformaciones son llamados teratógenos o “formadores de monstruos” (Gilbert, 1988). Para el estudio de la teratogénesis en el laboratorio, se deben considerar los seis principios de Wilson (1977):

1. La susceptibilidad a la teratogénesis depende del genotipo del *conceptus* y de la manera en que el genotipo interactúa con los factores ambientales.

2. La susceptibilidad a los agentes teratogénicos varía con el estado de desarrollo al tiempo de exposición.
3. Los agentes teratogénicos actúan en formas específicas (mecanismos) sobre las células y los tejidos en desarrollo para iniciar la embriogénesis anormal (patogénesis).
4. Las manifestaciones finales del desarrollo anormal son la muerte, las malformaciones, el retraso del desarrollo y el desorden funcional.
5. El acceso de las influencias ambientales adversas sobre los tejidos en desarrollo dependen de la naturaleza de las influencias (agentes).
6. Las manifestaciones del desarrollo afectado aumentan en grado conforme aumenta la dosis, desde la carencia de efecto hasta la letalidad total.

La influencia de las alteraciones metabólicas del estado diabético sobre el desarrollo es distinta en la gestación complicada por diabetes previa y en la DMG. Así, la gestación complicada con diabetes tipo 1 o tipo 2, provoca una amplia gama de probabilidades, desde el retraso del desarrollo hasta la muerte maternofoetal, pasando por la aparición de factores de riesgo neonatal, la manifestación de malformaciones menores (no letales), las malformaciones mayores (incompatibles con la vida), y el aborto (muerte fetal). Las implicaciones en cada gestación individual pueden ser definidas por el grado del control metabólico en estados específicos de la gestación, cuando el crecimiento embrionario, el desarrollo de la función de células β o el crecimiento de tejidos sensibles a insulina son influenciados por el ambiente (Metzger, 1991).

ESTUDIOS CLÍNICOS

Las primeras indicaciones de los efectos teratológicos de la diabetes mellitus son producto de reportes clínicos, y de revisiones de casos. A raíz del descubrimiento de la insulina por Banting y Best en 1921, se mejoró en gran medida no solamente la expectativa de vida de los diabéticos tipo 1 en general, sino en particular de mujeres diabéticas gestantes. Sin embargo, a lo largo de la historia completa de la incidencia de embarazo en las pacientes diabéticas, se han presentado numerosas complicaciones (Gabbe, 1993).

Actualmente, se ha observado que la incidencia de malformaciones es mayor en los neonatos de madres diabéticas que en los recién nacidos de madres sanas, y que se pueden presentar otro tipo de complicaciones (Gabbe, 1993). Aunque las tasas reportadas varían según la duración del estudio, el tamaño de la muestra, la población seleccionada y la localidad o país, en general los autores coinciden en señalar que el índice es de tres a cinco veces mayor que en la población general. Las malformaciones encontradas con más frecuencia indican daño a los sistemas nervioso, cardiovascular, musculoesquelético, renal, gastrointestinal y genitourinario (Barker y Fall, 1993; Hunter y cols, 1993; Moreno-Ruiz y cols, 1988; Ramírez-Torres y cols, 1992; Reece y cols, 1993; Rivera-Rueda y cols, 1993). Las malformaciones no son típicas de la diabetes, ya que malformaciones similares se han observado en los fetos, los abortos y los neonatos de madres con otro tipo de padecimientos, y/o que han tomado fármacos (Reece y cols, 1993, 1996b).

Entre las malformaciones del sistema nervioso central más frecuentes se han descrito la hidrocefalia, la anencefalia, la acrania, el meningocele, el meningomielocele, la arrinencefalia, la microcefalia, la holoprosencefalia, la ciclopi, la micrognatia y otras

(Connell y cols, 1985; Reece y cols, 1993; Rivera-Rueda y cols, 1993). Las malformaciones más comunes del sistema cardiovascular son una cardiopatía compleja y persistencia del conducto arterioso (Moreno-Ruiz y cols, 1988; Rivera-Rueda y cols, 1993). Como anomalías del sistema esquelético se ha reportado como más frecuente a la regresión caudal (Ramírez-Torres y cols, 1992) y malformaciones múltiples (Moreno-Ruiz y cols, 1988; Ramírez-Torres y cols, 1992; Rivera-Rueda y cols, 1993). Recientemente, se demostró que las mujeres con diabetes tipo 2 son igualmente susceptibles a tener neonatos con malformaciones que las mujeres diabéticas tipo 1 (Towner y cols, 1995).

Por otra parte, es frecuente encontrar en embarazos diabéticos, neonatos pequeños para la edad gestacional (PEG), ocasionados por diabetes mellitus de larga duración, asociada con cardiopatía y nefropatía diabéticas, tanto de mujeres diabéticas tipo 1 como tipo 2 (Rivera-Rueda y cols, 1993; Pearson, 1993).

Como resultado de un inadecuado control de la diabetes mellitus durante el desarrollo embrionario temprano, existe un retraso de éste, lo que origina un desarrollo fetal alterado (Pedersen y Mølsted-Pedersen, 1979, 1981). También se encontró por ultrasonografía, en embarazos de mujeres diabéticas cuyo control inició antes de la gestación o a partir de las semanas 7 a 13, que no existe relación entre el grado de retraso del crecimiento temprano con el crecimiento fetal (Mulder y Visser, 1992). Además, aunque un feto que se desarrolla en un ambiente metabólico anormal puede estar en riesgo elevado para manifestar retraso de crecimiento y malformaciones, no se ha encontrado que exista una relación entre ambas alteraciones del desarrollo (Reece y cols, 1996b). Estudios recientes sugieren que el retraso del desarrollo reportado por Pedersen y Mølsted-Pedersen (1979,

1981) pudiera no existir, y que la discrepancia entre desarrollo esperado y desarrollo observado pudiera ser debido a una estimación incorrecta de la fecha de ovulación (Steel y cols, 1995).

EL EMBARAZO DIABÉTICO COMO EXPERIMENTO NATURAL

Freinkel y Metzger (1979) propusieron que el desarrollo y crecimiento embrionarios son una "experiencia de cultivo de tejidos". Posteriormente, Freinkel (1980) propuso que un ambiente intrauterino anormal resulta en "teratogénesis mediada por energéticos maternos". Así, la embriopatía diabética resulta de las anomalías en el metabolismo materno durante las primeras seis o siete semanas de la gestación (Freinkel, 1980), mientras que la fetopatía diabética resulta de la sobrenutrición y la hiperinsulinemia durante el segundo y tercer trimestres (Buchanan y Kitzmiller, 1994).

Como ya se mencionó, el estado de deficiencia de insulina propio de la diabetes es agudizado por los efectos antiinsulínicos de las hormonas placentarias (Reece y cols, 1994; Zárate y cols, 1978); ya que inducen la movilización de ácidos grasos, la producción de glucosa a partir de aminoácidos y la resistencia de los tejidos periféricos a los efectos de la insulina (Reece y cols, 1994). Es bien sabido que en la diabetes mellitus existen hiperglucemia, glucosuria, y a menudo cetosis, en mujeres gestantes o no (Buchanan y Kitzmiller, 1994; Reece y cols, 1994; Genuth y cols, 1983; Felig y Coustan, 1991).

Adicionalmente, durante el embarazo de mujeres diabéticas se ha encontrado un aumento en la proporción de hemoglobina glucosilada (HbA₁C) (Artal y cols, 1984), y se ha propuesto que dicho aumento puede ser considerado como factor de riesgo (Wyse y cols,

1994), aunque otros reportes indican que el valor de la glucohemoglobina como predictor de riesgo puede no ser tan real (Brustman y cols, 1987).

En el embarazo diabético también se han encontrado una cantidad anormalmente elevada de fructosamina en la sangre materna (Roberts y Baker, 1987); una disminución de colesterol plasmático total y unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL), en particular a la HDL₃ (Knopp y cols, 1993); un aumento en los productos de lipoperoxidación y actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos maternos (Carone y cols, 1993); así como una disminución de α -fetoproteína a lo largo de la gestación (Henriques y cols, 1993). Esta disminución parece estar correlacionada con un bajo índice de crecimiento intrauterino, así como con la aparición de malformaciones, de manera que ha sido propuesta como una medida de pronóstico y riesgo (Reece y cols, 1996b).

Estas alteraciones deben tener su contraparte en los parámetros bioquímicos de la sangre fetal y/o el líquido amniótico. En éste, se ha encontrado que la cantidad de α -fetoproteína disminuye a lo largo de la gestación en mujeres diabéticas embarazadas (Henriques y cols, 1993), y que la concentración de la insulina y el IGF-I es similar a la de líquido amniótico de gestaciones normales (Delmis y cols, 1992).

En la sangre fetal se han realizado pocos estudios, debido principalmente a impedimentos técnicos, pero por cordocentesis se encontró recientemente que en embarazo a término, 24 h antes del parto inducido, hay una menor concentración de insulina y una más baja relación insulina/glucosa en la sangre de los fetos de madres diabéticas con respecto a los fetos de madres normales (Salvesen y cols, 1993). Si se asume que el metabolismo neonatal es continuación del metabolismo fetal (Kalhan, 1993), se puede aseverar que las

determinaciones realizadas en la sangre de cordón umbilical (SCU) de los neonatos de madres diabéticas (NMD) son reflejo del estado intrauterino. En SCU de NMD mal controladas se encontró una mayor cantidad de insulina, péptido C y proinsulina que en la de neonatos de madres sanas o de gestación diabética bien controlada (Hampton y cols, 1994). En SCU de NMD hay una menor concentración de péptido C, pero no hay diferencia en el glucagón, el enteroglucagón y el GIP, con respecto a los neonatos normales (Knip y cols, 1993). Los NMD muestran una concentración de Hb mas elevada (Mayhew y cols, 1993), menor concentración de IGF-I, y mayor de hGH (50), y mayor frecuencia de hipocalcemia e hipomagnesemia (Demarini y cols, 1994).

Como un intento de diagnosticar precozmente la propensión a la diabetes mellitus, se tomo SCU de neonatos hermanos de diabéticos, y se comparó con la de neonatos sanos, pero no se encontró diferencia en las concentraciones de glucosa, *mio*-inositol, péptido C y proinsulina entre ambos grupos (Lindgren y cols, 1993).

Si se asume que el metabolismo neonatal es continuación del fetal (Kalhan, 1993), los estudios realizados en NMD durante el primer dia de vida reflejan el estado intrauterino. Bajo esta consideración, se ha encontrado que los NMD muestran una capacidad de ureogénesis y glucemia basal similares a los sanos (Kalhan y cols, 1993), y que tienen similar capacidad de estimular la gluconeogénesis y glucogenólisis que los neonatos sanos (Baarsma y cols, 1993).

DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL

Para la investigación de la diabetes mellitus se han utilizado estudios clínicos, familiares y poblacionales en la especie humana. Adicionalmente, se han empleado modelos animales de la enfermedad. La diabetes mellitus puede producirse en animales de manera espontánea o ser inducida con diferentes fármacos (Mordes y Rossini, 1981).

La diabetes mellitus se puede presentar espontáneamente en varios animales. Se ha documentado en los monos, los perros, los gatos, los delfines, los roedores, los animales de granja y hasta en especies de aves y peces. En algunas cepas de ratas y ratones, el padecimiento es determinado genéticamente, y en otras, existe predisposición genética, siendo favorecida la manifestación de la enfermedad por las condiciones ambientales (Mordes y Rossini, 1981).

Para inducir la diabetes en animales experimentales, se han utilizado diversos agentes químicos. De estos, se pueden distinguir tres grupos: los fármacos con citotoxicidad específica sobre las células β ; las sustancias que actúan sobre las células β sin destruirlas, y los agentes que aumentan los requerimientos endógenos de insulina. Los fármacos más empleados, la aloxana y la estreptozotocina (STZ), son del primer tipo (Mordes y Rossini, 1981; Shafir, 1990; Méndez y Ramos, 1994).

La aloxana se une con elevada afinidad a la membrana plasmática de las células β , ocasiona alteraciones de su permeabilidad y finalmente necrosis. Se sabe que la vida media de la aloxana en condiciones fisiológicas (37°C, pH 7.4) es de 0.9 minutos (Patterson y cols, 1949), por lo que se ha pensado que su producto, el ácido dialúrico, sea el agente diabetógeno. La STZ también se fija a la membrana plasmática de las células β , y es

probable que sea por unión a receptores específicos. Se cree que provoca disminución de los niveles intracelulares de NAD (Ramos y Méndez, 1994).

MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA DIABETES MELLITUS DURANTE LA GESTACIÓN

Para estudiar la diabetes mellitus durante la gestación, el investigador ha tomado ventaja de los modelos animales. Esta estrategia ha consistido en inducir la diabetes en animales antes de la fertilización o después de ésta, y en observar las malformaciones fetales y las alteraciones del metabolismo materno, fetal o ambos. Se utilizan fármacos para inducir la diabetes, ya que las cepas de ratas que muestran alteraciones parecidas a la diabetes tipo I, durante la gestación aparentemente mejoran su metabolismo, y la incidencia de malformaciones o de efectos deletéreos para la progenie no es mayor que la observada en las cepas de ratas sanas (Kaufmann y cols, 1991).

Sin embargo, a pesar de que se ha utilizado desde hace muchos años la aloxana para inducir la diabetes, y de que se ha estudiado el efecto de la diabetes inducida sobre los parámetros reproductivos, existen contradicciones entre autores. Se ha reportado que la administración de la aloxana a dosis de 40 mg/Kg a ratas normales antes del apareamiento causa que al momento del parto se obtengan solo placentas (Davis y cols, 1947). Otros autores han encontrado que a esta dosis, hay incapacidad de apareamiento por las ratas, pero si se aparean, la gestación no llega a término (Kim y cols, 1969).

Una dosis de aloxana de 55 mg/Kg causa falla en el apareamiento, muerte fetal, camadas con neonatos muertos, y canibalismo (Sinden y Longwell, 1949). El tratamiento de

hembras inmaduras de 30 días de edad, o de hembras púberes, de 60 días de edad, con dosis de 50 mg/Kg, provoca la pérdida del ciclo estral, y si el apareamiento ocurre, los fetos de 21 días de desarrollo pueden pesar hasta un gramo menos que los de madres normales (Lawrence y Contopoulos, 1960). Se ha reportado que una dosis de 25 a 30 mg/Kg antes del apareamiento causa un estado de “subdiabetes”, sin afectar los parámetros reproductivos de la hembra, aunque los pesos de los neonatos se incrementan y hay una disminución de la viabilidad (Lazarow y cols, 1960). Es posible que este régimen cause un estado similar al de la DMG humana.

Por otro lado, cuando la diabetes severa se induce mediante pancreatectomía subtotal (95%) la habilidad de aceptar al macho se pierde (Foglia y cols, 1963). Se ha observado que dosis de aloxana de 140 a 175 mg/Kg causan pérdida de la capacidad de apareamiento, y si este ocurre, las gestaciones no llegan a término (Levi y cols, 1949). Dosis de aloxana de 75 o 150 mg/Kg causan profundos cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario en las ratas prepúberes, de 35 días de edad (Howland y Zebrowski, 1974), que podrían ser la causa de la pérdida de capacidad reproductiva observada por otros autores.

Es probable que las alteraciones reproductivas observadas en las ratas diabéticas sean causadas por una pérdida del soporte hormonal requerido para los cambios tisulares propios del endometrio, necesarios para la función reproductiva normal (Garris, 1988), aunque hay evidencias de que la diabetes afecta la respuesta uterina a las hormonas esteroides, sin afectar los cambios cíclicos de éstas (Piyachaturawat y cols, 1984). Por otro lado, también se ha reportado que en los ratones NOD machos y hembras diabéticos, la incidencia de anomalías cromosómicas es mayor que en los ratones no diabéticos, sean estos intactos o

tratados con aloxana; y que esta condición causa una conducta cromosómica anómala durante la meiosis, por lo que es probable que las malformaciones posean una base génica (Wauben-Penris y Prins, 1983).

Con respecto a la inducción diabética una vez que se ha dado la fertilización, Angerwall (1959) provocó diabetes con aloxana a dosis de 100 mg/Kg, el día 1 de desarrollo, para obtener un elevado porcentaje de pérdida de la gestación, en ratas a término. Otros autores encuentran daño a la neurulación o al SNC, siguiendo otros esquemas de administración de la aloxana. Así, hasta 28% de anormalidades se han reportado cuando se produce diabetes mediante administración de aloxana el día cuatro de desarrollo, a dosis de 80 mg/Kg en ratonas preñadas (Horii y cols, 1959). También se ha reportado que la inyección de aloxana a dosis de 160 mg/Kg el día 7, causa elevada frecuencia de malformaciones en SNC de ratas y ratones (Takano y Nishimura, 1966). Una dosis de 100 mg/Kg los días 8.5 al 13.5 causa gran mortalidad embrionaria y una elevada frecuencia de paladar hendido, siendo menor el efecto cuando el aloxana se administra en estados más avanzados de desarrollo (Watanabe e Ingalls, 1963); y la dosis de 60 mg/Kg al día 9 causa una elevada proporción de malformaciones del SNC (Deuchar, 1977), caracterizadas por retardo en el cierre de neuroporos. Sin embargo, tanto Watanabe e Ingalls (1963) como Deuchar (1977), no reportan los valores de glucemia alcanzados por el tratamiento.

En otros estudios, en los que se ha inducido diabetes con aloxana, se enfatiza sobre los defectos ocasionados por la diabetes mellitus en el desarrollo óseo. Así, Ellison y Maren (1972) reportan que la producción de diabetes el día 2 en ratas gestantes causa ausencia de

costillas y vértebras fetales, mientras que Wilson y cols (1985) reportan que por administración de aloxana el día 6 en ratas gestantes, se reduce el número de centros de osificación caudales y esternales en los fetos. En estudios utilizando STZ, se encontró que los fetos de 18, 20 y 22 días de desarrollo intrauterino muestran malformaciones gruesas, tales como disgenesia sacral y *omphalocele*, con una mayor frecuencia que los fetos de ratas control, y que el tratamiento con insulina revierte la severidad y frecuencia de los daños fetales (Eriksson y cols, 1982, 1985).

Recientemente, Kalter (1996) ha revisado los estudios realizados *in vivo*, tanto los llevados a cabo con aloxana como los llevados a cabo con STZ, determinando que en muchas ocasiones se confunde el retraso del desarrollo con malformaciones, y que, particularmente en el caso del sistema óseo, éste es tan heterogéneo aún en ratas normales, que difícilmente puede hablarse de teratogénesis cuando se encuentra variabilidad en el número de vértebras o costillas.

Por otra parte, para estudios de teratogénesis, también se ha utilizado el cultivo de embriones de roedores, y se altera el medio en el cual estos se desarrollan. Con el uso de esta estrategia, muy tempranamente se demostró que el suero de las ratas diabéticas tiene efectos teratogénicos durante la neurulación (Sadler, 1980a), y se ha atribuido las propiedades teratogénicas del suero a la glucosa, los cuerpos cetónicos y los "inhibidores de las somatomedinas". Más de quince años después, aún se mantienen los mismos factores sospechosos bajo la lupa (Reece y Eriksson, 1996).

PAPEL TERATOGENICO DE LA HIPERGLUCEMIA

Una concentración elevada de glucosa en el medio de cultivo de embriones de rata de 9.5 días durante 48 h causa una gran incidencia de malformaciones, y la mayoría de ellas involucra daño neural, efecto que no es mimetizado por la fructosa, la galactosa, el sorbitol o el *mio*-inositol (Freinkel y cols, 1986) pero sí por la manosa (Freinkel y cols, 1984).

La exposición *in vivo* a elevadas concentraciones de carbohidratos da como resultado una elevada incidencia de malformaciones en varios mamíferos y aves (Eriksson y cols, 1987; Gale, 1991). Estudios *in vitro* han mostrado que los efectos teratogénicos de la glucosa son dependientes de la dosis y la edad (Cockroft y Coppola, 1977; Sadler, 1980b).

Durante el desarrollo embrionario, existen cambios en las contribuciones relativas de las vías metabólicas a la obtención de energía. Así, en el cigoto, 97% de la energía es aportada por el ciclo de Krebs y el resto por la glucólisis, mientras que en estado de blastocisto, un 50% de la energía la aporta la glucólisis, y el otro 50% el ciclo de Krebs (Clough, 1985). Estudios recientes indican que la glucólisis es la vía más activa en los blastocistos de rata, y que es similar en los blastocistos de rata normal y diabética (Dufrasnes, 1993). Así pues, teóricamente, en estos estadios la hiperglucemia no debe inducir daño embrionario.

Sin embargo, se demostró que en ratona, la inducción diabética con aloxana o STZ, antes del apareamiento reduce la capacidad de ruptura de la vesícula germinal (Diamond y cols, 1989), evento que normalmente sucede pocas horas después de la entrada del espermatozoide al ovocito. Además, el número de estructuras unicelulares y bicelulares que

se recuperan dos días después del apareamiento es menor que en ratonas no tratadas (Diamond y cols, 1989).

Con objeto de demostrar que el efecto no era debido al fármaco diabetógeno sino al estado de hiperglucemia que se induce, se ha probado el efecto de un medio con elevada concentración de glucosa, y se encontró que existe un aumento en la frecuencia de retraso de desarrollo después de 72 h en cultivo (Diamond y cols, 1990). Posteriormente, el mismo grupo reportó resultados similares obtenidos al recuperar embriones a varios tiempos después de la fertilización, de ratonas NOD diabéticas, no diabéticas y diabéticas tratadas con insulina, en los que vieron que existía un alto porcentaje de falla de desarrollo entre la etapa de embriones bicelulares hasta blastocistos expandidos, en el primer grupo, con respecto al testigo, y que la administración de insulina previene hasta en 90% los defectos (Moley y cols, 1991).

Por otra parte, recientemente, se reportó que la administración de STZ a ratas el día de la concepción induce una disminución del número de embriones por útero, observado cuatro y cinco días después, y un retraso en la proliferación celular, más acentuado en el macizo celular interno que el trofoblasto (Pampfer, 1990), y que la insulina evita este daño (De Hertog y cols, 1992). Adicionalmente, se demostró que el daño temprano al blastocisto de rata en etapa de preimplantación no es revertido por posterior incubación en medio normal (Pampfer y cols, 1994).

Cuando se induce diabetes una, dos o tres semanas antes del apareamiento, con STZ, se observa retraso del desarrollo temprano, evaluado por la proporción de embriones en estado de blastocisto y de mórula el día cinco de desarrollo, y los blastocistos poseen menos

núcleos que los de rata normal. Además, los embriones recuperados aparentemente son menos maduros y están menos desarrollados (Vercheval y cols, 1990). Al parecer, esto es debido a que los embriones de ratas diabéticas expresan niveles más elevados de TNF α que los de ratas controles. La expresión de este factor es dependiente del estado de hiperglucemia (Pampfer y cols, 1997). En apoyo a esto, se encontró que la inmunoestimulación aumenta la tolerancia de ratonas hembras a los efectos teratogénicos de la diabetes (Torchinsky y cols, 1997).

En embriones de ratón, se encontró que el estado diabético induce retraso del desarrollo embrionario en la fase preimplantacional, después del estado bicelular (Beebe y Kaye, 1991). El estado diabético o subdiabético no afectan la ovulación, la fertilización o la primera división de segmentación, pero el desarrollo se ve comprometido al menos hasta la etapa octocelular, ya que muchos de los embriones muestran retraso del desarrollo o degeneración (Veselá y cols, 1994).

Durante la gastrulación y la neurulación, un 95% de la glucosa se convierte a lactato, 0.2% se oxida por completo en el ciclo de Krebs, y 2% se convierte a pentosas (Hunter y Sadler, 1987). De tal forma, en estos estadios, alteraciones del metabolismo de carbohidratos, como la diabetes mellitus, pueden afectar el crecimiento y el desarrollo. Así pues, se ha encontrado que tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia pueden ser teratogénicos para los embriones en cultivo.

Además, el daño causado por la hiperglucemia no se limita solamente a etapas preimplantacionales: se demostró que embriones de rata, de 9 días de edad gestacional, de madres diabéticas, muestran una elevada incidencia de malformaciones cuando se cultivan

por 48 h, mientras que los embriones de madres sanas de día 10 de gestación, no son afectados por elevadas concentraciones de glucosa en cultivo, lo que sugiere que los embriones de rata son muy sensibles en etapas muy tempranas del desarrollo (4-8 somitas) a desafíos teratogénicos (Menegola y cols, 1995).

En cultivos de embriones, para que el exceso de glucosa sea teratógeno, se requiere que sea de seis a ocho veces la concentración normal (Cockroft y Coppola, 1977; Hunter y Sadler, 1987). Las anomalías más comunes son el retraso del desarrollo y los defectos de cierre de tubo neural. Utilizando este sistema, se ha encontrado que el saco vitelino es clave en el desarrollo, ya sea este normal o alterado, debido a que este anexo embrionario, cuya función en roedores está relacionada con los mecanismos de transporte y almacén de nutrientes (Sadler y cols, 1993), se halla malformado tanto a nivel grueso como ultraestructural (Pinter y cols, 1986). También se sabe que existe una ventana crítica para que la hiperglucemia induzca daños. Esta ventana crítica es cercana a la neurulación (Reece y cols, 1996b).

Adicionalmente, se ha encontrado que el transportador 1 de glucosa (GLUT-1) se expresa en grandes cantidades en las células neuroepiteliales del tubo neural, así como en el saco vitelino, los días 9.5 a 12.5. Altas concentraciones de glucosa no causan disminución de la expresión del transportador, lo que sugiere que la carencia de regulación del GLUT-1 por un exceso de glucosa pudiera jugar un papel importante en la dismorfogénesis, particularmente durante el desarrollo del tubo neural (Trocino y cols, 1994).

Los mecanismos probables por los cuales la hiperglucemia manifiesta sus efectos deletéreos pueden ser alteración del metabolismo de ácido araquidónico y prostaglandinas,

alteración del metabolismo de *mio*-inositol y aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Reece y Eriksson, 1996).

Alteración del metabolismo del *mio*-inositol.

La demostración de que la inhibición de la acumulación de sorbitol sin impedir la disminución de *mio*-inositol endógeno por embriones de rata de 9.5 días en cultivo por 48 h no revierte los efectos teratológicos (Hod y cols, 1986), originó la hipótesis de que la hiperglucemia induce alteraciones del metabolismo del inositol como parte de los mecanismos teratogénicos. Con respecto a esto, se ha comprobado que la glucosa inhibe la captura de inositol por el embrión de rata de 10.5 días de gestación en cultivo, de manera competitiva (Weigensberg y cols, 1990).

La suplementación con *mio*-inositol al medio hiperglucémico restaura la captura de este azúcar-alcohol por el embrión de rata de 9.5 días de gestación en cultivo, (Hashimoto y cols, 1990) y revierte la dismorfogénesis inducida por la hiperglucemia, en embriones de rata de 8.25 días cultivados por 48 h (Baker y cols, 1990). En apoyo a esto, se demostró que el tratamiento con insulina o la suplementación de *mio*-inositol en la dieta de ratas diabéticas gestantes restaura el contenido normal del metabolito en los embriones y evita los daños dismorfogénicos causados por el estado diabético (Akashi y cols, 1991). La suplementación de *mio*-inositol en la dieta de ratas diabéticas gestantes no afecta los niveles circulantes de ese metabolito, pero sí manifiesta un efecto protector contra las malformaciones de embriones de 12 días (Reece y cols, 1997).

Alteración del metabolismo del ácido araquidónico.

La suplementación con ácido araquidónico (AA) a un medio con elevada concentración de glucosa reduce la incidencia de defectos de cierre de tubo neural en embriones de ratón de 8.3 días cultivados 48 h (Goldman y cols, 1985), y en embriones de 10 días cultivados por 48 h (Pinter y cols, 1986). Además, la administración de AA a ratas diabéticas gestantes reduce la incidencia de defectos de cierre de tubo neural (Goldman y cols, 1985). Esto ha sugerido que la deficiencia del metabolismo del AA puede causar deficiencia en prostaglandinas (PGs). Se ha encontrado que la suplementación de PGE₂ a un medio rico en glucosa revierte parcialmente los efectos teratogénicos (Baker y cols, 1990; Goto y cols, 1992). En contraste, se demostró que secciones uterinas de rata diabética gestante en día 10 producen una cantidad de PGE₁ y PGE₂ similar a las secciones uterinas de rata normal gestante (Jawerbaum y cols, 1993), y que los embriones producen mayor cantidad de PGE₂ y PGF_{2α} que los embriones control (Jawerbaum y cols, 1994).

El estado diabético aumenta el transporte placentario de AA, pero no de ácido palmítico en embriones de ratas *in vivo*, o en embriones de rata normal incubados en medio con elevadas concentraciones de glucosa (Engstrom y cols, 1991), lo que apoya la hipótesis de que la alteración del metabolismo del AA juega un papel importante en la dismorfogénesis. En estudios *in vitro* llevados a cabo con placentas humanas a término, se encontró que la captura de ácido araquidónico fue mayor en el tejido de placentas de las madres diabéticas que en las de madres sanas (Kuhn y cols, 1990).

Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno.

La evidencia sobre el posible efecto teratológico de las especies reactivas de oxígeno proviene de los hallazgos de que la adición de la superóxido dismutasa al medio de cultivo de embriones de 9 días por 48 h en un medio conteniendo altas concentraciones de glucosa, piruvato o β -hidroxibutirato revierte los efectos dismorfogénicos que dichos metabolitos causan (Eriksson y Borg, 1991a), y que la adición del inductor enzimático citiolona o las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPx) al medio con elevada concentración de glucosa evita la aparición de malformaciones en embriones de rata de 9 días de gestación en cultivo (Eriksson y Borg, 1991b). De esta manera, una combustión inadecuada de la glucosa o de otros energéticos pudiera causar una producción incrementada de especies reactivas de oxígeno, la que a su vez afecta de manera directa al metabolismo de las prostaglandinas, causando la dismorfogénesis (Eriksson y cols, 1991). La adición de SOD y N-acetilcisteína a los embriones de rata en cultivo reduce la teratogenicidad del suero de rata diabética (Wentzel y cols, 1997).

En embriones de 10 días de gestación, producidos por la cruce de ratones macho y hembra transgénicos para la enzima CuZnSOD humana, y sometidos *in utero* a condiciones diabéticas, la expresión de malformaciones y la frecuencia de reabsorciones son menores que en embriones producidos por cruce de ratones no transgénicos, sometidos a condiciones diabéticas; y muy similar a la expresión de malformaciones y la frecuencia de reabsorciones que los embriones de madre no diabética. Además, los embriones transgénicos provenientes de las madres diabéticas no presentaron el retraso de desarrollo que fue observado en los

embriones no transgénicos, de madres diabéticas. Estos resultados indican que la enzima CuZnSOD protege contra los efectos nocivos de la diabetes (Hagay y cols, 1995).

En embriones de 9.5 días de desarrollo incubados *in vitro* por 48 h, se encontró que la exposición a altas concentraciones de glucosa causa un aumento en la aparición de malformaciones, un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, y una disminución de la concentración de glutatión (GSH) y de la actividad de γ -glutamylcisteinil-sintetasa (enzima de la vía de síntesis de GSH), mientras que la suplementación de S-metil-GSH restaura los niveles de GSH, reduce la producción de las especies reactivas y protege a los embriones de la dismorfogénesis. De esta manera, parece ser que la protección celular mediada por GSH tiene un papel central en la morfogénesis durante la neurulación (Trocino y cols, 1995).

Por otra parte, en embriones de ratas diabéticas, de 11 días de gestación, hay un contenido menor de GSH con respecto a los embriones de ratas testigos, mientras que en el saco vitelino, la cantidad del tripéptido aumenta, lo que podría indicar alteración del mecanismo de transporte de esta molécula desde el saco vitelino hasta el embrión (Menegola y cols, 1996).

Con el objeto de estudiar si la hiperglucemia provoca disminución del metabolismo aeróbico en células de embriones de rata, como sucede en otros sistemas, se incubaron embriones de 10 y 11 días de rata sana en presencia de medio con concentración normal de glucosa, o con concentraciones elevadas, por ocho horas, y se demostró que la morfología de las mitocondrias de las células del neuroporo anterior de embriones incubados en el primer medio son circulares en sección transversa, con matriz clara y crestas de 45 nm de

ancho (tipo II), mientras que el medio alterado provoca que las mitocondrias muestren una sección transversa alargada, matriz oscura y ancho promedio de crestas de 80nm (tipo I), lo que indica alteraciones de la estructura mitocondrial por efecto de la diabetes (Finley y Norton, 1991).

Posteriormente, se encontró que embriones de rata diabética, de 9, 10 u 11 días de gestación, las células ectodérmicas muestran a nivel ultraestructural, gran diferencia con respecto a las células de embriones de ratas sanas. Las mitocondrias son largas, esféricas, de matriz pálida y crestas anormales. En cultivo de embriones de 9 días de gestación por 48 h, las mitocondrias de las células ectodérmicas de embriones sometidos a elevadas concentraciones de glucosa o piruvato muestran alteraciones similares a las observadas *in vivo*, mientras que las mitocondrias de las células ectodérmicas de embriones incubados en presencia de β -hidroxibutirato o α -cetoisocaproato son enormes e irregulares, de matriz muy pálida. Sin embargo, en los fetos de 15 días de gestación no se observaron anomalías en las mitocondrias del hígado, el cerebro o el corazón. El hecho de que la morfología mitocondrial responda a las alteraciones metabólicas sólo durante la fase de neurulación y organogénesis temprana sugiere un papel de esos organelos en la teratogenicidad diabética, quizá por un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (Yang y cols, 1995).

Sivan y cols (1997) encontraron que la actividad de la SOD es menor en los embriones de rata de 11.5 días de gestación anormales, ya sean de madres diabéticas o sanas, con respecto a sus pares normales, de madres diabéticas o sanas, y que la variable asociada con la disminución de la actividad enzimática no era el estado diabético sino la presencia del daño a nivel de tubo neural, mientras que, aunque hay disminución de la

actividad de la GPx en los embriones malformados de madres sanas con respecto a sus pares normales, no hay relación entre la alteración de la actividad enzimática con el estado diabético o la presencia de malformaciones, y que en el caso de la CAT, la actividad enzimática disminuye, asociada al estado diabético materno. En general, parece que el estado diabético no afecta las actividades de las enzimas depuradoras (CAT, SOD, GPx), sino las cantidades presentes de especies reactivas de oxígeno.

222484

En contraste, con la utilización de dos sub-líneas de ratas, una con elevada frecuencia de malformaciones cuando son inducidas a diabetes, y la otra con baja frecuencia, se demostró que en los embriones de la segunda sub-línea de 11 días de gestación, y en sus correspondientes membranas, hay una actividad de CAT superior, de manera que existe una correlación inversa entre la actividad de la enzima y el riesgo de dismorfogénesis (Cederberg y Eriksson, 1997).

PAPEL TERATOGENICO DE LA HIPOGLUCEMIA

La hipoglucemia puede ser aún más devastadora para el crecimiento que la hiperglucemia. Esto es de gran importancia en la medicina, ya que el tratamiento moderno con insulina puede causar episodios hipoglucémicos (Gabbe, 1985; Rosenn y cols, 1995a,b), aunque en humanos, los estudios disponibles (generalmente retrospectivos) no apoyan que exista una relación entre la frecuencia o número de episodios hipoglucémicos con la frecuencia de malformaciones o el retraso del crecimiento fetal (Reece y Eriksson, 1996b).

El primer indicio en animales fue el hallazgo de que una inyección de insulina o tolbutamida a ratonas gestantes el día 9, causó una elevada frecuencia de malformaciones,

sobre todo en el sistema esquelético (Smithberg y Runner, 1963), y se propuso que tanto la tolbutamida como la insulina eran teratógenos.

Hasta iniciada la década de los 80s, se encontró por experimentos *in vitro* que la insulina no posee papel teratogénico *per se*, sino que al parecer, tal efecto era mediado por la hipoglucemia que ocasionalmente causa (Sadler y Horton, 1983). Casi simultáneamente, el grupo de Freinkel demostró que la manosa inhibe el desarrollo de embriones en cultivo, por lo que postularon que durante la etapa de neurulación, el aporte de glucosa y su utilización por la vía glucolítica, es clave para el desarrollo normal embrionario, y que la alteración del desarrollo pudiera ser explicada por defecto de la utilización de glucosa, cuyo papel es clave en el metabolismo energético (Freinkel y cols, 1984).

Posteriormente, en embriones de 8 días de edad, cultivados con concentraciones bajas de glucosa, de 60 a 110 mg/dL durante 24 h, seguida por la incubación por 24 h en un medio con concentraciones normales de glucosa (120-150 mg/dL), se encontraron altos índices de malformaciones. Los defectos encontrados incluyen retraso del desarrollo, falta de rotación, primordios ópticos dismórficos y cierre cardiaco incompleto. Cuando la incubación fue de embriones de 9 días durante 2 a 24 h en medio con concentraciones bajas de glucosa, se demostraron deficiencias en la rotación, el latido cardiaco, la circulación, el número de somitas y defectos de cierre de tubo neural, así como otros defectos menores, siendo mayor la respuesta a menor concentración del azúcar y/o a mayor tiempo de exposición (Smoak y Sadler, 1990).

En el caso de embriones de 9 días de edad en cultivo, la incubación en un medio deficiente en glucosa (40-80 mg/dL) durante 28 horas causa una elevada incidencia de

malformaciones, que dependen de la dosis: a menor concentración de glucosa, mayor presencia de malformaciones. Este estado de desarrollo es análogo a los días 19-28 del desarrollo humano, que corresponde a la etapa de neurulación (Sadler y Hunter, 1987).

Los embriones de rata de 9.5 días de edad, cultivados por 48 h en medio con baja concentración de glucosa (40-45 mg/dL) muestran una elevada frecuencia de lesiones neurales y retraso del desarrollo, mientras que los embriones cultivados el mismo tiempo en medio normal son similares a los de 11.5 días de edad *in vivo*. Resultados similares se han observado por incubación durante 24 h en un medio deficiente seguido por 24 h en un medio normal, mientras que el tratamiento inverso causa retraso leve del desarrollo. Sin embargo, embriones de 10.5 días de edad incubados en un medio deficiente no desarrollan malformaciones (Akazawa y cols, 1987). La incubación de los embriones de 9.5 días de gestación por 24 ó 48 h en presencia de un medio con baja concentración de glucosa (40-45 mg/dL) causa disminución de la longitud cefalocaudal, un menor número de somitas y contenido de proteína más bajo que los embriones cultivados en un medio normal. Adicionalmente, se observan microcefalia y lesiones dismórficas (Ellington, 1987).

Con el uso de infusión de insulina, en ratas normales el día 9.5 ó 9.75 de desarrollo embrionario, se han inducido episodios hipoglucémicos (40-60 mg/dL) de una hora de duración, y en los embriones de día 11.6, se encontró que la hipoglucemia causa en los embriones un retraso generalizado del crecimiento, defectos de cierre de tubo neural, defecto de formación de vesículas cerebrales, así como rotación axial y diferenciación cardíaca anormales, con respecto a un testigo infundido con glucosa y a un testigo intacto.

En algunos casos se encontró además alteración del desarrollo de somitas y/o neuroporo posterior abierto (Buchanan y cols, 1986).

La exposición de los embriones de 9.7 días en cultivo, a 1 h de baja concentración de glucosa (40-45 mg/dL) el día 10.3 de gestación, causó predisposición a la aparición de malformaciones inducidas por concentraciones elevadas (600 mg/dL). La incubación en un medio con elevada concentración de glucosa sin previa exposición a medio deficiente no produjo malformaciones neurales, y sólo se observó una baja proporción de daños extraneurales (Akazawa y cols, 1989).

Cuando las ratas sanas o diabéticas se infundieron con insulina el día 9.5 ó 10.5, durante al menos una hora, se alcanzó un nivel de glucosa sérica cercano a 60 mg/dL, pero no se encontraron malformaciones en los embriones de 11.6 de desarrollo, aunque se observó retraso del desarrollo embrionario (Kawaguchi y cols, 1994).

La infusión de insulina el día 10.5 de desarrollo embrionario a ratas diabéticas gestantes produce concentraciones de glucosa sérica de 40 a 65 mg/dL, y en los fetos de día 20, se observó una elevada frecuencia de malformaciones esqueléticas que incluyen aparición de costillas supernumerarias, fusión de costillas, hipoplasia de arco vertebral, fusión de cuerpos vertebrales, retraso de osificación, bifurcaciones, fusiones y traslape de cartílagos. La frecuencia es menor en las ratas diabéticas infundidas con solución salina, y está dentro del intervalo de malformaciones espontáneas de esta especie. Cuando la infusión se realizó el día 9.5, la frecuencia de malformaciones no fue diferente entre ambos grupos (Tanigawa y cols, 1991).

Si se realiza infusión de insulina a ratas por una hora el día 10.6 de desarrollo, se induce un episodio hipoglucémico (40-60 mg/dL). Sin embargo, la frecuencia de las malformaciones es similar a la de ratas infundidas con salina, y cae dentro de la frecuencia espontánea de malformaciones. Al parecer, este efecto es debido a que a esta edad gestacional, los embriones son menos susceptibles al daño teratogénico comparados con los embriones de menor edad gestacional (Buchanan y Sipos, 1989). Estos resultados concuerdan con otras observaciones (Akazawa y cols, 1987), en las que se demostró que después del día 10.5 de desarrollo, no hay efecto de la hipoglucemia sobre el desarrollo embrionario.

PAPEL TERATOGENICO DE LOS CUERPOS CETONICOS

La cetoacidosis es una de las complicaciones metabólicas más comunes en la diabetes humana mal controlada. Esta complicación se debe a la deficiencia de insulina en todo el sistema. El tejido adiposo, en respuesta a catecolaminas, libera una gran cantidad de ácidos grasos a la sangre. El aumento en el cortisol y el glucagón, promueve asimismo un aumento en la lipólisis y la utilización de ácidos grasos, dando como consecuencia que el hígado produzca cantidades elevadas de los cuerpos cetónicos: β -hidroxibutirato y acetoacetato. Además de lo anterior, hay una disminución de la capacidad muscular para utilizar estos cuerpos cetónicos. A causa de la acumulación de los cuerpos cetónicos en sangre, la concentración iónica en los fluidos aumenta, y el pH disminuye. Los cuerpos cetónicos se eliminan por la orina gracias a que son neutralizados con el bicarbonato, lo que origina una carencia de este amortiguador y un empeoramiento de la cetoacidosis (Hagay, 1994).

En humanos, la frecuencia de episodios cetósicos durante el embarazo se ha asociado con una alta morbimortalidad perinatal y retraso mental (Churchill y cols, 1969; Hagay, 1994), pero no hay evidencia de que jueguen un papel importante en la muerte embrionaria o fetal, el retraso de desarrollo o la aparición de malformaciones (Montoro y cols, 1993). Inclusive, se ha sugerido que la cetoacidosis está más relacionada a los cambios metabólicos del embarazo que a la diabetes (Rodgers y Rodgers, 1991).

Sin embargo, en los roedores, la cetosis es más teratogénica que la hiperglucemia. En cultivos de embrión de rata de 9.5 días por 48 h, la suplementación del medio con β -hidroxibutirato causa defectos del desarrollo (Lewis y cols, 1983; Sheehan y cols, 1985). Recientemente, se encontró que el suero de ratas diabéticas tratadas con insulina es incapaz de inducir malformaciones en embrión de ratón de 9.5 días en cultivo, mientras que este tipo de suero suplementado con β -hidroxibutirato sólo o en presencia de glucosa causa una frecuencia y gravedad de daños similares a las causadas por el suero de rata diabética no tratada (Buchanan y cols, 1994).

La incubación de embriones bicelulares (de 48 h de desarrollo) por 72 h en presencia de acetoacetato (10 mM), o DL- β -hidroxibutirato (16 ó 32 mM) retarda la maduración de los embriones, mientras que la adición de dosis suprafisiológicas de lactato, una mezcla de aminoácidos, glicerol o lípidos no afecta el desarrollo en cultivo (Moley y cols, 1994), lo que demuestra que la diabetes mal controlada puede afectar el desarrollo preimplantacional, y que la hiperglucemia no es el único factor responsable de las malformaciones y el retraso de desarrollo temprano observados en la asociación entre diabetes y gestación.

Adicionalmente, en cultivo de precondrocitos de embrión de rata de 12 días de gestación, se mostró que el β -hidroxibutirato reduce más que la glucosa, la incorporación de timidina tritiada, siendo mayor el efecto en células provenientes de embriones de ratas diabéticas que en las obtenidas de embriones normales (Styrud y Eriksson, 1990). Debido a que se ha postulado que los cuerpos cetónicos inhiben la utilización de la glucosa por vía de pentosas, es probable que la disminución de ribosa y desoxirribosa disponible sea la causa de que la síntesis de ácidos nucleicos y el crecimiento celular se vean alterados.

Otra hipótesis probable es que la elevación de los cuerpos cetónicos reduzca la captación de glucosa: en cultivo de células de trofoblasto humano de primer trimestre, tanto el acetoacetato como el β -hidroxibutirato disminuyen la captura del azúcar (Shubert y cols, 1996).

"INHIBIDORES DE LAS SOMATOMEDINAS"

Desde la década anterior, se ha hecho énfasis en la presencia de sustancias con actividad inhibidora del crecimiento de cartilago *in vitro*, en suero de ratas diabéticas. Estos "inhibidores de las somatomedinas" son de bajo peso molecular (cerca de 1000 Da), y se hallan en concentraciones muy bajas como para ser purificados. Son capaces de promover la aparición de las malformaciones y el retraso del desarrollo en embriones de rata en cultivo (Cockroft y cols, 1981; Sadler y cols, 1986). Los mecanismos por los cuales los inhibidores de las somatomedinas causan teratogénesis podrían ser debido a la acumulación de proteínas en el saco vitelino, por un mecanismo que no involucra la inhibición de la degradación

proteínica por enzimas lisosomales, y disminución de la capacidad pinocítica (Hunter y cols, 1991).

PROTECCIÓN

En la terapéutica médica, para el tratamiento de mujeres diabéticas gestantes se ha utilizado dieta más insulina (Felig y Coustan, 1991; Zárate y cols, 1978; Steel y cols, 1994; Barker y Fall, 1993; Hunter y cols, 1993). En modelos animales, la insulina previene muchos de los efectos teratogénicos causados por la diabetes (Portha y Picon, 1982; Triadou y cols, 1982). El trasplante de células β o islotes pancreáticos a ratas gestantes diabéticas también reduce los efectos teratogénicos (Aerts y van Assche, 1992; Gillies y Mandel, 1990; Ryan y cols, 1993, 1995).

Por otra parte, se ha demostrado también que la dieta influye la dismorfogénesis. Una dieta rica en proteínas reduce la elevada mortalidad embrionaria observada en las ratas diabéticas y reduce la incidencia de malformaciones. En contraste, una dieta normoproteínica reducida en fibra aumenta tanto la mortalidad embrionaria como la incidencia de malformaciones (Giavini y cols, 1991). Una dieta rica en proteínas o fibra puede reducir el consumo de carbohidratos en ratas diabéticas gestantes, y disminuir los efectos teratogénicos de la diabetes (Giavini y cols, 1993). El zinc, un mineral traza, parece tener efecto protector, ya que su administración a ratas gestantes diabéticas por STZ reduce las malformaciones fetales, y tiende a disminuir el elevado número de reabsorciones embrionarias causadas por el estado diabético (Uriu-Hare y cols, 1989).

La suplementación de aceite de "primavera" (rico en ácidos grasos esenciales) a ratas diabéticas gestantes causó que mostraran una hiperglucemia menor a la de ratas diabéticas con dieta estándar, así como una reversión de la disminución del peso de los neonatos (Garland y cols, 1997). Estos hallazgos apoyan la idea de que los efectos deletéreos de la diabetes sobre la gestación son debidos en parte a la alteración del metabolismo del ácido araquidónico y las prostaglandinas.

La diabetes causa incremento de las concentraciones hepáticas maternas de Cu, Zn y Mg, y renales de Cu y Zn. Una dieta baja en Cu no influencia el grado de daño al sistema esquelético causado por la diabetes. Los fetos de madres diabéticas muestran una actividad disminuída de la CuZn-SOD, y la dieta baja en Cu no afecta posteriormente esta actividad enzimática (Jankowski y cols, 1993).

En contraste, el mismo grupo reportó posteriormente que los embriones de ratas diabéticas sólo manifiestan retraso del crecimiento, mientras que los de madres con dietas bajas en Zn muestran anomalías gruesas, originadas por el aumento en la muerte celular, y los de madres con dieta baja en Cu muestran retraso del desarrollo y cerebro posterior edematoso. Estos resultados manifiestan que los mecanismos por los que la deficiencia en metales traza causa las anomalías son distintos de los mecanismos por los cuales la diabetes produce las alteraciones (Jankowski y cols, 1995).

El tratamiento de ratas diabéticas con vitamina E en la dieta bloquea la manifestación de malformaciones, reduce el índice de malformaciones y restaura el peso normal de fetos (Simán y Eriksson, 1997). Estos hallazgos apoyan el postulado de que las alteraciones del

desarrollo causadas por el estado diabético son mediadas por alteración de la economía de sistemas antioxidantes.

La suplementación en la dieta de una mezcla de un antioxidante y sustratos (vitamina E, ácido araquidónico y *mio*-inositol) a ratas diabéticas gestantes, reduce la manifestación de malformaciones en los embriones a valores similares a los observados en el grupo testigo, junto con aumento en la actividad de SOD y en concentración de la vitamina E. De esta manera, parece ser que los daños causados por la condición diabética, son de origen multifactorial (Reece y Wu, 1997).

POLIAMINAS

Las poliaminas son sustancias alifáticas, no proteínicas, de bajo peso molecular. De éstas, la putrescina, la espermidina y la espermina han sido las más estudiadas.

Las poliaminas cumplen una función importante en la regulación de diversos procesos tales como el crecimiento, la proliferación, la multiplicación y la diferenciación celulares. Estas moléculas, a semejanza de los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las proteínas, se encuentran distribuidas ampliamente en los sistemas vivientes, lo que quizás sea un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular. Las poliaminas también están presentes en tejidos de mamíferos y en fluidos corporales asociadas covalentemente con proteínas (Méndez, 1989; Persson y Heby, 1990).

En los mamíferos, incluyendo al hombre, la espermidina y la espermina están presentes en la mayor parte de los tejidos, en una concentración aproximada de 1 mM, mientras que la putrescina se encuentra en concentraciones muy bajas, excepto en los tejidos

en crecimiento o que tienen un comportamiento celular proliferativo, como es la médula osea (Tabor y Tabor, 1984).

Los niveles intracelulares de las poliaminas, particularmente espermina y putrescina, aumentan espectacularmente con el crecimiento, tanto en células normales como neoplásicas.

222484

La putrescina es el precursor de la síntesis de espermidina y espermina. En las células animales esta diamina se obtiene de la ornitina, sin embargo en las células vegetales superiores, en bacterias y hongos la putrescina se puede obtener a partir de agmatina, que a su vez es producida por la descarboxilación de la L-arginina (Tabor y Tabor, 1984).

SÍNTESIS DE POLIAMINAS

La mayoría de las enzimas que participan en la biosíntesis de poliaminas se localizan en el citosol. En los mamíferos la ornitina descarboxilasa (ODC) cataliza el paso inicial en la biosíntesis de poliaminas. Esta enzima transforma a la ornitina en putrescina. La espermidina y la espermina se forman a partir de la putrescina y la espermidina respectivamente, por la transferencia de un residuo de propilamina aportado por la S-adenosil-homocisteamina, el producto descarboxilado de la S-adenosilmetionina. Estas reacciones están catalizadas por las enzimas S-adenosilmetionina descarboxilasa, espermina y espermidina sintasas (Pegg, 1986; Pegg y McCann, 1982).

La ornitina necesaria para la síntesis de poliaminas proviene del plasma, además de que puede formarse por acción de la arginasa a partir de la L-arginina, como lo demuestra el

hecho de que durante el aumento en la síntesis de poliaminas aumenta la actividad de la arginasa (Méndez, 1989).

Hay una fuerte evidencia de que las poliaminas son esenciales para el crecimiento y proliferación celular. Los estímulos asociados con estos eventos provocan cambios en los niveles intracelulares de poliaminas, en particular aumenta el contenido de espermidina (Bethell y cols, 1982).

La actividad de la ODC, enzima reguladora de la síntesis de poliaminas, se incrementa sustancialmente el día anterior a la implantación, en útero de ratas gestantes, aparentemente en respuesta a estímulos embrionarios (Heald y cols, 1979). La administración intraluminal de DL- α -difluorometil-ornitina (DFMO), inhibidor específico de esta enzima, a ratas gestantes, un día antes de la implantación, detiene el crecimiento embrionario (Méndez y cols, 1983). La administración oral de DFMO o análogos de la putrescina, suprime el incremento en la actividad de ODC postimplantacional y retrasa el desarrollo embrionario (Fozard y cols, 1980; Mannen y cols, 1983).

L-ARGININA

La L-arginina o ácido α -amino- δ -guanidín valeriánico, es un aminoácido alifático que ha sido considerado como semiesencial para los mamíferos y las aves, ya que aún cuando lo sintetizan, también lo requieren en la dieta para mantener niveles adecuados en el organismo, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo, para sostener una síntesis activa de proteínas y para la realización de múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos (Pau y Milner, 1981). Este aminoácido sigue varios destinos metabólicos por lo que sus

niveles plasmáticos pueden detectarse bajos en un momento dado. Algunos órganos y tejidos pueden requerir de un mayor aporte de L-arginina por las funciones que desempeñan, tal es el caso del hígado y del páncreas.

METABOLISMO DE LA L-ARGININA

El metabolismo de la L-arginina ocurre por dos mecanismos que son complementarios:

1) Hidrólisis enzimática, que ocurre por acción de la enzima arginasa, no sólo en el ciclo de la urea sino también en tejidos extrahepáticos y que lleva a la formación de ornitina y urea.

2) Desaminación oxidativa, proceso por el cual se conserva el radical guanidínico y se hace posible su utilización en la síntesis de creatina y de otros productos con gran actividad biológica.

La importancia de la L-arginina se debe a que participa en varios procesos metabólicos. En primer lugar este aminoácido participa en el ciclo de la urea, donde se elimina el amoníaco formado por desaminación oxidativa de los aminoácidos, el cual es desechado en la orina en forma de urea. También participa directamente en la formación de proteínas del tejido conjuntivo, al formarse a partir de ella prolina e hidroxiprolina, aminoácidos importantes en la síntesis de colágena.

La L-arginina también es un aminoácido gluconeogénico, ya que se oxida a glutamato y éste por oxidación produce α -cetoglutarato, un intermediario de la síntesis de glucosa (Caaldi y Algranati, 1989).

La L-arginina, junto con la L-glicina y la L-metionina, participan en la síntesis de creatina, la cual es un compuesto clave para el almacenamiento de grupos fosfato en forma de fosfocreatina en músculos y nervios.

Este aminoácido también forma parte de las histonas y protaminas junto con la L-lisina, siendo las histonas H3 y H4 las que presentan la mayor cantidad de L-arginina. La función de este aminoácido en las histonas es la de dar carga positiva a estas proteínas a pH neutro, para que se puedan combinar con el DNA duplohelicoidal cargado negativamente, dando lugar a complejos DNA-histona, y de esta manera, compactar la cadena de DNA en células eucariontes.

La L-arginina interviene en la producción de poliaminas, ya que por medio del ciclo de la urea este aminoácido es hidrolizado por la enzima arginasa, formando urea y ornitina, este último es un aminoácido no proteínico que interviene en la producción de poliaminas (Caaldi y Algranati, 1989; Cunningham y Werner, 1975).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes mellitus tipo 1 incontrolada en humanos, complicada con embarazo, es causa de numerosas alteraciones, desde muerte materna y/o neonatal, hasta de retraso del desarrollo. A nivel experimental, se han empleado numerosos tratamientos con objeto de prevenir los efectos deletéreos del metabolismo incontrolado por diabetes mellitus tipo 1 sobre los productos. Dichos tratamientos incluyen transplante de células β o islotes pancreáticos a las madres diabéticas gestantes, suplementación de metales traza, sustratos o antioxidantes en la dieta, así como modificación de los porcentajes de proteínas, lípidos, glúcidos y fibra en la misma.

En cultivo de embriones, también se han utilizado estrategias similares para estudiar el desarrollo embrionario anormal, los mecanismos como éste ocurre, y las estrategias para prevenirlo.

La L-arginina es un potente secretagogo de insulina, en varias especies animales (Nogowski y Novak, 1986). También ha sido reportado que las poliaminas se hallan presentes en las células β pancreáticas, y se ha propuesto que juegan un papel importante en la secreción de insulina por éstas células (Welsh y Sjöholm, 1988).

Recientemente, nuestro grupo reportó que la L-arginina manifiesta efectos citoprotectores sobre la acción de la aloxana en el páncreas (Méndez y Arreola, 1992), y se propuso que el mecanismo podría estar mediado por las poliaminas.

Por esta razón, en este trabajo se administró la L-arginina o las distintas poliaminas a ratas gestantes diabéticas por inducción con aloxana, con el fin de verificar si es posible

evitar las alteraciones del desarrollo observadas en los productos de ratas a las cuales se les induce diabetes durante la gestación.

OBJETIVOS

1. Establecer un modelo para estudiar la interacción diabetes-gestación en rata, que permita la sobrevivencia de ratas hembra gestantes, con el fin de obtener productos.

2. Evaluar el efecto teratogénico, de retraso de desarrollo o embriotóxico, de la diabetes inducida en la rata.

3. Estudiar el efecto de la L-arginina y las poliaminas sobre la teratogénesis, el retraso del desarrollo o la embriotoxicidad causada por la diabetes inducida, en la rata.

2.1. Determinar si el tratamiento con L-arginina y poliaminas normaliza los parámetros séricos y sanguíneos alterados por la diabetes mellitus, en ratas gestantes.

2.2. Prevenir el retraso del desarrollo y la embriotoxicidad causados por la diabetes mellitus, sobre los fetos de ratas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos. La aloxana, la arginina, las poliaminas (dihidrocloruro de putrescina, trihidrocloruro de espermidina, tetracloruro de espermina), el azul de tripano, la sal sódica de β -hidroxibutirato, la β -hidroxibutirato-deshidrogenasa (de *Rhodopseudomonas spheroides*), el disulfonato de batofenatrolina, el metosulfato de fenazina, el dinucleótido de nicotinamida-adenosina y la heparina monosódica se obtuvieron de Sigma Chemical Co, Sant Louis, Mo. El NaCl, el HClO₄, el KHCO₃, el FeCl₃, el KH₂PO₄, el alcohol etílico de 96°, el ácido pícrico y el formol se obtuvieron de Merck de México o de J.T. Baker. El pentobarbital sódico se obtuvo de Innovar. Los estuches comerciales para las determinaciones de glucosa, triglicéridos, colesterol y lípidos totales fueron siempre de la mejor calidad posible. La insulina humana NPH se adquirió de Lilly Co., y las tiras reactivas HaemoGlukotest 20-800R de Lakeside de México.

Animales. Se utilizaron ratas hembra, de la cepa Sprague-Dawley, de 2 - 2.5 meses de edad, y con peso de 240-270 g, con ciclos estrales definidos, de acuerdo a las recomendaciones de otros autores para estudios de esta naturaleza (Beaudoin, 1980). Las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio Central del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, y se mantuvieron en el mismo bioterio, bajo condiciones controladas de luz (12:12), humedad y temperatura, con agua y alimentación (Purina rat chow) *ad libitum*.

Apareamiento. Las ratas se aparearon con machos sanos, fértiles, de la misma cepa, por el método de trío, y se tomó como día cero de gestación el día en que presentaron espermatozoides en el lavado vaginal. Una vez gestantes, las ratas se distribuyeron al azar en

grupos de al menos seis animales cada uno, con el fin de probar distintas dosis de aloxana en la inducción diabética, así como el tiempo de administración del fármaco y de obtención de muestras. Para probar el efecto de la L- arginina y las poliaminas sobre las alteraciones del desarrollo provocados por el estado diabético, los grupos experimentales constaron de 10 animales cada uno.

Efecto de la aloxana sobre la implantación embrionaria. Para determinar el posible efecto de la diabetes mellitus inducida por aloxana sobre la implantación embrionaria, ratas gestantes en el día cero se trataron con aloxana a dosis de 120, 140 o 150 mg/Kg de peso, i.p., o solución salina como testigo. Se seleccionaron estas dosis con base en resultados previos de investigaciones realizadas en nuestro laboratorio (Méndez y Arreola, 1992), de que estas dosis causan un estado de hiperglucemia elevada y sostenida, así como otros cambios del metabolismo, que asemejan la diabetes tipo 1 humana (Méndez y Ramos, 1984). El día cinco de desarrollo embrionario, las ratas fueron inyectadas con 1.0 mL de azul de tripano al 1% en solución salina, por la vena caudal, y entre 45 y 60 min después se sacrificaron con anestesia (0.2-0.3 ml de pentobarbital sódico i.m.). Los cuernos uterinos fueron obtenidos, para cuantificar en cada uno de ellos el número de sitios de implantación, que se visualizan de un color azul intenso a causa de la permeabilidad incrementada de esas zonas, lo que ocasiona una elevada capacidad de captura de macromoléculas, entre ellas albúmina, a la cual se adsorbe el colorante (Psychoyos, 1973).

Efecto de la aloxana sobre el desarrollo embrionario. Con el objeto de verificar el daño provocado por la diabetes inducida por aloxana sobre la neurulación, se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero de ellos, se trataron ratas gestantes el día cero con las

mismas dosis de aloxana empleadas previamente (120, 140 o 150 mg/Kg, i.p.), y un grupo testigo tratado con solución salina. Al día 8 de gestación, cuando inicia la neurulación las ratas fueron sacrificadas como se indicó (Beaudoin, 1980, Gilbert, 1993), y se obtuvo sangre por punción cardíaca. Los úteros fueron removidos, se contaron los deciduomas presentes, y se disecaron para obtener los embriones, que fueron fijados en formol al 1.5% para ser analizados al microscopio estereoscópico.

En otro experimento, se utilizaron dosis de aloxana de 80, 100, 120, 140 o 150 mg/Kg, o solución salina el día cero, y las ratas fueron sacrificadas el día 10. Se obtuvo sangre, los úteros fueron removidos y los deciduomas y/o sitios de reabsorción contados. Los embriones fueron recuperados, fijados en formol 1.5%, y posteriormente evaluados.

Efecto de la aloxana en los niveles sanguíneos de glucosa y el desarrollo fetal. Otros grupos de ratas fueron inyectados el día cero de gestación con 80, 90, 100 o 110 mg/Kg de aloxana, y se tuvo un grupo testigo (solución salina). Entre los días 0 a 18 de gestación se tomó entre las 8:00 y 9:00 h una gota de sangre de la vena caudal, y se determinó el nivel de glucosa con ayuda de las tiras reactivas y un glucómetro digital (Reflolux S, Lakeside). El día 19 de gestación se sacrificaron, como se describió anteriormente, y se recuperó el útero, en el que se contaron los fetos viables y las reabsorciones, y se obtuvo sangre para las determinaciones bioquímicas. Los fetos se separaron, se fijaron en fluido de Bouin, y se analizaron de acuerdo al método de Wilson modificado (Barrow y Taylor, 1969), para evaluar malformaciones internas.

Inducción de diabetes en distintas fases de la gestación. Otros dos grupos de ratas fueron tratados con aloxana a dosis de 110 mg/Kg el día cero o cuatro de gestación, y

comparados con sus respectivos testigos. Las ratas fueron sacrificadas el día 13, y se obtuvieron los úteros, en los que se contaron los fetos vivos, muertos y reabsorbidos, para posteriormente ser fijados en formol al 10%, para su análisis al microscopio estereoscópico. Se obtuvo sangre por punción cardiaca para las determinaciones bioquímicas. Del día cero al día 12 se monitorearon diariamente los niveles de glucosa sérica.

Determinaciones bioquímicas. La sangre obtenida se centrifugó a 1500 X g en una centrífuga Beckman CS-12R, para obtener el suero, en el que se determinaron la glucosa (Trinder, 1969), los lípidos totales (Fring y cols, 1972) y los triacilglicéridos (Wahlefeld, 1979).

Efecto de la L-arginina y las poliaminas sobre las alteraciones del desarrollo causadas por la diabetes. Seis grupos de ratas de 10 animales cada uno, fueron inyectados con aloxana a dosis de 110 mg/Kg, el día cuatro de gestación. Uno de los grupos (INS) recibió insulina humana intermedia desde el día 5 de gestación, a dosis de 1 a 5 UI/día, i.m., de acuerdo a Lawrence y Contopoulos, (1960): hasta glucemia de 200 mg/dL, 1 UI; glucemia ~ 300 mg/dL, 2 UI; glucemia ~ 400 mg/dL, 3 UI; glucemia ~ 500 mg/dL, 4UI; glucemia \geq 600 mg/dL, 5 UI.

Otro grupo (ARG) recibió desde el día cinco 1.0 mL de L-arginina 10 mM en solución salina, i.p.; mientras que los grupos PUT, SPD y SPM recibieron 1.0 mL de la respectiva poliamina (putrescina, espermidina o espermina) 10 μ M en solución salina, i.p., desde el día cinco

Se tuvo un grupo de animales diabéticos (DIAB), el cual, después de la inducción diabética el día cuatro, fue inyectado desde el día cinco con solución salina. Además, se tuvo

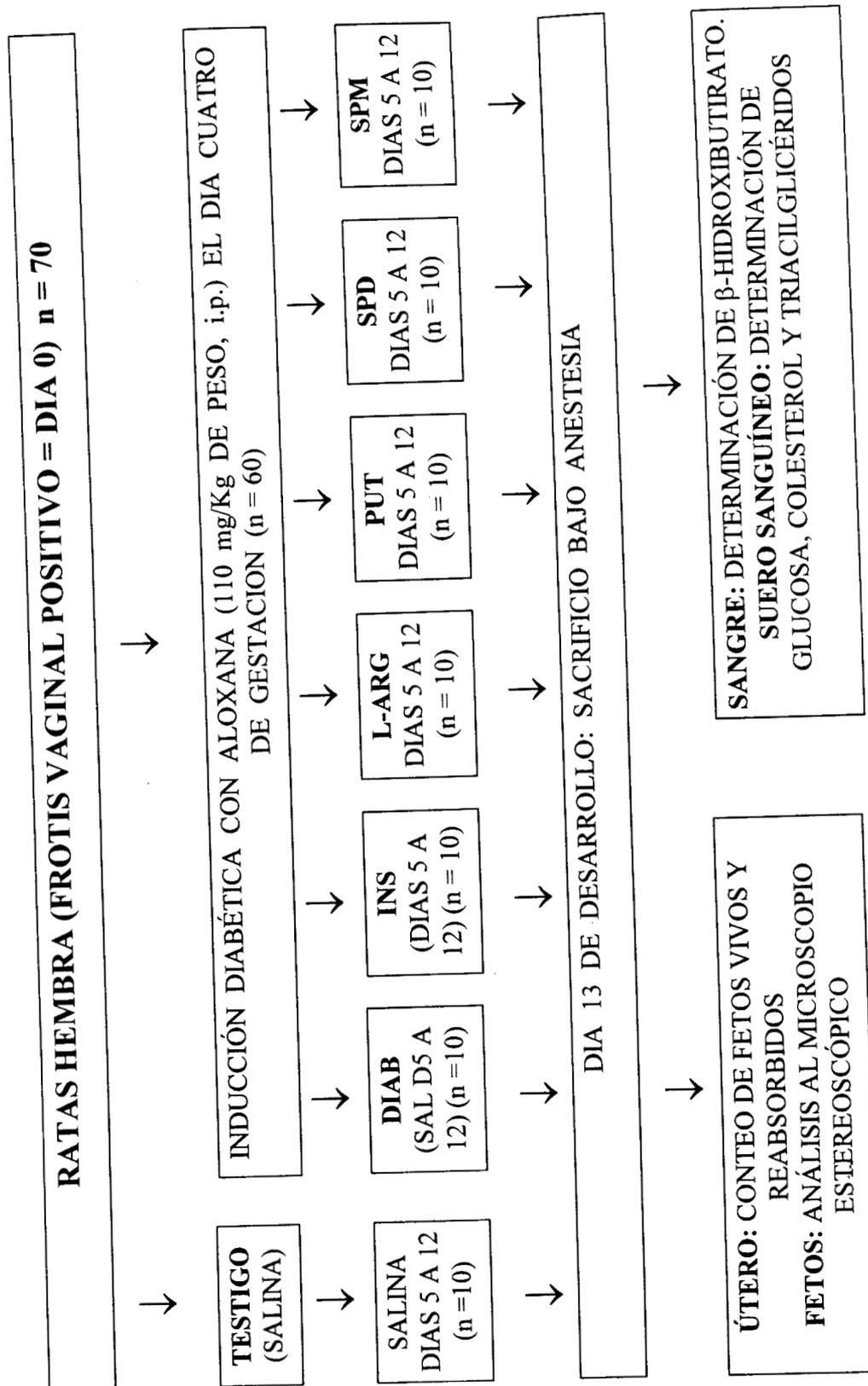
un testigo no diabético (TES) al cual se le administró solución salina diariamente, desde el día cuatro (ver diagrama de la página siguiente).

En estos grupos se monitoreó diariamente la glucemia. Las ratas fueron sacrificadas el día 13 de gestación, y se obtuvieron los úteros, en los que se contaron los fetos vivos y reabsorbidos. Los fetos se fijaron en formol al 10% para analizarlos posteriormente. La sangre recuperada se dividió en dos alícuotas, una de las cuales se centrifugó sin anticoagulante, y fue posteriormente subdividida para determinar la concentración de glucosa, triacilglicéridos y colesterol (Bowman y Wolf, 1962); y otra fracción se trató con heparina (100 U/ml), y posteriormente se precipitó con HClO_4 10%, para ser neutralizada con KHCO_3 , y centrifugada; en el sobrenadante se determinó la concentración de β -hidroxibutirato (Kientsch-Engel y Siess, 1981).

222484

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos de los grupos experimentales se compararon con los controles mediante la prueba de análisis de varianza simple seguido de prueba de Tukey. Para los experimentos en los que se tenían dos grupos de datos, se utilizó la prueba de t de Student no pareada; la glucemia diaria se analizó mediante la prueba de comparación de pendientes; y para la frecuencia de reabsorciones se utilizó el estadístico χ^2 (chi-cuadrada), utilizando la corrección de Yates. Todas las pruebas fueron llevadas a cabo en el programa Statistica 4.5 para Windows.

DIAGRAMA 1



RESULTADOS

Sitios de implantacion. El primer experimento realizado fue administración de aloxana a dosis de 120, 140 ó 150 mg/Kg a ratas gestantes el día cero de gestación, con objeto de comprobar que la inducción diabética con aloxana no interfiere con la fertilidad. Se encontró una gran mortalidad materna los primeros cinco días post-inducción. Al sacrificio, el número de sitios de implantación encontrado fue similar al de las ratas tratadas con solución salina (Figura 1, Cuadro 1).

Desarrollo embrionario. Los experimentos subsecuentes fueron llevados a cabo para estudiar el efecto de la aloxana sobre la neurulación. Para este fin, primero se administraron dosis de 80, 100, 120, 140 ó 150 mg/Kg de aloxana a ratas gestantes el día cero, para sacrificarlas el día 10 de desarrollo. La dosis mayor del diabetógeno (150 mg/Kg) causó mortalidad en todas las hembras gestantes, mientras que las dosis de 120 ó 140 mg/kg causaron también mortalidad, pero, cuando las madres sobrevivieron, al momento de sacrificio mostraron hiperglucemia, y se observaron solamente reabsorciones embrionarias. Los deciduomas fueron pequeños, sanguinolentos, y formados por tejido amorfo, sin indicio de embriones reconocibles. La tinción convencional H y E indicó presencia de tejido necrótico y degenerado, y no se detectaron células viables.

La dosis de aloxana de 100 mg/kg no causó incremento significativo en la concentración de glucosa. De seis camadas, dos mostraron reabsorciones embrionarias, otras dos constaron de embriones muy pequeños, degenerados y probablemente muertos antes del día 10 de gestación. En las otras dos camadas, no se observó ninguna alteración embrionaria (Cuadro 2). Con aloxana a dosis de 80 mg/kg, la concentración sérica de glucosa no se alteró de manera significativa, aunque se observaron algunas malformaciones (Figura 2). En

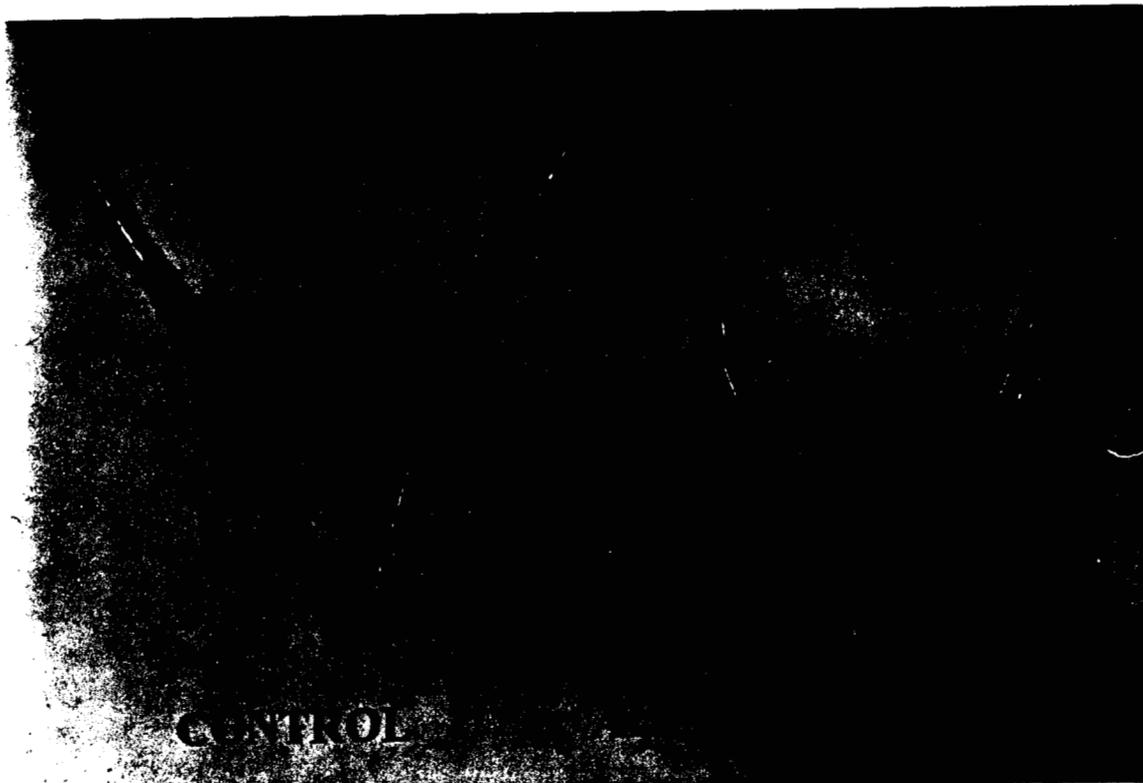


Figura 1. Úteros al quinto día de preñez, de una rata testigo (izquierda) y de una rata tratada con aloxana a dosis de 140 mg/Kg (derecha) el día cero de gestación. La aparición de sitios de implantación (regiones azules) no se afecta por el estado diabético.

**CUADRO 1. DIFERENCIACIÓN DE SITIOS DE
IMPLANTACIÓN EN RATAS NORMALES
Y TRATADAS CON ALOXANA**

CONDICIÓN	Ratas el día cero	Ratas con sitios/ratas vivas	Porcentaje de supervivencia	Sitios de Implantación (Media \pm D. E.)
Testigo (salina)		6/6	100	11.8 \pm 2.0
Diabéticas (mg aloxana/Kg., i.p.)				
120	10	4/7	70	12.2 \pm 1.7
140	10	5/7	70	11.4 \pm 2.0
150	11	4/5	45.5	11.0 \pm 3.5

La diabetes fue inducida el día cero de gestación, con las dosis de aloxana que se indican. Las ratas fueron sacrificadas el día cinco, previa inyección endovenosa de azul de tripano al 1%, y los sitios de implantación se contaron en ambos cuernos uterinos. Se reporta la mortalidad en cada uno de los grupos.

CUADRO 2. EFECTO DE LA ALOXANA SOBRE LA GLUCOSA SÉRICA MATERNA Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO, AL DÍA 10 DE LA GESTACIÓN EN RATA

CONDICIÓN	Ratas el día cero	Ratas con sitios/ratas vivas	Porcentaje de sobrevivencia	Glucosa sérica (mg/dL) (Media ± D. E.)	Sitios desarrollados (Media ± D. E.)	Características de los embriones (Media ± D. E.)	Num. so-mitas
Testigo (salina)	6	5/6	100	119.3 ± 21.5	12.8 ± 3.3	Normales	23-24
Tratados con aloxana (mg/Kg, i.p.)	6	6/6	100	141.0 ± 39.8	11.5 ± 2.1	Normales, 0-2 anormales/carnada	22-24
100	6	6/6	100	275.5 ± 217.5	11.6 ± 4.1	Normales (2 cam) Pequeños (2 cam), Reabsorciones (2 cam)	22-23
120	6	4/4	66	474.0 ± 170.5*	8.0 ± 2.1	Reabsorciones	---
140	6	4/4	66	353.0 ± 198.6*	9.0 ± 2.6	Reabsorciones	---
150	6	0/0	0	---	---	---	---

La diabetes se indujo el día cero de gestación con las dosis de aloxana indicadas, y las ratas se sacrificaron el día 10. Se contaron los deciduomas y reabsorciones en cada cuerno uterino. Para cada grupo se indica la mortalidad. * P < 0.05 con respecto al testigo.



Figura 2. Embrión de día 10 de desarrollo, de una rata diabética (izquierdo) con respecto a un embrión de una rata no diabética (derecha). Nótese una constricción (flecha) que imposibilitaría el desarrollo posterior.

una camada, un embrión mostró exencefalia; en otra, un embrión mostró plegamiento defectuoso, y otro embrión con plegamiento defectuoso y anencefalia. Las otras cuatro camadas no mostraron ninguna malformación.

En vista de estos hallazgos, se realizó otro experimento, en el cual se administró aloxana a dosis de 120, 140, ó 150 mg/Kg, el día cero de gestación, pero los embriones fueron recuperados el día 8. Las tres dosis causaron gran mortalidad, pero en las ratas sobrevivientes, los embriones mostraron morfología similar a la de embriones normales; se hallaban en el estado de cilindro-huevo, al inicio de la neurulación (Cuadro 3, Figura 3).

Desarrollo fetal. Debido a que dosis muy elevadas de aloxana causaban gran mortalidad, se realizó otro experimento en el que ratas gestantes fueron tratadas el día cero con 80, 90, 100, ó 110 mg/Kg, para ser sacrificadas el día 19 de desarrollo. La dosis de 80 mg/Kg no causó cambios metabólicos o malformaciones. De las ratas tratadas con 90 mg/Kg, dos murieron los días 15 y 16 de la gestación, y mostraron hipoglucemia desde el día 9 (Cuadro 4). Los fetos mostraron cambios necróticos, pero fueron de apariencia normal (Figura 4). Las restantes madres fueron normoglucémicas durante el período de gestación completa (Figura 5), y los fetos fueron normales.

De las ratas tratadas con aloxana a dosis de 100 mg/Kg, tres murieron antes del día 19, y los fetos no pudieron ser recuperados. Dos hembras no estaban gestantes, y fueron descartadas. De las restantes, tres mostraron hiperglucemia sostenida durante toda la gestación, cuatro mostraron hiperglucemia transitoria, y dos estuvieron normoglucémicas. Al sacrificio, la hiperglucemia fue prominente en el grupo experimental (Cuadro 4). Los fetos fueron de apariencia normal.

CUADRO 3. EFECTO DE LA ALOXANA SOBRE LA GLUCOSA SÉRICA Y EL NÚMERO DE DECIDUOMAS EN RATAS GESTANTES EL DÍA 8

CONDICIÓN	Ratas el día cero	Ratas con sitios/vivas	Porcentaje de supervivencia	Glucosa sérica (mg/dL) (Media ± D. E.)	Deciduomas con embriones (Media ± D. E.)
Testigo (salina)	6	5/6	100	148.02 ± 14.97	12.6 ± 1.5
Diabéticas (mg/Kg de aloxana, i.p.)					
120	10	6/8	80	401.25 ± 271.89*	12.8 ± 1.6
140	15	4/11	73	513.75 ± 293.61*	13.0 ± 2.4
150	6	1/3	50	n.d. ^a	10

La diabetes se indujo el día cero con las dosis de aloxana indicadas. Las ratas se sacrificaron el día 8. Los deciduomas presentes se contaron para cada cuerno uterino. La mortalidad se reporta para cada grupo. En todos los casos, los embriones fueron de apariencia normal. *P < 0.05 con respecto al testigo; ^aNo fue posible obtener sangre, ya que el animal estaba muy dañado.

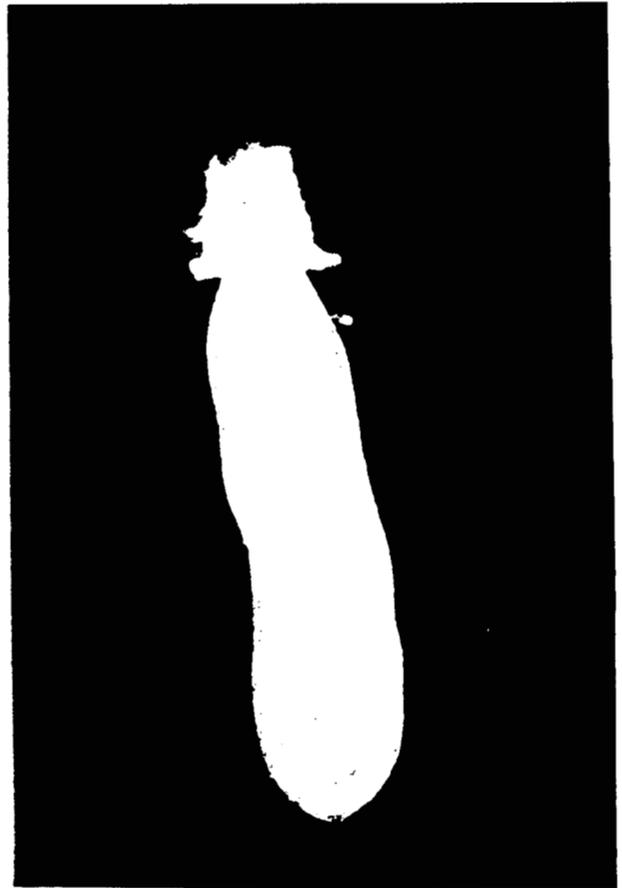
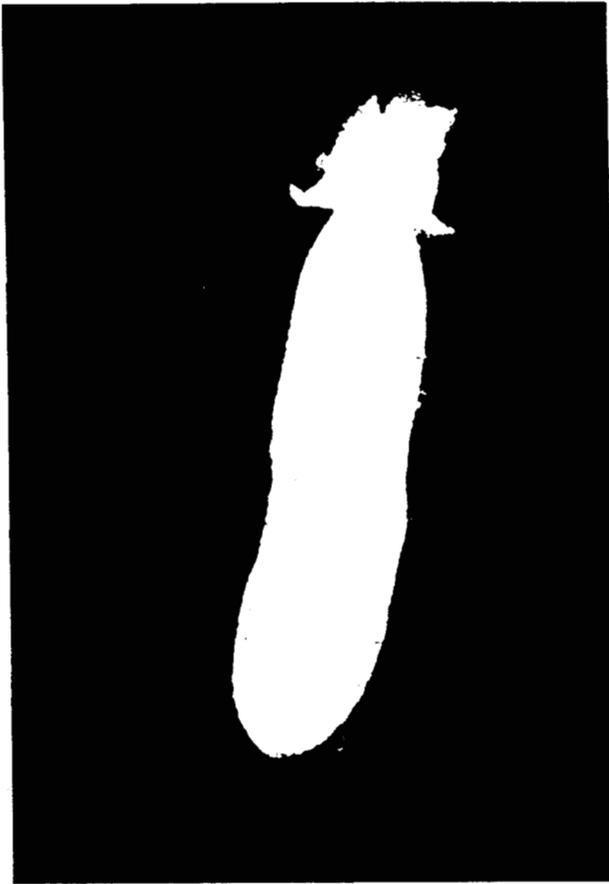


Figura 3. Embrión de día 8 de gestación, de una rata diabética (izquierda) comparado con un embrión de una rata normal (derecha). Ambos se hallan en etapa de cilindro-huevo, apropiada para ese día de desarrollo. A esta edad gestacional no se observa daño causado por el estado diabético sobre el desarrollo embrionario.

**CUADRO 4. EFECTO DE LA ALOXANA SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS
Y MORFOLÓGICOS EN RATAS EL DIA 19 DE GESTACIÓN**

CONDICIÓN	n	n	Glucosa sérica (mg/dL)	Triacilglicéridos (mg/dL)	Lípidos totales (mg/dL)	Tamaño de camada
	inicial	final	(Media ± D. E.)	(Media ± D. E.)	(Media ± D. E.)	(Media ± D. E.)
Testigo (salina)	7	7	97.7 ± 6.39	451.71 ± 180.86	458.4 ± 360.5	12.6 ± 1.3
Tratadas con aloxana (mg/Kg, i.p.)						
80	6	6	95.0 ± 14.34	339.16 ± 304.36	549.5 ± 125.3	12.8 ± 1.3
90	6	4	106.0 ± 20.15	325.75 ± 183.99	702.2 ± 41.8	12.0 ± 3.6
		2	Hipoglucemia ^a			7,6
100	13	9 ^b	207.0 ± 134.56	243.11 ± 119.88	616.9 ± 144.3	9.0 ± 3.9
		3	Hiperglucemia ^c			?
		1	Hipoglucemia ^d			?
110	12	9	187.0 ± 176.80	740.80 ± 311.10	346.7 ± 289.4	10.5 ± 2.1
		3	Hiperglucemia ^e			

La diabetes se indujo el día cero de gestación con las dosis indicadas de aloxana. Las ratas se sacrificaron el día 19, se obtuvo la sangre y los fetos presentes en cada cuerno uterino se contaron y sometieron a visualización interna. Se reporta la mortalidad en cada grupo. ^aMostraron hipoglucemia desde el día 3 ó 4 y murieron los días 15 y 16; los fetos se recuperaron y mostraron anomalías. ^bReabsorciones probablemente en tres de ellas. ^cMostraron hiperglucemia desde el día 3 ó 4 y murieron entre el día 10 ó 12. ^dMostró hipoglucemia desde el día 7 y murió el día 14. ^eMostraron hiperglucemia desde el día 2 ó 3 y murieron entre el día 8 y 10. Para los casos c,d,e no pudieron ser recuperados los fetos.



Figura 4. Feto de día 15, de una rata tratada con aloxana 90 mg/Kg (derecha), y que murió en ese día de desarrollo. Al parecer, no hay cambios morfológicos, sólo una disminución del tamaño corporal, además de cambios necróticos.

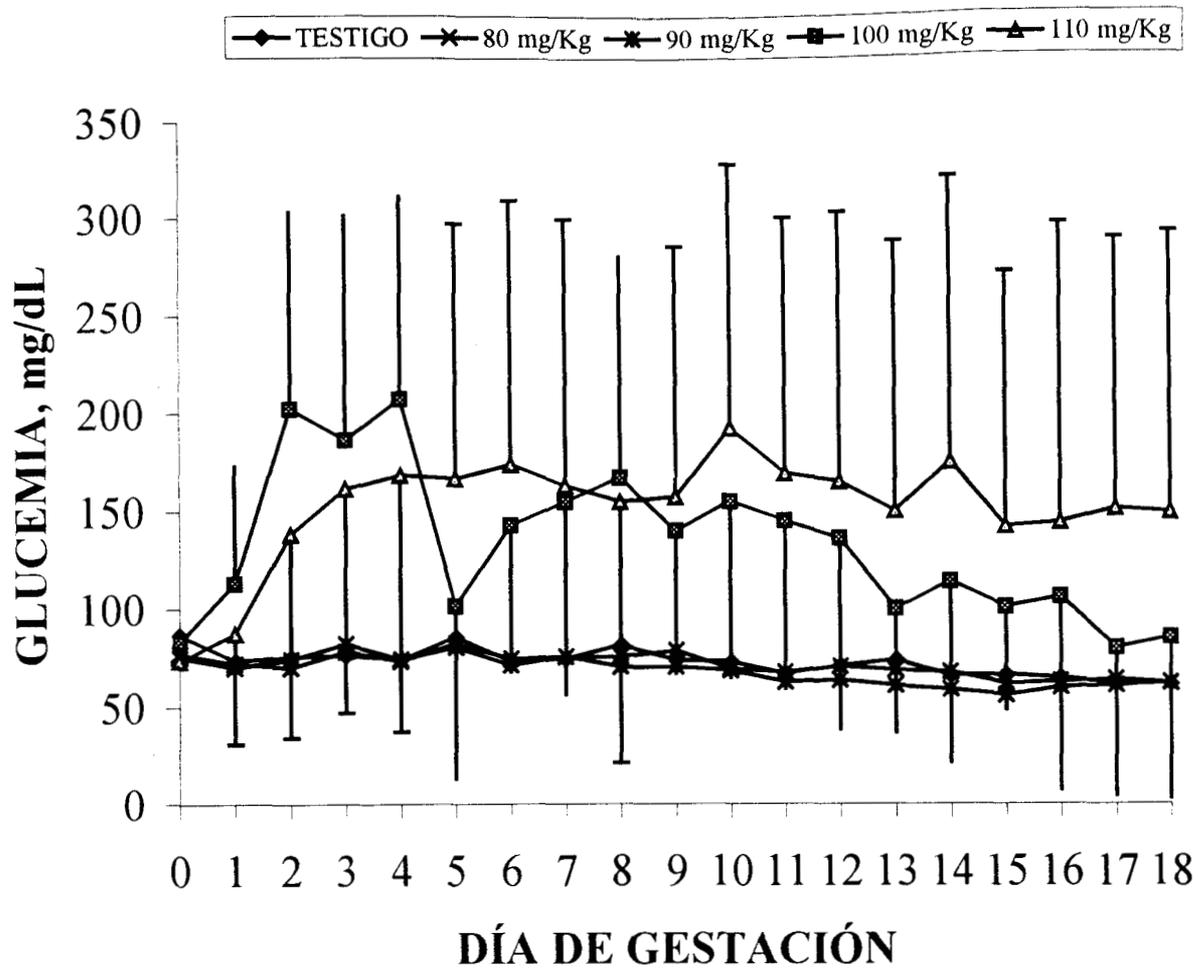


Figura 5. Efecto de distintas dosis de aloxana sobre la glucemia de ratas gestantes. Por claridad, sólo se indican las desviaciones estándar de los grupos tratados con 100 y 110 mg/Kg. La glucemia de los grupos tratados con 100 y 110 mg/Kg es diferente estadísticamente ($P < 0.001$) de la del grupo testigo, desde el día 2 de gestación.

Del grupo tratado con aloxana 110 mg/kg, tres murieron antes del día 19 de gestación, por diabetes severa e incontrolada. De las remanentes 11, una mostró siempre normoglucemia, tres mostraron hiperglucemia sostenida desde el día 1 ó 2 de gestación, y siete mostraron hiperglucemia transitoria (Figura 5). Cabe destacar que las ratas con hiperglucemia constante no mostraron fetos, mientras que los fetos de las restantes ratas tenían apariencia normal, tanto externa como interna.

Efecto del tiempo de inducción diabética sobre el desarrollo fetal. En el cuadro 5 se resumen los resultados obtenidos de las ratas que recibieron aloxana 110 mg/kg el día 0 ó 4 de gestación, y que se sacrificaron el día 13. No se encontraron embriones en el grupo tratado con aloxana el día 0, pero hubo reabsorciones en dos ratas (Figura 6). La hiperglucemia se presentó en las ratas desde el día 2 de gestación (Figura 7). El día de sacrificio, la glucosa y los lípidos totales mostraron diferencias significativas con respecto a los valores testigos (Cuadro 5).

Cuando el aloxana se administró el día 4, en cuatro ratas se hallaron fetos con retraso del desarrollo (Figura 8) y en las otras cinco, sólo reabsorciones. Todas las ratas mostraron hiperglucemia desde el día 6 de desarrollo, comparadas con el grupo testigo (Figura 9). Al día de sacrificio, los valores de glucosa y triacilglicéridos mostraron diferencia significativa con respecto al testigo (Cuadro 5).

Efecto de L-arginina y poliaminas sobre el retraso de desarrollo y la embriotoxicidad causada por la inducción diabética. Analizando los resultados de los experimentos anteriores, al parecer el mejor modelo, en nuestras condiciones, para el estudio del efecto de la diabetes mellitus sobre el desarrollo embrionario, fue la inducción diabética con aloxana a dosis de 110 mg/kg, el día cuatro de desarrollo y sacrificio al día 13 de

**CUADRO 5. EFECTO DE LA ALOXANA (110 mg/kg) ADMINISTRADA A DOS
DIFERENTES DIAS, SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y
MORFOLÓGICOS DE RATAS GESTANTES**

	INDUCCIÓN EL DÍA CERO		INDUCCIÓN EL DÍA CUATRO	
	TESTIGO	EXPERIMENTAL	TESTIGO	EXPERIMENTAL
n inicial	6	19 ^a	7	29 ^a
n final	6	9	7	9
Glucosa (mg/dL) (Media ± D. E.)	135.5 ± 18.98	524.2 ± 80.06**	133.3 ± 18.07	534.3 ± 29.61**
Triacilglicéridos (mg/dL) (Media ± D. E.)	103.3 ± 16.89	121.8 ± 72.39*	104.1 ± 15.57	394.6 ± 185.2*
Lípidos totales (mg/dL) (Media ± D. E.)	276.2 ± 45.82	425.5 ± 81.61	273.3 ± 42.52	230.6 ± 132.7
Tamaño de la camada (Media ± D. E.)	9.5 ± 2.5	0.0 ^b	9.5 ± 4.5	9.3 ± 2.4 ^c

Ratas gestantes fueron tratadas con solución salina (testigo) o aloxana 110 mg/Kg (i.p.) el día cero o cuatro de gestación. Se sacrificaron el día 13, y se obtuvo sangre para las determinaciones bioquímicas, y los embriones se recuperaron y analizaron al microscopio de disección. *P < 0.05 con respecto al testigo. **P < 0.01 con respecto al testigo. ^aDe ese número inicial, algunas murieron por hiperglucemia antes, y otras no mostraron hiperglucemia y se descartaron. ^bReabsorciones en dos ratas. ^cFetos en cuatro ratas y reabsorciones en las otras cinco.

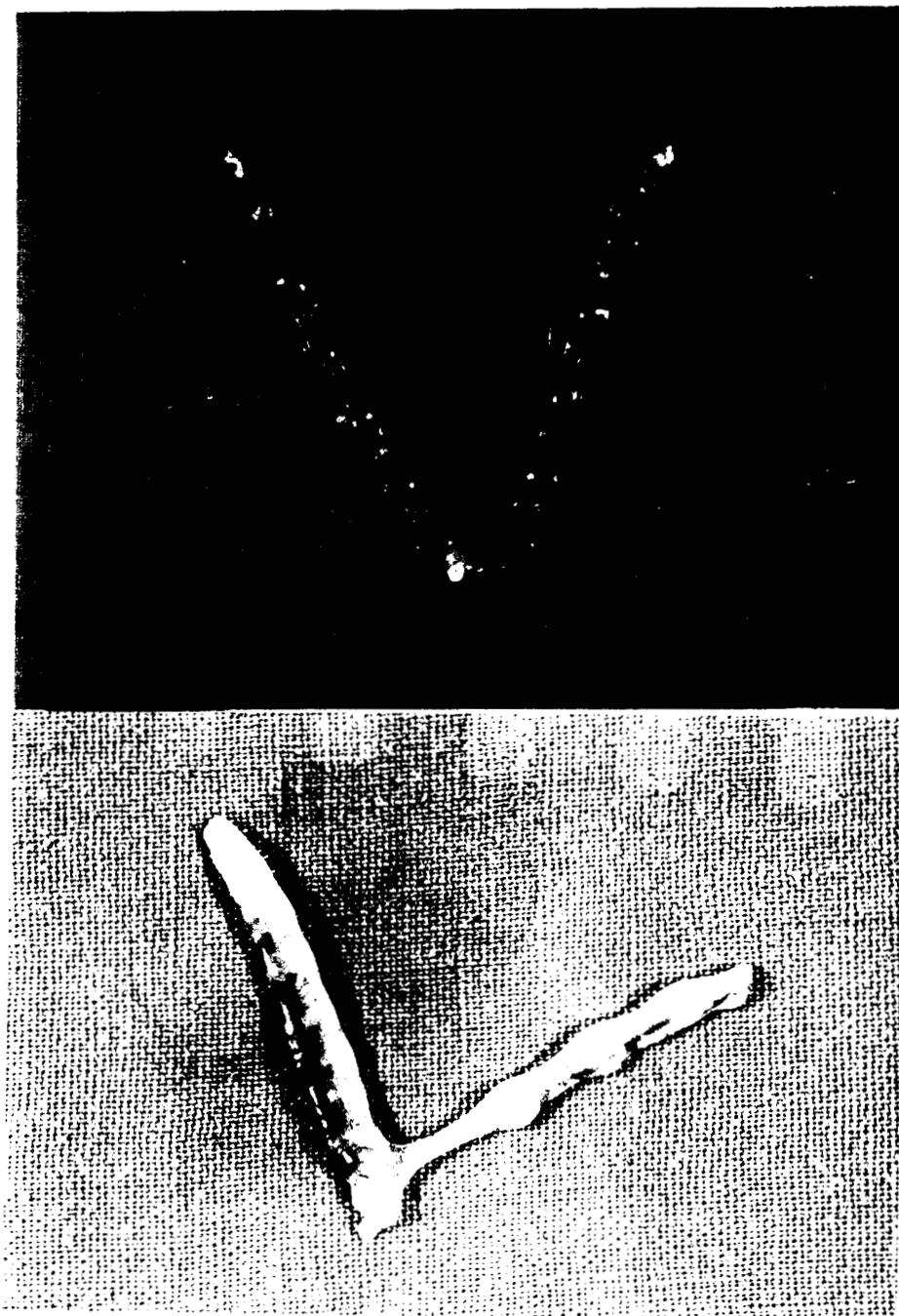


Figura 6. Útero al día 13 de gestación, de una hembra tratada con aloxana 110 mg/Kg, el día cero de gestación (abajo) comparado con un útero normal. Se observan solamente reabsorciones.

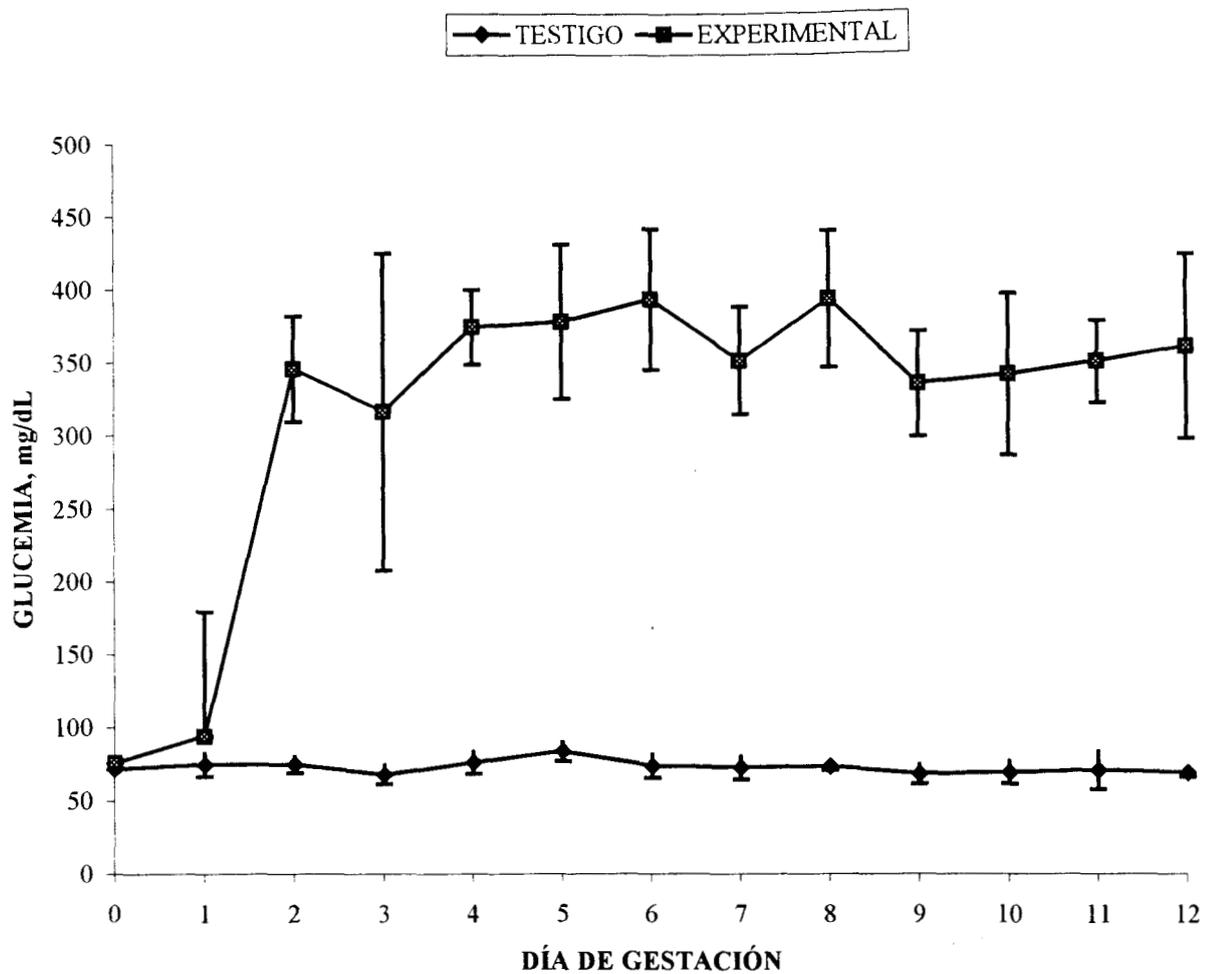


Figura 7. Efecto de la administración de aloxana, a dosis de 110 mg/Kg, el día cero de gestación, sobre la glucemia de ratas. La glucemia es diferente entre ambos grupos ($P < 0.001$) desde el día 2 de gestación.

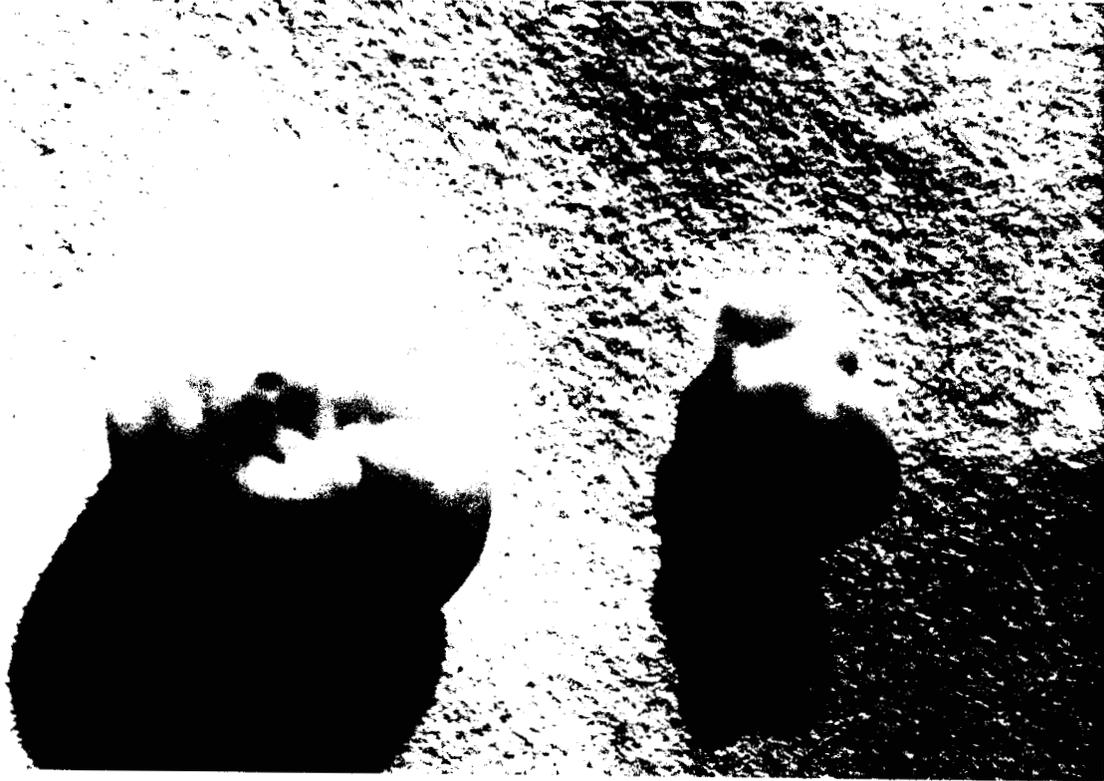


Figura 8. Feto de día 13 de desarrollo, resultado del tratamiento con aloxana 110 mg/Kg, el día 4 de desarrollo (derecha). Se muestra un feto de una madre sana para fines de comparación. El retraso de desarrollo es evidente.

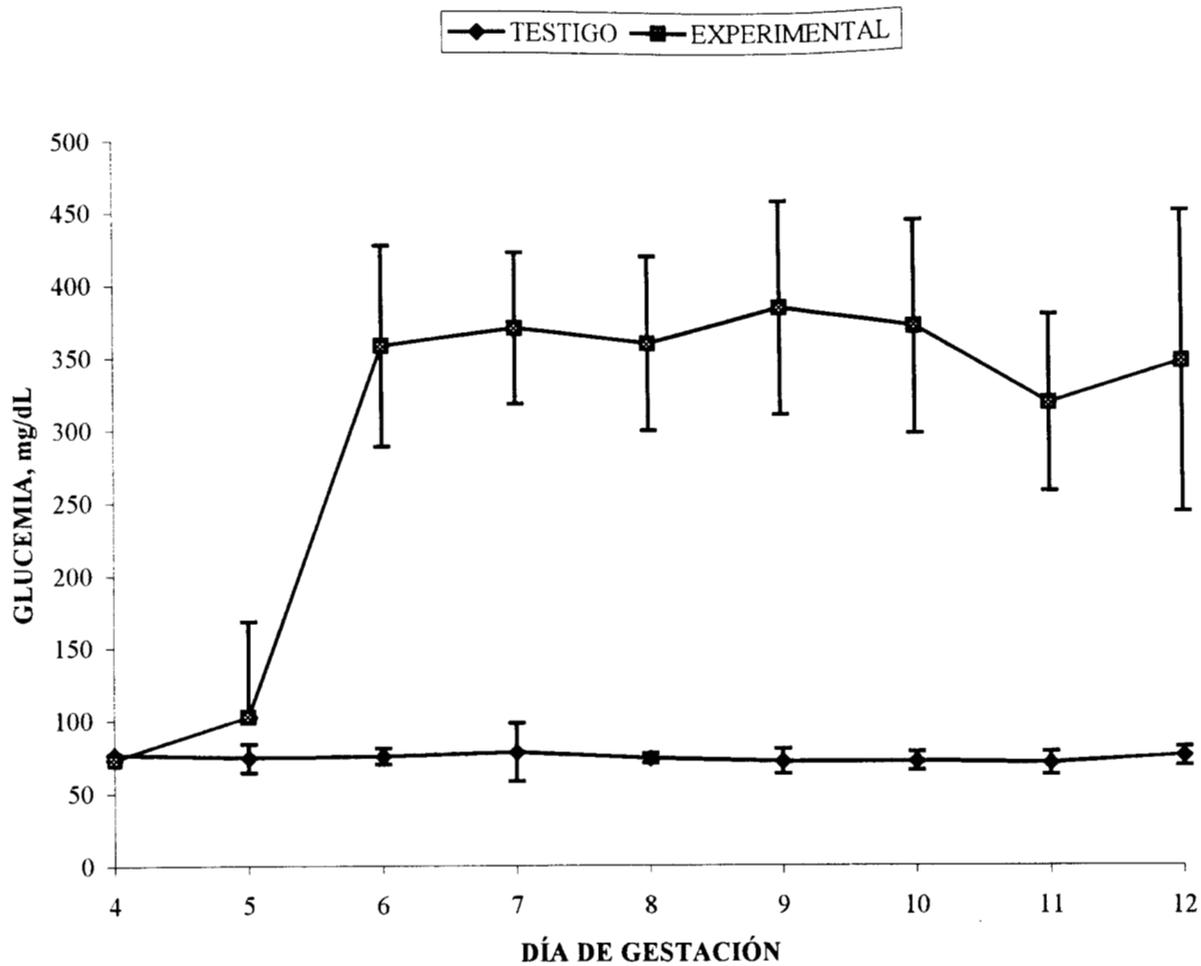


Figura 9. Efecto de la administración de aloxana, a dosis de 110 mg/Kg, el día 4 de gestación, sobre la glucemia de ratas. La glucemia es diferente entre ambos grupos ($P < 0.001$) desde el día 6 de gestación.

desarrollo embrionario, de manera que se realizó otro experimento, en el cual se administró aloxana a dosis de 110 mg/Kg el día 4 de gestación a seis grupos de al menos 10 ratas, y se tuvo un testigo al cual se le administró solución salina, desde el día 4 hasta el 12.

Uno de los seis grupos inducidos con aloxana fue tratado subsecuentemente con salina desde el día 5 hasta el 12; otro recibió desde el día 5 insulina humana NPH 1-5 U/día, i.m.; el tercer grupo fue tratado con 1.0 mL de L-arginina 10 mM i.p.; y los tres grupos restantes fueron tratados con 1.0 mL de putrescina, espermidina o espermina 10 μ M, i.p.

En este punto, se decidió no determinar los lípidos totales por ser poco indicativos, y evaluar la concentración sérica de colesterol total, parámetro que también es controlado en pacientes diabéticos humanos. Además, se cuantificó la concentración de β -hidroxibutirato en sangre, ya que ha sido propuesto que este metabolito, resultado de alteraciones en el metabolismo lipídico, sea responsable, al menos parcialmente, de algunos de los efectos que sobre el desarrollo embrionario manifiesta la diabetes.

Las ratas diabéticas mostraron una diferencia en la glucemia diaria a partir del segundo día post-inducción, o sea el día 6 de desarrollo embrionario, y hasta un día antes del sacrificio, con respecto al testigo ($P < 0.001$), mientras que los grupos tratados con insulina, L-arginina o poliaminas no mostraron diferencia cuando se compararon contra el testigo, pero son estadísticamente diferentes del grupo de ratas diabéticas ($P < 0.001$) desde el día 6 en adelante (Figura 10).

El día de sacrificio, se encontró que, en ratas diabéticas, hay un gran aumento de la concentración de glucosa sérica, con respecto al testigo (Figura 11; $P < 0.001$). La administración de insulina humana NPH, a dosis de 1-5 UI/día/rata, aparentemente revierte algunas de las manifestaciones bioquímicas de la diabetes mellitus, ya que la concentración

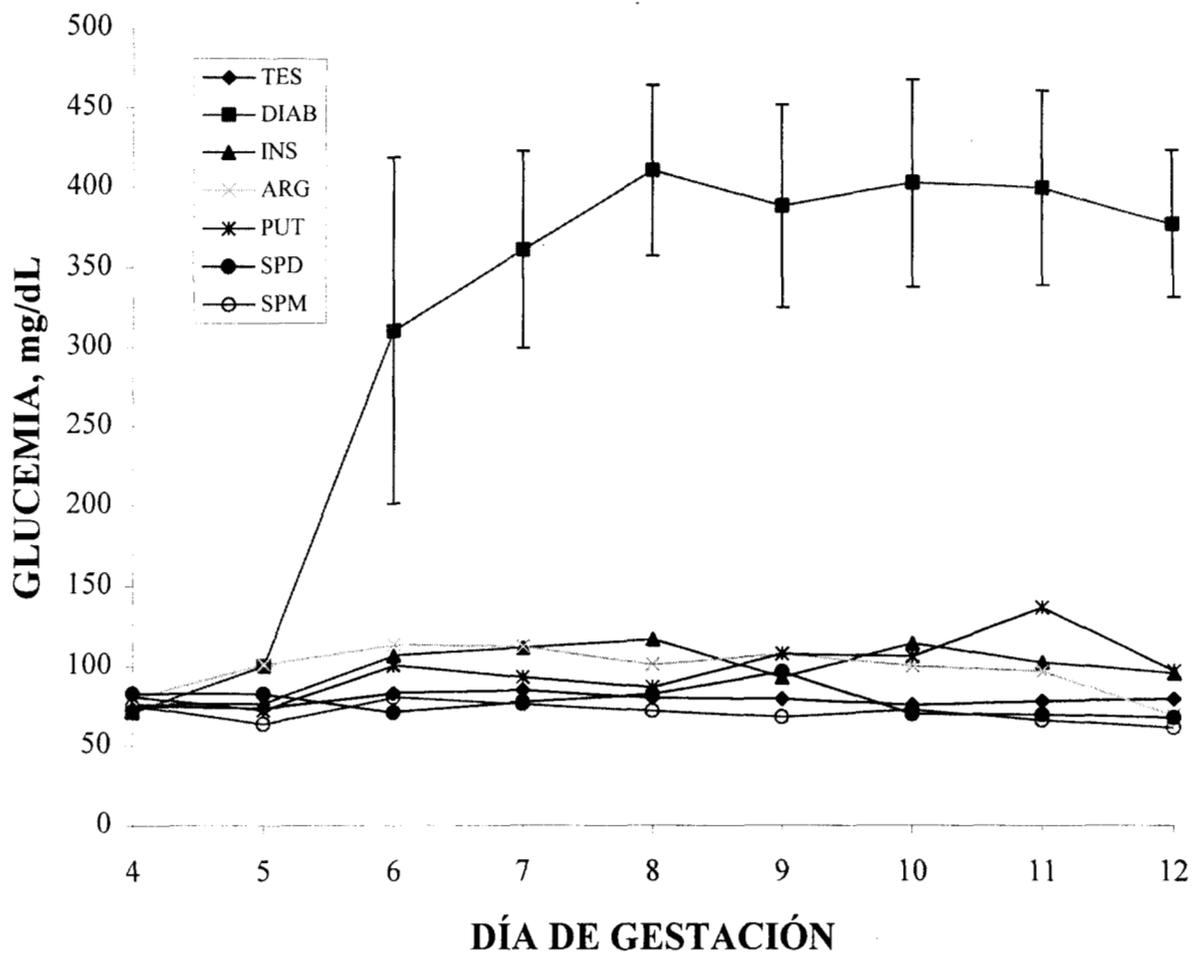


Figura 10. Glucemia diaria, en ratas diabéticas, por efecto de L-arginina y poliaminas. La glucemia del grupo diabético es estadísticamente diferente ($P < 0.001$) del grupo testigo, a partir del día 6. La glucemia de los demás grupos es estadísticamente diferente ($P < 0.001$) de la del grupo diabético ($P < 0.001$) desde el día 6 de gestación.

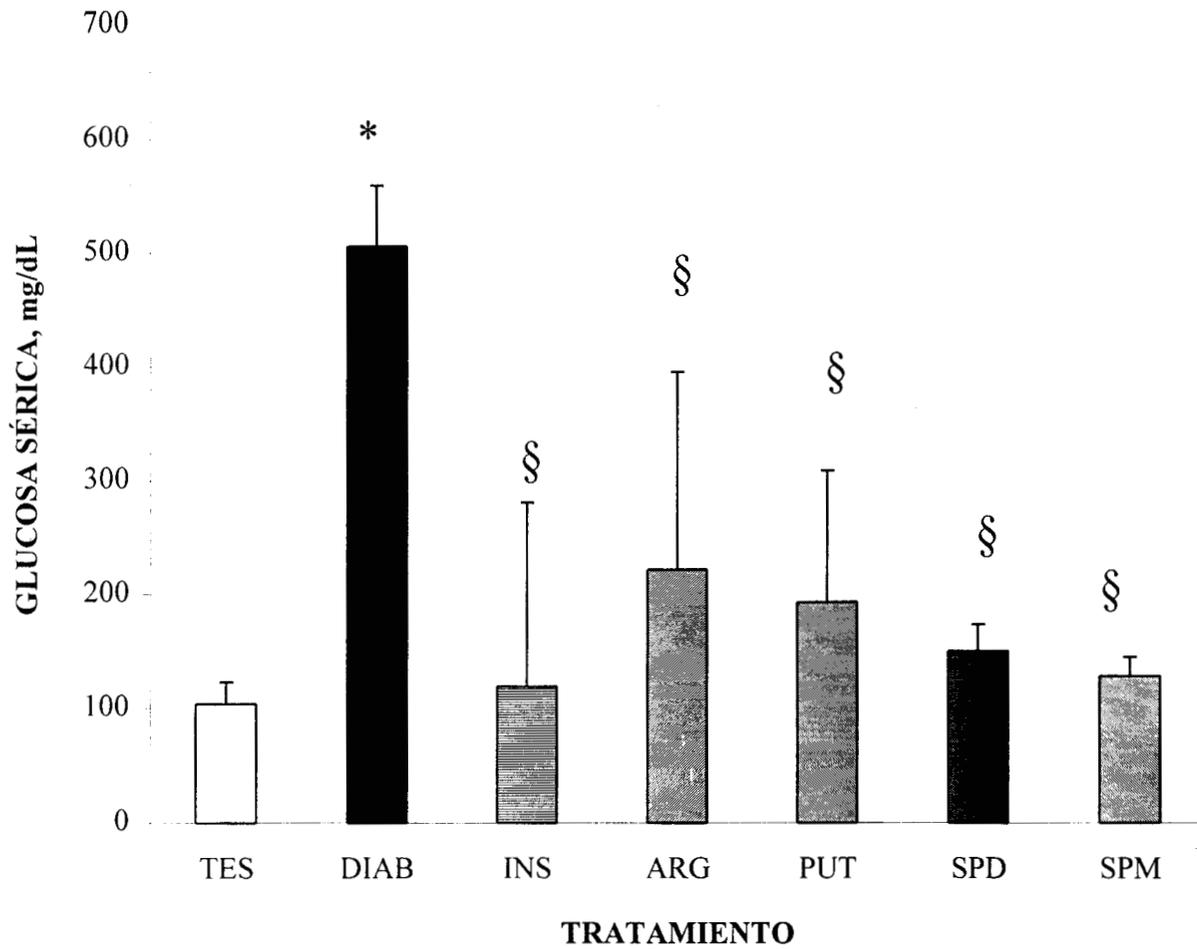


Figura 11. Efecto del tratamiento con L-arginina y poliaminas sobre la glucosa sérica en ratas diabéticas gestantes. *P < 0.001 vs. testigo; §P < 0.001 vs. diabéticas.

de glucosa sérica no es diferente entre este grupo y el testigo, mientras que es diferente ($P < 0.001$) de la observada para ratas diabéticas. En el grupo tratado con L-arginina, se encontró que la concentración sérica de glucosa se revierte casi a valores normales ($P < 0.001$ contra el grupo diabético). El tratamiento con putrescina previno sólo de manera parcial las alteraciones metabólicas causadas por la diabetes, ya que los valores de glucosa sérica fueron menores que en las ratas diabéticas ($P < 0.001$) pero son también diferentes de los valores hallados en las ratas normales ($P < 0.05$). La administración de espermidina provocó de la misma manera una recuperación parcial, ya que la glucosa fue menor que en las ratas diabéticas ($P < 0.001$), aunque mayor que en las ratas normales ($P < 0.01$). Por último, la espermina también causó una tendencia a la normalización, puesto que los niveles de glucosa fueron diferentes ($P < 0.001$) de los hallados en ratas diabéticas, sin llegar a la normalización total, ya que son diferentes al testigo ($P < 0.01$).

Otro parámetro de gran relevancia es el β -hidroxibutirato (Figura 12): Se observa un gran aumento de la concentración sanguínea de este metabolito en las ratas diabéticas con respecto a las ratas testigo ($P < 0.001$), mientras que el tratamiento con insulina revierte esta elevación ($P < 0.001$ con respecto a ratas diabéticas), y en las ratas tratadas con L-arginina la concentración de β -hidroxibutirato en sangre está elevada con respecto al testigo, pero es más baja que en el grupo diabético ($P < 0.001$ contra ambos grupos). Cuando se administraron las poliaminas, los resultados son similares, ya que el valor de β -hidroxibutirato sanguíneo encontrado en respuesta a administración de putrescina tendió a ser menor que en las ratas diabéticas ($P < 0.01$) pero es también diferente del valor hallado en las ratas normales ($P < 0.01$). La administración de espermidina provocó de la misma manera una recuperación parcial, ya que el β -hidroxibutirato fue menor que en las ratas

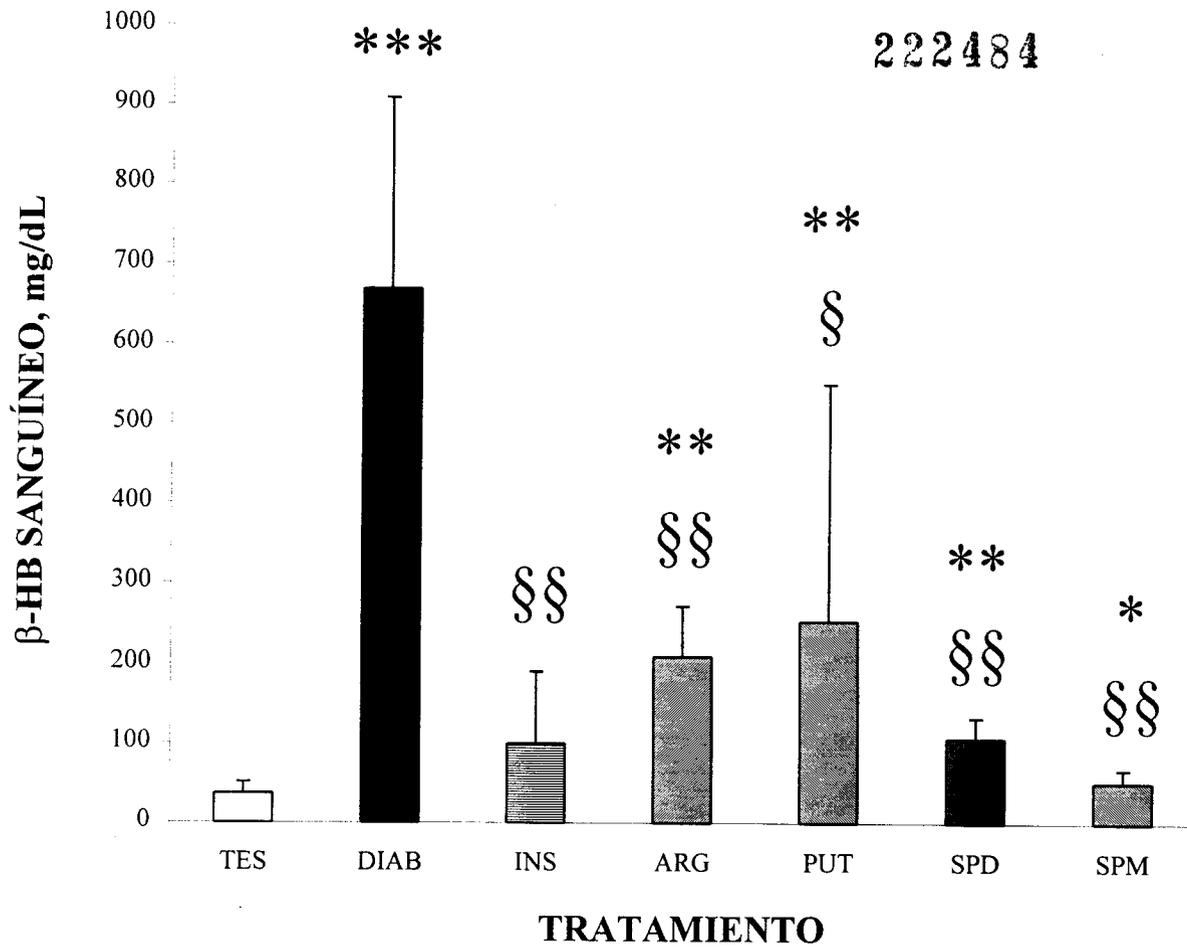


Figura 12. Concentración de β -hidroxibutirato sanguíneo en ratas diabéticas tratadas con L-arginina y poliaminas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. el grupo testigo; § $P < 0.01$, §§ $P < 0.001$ vs. diabéticas.

diabéticas ($P < 0.001$), aunque mayor que en las ratas normales ($P < 0.001$). Por último, la espermina también causó una tendencia a la normalización, puesto que los niveles de β -hidroxibutirato fueron diferentes ($P < 0.001$) de los hallados en las ratas diabéticas, sin llegar a la normalización total, ya que son diferentes al testigo ($P < 0.05$, respectivamente),

Por otra parte, las concentraciones séricas del colesterol y los triacilglicéridos (Figuras 13 y 14) no varían por efecto de la inducción de diabetes, la administración de insulina, o de L-arginina o poliaminas.

Con respecto al desarrollo intrauterino (Cuadro 6, Figura 15), las ratas testigo mostraron fetos de apariencia normal, mientras que de las 10 ratas diabéticas, nueve mostraron reabsorciones por completo, y una, fetos con retraso de desarrollo. El análisis estadístico mostró que la frecuencia de reabsorciones y retraso del desarrollo es estadísticamente diferente ($P < 0.001$) del testigo. Se encuentra una frecuencia de reabsorciones embrionarias o embriones con retraso de desarrollo por camada por tratamiento con insulina muy similar a la del testigo, pero diferente de la encontrada para las ratas diabéticas ($P < 0.001$ contra este grupo). Cuando las ratas diabéticas se trataron con L-arginina: en las diez camadas se encontró generalmente una frecuencia muy baja de reabsorciones, siendo la distribución de los fetos distinta ($P < 0.001$) a la distribución en ratas diabéticas, y muy similar a la del testigo.

El tratamiento con putrescina previno sólo de manera parcial las alteraciones del desarrollo provocadas por la diabetes, puesto que en cuatro de las diez camadas se encontraron exclusivamente reabsorciones, mientras que la distribución de fetos retrasados o reabsorbidos es diferente tanto a la del grupo testigo ($P < 0.001$), como a la encontrada en las ratas diabéticas ($P < 0.001$). De la misma manera, por efecto de la espermidina en tres de

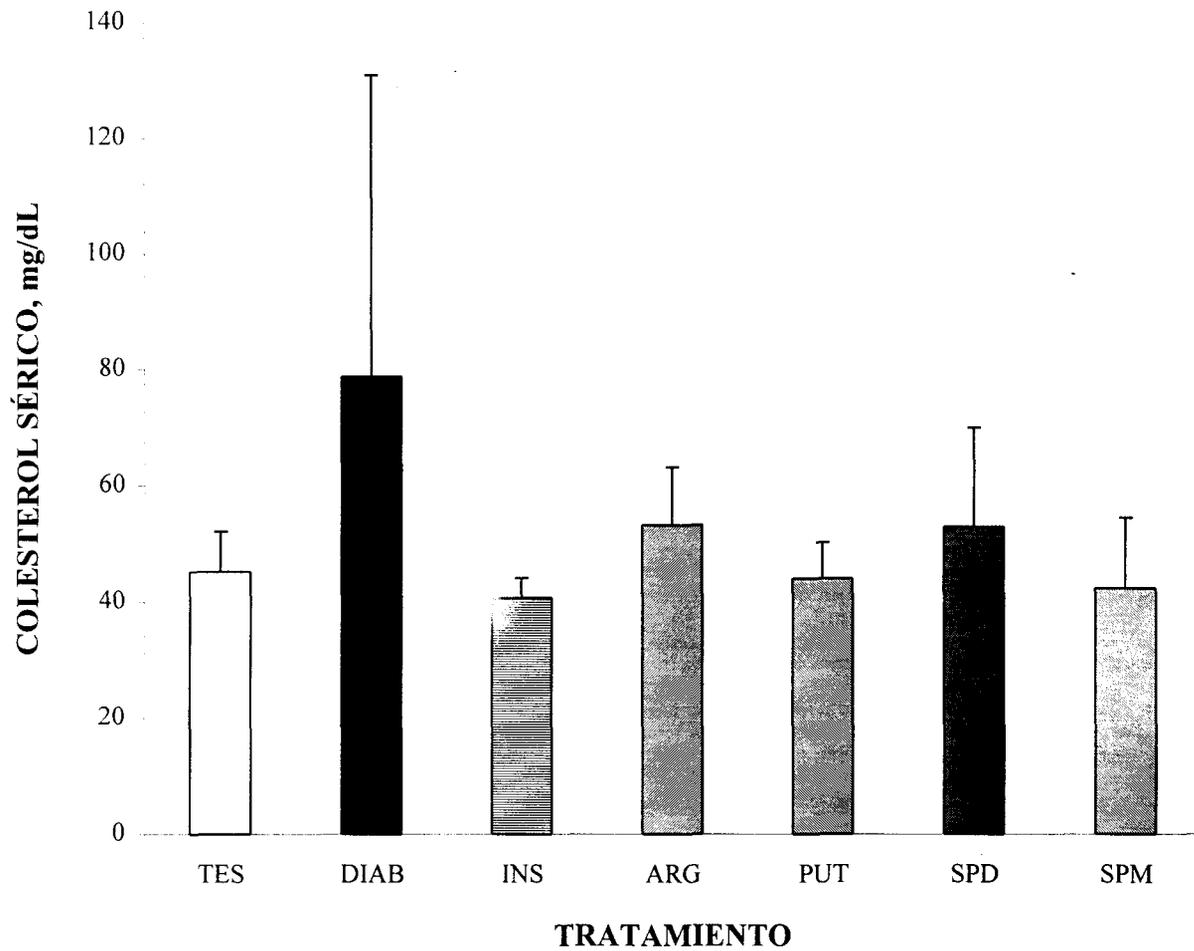


Figura 13. Efecto del tratamiento con L-arginina y poliaminas sobre la concentración sérica de colesterol en ratas diabéticas gestantes. No existen diferencias significativas de ningún grupo con respecto al testigo o al grupo diabético.

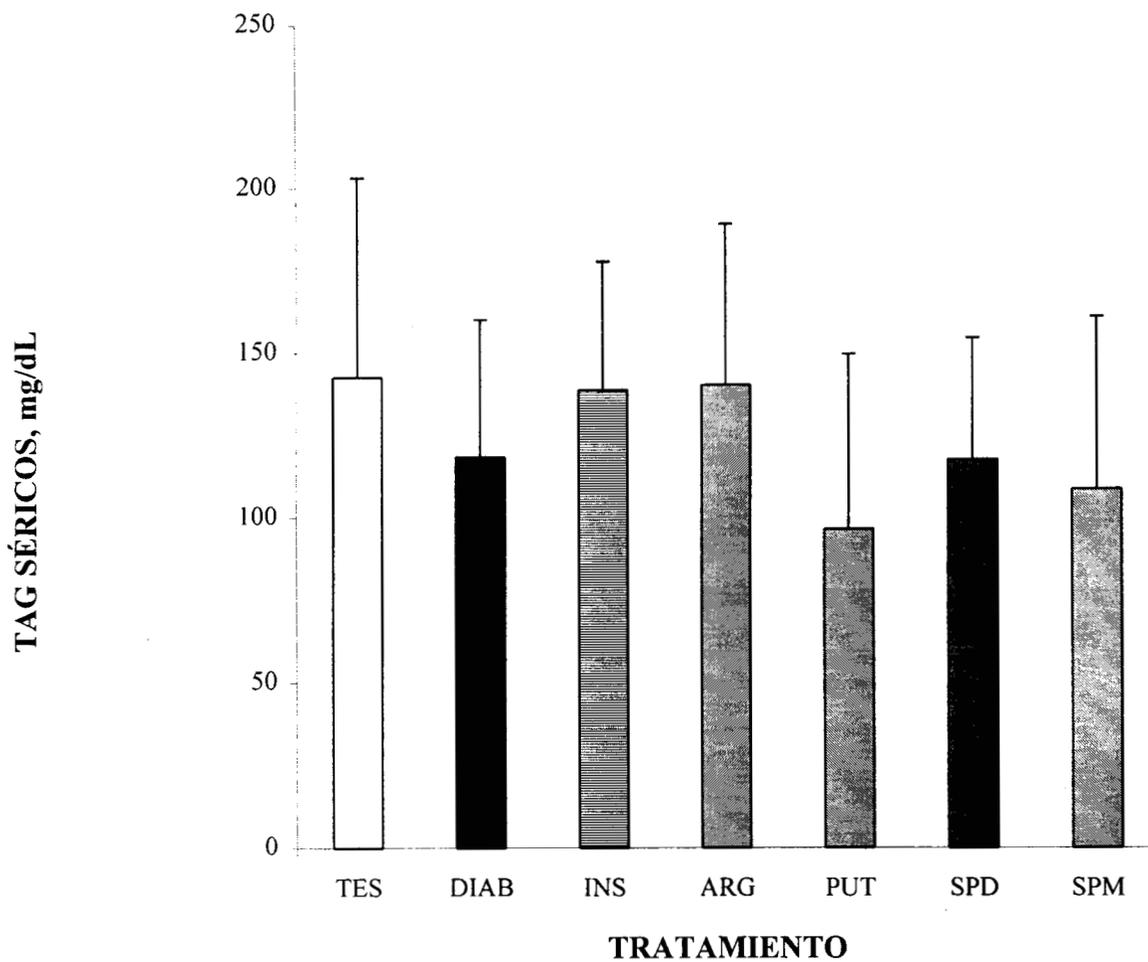


Figura 14. Efecto del tratamiento con L-arginina y poliaminas sobre la concentración sérica de triacilglicéridos en ratas diabéticas gestantes. No existen diferencias significativas entre grupos.

**CUADRO 6. EFECTO DE L-ARGININA Y POLIAMINAS
SOBRE EL TAMAÑO DE CAMADA Y LA PRESENTACIÓN
DE REABSORCIONES Y RETRASO DE DESARROLLO
EN RATAS DIABÉTICAS**

TRATAMIENTO	TAMAÑO DE CAMADA (Media \pm D.E.)	CAMADAS CON FETOS CON RETRASO DE DESARROLLO	CAMADAS CON REABSORCIONES ^b
Testigo	10.2 \pm 1.99	1	4
Diabéticas	11.0 \pm 1.63	1 ^a	9 (9)
Insulina	10.3 \pm 2.06	3	2
L-Arginina	9.7 \pm 2.87	3	5
Putrescina	10.0 \pm 2.00	2	5 (4)
Espermidina	9.5 \pm 4.01	1	7 (3)
Espermina	8.8 \pm 2.15	1	5 (2)

Ratas hembras gestantes el día cuatro fueron tratadas con 110 mg de aloxana/Kg de peso, o con solución salina (testigo), el día cuatro de gestación. Las ratas diabéticas fueron tratadas como se indica en el texto desde el día 5 hasta el 12 de gestación. Se sacrificaron el día 13, y se obtuvieron los úteros, en los que se contaron las reabsorciones. Los fetos no resorbidos se extrajeron y analizaron. ^aTodos los fetos mostraban retraso del desarrollo. ^bEntre paréntesis el número de camadas que mostraban exclusivamente reabsorciones.

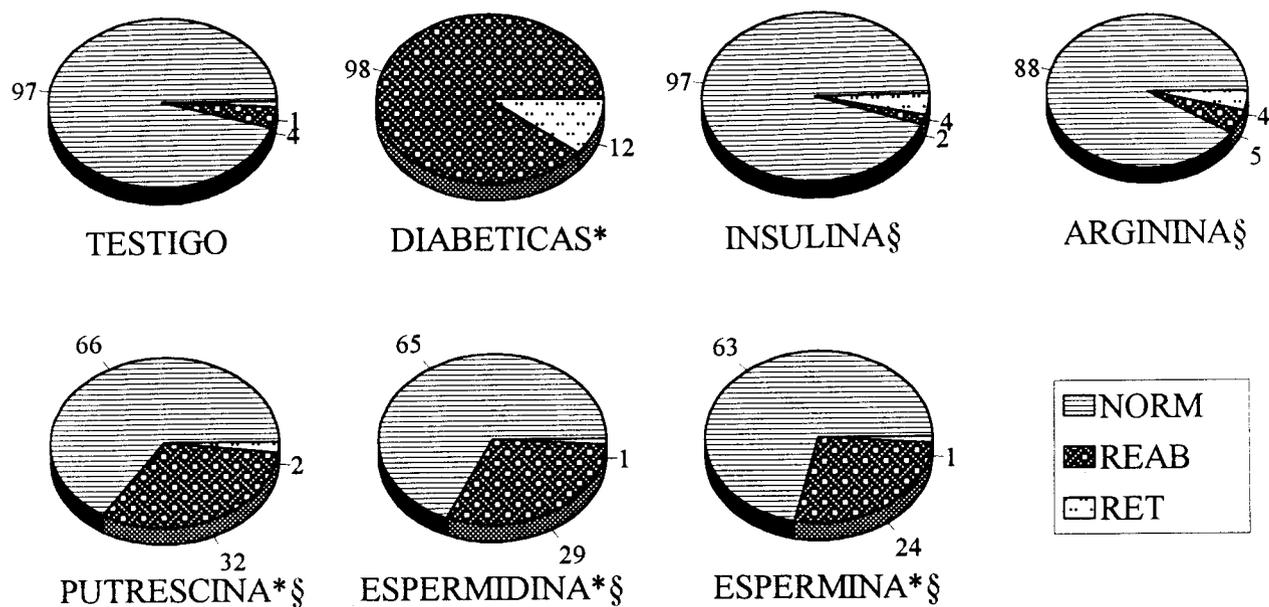


Figura 15. Distribución de fetos por efecto del tratamiento con L-arginina y poliaminas en ratas diabéticas. *P < 0.001 vs. testigo; §P < 0.001 vs. diabéticas.

las diez camadas se observaron solamente reabsorciones, y la frecuencia de reabsorciones y fetos con retraso es diferente tanto al grupo testigo como al grupo diabético ($P < 0.001$). Por último, el tratamiento con espermidina causó que en dos de las diez camadas se observaran solamente reabsorciones, y la frecuencia de fetos que mostraron retraso de desarrollo fue diferente a la de ratas testigos y ratas diabéticas ($P < 0.001$ contra ambos grupos).

DISCUSION

Modelo para el estudio de la interacción entre diabetes y gestación. Desde la década de los años 40, se han realizado numerosos intentos para estudiar la interacción entre la diabetes mellitus y la gestación. Los enfoques utilizados son de varios tipos. Uno de ellos consiste en inducir la diabetes mellitus por medios químicos, con el uso de agentes tales como la aloxana o la STZ, o mediante la extirpación subtotal del páncreas, a ratas normales cíclicas, y después de la aparición de hiperglucemia o glucosuria, aparearlas con machos sanos y estudiar la descendencia. Otro enfoque consiste en administrar el diabetógeno o practicar la cirugía a animales ya gestantes. El empleo de cepas genéticamente diabéticas no está muy generalizado. También se ha empleado el uso de infusión de glucosa para inducir hiperglucemia en animales gestantes. El último enfoque es cultivar embriones, ya sea preimplantacionales o postimplantacionales, y estudiar los efectos ocasionados por los cambios en nutrientes, sustratos y factores sobre el desarrollo embrionario.

Mediante el primer esquema, la administración de aloxana o la pancreatectomía a ratas normales previo al apareamiento, se ha encontrado que en la mayoría de los casos, se pierde la capacidad reproductiva (Davis y cols, 1947; Foglia y cols, 1963; Kim y cols, 1969; Lawrence y Contopoulos, 1960; Levi y cols, 1949; Sinden y Longwell, 1949), y se ha reportado que la pérdida de capacidad reproductiva se debe a cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Howland y Zebrowski, 1974), a una pérdida de soporte hormonal para los cambios tisulares propios del endometrio (Garris, 1988), o a la carencia de respuesta uterina a hormonas esteroides (Piyachaturawat y cols, 1984).

Sea cual sea la causa o causas, a nivel organismo se pierde generalmente el potencial reproductivo, como era el caso en las mujeres diabéticas tipo 1 antes del uso terapéutico de la insulina (Gabbe, 1993; Farrell, 1982; Freinkel, 1980). De cualquier manera, la capacidad de apareamiento no se restaura únicamente con el tratamiento con insulina, sino además es necesario administrar hormonas gonadotrópicas a las hembras (Diamond y cols, 1989, 1990), lo que implica una ulterior manipulación del sistema.

Otros autores han aplicado el diabetógeno a diversas etapas de la gestación, obteniendo resultados diversos, desde la aplicación al día 1 (Angerwall, 1959), hasta el día 13.5 de preñez (Watanabe e Ingalls, 1963) y diversas dosis, desde 60 hasta 160 mg/Kg. Los resultados varían desde la pérdida de la gestación, hasta defectos menores de desarrollo, pasando por defectos de cierre de tubo neural y daño sobre el desarrollo del sistema óseo. En nuestra experiencia previa (no reportada), con machos y hembras no gestantes, la dosis diabetógena es 120 mg/Kg, definiendo como dosis efectiva o diabetógena a la que se obtiene mas del 80% de animales diabéticos (Méndez y Ramos, 1994), y que el intervalo en el cual se obtienen animales con hiperglucemia varía desde 100 a 150 mg/Kg de peso, siendo dosis menores inefectivas y dosis mayores letales.

La estrategia de utilizar cepas de animales genéticamente diabéticos ha sido poco utilizada, y en un caso se encontró que no era buen sistema, ya que no se desarrollaban anomalías (Kaufmann y cols, 1991). Sin embargo, una cepa de ratones diabéticos genéticamente, sí manifiesta una alta proporción de diabetes, y con defectos en la estructura y número de cromosomas asociados a la aparición de malformaciones (Moley y cols, 1991; Wauben-Penris y Prins, 1983).

Un número muy grande de autores ha empleado el sistema de cultivo post-implantacional de New (1977), y recientemente, dos o tres grupos de investigación han comenzado el estudio en cultivo de embriones pre-implantacionales (Dufrasnes y cols, 1993), en ambos casos, para estudiar la interacción diabetes-gestación. Si bien ambos modelos tienen la ventaja de utilizar un sistema más simple, la desventaja es que los medios de cultivo artificiales no son de la misma naturaleza que el fluido amniótico en el cual se desarrollan los *concepti*, y no se reproducen fielmente las condiciones espaciotemporales propias del desarrollo intrauterino.

Otra gran discrepancia entre autores es el tiempo de muestreo. Así, hay algunos que observan daños sobre los embriones a etapas tempranas del desarrollo (Deuchar, 1977, Watanabe e Ingalls, 1963), mientras que otros observan daños hasta el día 20 ó 21 (Angerwall, 1959; Wilson, 1985).

Por estas razones, y pensando en que, aunque la aloxana tiene una vida media de 0.9 minutos en condiciones fisiológicas (Patterson y cols, 1949), y se ha reportado que por sí sola no es teratogénica (Ellison y Maren, 1972), se administró la aloxana en las primeras fases de este estudio el día cero, día en el que se encontraban espermatozoides en el lavado vaginal. Escogimos iniciar con dosis de 120 a 150 mg de aloxana por Kg de peso, y observar los efectos que estas dosis tenían sobre el desarrollo embrionario temprano, ya que son muy efectivas para la inducción diabética en animales no gestantes. Sin embargo, encontramos que estas dosis no causan pérdida de gestación, ni interfieren con la fertilidad de las ratas cuando se aplican el día cero, ya que el número de sitios de implantación observado en las

ratas diabéticas no varió con respecto al tratamiento con solución salina, aunque provocan una elevada mortalidad materna.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la aloxana a dosis de 80 a 150 mg/Kg, al día 8 de desarrollo, así como el efecto de dosis de 120 a 150 mg del fármaco al día 10 de desarrollo. Analizando en conjunto ambos experimentos, se puede observar que existe entre esos días un daño severo al desarrollo embrionario si la hiperglucemia inducida es severa, ya que, si bien los embriones de ratas son de apariencia normal al día 8, a cualquier dosis de aloxana administrada, al día 10 se observaron reabsorciones solamente, a dosis de 120 mg/Kg y mayores. Se ha reportado que existe una ventana crítica para que la hiperglucemia (y tal vez los demás factores implicados) provoque alteraciones de desarrollo, que es cercana a la neurulación, la cual sucede entre los días 8 a 10 (Beaudoin, 1980). Quizá la razón sea que en ese momento, se inicia la función de transporte y almacén del saco vitelino (Sadler y cols, 1993), el cual ha sido reportado que actúa durante el desarrollo normal, y que muestra desarrollo alterado por efecto de la hiperglucemia (Pinter y cols, 1986), y se ha sugerido que la estructura y función alteradas de este anexo embrionario pudiera jugar un papel importante en la dismorfogénesis, particularmente durante el desarrollo del tubo neural (Sadler y cols, 1993; Trocino y cols, 1994). Además, los embriones de rata son muy susceptibles en este periodo a desafíos teratogénicos (Menegola y cols, 1995).

Nuestros resultados no apoyan la evidencia de daño por diabetes mellitus en etapas preimplantacionales de desarrollo, como ha sido reportado por otros (Beebe y Kaye, 1991; De Hertog, 1992; Diamond y cols, 1989, 1990; Moley y cols, 1991, 1994; Pampfer, 1990; Pampfer y cols, 1994, 1997; Vercheval y cols, 1990; Veselá y cols, 1994), ya que los

embriones en día 8 son de apariencia normal, y la frecuencia de reabsorciones no es mayor en los grupos tratados con aloxana que en el normal.

Sin embargo, aunque suponemos que el mayor daño al desarrollo, cuando se administra aloxana el día cero, se dá entre los días 8 a 10, no se descarta que exista una predisposición a mostrar dismorfogénesis a causa de haber estado sometidos desde la concepción a un ambiente alterado (Pampfer y cols, 1994), o que con la metodología empleada en este estudio, no hayamos sido capaces de detectar si hubo daño pre- o peri-implantacional en los embriones, y si lo hubo, no fue tan severo, ya que permitió la implantación embrionaria, y que los embriones alcanzaran la etapa de cilindro-huevo.

Cuando se analizaron las anomalías en fetos de 19 días de desarrollo, como otros autores, bajo el tratamiento con dosis bajas de aloxana (80-100 mg/Kg), no se encontraron malformaciones, mientras que dosis mayores provocaban alta mortalidad materna, y en los pocos casos en los que la hembra sobrevivía, se encontraban exclusivamente reabsorciones. Sin embargo, se encontró que la dosis de 110 mg/Kg producía en algunas ratas hiperglucemia y no mostraban fetos; mientras que otras ratas eran normoglucémicas, con fetos de apariencia normal. Supusimos que las primeras habían estado gestantes, y habían perdido la gestación.

Por esta razón, se empleó la dosis de aloxana de 110 mg/Kg de peso, pero se recuperaron los úteros al día 13 de gestación. Se encontró en los úteros exclusivamente reabsorciones, pero ninguna malformación ni feto con retraso de desarrollo. Esto nos llevó a sugerir un efecto de "todo-o-nada" (Palomar-Morales y cols, 1998), por el cual la diabetes incontrolada produce siempre muerte fetal aunque no materna, y la diabetes ligera y/o

transitoria no manifiesta efectos sobre la descendencia.

Por otra parte, se sabe que durante la neurulación, hay una expresión elevada del transportador de glucosa GLUT-1 en saco vitelino, independientemente del estado diabético, lo que pudiera resultar en un exceso de transporte de glucosa hacia el producto y/o en un daño directo sobre su ultraestructura (Trocino y cols, 1994). Es probable que el efecto que nosotros observamos se relacione con esta idea, ya que siempre que se indujo diabetes sostenida, esta fue severa, nunca moderada.

Para recortar más aún el periodo de diabetes mellitus, y pensando en que la inducción diabética con aloxana no daña al embrión pre- y peri-implantacional, se administró la misma dosis al día 4 de gestación, observando que las hembras tratadas manifiestan, o reabsorciones de una manera total, o todos los fetos con retraso del desarrollo. Esto concuerda con el cuarto principio teratogénico de Wilson (1977), ya que encontramos muerte embrionaria (reabsorciones) y retraso del desarrollo.

En la gestación humana, la diabetes (tipo 1 ó 2) no controlada causa aborto espontáneo y malformaciones congénitas. Los roedores no abortan los fetos muertos; en lugar de eso, el *conceptus* es reabsorbido. Durante el primer trimestre, el feto humano de una madre diabética es menor que el de una madre no diabética. Por lo tanto, el tamaño reducido y la tasa de reabsorciones aumentada en roedores mimetizan los efectos de la diabetes observados en humanos (Simán y Eriksson, 1997).

Así pues, nos decidimos a emplear como modelo para el estudio de la interacción diabetes-gestación la inducción diabética con aloxana a dosis de 110 mg/Kg de peso, el día cuatro de gestación.

Prevención de la embriotoxicidad y retraso de desarrollo producidos por diabetes química, por la L-arginina y las poliaminas. Se ha reportado, por nuestro grupo, que la L-arginina protege al páncreas contra la toxicidad de la aloxana (o de sus productos) sobre las células β pancreáticas (Méndez y Arreola, 1992), por lo que hipotetizamos al inicio de este trabajo que la aplicación del aminoácido o de sus derivados, las poliaminas, protegería de manera indirecta al embrión, de los daños causados por la diabetes mellitus inducida químicamente. Nuestro grupo posteriormente encontró que la L-arginina y las poliaminas protegen al individuo de los daños producidos por inducción diabética con aloxana (Balderas y Méndez, en preparación).

Por esta razón, tratamos a ratas diabéticas, con L-arginina o poliaminas, encontrando que el aminoácido revierte casi en su totalidad los efectos de la diabetes, de manera muy parecida al efecto de la insulina, mientras que las poliaminas revierten parcialmente los efectos:

Primero, por aplicación de la L-arginina a ratas diabéticas, se observa una normoglucemia diaria, mientras que las poliaminas revierten la hiperglucemia sólo en algunos animales.

Segundo, los parámetros bioquímicos evaluados al día de sacrificio, y que se afectaron por aplicación de aloxana sobre ratas normales, es decir, glucosa sérica y β -hidroxibutirato sanguíneo, se revierten a valores cercanos a los normales con la aplicación de insulina, mientras que el tratamiento con L-arginina y poliaminas sólo causa que se revierta la elevación de la concentración sérica de glucosa, pero la concentración sanguínea de β -hidroxibutirato, que se elevó entre 10 y 12 veces el dato reportado para ratas normales,

alcanzó valores intermedios en los grupos tratados con el aminoácido y con poliaminas, con respecto tanto al grupo control y al tratado con insulina, como al grupo de ratas diabéticas. Las concentraciones séricas de triacilglicéridos y colesterol no variaron entre grupos, por lo cual no se tomarán en cuenta para la discusión.

Tercero, mientras que el tratamiento con insulina reduce la frecuencia de reabsorciones y fetos con retraso de desarrollo hasta valores estadísticamente no diferentes del testigo, el tratamiento de ratas diabéticas con L-arginina o poliaminas produce una tasa intermedia de reabsorciones y de fetos con retraso de desarrollo. Estos hallazgos se hallan en plena concordancia con el primero y cuarto principios teratogénico de Wilson (1977).

En nuestro modelo, se encontró siempre, a pesar del tratamiento con L-arginina o poliaminas, una tasa intermedia de fetos con retraso de desarrollo y de reabsorciones, además de una concentración elevada de β -hidroxibutirato, a pesar de que la concentración de glucosa era normal. El β -hidroxibutirato se ha señalado como agente teratogénico, y con un potencial aún más elevado que el de la glucosa (Buchanan y cols, 1994; Lewis y cols, 1983; Moley y cols, 1994; Sheehan y cols, 1985; Shubert y cols, 1996; Styrod y Eriksson, 1990).

Otra posibilidad es que, a pesar de la normalización en la concentración de glucosa y de la tendencia a la normalización de la concentración de β -hidroxibutirato por el tratamiento con L-arginina y poliaminas, existan más sustancias teratogénicas en el sistema. El suero de ratas macho diabéticas tratadas con insulina (normalizado), a pesar de la normalización de la mayoría de los componentes séricos alterados (glucosa, colesterol, creatinina, triacilglicéridos, β -hidroxibutirato) ejerce una influencia diabética moderada sobre

embriones de 9 días en cultivo. En suero normalizado, permanecen elevadas las concentraciones de prolina y ornitina, y disminuídas las de glutamato, glicina, histidina y vitamina B₁₂. No está claro si el potencial teratogénico residual del suero normalizado está relacionado con estas alteraciones de manera causal o casual, y no es posible saber si existen otras alteraciones metabólicas no determinadas hasta el momento (Reece y cols, 1991).

Uno de los posibles factores teratogénicos son los inhibidores de somatomedinas (Cockroft y cols, 1981; Hunter y cols, 1991; Sadler y cols, 1986). En este trabajo no se determinaron estas moléculas, ya que la metodología para cuantificarlos implica su purificación parcial, y es larga y complicada, además de que escapa a los objetivos planteados. Es probable que el tratamiento con L-arginina o poliaminas no reduzca en gran medida la concentración de estas sustancias, si bien es posible que el retraso del desarrollo se deba, más que a presencia de estas moléculas, a pérdida de efecto de la madre sobre el sistema de factores de crecimiento insulinoides (IGF-I e IGF-II), así como sus proteínas de enlace (IGFBP), implicados en el desarrollo normal.

Entre los días 12 a 14 de desarrollo embrionario, el hígado fetal de la rata produce mRNA para IGFBP-1, el cual se halla sobreexpresado en fetos de ratas diabéticas. Estos fetos son menores que los normales. La abundancia del RNAm para IGFBP-1 parece ser efecto de la condición diabética más que de retraso del desarrollo. Sin embargo, los días 15 y 16 de gestación, no hay diferencias entre grupos, aunque al día 20, los fetos son más pequeños en madres diabéticas que en madres sanas. La expresión aumentada del IGFBP-1 pudiera contribuir al retraso del desarrollo generalizado que se observa en la diabetes inducida (Rajaratnam y cols, 1997).

Los factores de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II) han sido implicados en etapas tempranas de desarrollo tanto en humano (Milner y Hill, 1984), como en la rata (Lund y cols, 1986). Particularmente, la concentración de IGF-I en la sangre de cordón umbilical se correlaciona fuertemente con el peso de los neonatos (Milner y Hill, 1984), y se ha encontrado el mRNA para ambas somatomedinas en tejidos fetales de rata desde el día 14 de desarrollo (Lund y cols, 1986), que equivale al día 13 del presente estudio. Además, al menos en la gestación humana, la expresión de ambos factores es dependiente de la unión de la insulina materna a la placenta (Milner y Hill, 1984).

Sin embargo, otros autores han encontrado que la inducción diabética el día 16 de gestación en ratas induce un aumento del IGF-II fetal los días 18, 19 y 21 de desarrollo, así como una disminución de la expresión del mRNA para IGFBP-1 hepática, mientras que el IGF-I sérico no se altera (Rivero y cols, 1994). Nosotros no evaluamos los factores ni sus proteínas de enlace, pero con base en esta evidencia, es probable que se encuentren alterados, y sean los responsables, al menos en parte, del retraso del desarrollo observado aquí reportado.

La deficiencia materna o fetal de insulina, en humanos o en modelos animales, causa reducción del crecimiento fetal. Se han propuesto dos mecanismos. En el primero, la deficiencia en insulina causa disminución de la captura y utilización de nutrientes. En el segundo, la deficiencia de insulina reduce la concentración de IGF-I circulante, reduciendo entonces el índice de proliferación celular (Fowden, 1993). No pudimos, en este estudio, determinar la concentración de insulina en sangre materna, al momento de sacrificio, pero es

probable que se halle reducida, en el estado diabético, y restaurada en los tratamientos, ya que estos tendieron a normalizar los parámetros bioquímicos y el desarrollo.

La L-arginina es un aminoácido semiesencial. Las células de mamífero pueden sintetizarlo a partir de sus precursores. Sin embargo, debido a que se utiliza como generador de urea para su excreción, y a que cumple con otros procesos bioquímicos, se requiere en la dieta. En ratas macho tratadas con aloxana, la L-arginina revierte los daños diabéticos, y se sabe que es por citoprotección de las células β (Méndez y Arreola, 1992). Sin embargo, recientemente se encontró que en ratas macho tratadas con STZ (donadoras de suero para cultivo de embriones), la concentración sérica de L-arginina fue más del doble de la encontrada en ratas normales. Otros aminoácidos también se alteran, aunque hasta el momento no se conoce el significado fisiológico de estas alteraciones sobre el desarrollo embrionario (Wentzel y cols, 1997). Nosotros nos atrevemos a pensar que la alteración de L-arginina no tiene un papel teratogénico, sino que un gran aumento de la concentración del aminoácido revertiría los daños ocasionados por la diabetes.

Por otra parte, se demostró que la L-arginina *in vitro* estimula la síntesis de glucógeno dependiente de insulina en adipocitos 3T3-L1, pero no la basal. La L-lisina y la espermidina no mimetizan las acciones de L-arginina, sugiriendo que el mecanismo no es por despolarización inespecífica de la membrana ni por vía de poliaminas. El efecto de la L-arginina no se disminuye por co-administración de dos inhibidores de la NO-sintasa, la aminoguanidina y la NMMA, lo que sugiere que el efecto de L-arginina no es vía NO. Debido a que el L-glutamato mimetiza los efectos de la L-arginina, es probable que en este

sistema, la L-arginina realice su acción vía degradación a L-glutamato (Egan y cols, 1995) si bien en otros sistemas pudiera ser mediante otro mecanismo.

La L-arginina es metabolizada en tejidos de mamíferos a L-ornitina, urea y poliaminas. Algunos tejidos pueden formar NO a partir de la L-arginina, y es posible que algunos de los efectos biológicos de la L-arginina puedan ser mediados por el NO. Sin embargo, no hay datos suficientes para explicar el mecanismo por el cual la L-arginina influencia el metabolismo de carbohidratos (Egan y cols, 1995). En nuestro caso, es factible que la L-arginina actúe a través de síntesis de poliaminas, al menos parcialmente, para revertir los daños causados por la diabetes, ya que su administración previene los daños nocivos de la diabetes mellitus sobre el desarrollo embrionario, y las poliaminas muestran un efecto similar, aunque menor.

En mamíferos la ODC, es la enzima reguladora de la síntesis de poliaminas. Hay evidencias de que la diabetes mellitus provoca cambios en la actividad de esta enzima. La actividad de ODC renal en machos diabéticos aumenta seis veces al día siguiente de la inducción, para disminuir cerca de un tercio, los primeros cuatro días post-inducción. El tratamiento con insulina causa aumento al triple al día siguiente de la inducción, para mantenerse cerca del doble de la de machos sanos. En contraste, en músculo gastrocnemio de ratas diabéticas disminuye cerca de la mitad del valor hallado en el de ratas controles, y el tratamiento con insulina muestra un valor similar al control (Pedersen y cols, 1992).

La diabetes no modifica la actividad de la ODC en hígado de ratas en gestación avanzada, con respecto a ratas no diabéticas gestantes; sin embargo, la actividad de la ODC es menor en ratas diabéticas gestantes que en ratas diabéticas vírgenes. La diabetes causa

disminución del contenido de espermina hepática en ratas gestantes (Poveda y cols, 1993). El hecho de que tanto la L-arginina como sus derivados puedan revertir los efectos de la diabetes mellitus, apoya la idea de que este aminoácido ejerza algunos de sus efectos vía poliaminas.

Uno de los mecanismos propuestos para las acciones biológicas de las poliaminas es intervenir de manera directa en la síntesis de proteínas. La diabetes inducida por STZ disminuye la síntesis de proteínas del hígado de ratas gestantes y no gestantes. Debido a que no se ha detectado diferencia en el contenido de proteínas en los animales diabéticos y controles, es probable que estos resultados impliquen también una disminución de la degradación de proteínas. El hígado de fetos de ratas diabéticas también muestra una velocidad de síntesis de proteínas menor que la encontrada para fetos de ratas sanas (García y cols, 1996). En la condición diabética, tanto en ratas no gestantes como en las gestantes y sus fetos, hay una disminución de la capacidad de formar polisomas, lo que indica que la diabetes altera la fase de iniciación (Martin y cols, 1995).

Otro mecanismo por el cual las poliaminas ejercen su función es debido a su propiedad antioxidante. Tanto la L-arginina como la agmatina o la espermidina muestran capacidad de reducir la acumulación de colágeno en riñón de ratones diabéticos. El mecanismo por el cual llevan a cabo este efecto parece ser por bloquear y rescatar residuos carbonilo reactivos, que son abundantes en el estado diabético (Marx y cols, 1995). Es probable que haya sucedido esto en nuestro sistema, ya que en el estado diabético se ha reportado, tanto para humanos como para modelos animales, un aumento de radicales libres de oxígeno y/o una disminución de la actividad de enzimas depuradoras. Los radicales libres

de oxígeno, una vez formados, actúan de manera inespecífica sobre otros tipos de moléculas, causando formación de radicales de varios tipos, inestables, que culminan en daño celular. La idea de que las poliaminas previenen el daño originado a la diabetes por disminución de daño causado por especies reactivas, es atractiva, y podría ser estudiada en el futuro.

Por último, el tratamiento con L-arginina o poliaminas en la terapéutica médica no es aún factible. Deben todavía realizarse otro tipo de estudios, tales como estudios de toxicidad en humanos y animales, así como de búsqueda de dosis óptimas. Por otra parte, debe ejercerse un mejor control de la diabetes mellitus durante el embarazo, ya que en nuestro caso, el tratamiento con insulina (así como con arginina y poliaminas), aunque causa normalización de la glucemia, no manifiesta el mismo efecto sobre la cetonemia, ni sobre el desarrollo intrauterino alterado.

CONCLUSIONES

1. La aplicación de aloxana, a dosis menores a 110 mg/Kg, el día cero de gestación, no provoca hiperglucemia ni afecta el desarrollo embrionario. Es probable que no se haya alcanzado la dosis efectiva.

2. La aplicación de aloxana, a dosis de 110 mg/Kg y mayores, el día cero de gestación, provoca hiperglucemia en las madres, y pérdida del desarrollo embrionario. La razón puede ser que se produce un estado de hiperglucemia tan elevada y sostenida, que sea incompatible con la gestación.

3. La aplicación de aloxana 110 mg/Kg, el día cuatro de gestación, provoca hiperglucemia, acompañada algunas veces por embriotoxicidad y otras veces por retraso del desarrollo. Es posible que haya distinta respuesta, debida a diferente susceptibilidad de las madres tratadas.

4. La aplicación de L-arginina a ratas diabéticas gestantes revierte la hiperglucemia, pero no la cetonemia, y previene casi por completo los daños sobre la progenie. Esto apoya la evidencia de que el aminoácido protege a las células β pancreáticas.

5. Las poliaminas revierten parcialmente la hiperglucemia y la cetonemia, y protegen parcialmente a la descendencia de los efectos nocivos de la diabetes mellitus. Estos hallazgos

apoyan la idea de que el mecanismo por el cual la L-arginina protege a las células β pancreáticas del daño provocado por la aloxana es mediado por vía de poliaminas.

6. Es probable que el principal factor causante del retraso del desarrollo embrionario y la embriotoxicidad sea el β -hidroxibutirato, aunque no podemos descartar la presencia de otros factores que no se determinaron.

7. No es posible, con nuestro estudio, inferir sobre los mecanismos por los cuales la diabetes mellitus afecta el desarrollo, ni los mecanismos por los cuales la L-arginina y las poliaminas lo protegen, aunque es probable que sea, o por acción estimuladora de las poliaminas sobre síntesis de proteínas, o por protección contra especies reactivas de oxígeno.

REFERENCIAS

- Aerts, L. y van Assche, F.A. (1992). Islet transplantation in diabetic pregnant rats normalizes glucose homeostasis in their offspring. *J. Dev. Physiol.* 17: 283-287.
- Akashi, M., Akazawa, S., Akazawa, M., Trocino, R., Hashimoto, M., Maeda, Y., Yamamoto, H., Kawazaki, E., Takino, H. y Yokota, A. (1991). Effects of insulin and myo-inositol on embryo growth and development during early organogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 40: 1574-1579.
- Akazawa, S., Akazawa, M., Hashimoto, M., Yamaguchi, Y., Toyama, K., Ueda, Y., Nakanishi, T., Mori, T., Miyake, S., y Nagataki, S. (1987). Effects of hypoglycaemia on early embryogenesis in rat embryo organ culture. *Diabetologia.* 30: 791-796.
- Akazawa, M., Akazawa, S., Hashimoto, M., Akashi, M., Yamazaki, H., Tahara, D., Yamamoto, H., Yamaguchi, Y., Nakanishi, Y., y Nagataki, S. (1989). Effects of brief exposure to insulin-induced hypoglycemic serum during organogenesis in rat embryo culture. *Diabetes.* 38: 1573-1578.
- Angerwall, L. (1959). Alloxan diabetes and pregnancy in the rat. *Acta Endocrinol.* 39(Suppl 44): 1-86.
- Artal, R., Mosley, G.M. y Dorey F.J. (1984). Glycohemoglobin as a screening test for gestational diabetes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 148: 412-414.
- Baarsma, R., Reijngoud, D.-J., van Asselt, W.A., van Doormaal, J.J., Berger, R. y Okken, A. (1993). Postnatal glucose kinetics in newborns of tightly controlled insulin-dependent diabetic mothers. *Pediatr. Res.* 34: 443-447

- Baker, L., Piddington, R., Goldman, A., Eagler, J. y Moehring, J. (1990). *Myo-inositol and prostaglandins reverse the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos. Diabetologia* 33: 593-596.
- Barrow, M.V. y Taylor, W.J. (1969). A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J Morphol.* 127: 291-306.
- Beaudoin, A.R. (1980). Embryology and teratology. En: Baker, H.J., Lindsey, J.R., Weisbruth, S.H., eds. The laboratory rat. San Diego: Academic Press. Vol. II: 75-101.
- Beebe, L.F. y Kaye, P.L. (1991). Maternal diabetes and retarded preimplantation development of mice. *Diabetes* 40: 457-461.
- Bethell, D.R., Hibasami, H. y Pegg, A.E. (1982). Regulation of polyamine content in cultured fibroblasts. *Am. Phys. Soc.* C262-C269.
- Bowman, R.E. y Wolf, R.C. (1962). A rapid and specific ultramicromethod for total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 235: 2595.
- Brustman, L., Langer, O., Engel, S., Anyaegbunam, A. y Mazze, R. (1987). Verified self-monitoring blood glucose data versus glycosylated hemoglobin and glycosylated serum protein as a means of predicting short- and long-term metabolic control in gestational diabetes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157: 699-703.
- Buchanan, T.A. (1996). Birth defects in diabetic pregnancies: where do we go from here? *Eur. J. Endocrinol.* 134: 395-397.
- Buchanan, T.A., Denno, K.M., Sipos, G.F., y Sadler, T.W. (1994). Diabetic teratogenesis: In vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose *per se.* *Diabetes* 43: 656-660.

- Buchanan, T.A., Schemmer, J.K., y Freinkel, N. (1986). Embryotoxic effects of brief maternal insulin-hypoglycemia during organogenesis in the rat. *J. Clin. Invest.* 78: 643-649.
- Buchanan, T.A. y Kitzmiller, J.L. (1994). Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annu. Rev. Med.* 45: 245-260.
- Buchanan, T.A., y Sipos, G.F. (1989). Lack of teratogenic effect of brief maternal insulin-induced hypoglycemia in rats during late neurulation. *Diabetes.* 38: 1063-1066.
- Caaldi, A.A., y Algranati, I.D. (1989). Polyamines and regulation of ornithine biosynthesis in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 171: 1998-2002.
- Carone, D., Lovero, G., Greco, P., Capuano, F. y Selvaggi, L. (1993). Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 51: 103-109.
- Catalano, P.M., Tyzbit, E.D., Wolfe, R.R., Calles, J., Roman, N., Amini, S.B. y Sims, E.A.H. (1993). Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am. J. Physiol.* 264 (Endocrinol. Metab. 27): E60-E67
- Cederberg, J. y Eriksson, U.J. (1997). Decreased catalase activity in malformation-prone embryos of diabetic rats. *Teratology* 56: 530-537.
- Clough, J.R. (1985). Energy metabolism during mammalian embryogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 77-79.
- Cockroft, D.L. y Coppola, P.T. (1977). Teratogenic effects of excess glucose on head-fold rat embryos in culture. *Teratology* 16: 141-146.

- Cockcroft, D.L., Freinkel, N., Phillips, L.S y Shambaugh, G.E. (1981). Metabolic factors affecting organogenesis in diabetic pregnancy. *Clin. Res.* 29: 577A (Abstract)
- Connell, F.A., Vadheim, C., y Emanuel, I. (1985). Diabetes in pregnancy: A population-based study of incidence, referral for care, and perinatal mortality. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151: 598-603.
- Copeland, A.D., Hendrich, C.E. y Porterfield, S.P. (1990). Distribution of free amino acids in streptozotocin-induced diabetic pregnant rats, their placentae and fetuses. *Horm. Metab. Res.* 22: 65-70.
- Cunningham, R. y Werner, K.M. (1975). Isolation, characterization and mapping of *E. coli* mutants blocked in the synthesis of ornithine decarboxylase. *J. Bacteriol.* 124: 791-799.
- Churchill, A.J., Berendes, H.W. y Nemore, J. (1969). Neuropsychological deficits in children of diabetic mothers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 105:257-268.
- Davies, A. y Nicholls, J.S.D. (1993). Reversal of diabetic related accelerated fetal growth by maternal glycaemic control. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 50: 251-254.
- Davis, M.E., Fugo, N.W. y Lawrence, K.G. (1947). Effect of alloxan diabetes on reproduction in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 66: 638-641.
- De Hertog, R., Vanderheyden, I., Pampfer, S., Robin, D. y Delcourt, J. (1992). Maternal insulin treatment improves pre-implantation embryo development in diabetic rats. *Diabetologia* 35: 406-408.

- Delmis, J., Drazancic, A., Ivanisevic, M. y Suchanek, E. (1992). Glucose, insulin, HGH and IGF-1 levels in maternal serum, amniotic fluid and umbilical venous serum: A comparison between late normal pregnancy and pregnancies complicated with diabetes and fetal growth retardation. *J. Perinat. Med.* 20: 47-56.
- Demarini, S., Mimouni, F., Tsang, R., Khoury, J. y Hertzberg, V. (1994). Impact of metabolic control of diabetes during pregnancy on neonatal hypocalcemia: A randomized study. *Obstet. Gynecol.* 83: 918-922.
- Deuchar, E.M. (1977). Embryonic malformations in rats, resulting from maternal diabetes: preliminary observations. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 41: 93-99.
- Diamond, M.P., Moley, K.H., Pellicer, A., Vaughn, W.K. y DeCherney, A.H. (1989). Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development. *J. Reprod. Fertil.* 86: 1-10.
- Diamond, M.P., Harbert-Moley, K., Logan, J., Pellicer, A., Lavy, G., Vaughn, W. Y DeCherney, A.H. (1990). Manifestation of diabetes mellitus on mouse follicular and pre-embryo development: effect of hyperglycemia per se. *Metabolism* 39: 220-224.
- Dufresnes, E., Vanderheyden I., Robin, D., Delcourt, J., Pampfer, S. y De Hertogh, R. (1993). Glucose and pyruvate metabolism in preimplantation blastocyst from normal and diabetic rats. *J. Reprod. Fert.* 98: 169-177.
- Egan, J.M., Henderson, T.E. y Benier, M. (1995). Arginine enhances glycogen synthesis in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol.* 269: E61-E66.
- Ellington, S.K.L. (1987). Development of rat embryos cultured in glucose-deficient media. *Diabetes.* 36: 1372-1378.

- Ellison, A.C. y Maren, T.H. (1972). The effects of metabolic alterations on teratogenesis. *John's Hopkins Med. J.* 130: 87-94.
- Engstrom, E., Haglund, A. y Eriksson, U.J. (1991). Effects of maternal diabetes or in vitro hyperglycemia on uptake of palmitic and arachidonic acid by rat embryos. *Pediatr. Res.* 30: 150-153.
- Eriksson, U.L., Borg, L.A.H., Forsberg, H. y Styruud J. (1991). Diabetic embryopathy: Studies with animal and in vitro models. *Diabetes* 40 (Suppl 2): 94-98.
- Eriksson, U., Dahlstrom, E., Larsson, K.S. y Hellerstrom, C. (1982). Increased incidence of congenital malformations in the offspring of diabetic rats and their prevention by maternal insulin therapy. *Diabetes* 30: 1-6.
- Eriksson, U.J., Dahlstoöm, E. y Styruud, J. (1985). Metabolically determined teratogenesis: Malformations and maternal diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 79-82.
- Eriksson, U.J., Karlsson, M.-G. y Styruud, J. (1987). Mechanisms of congenital malformations in diabetic pregnancy. *Biol. Neonate* 51: 113-118.
- Eriksson, U.J. y Borg, L.A.H. (1991a). Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* 34: 325-331.
- Eriksson, U.J. y Borg, L.A.H. (1991b). Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* 42: 411-419.

- Farrell, P.M., Engle, M.J., Frantz, I.D., Goldman, A.S., Kalkhoff, R.D., Kemnitz, J.W., Perelman, R., Stern, J.S. y Susa, J.B. (1982). Complications of pregnancy and fetal development. *Diabetes*. 31 (Suppl 1): 89-94.
- Felig, P. y Coustan, D. (1991). Diabetes sacarina en: Complicaciones médicas durante el embarazo. Burrow, G.N. y Ferris, T. F. (Eds.). Panamericana. 2a. ed. Buenos Aires, Argentina. pp. 55-81.
- Ferris, A.M. y Reece, E.A. (1994). Nutritional consequences of chronic maternal conditions during pregnancy and lactation: lupus and diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 59(Suppl): 465S-473S.
- Finley, B.E. y Norton, S. (1991). Effects of hyperglycemia on mitochondrial morphology in the region of the anterior neuropore in the explanted rat embryo model: evidence for a modified Reid Hypothesis as a mechanism for diabetic teratogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 1661-1666.
- Foglia, V.G., Borghelli, D.D.S., Chieri, R.A., Fernández-Collazo, E.L., Spindler, I. y Wesely, O. (1963). Sexual disturbances in the diabetic rat. *Diabetes*. 1963; 12: 231-237.
- Fowden, A.L. (1993). Insulin deficiency: effects on fetal growth and development. *J. Paediatr. Child Health.* 29: 6-11.
- Fozard J.R., Part, M.L., Prakash, N.J., Grove J., Schechter, P.J., Sjoerdsma, A. y Koch-Weser, J. (1980). L-ornithine decarboxylase: an essential role in early mammalian embryogenesis. *Science* 208: 505-509.
- Freinkel, N. (1980). The Banting lecture 1980: of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29: 1023-1035.

- Freinkel, N., Cocckcroft, D.L., Lewis, N.J., Gorman, L., Akazawa, S., Phillips, L.S. y Shambaugh, G.E. III. (1986). The 1986 McCollum award lecture. Fuel-mediated teratogenesis during early organogenesis: The effects of increased concentrations of glucose, ketones, or somatomedin inhibitor during rat embryo culture. *Am. J. Clin. Nutr.* 44:986-995.
- Freinkel, N., Dooley, S.L. y Metzger, B.E. (1985). Care of the pregnant woman with insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 313: 96-101.
- Freinkel, N., Lewis, N.J., Akazawa, S., Roth, S.I. y Gorman, L. (1984). The honeybee syndrome: Implications of teratogenicity of mannose in rat embryo culture. *N. Eng. J. Med.* 310: 223-230.
- Freinkel, N y Metzger, B.E.T. (1979). Pregnancy as a tissue culture experience. The critical implications of maternal metabolism for fetal development, en: Pregnancy, metabolism, diabetes and the fetus. CIBA Foundation symposium no. 63. Amsterdam; *Excerpta Médica*, pp. 3-23.
- Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T. y Queen, C.A. (1972). Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vainillin reaction. *Clin Chem.* 18: 673.
- Gabbe, S.G. (1985). Management of diabetes mellitus in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 153: 824-828.
- Gabbe, S.G. (1993). Embarazo de la diabética: los inicios. *Clin. Perinatol.* (versión en español). 20: 511-519.

- Gale, T.F. (1991). Effects of in vivo exposure of pregnant hamster to glucose. I. Abnormalities in LVG strain fetuses following intermitent multiple treatments with two isomers. *Teratology* 44: 193-202.
- García, A.M., Martín, M.E., Blanco, L., Martín-Hidalgo, A., Fando, J.L., Herrera, E. y Salinas, M. (1996). Effect of diabetes on protein synthesis rate and eukaryotic initiation factor activities in the liver of virgin and pregnant rats. *Biol. Neonate* 69: 37-50.
- Garland, H.O., Forshaw, A.G. y Sibley, C.P. (1997). Dietary essential fatty acid supplementation, urinary calcium excretion and reproductive performance in the diabetic pregnant rat. *J. Endocrinol.* 153: 357-363.
- Garris, D.R. (1988). Effects of diabetes on uterine condition, decidualization, vascularization, and corpus luteum function in the pseudopregnant rat. *Endocrinology* 122: 665-672.
- Giavini, E., Broccis, M.L., Prati, M. y Roversi, G.D. (1991). Diet composition modifies embryotoxic effects induced by experimental diabetes. *Biol. Neonate* 59: 278-286.
- Giavini, F., Airoidi, L., Broccis, M.L., Roversi, G.D. y Prati, M. (1993). Effects of diets with different content in protein and fiber on embryotoxicity induced by experimental diabetes in rats. *Biol. Neonate* 63: 353-359.
- Gilbert, S.F. (1988). *Developmental biology*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. 2a. Ed. pp. 187-191.
- Gillies, M.C. y Mandel, T.E. (1990). The evolution of function and response to arginine challenge and pregnancy of portally and systemically placed islet cell grafts in streptozotocin diabetic mice. *Metabolism* 39: 1253-1258.

- Goldman, A.S., Baker, L., Piddington, R., Marx, B., Herold, R. y Egler, J. (1985). Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8227-8231.
- Goto, M.P., Goldman, A.S. y Uhing, M.R. (1992). PGE₂ prevents anomalies induced by hyperglycemia or diabetic serum in mouse embryos. *Diabetes* 41: 1644-1650.
- Hagay, Z.J. (1994). Diabetic ketoacidosis in pregnancy: etiology, pathophysiology, and management. *Clin. Obstet. Gynecol.* 37: 39-49.
- Hagay, Z.J., Weiss, Y., Zusman, I., Peled-Kamar, M., Reece, E.A., Eriksson, U.J. y Groner, Y. (1995). Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173: 1036-1041.
- Hampton, S.M., Hare, K., Morgan, J.B. y Evans, M. (1994). β cell status in infants of diabetic mothers: A pilot study. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 140S (Abstract).
- Hashimoto, M., Akazawa, S., Akazawa, M., Akashi, M., Yamamoto, H., Maeda, Y., Yamaguchi, Y., Yamasaki, H., Tahara, D., Nakanishi, T. y Nagataki, S. (1990). Effect of hyperglycaemia on sorbitol and *myo*-inositol content of cultured embryos: treatment with aldose reductase inhibitor and *myo*-inositol supplementation. *Diabetologia* 33: 597-602.
- Heald, P.J. (1979). Changes in ornithine decarboxylase during early implantation in the rat. *Biol. Reprod.* 20: 1195-1199.

- Henriques, C.U., Damm, P., Tabor, A., Pedersen, J.F. y Mølsted-Pedersen. (1993). Decreased alpha-fetoprotein in amniotic fluid and maternal serum in diabetic pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 82: 960-964.
- Hod, M., Star, S., Passonneau, J.V., Unterman, T.G. y Freinkel, N. (1986) Effect of hyperglycemia on sorbitol and myo-inositol content of cultured rat conceptus: failure of aldose reductase inhibitors to modify myo-inositol depletion and dysmorphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140: 974-980.
- Horii, K.-I., Watanabe, G.-I. e Ingalls TH. (1966). Experimental diabetes in pregnant mice. Prevention of congenital malformations in offspring by insulin. *Diabetes.* 15: 194-204.
- Howland, B.E. y Zebrowski, E.J. (1974). Gonadotropin levels in sera and pituitary glands of female rats treated with alloxan. *Life Sci.* 14: 289-296.
- Hunter, D.J.S., Burrows, R.F., Mohide, P.T. y Whyte, R.K. (1993). Influence of maternal insulin-dependent diabetes mellitus on neonatal morbidity. *Can. Med. Assoc. J.* 149: 47-52.
- Hunter E.S. y Sadler, T.W. (1987). Fuel-mediated teratogenesis: Biochemical effects of hypoglycemia during neurulation in mouse embryos in vitro. *Am. J. Physiol.* 257 (Endocrinol. Metabol. 20): E269-E276.
- Hunter, E.S., Phillips, L.S., Goldstein, S. y Sadler, T.W. (1991). Altered visceral yolk sac function produced by a low-molecular-weight somatomedin inhibitor. *Teratology* 43: 331-340.

- Ikawa, H., Irahara, M., Matsuzaki, T., Saito, S., Sano, T. y Aono, T. (1992). Impaired induction of prolactin secretion from the anterior pituitary by suckling in streptozotocin-induced diabetic rat. *Acta Endocrinol.* 126: 167-172.
- Jankowski, M.A, Uriu-Hare, J.Y., Rucker, R.B. y Keen, C.L. (1993). Effect of maternal diabetes and dietary copper on fetal development in rats. *Reprod. Toxicol.* 7: 589-598.
- Jankowski, M.A., Uriu-Hare, J.Y., Rucker, R.B., Rogers, J.M. y Keen, C.L. (1995). Maternal zinc deficiency, but no copper deficiency or diabetes, results in increased embryonic cell death in the rat: implicatio for mechanisms underlying abnormal development. *Teratology* 51: 85-93.
- Jawerbaum, A., Catafau, J.R., Gonzalez, E.T., Novaro, V., Gomez, G., Gelpi, E., Gimeno, A.L. y Gimeno, M.A.F. (1994). Glucose metabolism, tryglyceride and glycogen levels in isoleted uterine strips and in embryos in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus during pregnancy. *Prostaglandins* 47: 81-96.
- Jawerbaum, A., Gonzalez, E.T., Catafau, R., Rodriguez, R .R., Gomez, G., Gimeno, A.L. y Gimeno, M.A.F. (1993). Glucose, glycogen and tryglyceride metabolism, as well as prostaglandin production in uterine strips and in embryos from diabetic pregnant ratas. Influences of the presence of substrate in the incubation medium. *Prostaglandins* 46: 417-431.
- Kalhan, S.C. (1993). Rates of urea synthesis in the human newborn: Effect of maternal diabetes and small size for gestational age. *Pediatr. Res.* 34: 801-804.
- Kalter, H. (1966). Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. *Reprod Toxicol.* 10: 417-438.

- Kaufmann, R.C., Khosho, F.K., Verhulst, S.J. y Amankwah, K.S. (1991). Effect of pregnancy on glucose metabolism in glucose intolerant 'BB' wistar rats. *Am. J. Perinatol.* 8: 11-14.
- Kawaguchi, M., Tanigawa, K., Tanaka, O., y Kato, Y. (1994). Embryonic growth impaired by maternal hypoglucemia during early organogenesis in normal and diabetic rats. *Acta. Diabetol.* 31: 141-146.
- Kientsch-Engel, R. y Siess, E.A. (1981). D-(-)-3-Hydroxybutyrate and acetoacetate. En: Bergmeyer, H.U. (ed.). *Methods of enzymatic analysis.* 3ª. Vol. 8, VCH Publishers. Weinheim, FR Germany. pp. 60-69.
- Kim, J.N., Runge, W., Welles, L.J. y Lazarow, A. (1969). Effects of experimental diabetes on the offspring of the rat: fetal growth, birth weight, gestation period and fetal mortality. *Diabetes.* 9: 396-404.
- Knopp, R.H., Van Allen, M.I., McNelly. M., Walden, C .E. , Plovie, B., Shiota , K. y Broen, Z. (1993). Effect of insulin-dependent diabetes on plasma lipoproteins in diabetic pregnancy. *J. Reprod. Med.* 38: 703-710.
- Kuhn, D.C., Crawford, M.A., Stuart, M.J., Botti, J.J. y Demers, L.M. (1990). Alterations in transfer and lipid distribution of arachidonic acid in placentas of diabetic pregnancies. *Diabetes* 39: 914-918.
- Langer, O., Anyaegbunam, A., Brustman, L., Guidetti, D. y Mazze, R. (1987). Gestational diabetes: Insulin requirements in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157: 669-675.

- Lawrence A.M. y Contopoulos A.N. (1960). Reproductive performance in the alloxan diabetic female rat. *Acta Endocrinol.* 33: 175-184.
- Lazarow, A., Kim, J.N. y Wells, L.J. (1960). Birth weight and fetal mortality in pregnant subdiabetic rats. *Diabetes* 9: 114-117.
- Lee, A.T., Plump, A., DeSimone, C., Cerami, A. y Bucala, R. (1995). A role for DNA mutations in diabetes-associated teratogenesis in transgenic embryos. *Diabetes.* 44: 20-24.
- Lesser, K.B. y Carpenter, M.W. (1994). Metabolic changes associated with normal pregnancy and pregnancy complicated by diabetes mellitus. *Semin. Perinatol.* 18: 399-406.
- Levi, J.E., y Weinberg, T. (1949). Pregnancy in alloxan diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 72: 658-662.
- Lewis, N.J., Akazawa, S., y Freinkel, N. (1983). Teratogenesis from β -hydroxybutyrate during organogenesis in rat embryo organ culture and enhancement by subteratogenic glucose. *Diabetes* 32(Suppl): 11A (Abstract).
- Lindgren, F.A., Hartling, S.G., Persson, B.E., Röder, M.E., Snellman, K., Bidner, C. y Dahlquist, G. (1993). Proinsulin levels in newborn siblings of type I (insulin-dependent) diabetic children and their mothers. *Diabetologia* 36: 560-563.
- Lund, P.K., Moats-Staats, B.M., Hynes, J.G., Simmons, J.G., Jansen, M., D'Ercole, A.J. y Van Wyk, J.J. (1986). Somatomedin-C/Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J. Biol. Chem.* 261: 14359-14544.

- Mannen, C.A., Hood, R.D. y Farina, J. (1983). Ornithine decarboxylase inhibitors and fetal growth retardation in mice. *Teratology* 28: 237-242.
- Martin, M.E., Garcia, A.M., Blanco, L., Herrera, E. y Salinas, M. (1995). Effect of streptozotocin diabetes on polysomal aggregation and protein synthesis rate in the liver of pregnant rats and their offspring. *Bioscience Rep.* 15: 15-20.
- Marx, M., Trittenwein, G., Aufricht, C., Hoeger, H. y Lubec, B. (1995). Agmatine and spermidine reduce collagen accumulation in kidneys of diabetic db/db mice. *Nephron* 69: 155-158.
- Mayhew, T.M., Sørensen, F.B., Klebe, J.G. y Jackson, M.R. (1993). Oxygen diffusive conductance in placentae from control and diabetic women. *Diabetologia* 36: 955 -960.
- McManus, R.M. y Ryan, E.A. (1992). Insulin requirements in insulin-dependen and insulin-requiring GDM women during final months of pregnancy. *Diabetes Care.* 15: 1323-1327.
- Menegola, E., Prati, M., Broccia, M.L. y Giavini, E. (1995). In vitro development of rat embryos obtained from diabetic mothers. *Experientia* 51: 394-397.
- Menegola, E., Broccia, M.L., Prati, M., Ricolfi, R. y Giavini, E. (1996). Glutathione status in diabetes-induced embryopathies. *Biol. Neonate* 69: 293-297.
- Méndez, J.D. (1989). Poliaminas, en: *Bioquímica e Inmunología*. Vol II. Hicks, J.J. y Díaz-Zagoya, J.C. (Eds). Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 365-385.

- Méndez, J.D., Díaz-Flores, M., Durán, G. y Hicks, J.J. (1983). Inhibition of rat embryonic development by the intrauterine administration of α -difluoromethylornithine. *Contraception* 28: 93-98.
- Méndez, J.D. y Arreola, M.A. (1992). Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem. Int.* 28: 569-575.
- Méndez, J.D. y Ramos, H.G. (1994). Animal models in diabetes research. *Arch. Med. Res.* 25: 367-375.
- Metzger B.E. (1991). Biphasic effects of maternal metabolism on fetal growth. Quintessential expression of fuel-mediated teratogenesis. *Diabetes* 40 (Suppl 2): 99-105.
- Milner, R.D.G. y Hill, D.J. (1984). Fetal growth control: the role of insulin and related peptides. *Clin. Endocrinol.* 21: 415-433.
- Moley, K.H., Vaughn, W.K. y Diamond, M.P. (1994). Manifestations of diabetes mellitus on mouse preimplantation development: effect of elevated concentration of metabolic intermediates. *Hum. Reprod.* 9: 113-121.
- Moley, K.H., vaughn, W.K, DeCherney, A.H. y Diamond, M.P. (1991). Effect of diabetes mellitus on mouse pre-implantation embryo development. *J. Reprod. Fert.* 93: 325-332.
- Mølsted-Pedersen, L. (1985). Pregnancy and diabetes, en: *The Diabetes Annual. Vol. I.*, Alberti, K.G.M.M. y Kroll, L.P. (Eds). Elsevier. p. 243.

- Montoro, M.N., Myers, V.P., Mestman, J.H., Yunhua, X., Anderson, B.G. y Golde, S.H. (1993). Outcome of pregnancy in diabetic ketoacidosis. *Am. J. Perinatol.* 10: 17-20.
- Moore, T.R., Hollingsworth, D.R., Kolterman, O y Nager, C. (1987). Continuous subcutaneous insulin infusion in an obese insulin-resistant pregnant woman with type II diabetes: accelerated fetal growth and neonatal complications. *Obstet. Gynecol* 70: 480-485.
- Mordes, J.P. y Rossini, A.A. (1981). Animal models of diabetes. *Am. J. Med.* 70: 353-
- Moreno-Ruiz, M.E., Palacio-Vasco, F. y Espinosa de los Monteros, A. (1988). Malformaciones congénitas en los hijos de madres con alteración en el metabolismo de la glucosa. *Bol. Med. Hosp. Inf. Méx.* 45: 666-670.
- Mulder, E.J.H. y Visser, G.H.A. (1992). Impact of early growth delay on subsequent fetal growth and functional development: a study on diabetic pregnancy. *Early Hum. Develop.* 31: 91-95.
- New, D.A.T. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.* 53: 81-122.
- Nogowski, L. y Nowak, K.W. (1986) Arginine, administrated in various ways, as a stimulator of insulin secretion in the rabbit. *Horm. Metab. Res.* 18: 730-733.
- Nolan, C.J., Riley, S.F., Sheedy, M.T., Walstab, J.E. y Beischer, N.A. (1995). Maternal serum tryglyceride, glucose tolerance, and neonatal birth weight ratio in pregnancy. *Diabetes Care.* 18: 1550-1556.

- Palomar-Morales, M., Baiza, L.A., Verdín-Terán, L., Román-Ramos, R., Altamirano-Lozano, M. y Méndez, J.D. (1998). Fetal development in alloxan-treated rats. *Reprod. Toxicol.* (en prensa).
- Pampfer, S., De Hertogh, R., Vanderheyden, I., Michiels, B. y Vercheval, M. (1990). Decreased inner cell mass proportion in blastocyst from diabetic rats. *Diabetes* 39: 471-476.
- Pampfer, S., Wu, Y.D., Vanderheyden, I. y De Hertogh, R. (1994). In vitro study of the carry over effect associated with early diabetic embryopathy in the rat. *Diabetologia* 37: 855-863.
- Pampfer, S., Vanderheyden I. y De Hertogh, R. (1997). Increased synthesis of tumor necrosis factor- α in uterine explants from pregnant diabetic rats and in primary cultures of uterine cells in high glucose. *Diabetes* 46: 1214-1224.
- Patterson, J.W., Lazarow, A. y Levey, S. (1949). Alloxan and dialuric acid: their stabilities and ultraviolet absorption spectra. *J. Biol. Chem.* 177: 187-198.
- Pau, M.Y. y Milner, J.A. (1981). Arginine deficiency during gestation and lactation in the rat. *J. Nutr.* 111: 184-193.
- Pearson, J.F. (1993). Pregnancy and complicated diabetes. *Br. J. Hosp. Med.* 49: 739-742.
- Pedersen, J.F. (1977). The pregnant diabetic and her newborn. Williams y Wilkins. 2a. Ed. Baltimore, USA. p. 212-219.
- Pedersen, J.F. y Mølsted-Pedersen, L. (1979). Early growth retardation in diabetic pregnancy. *Br. Med. J.* I: 18-19.

- Pedersen, J.F. y Mølsted-Pedersen, L. (1981). Early fetal growth delay detected by ultrasound marks increased risk of congenital malformations in diabetic pregnancy. *Br. Med. J.* 283: 269-277.
- Pedersen, S.B., Flybjerg, A. Grønbaek, H. y Richelsen, B. (1992). Increased ornithine decarboxylase activity in kidneys undergoing hypertrophy in experimental diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 86: 67-72.
- Pegg, A. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234: 249-262.
- Pegg, A. y McCann, P.P. (1982). Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 273: C212-C221.
- Persson, L y Heby, O. (1990). Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. Elsevier Science Publishers LTD. April 15: 153-158.
- Pettitt, D.J., Nelson, R.G., Saad, M.F., Bennett, P.H. y Knowler, W.C. (1993). Diabetes and obesity in the offspring of Pima indian women with diabetes during pregnancy. *Diabetes Care* 16(Suppl 1): 310-314.
- Phelan, S.A., Ito, M. y Loecjken, M.R. (1997). Neural tube defects in embryos of diabetic mice. Role of the *Pax-3* gene and apoptosis. *Diabetes.* 46: 1189-1197.
- Pinter, E., Reece, E.A., Leranath, C.Z., García-Segura, M., Hobbins, J.C., Mahoney, M.J. y Naftolin, F. (1986). Arachidonic acid prevents hyperglycemia-associated yolk sac damage and embryopathy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 155: 691-702.

- Piyachaturawat, P., Peungvich, P., Limlomwongse, L. y Krishnamra N. (1984). Depression of estrogen-induced uterine peroxidase in alloxan-diabetic rats. *J. Steroid. Biochem.* 21: 685-690.
- Portha, B. y Picon, L. (1982). Insulin treatment improves the spontaneous remission of neonatal streptozotocin diabetes in the rat. *Diabetes* 31: 165-169.
- Poveda, B., Soler, C., Soley, M. y Pastor-Anglada, M. (1993). Ornithine decarboxylase activity and urea in liver of late-pregnant rats. *Biol. Neonate.* 63: 44-51.
- Psychoyos, A. (1973). Hormonal control of ovum implantation. *Vitam. Horm.* 34: 215-242.
- Rajaratnam, V.S., Webb, P.J., Fishman, R.B. y Streck, R.D. (1997). Maternal diabetes induces upregulation of hepatic insulin-like growth factor binding protein-1 mRNA expression, growth retardation and developmental delay at the same state of rat fetal development. *J. Endocrinol.* 152: R1-R6.
- Ramírez-Torres, M.A., Barranco, J.A., Espinosa de los Monteros, M.A., Shor, P.V., Cornejo, J., Karchmer, S. y Parra, A. (1992). Alteración del metabolismo de la glucosa durante la gestación: Experiencia institucional. *Ginec. Obstet. Méx.* 60: 217-225.
- Ramos, R.H.G. y Méndez, J.D. (1994). Diabetes Mellitus Experimental en: *Ciencia Veterinaria.* 6. 347-377
- Reece, E.A., Coustan, D.R., Sherwin, R.S., Tuck, S., Bates, S., O'Connor, T. y Tamborlone, W.V. (1991). Does intensive glycemc control in diabetic pregnancies result in normalization of other metabolic fuels? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165: 126-130.

- Reece, E.A, Homko, C.J. y Hagay, Z. (1996a). Prenatal diagnosis and prevention of diabetic embryopathy. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 23: 11-28.
- Reece, E.A., Homko, C. y Wiznitzer, A. (1994). Metabolic changes in diabetic and nondiabetic subjects during pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* 49: 64-71.
- Reece, E.A., Homko, C.J., Wu, Y.-K. y Witznizer, A. (1993). Mezclas energéticas metabólicas y embriopatía por diabetes. *Clin. Perinatol.* (versión en español). 20: 521-536.
- Reece, E.A., Khandelwal, M., Wu, Y.-K. y Borenstein, M. (1997). Dietary intake of mio-inositol and neural tube defects in offspring of diabetic rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176: 536-539.
- Reece, E.A, Wiznitzer, A., Homko, C.J., Hagay, Z. y Wu, Y.K. (1996b). Synchronization of the factors critical for diabetic teratogenesis: an in vitro model. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 1284-1288.
- Reece, E.A. y Eriksson, U.J. (1996). The pathogenesis of diabetes-associated congenital malformations. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 23: 29-45.
- Reece, E.A. y Wu, Y.-K. (1997). Prevention of diabetic embryopathy in offspring of diabetic rats with use of a cocktail of deficient substrates and an antioxidant. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176: 790-798.
- Rivera-Rueda, M.A., Barranco-Jaubert, A., Mas-Muñoz, L., Cardona-Pérez, A. y Udaeta-Mora, E. (1993). Hijo de madre diabética insulino-dependiente: Repercusiones neonatales. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 50: 321-327.

- Rivero, F., Goya, L., Aláez, C. Y Pascual-Leone, A.M. (1994). Effects of undernutrition and diabetes on serum and liver mRNA expression of IGFs and their binding proteins during rat development. *J. Endocrinol.* 145: 427-440.
- Roberts, A.B. y Baker, J.R. (1987). Relationship between fetal growth and maternal fructosamine in diabetic pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 70: 242-246.
- Roberts, A.B., Mitchell, J., Murphy, C., Koya, H. y Cundy, T.C. (1994). Fetal liver length in diabetic pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 170: 1308-1312.
- Rodgers, B.D. y Rodgers, D.E. (1991). Clinical variables associated with diabetic ketoacidosis during pregnancy. *J Reprod Med* 36: 797-799.
- Rosenn, B., Siddiqui, T.A. y Miodovnik, M. (1995a). Normalization of blood glucose in insulin-dependent diabetic pregnancies and the risk of hypoglycemia: A therapeutic dilemma. *Obstet. Gynecol. Surv.* 50: 56-61.
- Rosenn, B.M., Miodovnik, M., Holberg, G., Khoury, J.C. y Siddiqui, T.A. (1995b). Hypoglycemia: the price of intensive insulin therapy for pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Obstet. Gynecol.* 85: 417-422.
- Ryan, E.A., Tobin, B.W., Tang, J. y Finegood, D.T. (1993). A new model for the study of mild diabetes during pregnancy: Syngenic islet-transplanted STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* 42: 316-323.
- Ryan, E.A, Liu, D., Bell, R.C., Finegood, D.T. y Crawford, J. (1995). Long-term consequences in offspring of diabetes in pregnancy: studies with syngeneic islet-transplanted streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 136: 5587-5592.

- Sadler, T.W. (1980a). Effects of maternal diabetes on early embryogenesis: I. The teratogenic potential of diabetic serum. *Teratology* 21: 339-347.
- Sadler, T.W. (1980b). Effects of maternal diabetes on early embryogenesis. II. Hyperglycemia-induced exencephaly. *Teratology* 21: 349-356.
- Sadler, T.W., Denno, K.M., y Hunter, E.S. (1993). Effects of altered maternal metabolism during gastrulation and neurulation stages of embryogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 678:48-61.
- Sadler, T.W., Phillips, L.S., Balkan, W. y Goldstein, S. (1986). Somatomedin inhibitors from diabetic rat serum alter growth and development of mouse embryos in culture. *Diabetes* 35: 861-865.
- Sadler, T.W., y Horton, W.E. (1983). Effects of maternal diabetes on early embryogenesis. The role of insulin and insulin therapy. *Diabetes*. 32: 1070-1074.
- Sadler, T.W., y Hunter, E.S. (1987). Hypoglycemia: how little is too much for the embryo? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157: 190-193.
- Salvesen, D.R., Brudenell, M., Proudler, A.J., Crook, D. y Nicolaides, K.H. (1993). Fetal pancreatic β -cell function in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus: relationship to fetal acidemia and macrosomia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168: 1363-1369.
- Shafrir, E. (1990). Diabetes in animals, En: Rifkin, H. y Porter, D. (Eds.). *Diabetes Mellitus*. Elsevier, 4th. New York. pp. 299-
- Sheehan, E. A., Beck, F., Clarke, C.A. y Stanisstreet, M. (1985). Effects of β -hydroxybutirate on rat embryos grown in culture. *Experientia* 41: 273-275.

- Shubert, P.J., Gordonm, M.C., Landon, M.B., Gabbe, S.G. y Kniss, D.A. (1996). Ketoacids attenuate glucose uptake in human trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 56-62.
- Simán, C.M. y Eriksson, U.J. (1997). Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* 46: 1054-1061.
- Sinden J.A. y Longwell B.B. (1949). Effect of alloxan diabetes on fertility and gestation in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70: 607-610.
- Sivan, E., Lee, Y.-C., Wu, Y.-K. y Reece, E.A. (1997). Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology* 56: 343-349.
- Smithberg, M., y Runner, M.N. (1963). Teratogenic effects of hypoglycemic treatments in inbreed strains of mice. *Am. J. Anat.* 13: 479-489.
- Smoak, I.W. y Sadler, T.W. (1990). Embryopathic effects of short-term exposure to hypoglycemia in mouse embryos in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163: 619-624.
- Steel, J.M., Johnstone, F.D., Hume, R. y Mao, J-H. (1994). Insulin requeriments during pregnancy in women with type I diabetes. *Obstet. Gynecol.* 83:253-258.
- Steel, J.M., Wu, P.S., Johnstone, F.D., Muir, B.B., Sweeting, V.M. y Hillier, S.G. (1995). Does early growth delay occur in diabetic pregnancy? *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 102: 224-227.
- Styrud, J. y Eriksson, U.J. (1990). Effects of D-glucose and β -hydroxybutyric acid on the in vitro development of (pre)chondrocytes from embryos of normal and diabetic rats. *Acta Endocrinol.* 122: 487-498.
- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.

- Takano, K. y Nishimura, H. (1966). Congenital malformations induced by alloxan diabetes in mice and rats. *Anat. Rec.* 158: 303-312.
- Tanigawa K., Kawaguchi, M., Tanaka, O. y Kato Y. (1991). Skeletal malformations in rat offspring. Long-term effect of maternal insulin - induced hypoglycemia during organogenesis. *Diabetes* 40: 1115-1121.
- Tatewaki, R., Otani, H., Hashimoto, R., Naora, H. y Tanaka, O. (1991). Chromosome analysis of postimplantation stage embryos for studying possible causes of developmental abnormalities in nonobese diabetic mice. *Biol. Neonate* 60: 395-402.
- Tatewaki, R., Hashimoto, R., Tanigawa, K., Furuse, K. y Tanaka, O. (1995). Relationship between associations of NOR and chromosomal anomalies in the abnormal embryos of nonobese diabetic and STZ-diabetic mouse. *Biol. Neonate.* 67: 132-139.
- Torchinsky, A., Toder, V, Savion, S., Shepshelovich, J., Orenstein, H. y Fein, A. (1997). Immunostimulation increases the resistance of mouse embryos to the teratogenic effect of diabetes mellitus. *Diabetologia* 40: 635-640.
- Towner, D., Kjos, S.L., Leung, B., Montoro, M.M., Xiang, A., Mestman, J.H. y Buchanan, T.A. (1995). Congenital malformations in pregnancies complicated by NIDDM. *Diabetes Care.* 18: 1446-1451.
- Triadou, N., Portha, B., Picon, L. y Rosselin, G. (1982). Experimental chemical diabetes and pregnancy in the rat: Evolution of glucose tolerance and insulin response. *Diabetes* 31: 75-79.
- Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 1969; 6: 24.

- Trocino, R.A., Akazawa, S., Takino, H., Takao, Y., Matsumoto, K., Maeda, Y., Okuno, S.-I., y Nagataki, S. (1994). Cellular-tissue localization and regulation of the GLUT-1 protein in both the embryo and the visceral yolk sac from normal and experimental diabetic rats during the early postimplantation period. *Endocrinology* 134: 869-878.
- Trocino, R.A, Akazawa, S., Ishibashi, M., Matsumoto, K., Matsuo, H., Yamamoto, H., Goto, S., Urata, Y., Kondo, T. Y Nagataki, S. (1995). Significance of glutathione depletion and oxidative stress in early embryogenesis in glucose-induced rat embryo culture. *Diabetes* 44: 992-998.
- Uriu-Hare, J.Y., Stern, J. y Kleen, C.L. (1989). Influence of maternal dietary Zn intake on expression of diabetes-induced teratogenicity in rats. *Diabetes* 38: 1282-1290.
- Veselá, J., Reháek, P., Baran, V. y Koppel, J. (1994). Effects of healthy pseudopregnant milieu on development of two-cell subdiabetic mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 100: 561-565.
- Vercheval, M., De Hertogh, R., Pampfer, S., Vanderheyden, I., Michiels, B., De Bernardi, P. y De Meyer, R. (1990). Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantacion period. *Diabetologia* 33: 187-191.
- Wahlefeld, A.W. (1979). Total lipids. En: Bergmeyer HU, *Methoden der enzymatischen analyse*. 3a. Ed. Tomo II. Weinheim: Verlag-Chemie, pp. 1878.
- Watanabe, G.-I. e Ingalls, T.H. (1963). Congenital malformations in the offspring of alloxan-diabetic mice. *Diabetes*. 12: 66-72.
- Wauben-Penris, P.J.J. y Prins, J.-B. (1983). Meiotic behavior of alloxan-treated diabetic and nondiabetic T(1;13)70H mice. *Hum. Genet.* 63: 268-273.

- Weigensberg, M.J., García-Palmer, F.J. y Freinkel, N. (1990). Uptake of myo-inositol by early-somite rat conceptus: Transport kinetics and effects of hyperglycemia. *Diabetes* 39: 575-582.
- Welsh, N. y Sjöholm, A. (1988). Polyamines and insulin production in isolated mouse pancreatic islets. *Biochem. J.* 252: 701-707.
- Wentzel, P., Thunberg, L. y Eriksson, U.J. (1997). Teratogenic effect of diabetic serum is prevented by supplementation of superoxide dismutase and N-acetylcysteine in rat embryo culture. *Diabetologia* 40: 7-14.
- Wilson, J.G. (1977). Current status of teratology: general principles and mechanisms derived from animal studies. En: Wilson, J.G., Fraser, F.C., (eds). *Handbook of Teratology, general principles and etiology*. Vol. I. New York: Plenum Press. pp. 46-90.
- Wilson, G.N., Howe, M. y Stover, J.M. (1985). Delayed developmental sequences in rodent diabetic embryopathy. *Pediatric Res.* 19: 1337-1340.
- Wyse, L.J., Jones, M. y Mandel, F. (1994). Relationship of glycosylated hemoglobin, fetal macrosomia, and birthweight macrosomia. *Am. J. Perinatol.* 11: 260-262.
- Yang, X., Borg, L.A.H. y Eriksson, U.J. (1995). Altered mitochondrial morphology of rat embryos in diabetic pregnancy. *Anat. Rec.* 241: 255-267.
- Zárate, A., Alger, M., Paniagua, H., Canales, E.S. y MacGregor, C. (1978). Tratamiento de la diabética embarazada. *Gac. Med. Méx.* 114: 147-155.

PUBLICACION GENERADA EN ESTA TESIS

FETAL DEVELOPMENT IN ALLOXAN-TREATED RATS

MARTÍN PALOMAR-MORALES,*[†], LUIS A. BAIZA,[†] LETICIA VERDÍN-TERÁN,[†]
RUBÉN ROMÁN-RAMOS,[‡] MARIO ALTAMIRANO-LOZANO,[§] and JOSÉ D. MÉNDEZ,*

*Medical Research Unit in Metabolic Diseases, National Medical Center, Mexican Institute of Social Security, Mexico; [†]Developmental Biology Laboratory, Morphology and Function Unit, ENEP Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, State of Mexico; [‡]Pharmacology Laboratory, Health Sciences Department, Biological and Health Sciences Division, UAM-Iztapalapa, Mexico and [§]Cytogenetic, Mutagenesis and Reproductive Toxicology Laboratory, Reproductive Biology Research Unit, Bioterium, Campus II, FES Zaragoza, UNAM, Mexico.

Abstract — The effect of alloxan on embryo and fetal development in rats was evaluated. Alloxan was injected intraperitoneally (ip) in pregnant rats at doses of 80 to 150 mg/kg at Day 0 (day of fertilization), and 110 mg/kg at Day 4 of pregnancy. Hyperglycemia was rarely produced at alloxan doses from 80 to 100 mg/kg, and the frequency of malformations observed was low. Higher doses (110 to 150 mg/kg) caused severe hyperglycemia, and maternal or embryonic death. When 110 mg/kg was administered on Day 4 of gestation (the day before embryo implantation), all rats had resorption nodules and litters with embryos with delayed growth. We recommend the induction of diabetes mellitus on Day 4 of pregnancy for studies of diabetes-gestation interaction. © 1998 Elsevier Science Inc.

① **Key Words:** diabetes; embryotoxicity; alloxan; fetal development.

INTRODUCTION

It is well known that inadequate control of diabetes mellitus type I during the first trimester of pregnancy, and particularly during the first six weeks of intrauterine development, has been associated with a spectrum of developmental abnormalities, from growth retardation to nervous system, heart, renal, and skeletal abnormalities, and the loss of the conceptus by spontaneous abortion (1,2). The incidence of malformations is three to four times higher in children of diabetic than nondiabetic mothers (2).

Laboratory tests using whole embryo culture, developed by New (3), have demonstrated that factors in the sera of diabetic mammals can induce teratogenesis. However, the precise cause of malformations seems to be multifactorial involving hyperglycemia, hyperinsulinemia, hypoglycemic episodes, and hyperketonemia. The mechanisms seem to be mediated by a deficiency in the metabolism of *myo*-inositol, arachidonic acid, prostaglandins, and/or the increased production of free oxygen radicals (2,4).

Despite the above, an adequate experimental model is unavailable for the study of the *in vivo* diabetes-gestation interaction, since there are controversies on both the time of induction and the amount and route of the diabetogenic substance (alloxan or streptozotocin) injected, as well as its effects on embryo and fetal development (5).

This study was designed to reevaluate the diabetogenic effect of different doses of alloxan and the timing of its administration during rat pregnancy, and the effect of alloxan-induced diabetes on rat embryo and fetal development.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female rats of the Sprague-Dawley strain, approximately 75 d old and weighing 250 g, with defined estrous cycles, according to recommendations for studies of this nature (6), were used. They were kept under controlled light (12:12), humidity, and temperature conditions, with water and feed (Purina rat chow) *ad libitum*.

Mating

The rats were mated with healthy fertile males of the same strain, and Day 0 was set as the day spermatozoa were detected in the vaginal smear. The rats were randomly distributed in groups of at least six animals each.

Effects of alloxan on embryo development

To evaluate damage at Day 10, when neurulation is completed (6,7), 80, 100, 120, 140, and 150 mg/kg alloxan or saline were given ip on Day 0, and dams were sacrificed under anesthesia (ketamine 50 mg/kg, intramuscularly) on Day 10. Blood was obtained, the uteri

Table 1. Effect of Alloxan on Maternal Glucose and Embryonic Development Evaluated on Day 10 of Rat Gestation

Alloxan dose (mg/kg)	Dams on Day 0	Dams with implantation sites/live dams	Survival percentage ^a	Serum glucose (mg/dL)	Number of live embryos/litter	Embryo characteristics	Somites
0 (saline)	6	5/6	100	119.3 ± 21.5	12.8 ± 3.3	Normal	23-24
80	6	6/6	100	141.0 ± 39.8	11.5 ± 2.1	Normal, with some abnormal (0-2/litter)	22-24
100	6	6/6	100	275.5 ± 217.5	11.6 ± 4.1	Normal (2 litters); Small and dead (2 litters); Resorptions (2 litters)	22-23
120	6	4/4	66	474.0 ± 170.5 ^b	0	Resorptions	—
140	6	4/4	66	353.0 ± 198.6 ^b	0	Resorptions	—
150	6	0/0	0	—	—	—	—

Diabetes was induced on Day 0 of gestation with the indicated alloxan doses. Rats were sacrificed on Day 10. The serum glucose and number of embryos/litter are reported as mean ± SD.

^aPercent of litters with implantations that had living embryos.

^b $P < 0.05$ compared with control.

were removed, and deciduomas and/or resorption sites counted. The embryos were recovered for evaluation of development.

Other groups of rats were sacrificed under anesthesia on Day 8 of gestation, after treatment with doses of 120, 140, and 150 mg/kg of alloxan or saline at Day 0, to evaluate whether the diabetic state affects embryo viability at the egg-cylinder stage, because resorptions were observed at these doses when animals were sacrificed on Day 10. (See Results.)

Effect of alloxan on serum glucose levels and fetal development

Other groups of rats were injected on Day 0 with 80, 90, 100, or 110 mg/kg alloxan or with saline. A blood sample was taken from the caudal vein and glucose levels measured from Day 0 to Day 18 of gestation between 0800 h and 0900 h using a glucometer (RefloLux S, Lakeside) and reactive strips (Haemo Glukotest 20-800 R, Lakeside). These rats were anesthetized on Day 19 of gestation and blood collected, then the uteri were removed, and the number of live and dead fetuses as well as resorption nodules were recorded. Fetuses were analyzed to determine the number and severity of malformations using a modified version of the Wilson method (8). Tissue samples were taken for histologic analysis using conventional H and E staining.

Induction of diabetes on Day 0 or 4

Other groups of rats were treated with 110 mg alloxan/kg on Day 0 or 4 of gestation and compared with respective control groups. The rats were sacrificed on Day 13.

Biochemical tests

Blood was centrifuged at 1500 × g using a Beckman CS-12R centrifuge, and serum divided into aliquots

for glucose (9), total lipid (10), and triglyceride (11) determinations.

Statistical analysis

Results were compared using ANOVA followed by a Tukey test. For those experiments where there was only a control and an experimental group, Student's *t*-test was used.

RESULTS

Embryo development

The experiments conducted to study the effects of alloxan on neurulation showed that the higher dose of alloxan (150 mg/kg) caused mortality in all the pregnant females. The doses of 120 and 140 mg/kg also caused high mortality, and when the mothers survived, only embryonic resorption was seen. The deciduomas were small and bloody, and consisted of amorphous tissue instead of recognizable embryos. H and E staining indicated the presence of necrotic and degenerated tissue; viable cells were not detected. The 100 mg/kg alloxan dose caused no significant increase in serum glucose concentrations. Of six litters, two showed resorbed embryos. In two other litters, the embryos were small and degenerate, and appeared to have died before the established observation period. In the final two litters, no embryonic alteration was observed (Table 1). With 80 mg/kg alloxan, glucose serum concentration was not significantly altered at Day 10, although malformations were seen in some embryos (Figure 1). In only two litters were altered embryos found; in the first, one embryo showed exencephaly, and in the second, two embryos showed defective flexion and one of them also showed anencephaly, whereas in the other litters, no malformations were found.

In view of these findings, an experiment was



Fig. 1. Embryos at Day 10 of gestation. The effect of the administration of 80 mg/kg alloxan on Day 0 of pregnancy (left) is compared with a normal control embryo (right). 10x.

conducted to assess the effect of 120, 140, and 150 mg/kg alloxan evaluated at Day 8 of gestation. The three doses caused maternal mortality (Table 2), but in surviving dams, the embryos showed similar morphology to the control embryos; they were in the egg-cylinder stage and at the beginning of neurulation (Figure 2).

Fetal development

Rats treated with 80, 90, 100, and 110 mg/kg alloxan on Day 0 and were sacrificed on Day 19. At 80 mg/kg, no metabolic changes or malformations were seen (Table 3). Of the rats treated with 90 mg/kg, two died at 15 and 16 d of gestation and were hypoglycemic from Day 9 (Table 3). The fetuses showed necrotic changes but were of normal appearance. The remaining mothers were normoglycemic during the entire gestation period (Figure 3), and their fetuses were normal. Of the 14 rats treated with 100 mg/kg alloxan, three died before Day 19 and fetuses could not be recovered. Two were not pregnant and were discarded. Of the remaining, three had sustained hyperglycemia during the pregnancy, four showed transitory hyperglycemia, and two were normo-

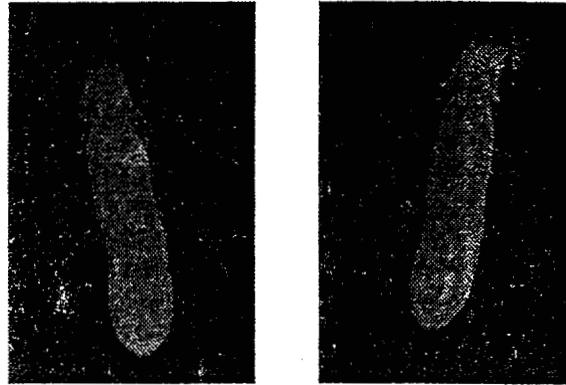


Fig. 2. Embryos at Day 8 of gestation. Normal control embryo (left) compared with a typical embryo recovered from a dam treated with alloxan on Day 0. No morphologic differences are seen. 60x.

glycemic. Despite the variability, blood glucose concentration was statistically different with respect to the control group during most of the pregnancy ($P < 0.05$). When sacrificed, hyperglycemia was prominent in the experimental group (Table 3). The fetuses were normal.

In the group treated with 110 mg/kg alloxan, three rats died before Day 19 of gestation. Of the remaining 11, one was normoglycemic, three showed sustained hyperglycemia from Day 1 or 2 of gestation, and seven had transitory hyperglycemia. The three hyperglycemic rats had no fetuses; normal fetuses were observed in the other rats.

Effect of the time of diabetes induction on fetal development

Table 4 summarizes the results obtained from rats that received 110 mg/kg alloxan on Day 0 or 4, and were sacrificed on Day 13 of gestation. After Day 0 of treatment, no embryos were found, but there were resorptions in two rats. Hyperglycemia was present in treated rats from Day 2 of gestation (Figure 4). On the day of sacrifice, glucose and total lipids were different with respect to the control values (Table 4).

When alloxan was administered on Day 4, in four

Table 2. Effect of Alloxan on Serum Glucose and Litters with Embryos Evaluated on Day 8

Alloxan dose (mg/kg)	Dams on Day 0	Dams with implantation sites/live dams	Survival percentage ^a	Serum glucose (mg/dL)	Number of live embryos/litter
0 (Saline)	6	5/6	100	148.0 ± 15.0	12.6 ± 1.5
120	10	6/8	80	401.2 ± 271.9 ^b	12.8 ± 1.6
140	15	4/11	73	513.8 ± 293.6 ^b	13.0 ± 2.4
150	6	1/3	75	n.d. ^c	10

Diabetes was induced on Day 0 of gestation with the indicated alloxan doses, and rats sacrificed on Day 8. In all the cases, embryos were of normal appearance. (See text.) Serum glucose and number of live embryos are given as mean ± SD.

^aPercent of litters with implantations that had living embryos; ^b $P < 0.05$ with respect to the control; ^cblood could not be drawn from the one dam of interest.

Table 3. Effect of Different Doses of Alloxan on Biochemical Parameters and Litter Size in Rats Evaluated at Day 19 of Gestation

Alloxan dose	Fate of dams	Serum biochemical determinations at sacrifice			Litter size
		Glucose (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Total lipids (mg/dL)	
0 (saline), n = 7	Alive	97.7 ± 6.4	451.7 ± 180.9	458.4 ± 360.5	12.6 ± 1.3
80, n = 6	Alive	95.0 ± 14.3	339.2 ± 304.4	549.5 ± 125.3	12.8 ± 1.3
90, n = 6	4 Alive	106.0 ± 20.2	325.75 ± 184.0	702.2 ± 41.8 ^a	12.0 ± 3.6
	2 Dead with hypoglycemia (30–60 mg/dL whole blood) ^b				7.6
100, n = 13	9 Alive ^c	207.0 ± 134.6 ^a	243.11 ± 119.9	616.9 ± 144.3 ^a	9.0 ± 3.9
	3 Dead with hyperglycemia (more than 300 mg/dL whole blood) ^d				?
	1 Dead with hypoglycemia (45–65 mg/dL whole blood) ^e				?
110, n = 12	9 Alive	187.0 ± 176.8	740.8 ± 311.1 ^a	346.7 ± 289.4	10.5 ± 2.1
	3 Dead with hyperglycemia (more than 300 mg/dL whole blood) ^f				

Diabetes was induced on Day 0 of gestation with the indicated alloxan doses. The rats were sacrificed on Day 19. Biochemical values were given as mean ± SD. ^a*P* < 0.05 with respect to control. ^bHad hypoglycemia from Day 3 or 4 and died before Day 19. In both cases, fetuses were recovered and analyzed; they showed no abnormalities. ^cProbable resorptions in three of them. ^dShowed hyperglycemia from Day 3 or 4 and died between Day 10 and 12; no fetuses could be recovered. ^eShowed hypoglycemia from Day 7 and died on Day 14; no fetuses could be recovered. ^fShowed hyperglycemia from Day 2 or 3 and died between Day 8 and 10; no fetuses were recovered.

rats the embryos showed delayed development, and in another five, only resorption nodules were found. All the rats showed hyperglycemia from Day 6 of gestation compared with the control (Figure 5). On the day of

sacrifice, glucose and triglyceride values were significantly higher than in the controls (Table 4).

DISCUSSION

In animal models of the gestation–diabetes type 1 interaction, two strategies have been developed. In the first, diabetes is induced by diabetogens (i.e., alloxan, streptozotocin) in normal female rats, and the animals mated. In the second strategy, diabetes is induced after mating (5). Contradictory findings exist among several reports in the literature.

Some authors have reported that the administration of 40 mg/kg alloxan to normal rats before mating causes only placentas to be obtained at birth (12). At this dose, failure to mate has been reported, but if mating takes place, gestation will not reach full term (13). A dose of 55 mg/kg alloxan causes mating failure, maternal death, litters with dead neonates, and cannibalism (14). After treatment of immature 30-d-old, or 60-d-old pubescent rats with 50 mg/kg alloxan, the estrous cycle is lost, and if mating occurs, the 21-d fetuses may weigh up to a gram less than those of normal mothers (15). It has been reported that 25 to 30 mg/kg doses before mating cause a state of “subdiabetes” without affecting the female’s reproductive parameters, although the weights of the neonates are increased and there is a decrease in viability (16). This regimen may cause a state similar to that of gestational diabetes mellitus in humans. These doses are lower than those used in this study.

On the other hand, when severe diabetes is induced by partial (95%) pancreatectomy, the ability to accept the male is lost (17). It has been observed that doses of 140 to 175 mg/kg alloxan cause loss of mating ability, and if mating occurs, pregnancies are not full term (18). Alloxan doses of 75 and 150 mg/kg cause profound changes in the hypothalamic–hypophysial–ovarian axis

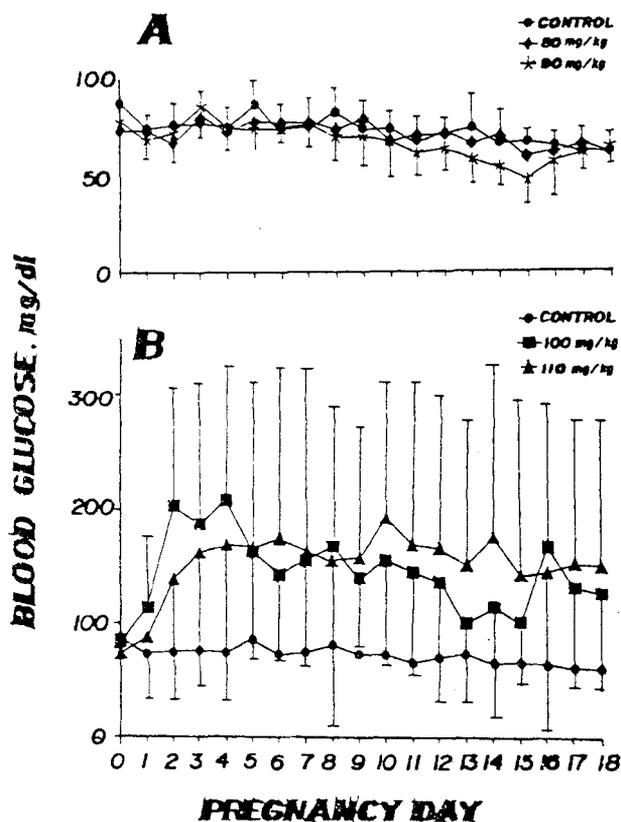


Fig. 3. Blood glucose (mean ± SD) after different doses of alloxan on Day 0 of gestation. A. 80 or 90 mg/kg (*n* = 6) and the control (*n* = 7); B. 100 or 110 mg/kg (*n* = 9) and the control. The values were different between the 100 mg/kg dose and control at Days 2 to 8, and 10 and 11, and between the 110 mg/kg dose and control at Days 3, 4, 6, 10, 11, and 13 (*P* < 0.05).

Table 4. Effect of Alloxan (110 mg/kg) Administered at Two Different Days on Biochemical Parameters and Litter Size in Pregnant Rats

	Induction on Day 0		Induction on Day 4	
	Control	Experimental	Control	Experimental
Surviving dams/dams treated	6/6	9/19 ^a	7/7	9/29 ^a
Glucose (mg/dL)	135.5 ± 19	524.2 ± 80.1 ^b	133.3 ± 18.1	534.3 ± 29.6 ^b
Triglycerides (mg/dL)	103.3 ± 16.9	121.8 ± 72.4 ^c	104.1 ± 15.6	394.6 ± 185.2 ^c
Total lipids (mg/dL)	276.2 ± 45.8	425.5 ± 81.6	273.3 ± 42.5	230.6 ± 132.7
Litter size	9.5 ± 2.5	0.0 ^d	9.5 ± 4.5	9.3 ± 2.4 ^e

Pregnant rats were treated with saline solution (control) or with alloxan 110 mg/kg (ip) on Day 0 or 4 of gestation and sacrificed on Day 13. Blood was obtained from the pregnant rats at sacrifice. The values were given as mean ± SD. ^aOf these, some rats were hyperglycemic and died before Day 13, and others were normoglycemic and were discarded. ^b $P < 0.01$ with respect to the control; ^c $P < 0.05$ with respect to the control; ^dresorptions in two rats; ^eFetuses in four rats and resorptions in the other five.

in prepubertal (35-d-old) rats (19) that could cause the loss of reproductive capacity observed by other authors.

According to other reports (12–19), diabetes induction before mating causes infertility or sterility more than teratogenesis. For these reasons, we treated rats with alloxan after fertilization to be sure that an interaction between diabetes and gestation would be established. In accord with our results, Angerwall (20) found that the administration of 100 mg/kg on Day 1 of gestation causes a high percentage of pregnancy loss, but he did not specify whether the day of sperm in the vaginal smear or day of vaginal plug was Day 0 or Day 1. In this study, we observed pregnancy loss after the administration of alloxan at doses of 110 mg/kg and higher on Day 0 of pregnancy (Tables 1–4).

With respect to damage to neurulation or the CNS, up to 28% CNS abnormalities have been reported when induction occurs on Day 4 using 80 mg/kg in pregnant mice (21). It also has been reported that induction on Day 7 with 160 mg/kg causes a high frequency of CNS malformations in rats and mice (22). A dose of 100 mg/kg on Days 8.5 to 13.5 causes high embryonic

mortality and a high frequency of cleft palate, with a lower effect observed when the alloxan is given at more-advanced stages of embryonic development (23); a 60 mg/kg dose on Day 9 causes a high rate of CNS malformations (24), characterized by delay of closure of their neuropores.

In this study, we evaluated the effect of diabetes on neurulation. The doses of alloxan used by other authors were lower than those that we determined to be diabetogenic (110 mg/kg). Both Watanabe and Ingalls (23), as well as Deuchar (24), induced diabetes just before neurulation or during this process and reported anomalies. However, the serum glucose levels achieved in those rats were not reported.

At 100 mg/kg, hyperglycemia was not produced by us in any of the animals. The Gestation Day 19 fetuses were normal, although in some cases, there were resorption nodules at Day 10 of gestation (Table 1). In our experience, a dose of 120 mg/kg or greater is required to produce sustained hyperglycemia in all pregnant rats. However, this dose causes total pregnancy loss (Table 2). Because of the observation that these doses and higher

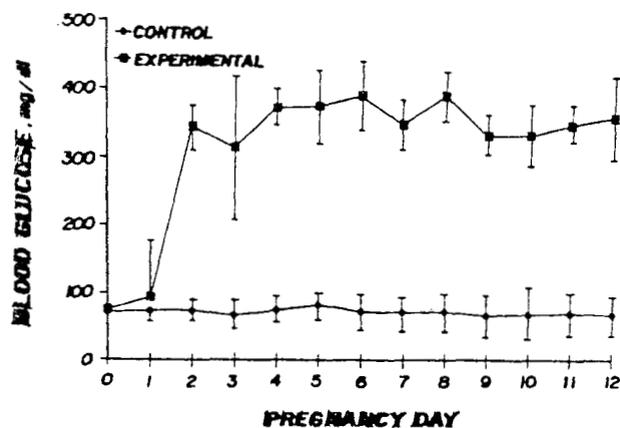


Fig. 4. Blood glucose (mean ± SD) after the administration of 110 mg/kg alloxan on Day 0 of gestation ($n = 9$), compared with saline control ($n = 6$). Values are different from Day 2 forward ($P < 0.01$).

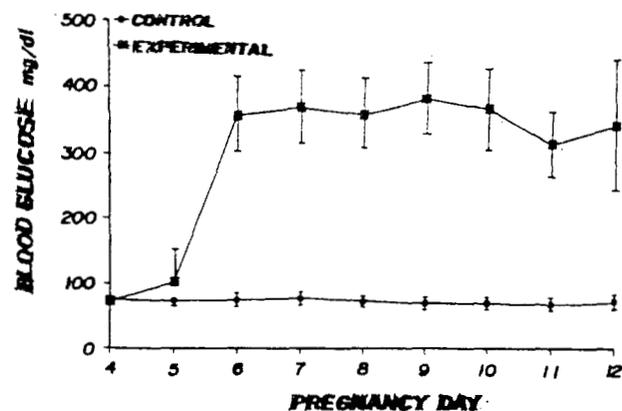


Fig. 5. Blood glucose (mean ± SD) after the injection of 110 mg/kg alloxan on Day 4 of gestation ($n = 9$), compared with saline control ($n = 7$). Values are different from Day 6 forward ($P < 0.01$).

cause resorption evaluated at Day 10 of pregnancy, the effect was tested at Day 8, observing that the embryos at this gestational age were not affected at any of these three doses. We suggest that embryotoxic and/or teratogenic damage is produced between Days 8 and 10 of embryo development when diabetes is induced on Day 0 of pregnancy.

When 80 mg/kg alloxan was injected at Day 0 of pregnancy, some malformations (0 to 2/litter) were observed on the 10th day, but hyperglycemia was not produced (Figure 4), nor were 19-d-old fetuses affected. The malformations seen were consistent with spontaneous malformations (6) since their frequency was low. The differences between our results and those of Horii et al. (21) are probably due to the fact that we administered alloxan on Day 0 of gestation, while they induced diabetes on Day 4, when the metabolic and endocrine changes related to gestation had already started (2), or that they used mice and we used rats. It is also probable that at Day 4 of gestation, the mothers were more labile to a diabetogenic stimulus than on the day they conceived.

Several studies have reported pregnancy loss. If 100 mg/kg is administered on Day 9 of gestation, a higher percentage of fetal resorptions is found (25). Also, it has been reported that the injection of 100 mg/kg between Days 10 and 12 of gestation causes a high percentage of pregnancy loss (20).

Doses of alloxan from 80 to 150 mg/kg were used to establish the minimum diabetogenic doses associated with abnormal development. Doses of 100 mg/kg or less do not produce hyperglycemia or the hyperglycemia is not sustained or generalized, and if malformations do occur, their percentage is low. At 120 mg/kg or higher doses, hyperglycemia is sustained in pregnant rats and causes maternal or embryonic death. At the 110 mg/kg dose administered on Day 0, there is only pregnancy loss as evaluated on Day 19, and although maternal mortality does occur, it is low. The effects observed by us suggest an "all-or-nothing" response, since alloxan at a dose of 110 mg/kg or higher provokes hyperglycemia and resorption or other pregnancy loss, and doses of 100 mg/kg (and occasionally 110 mg/kg) do not induce diabetes (evaluated by hyperglycemia) or affect embryo development.

For this reason, the 110 mg/kg dose was chosen for assessing the effect of induced diabetes on Day 0 on fetal development on Day 13 of gestation. Only resorptions were found (Table 4), which support our idea of an "all-or-nothing" response. It was then considered advisable to decrease the duration of diabetes by inducing it on Day 4 of gestation using the same dose of alloxan (Table 4). With this design, we obtained embryos with delayed development and resorptions on Day 13. Resorp-

tions are considered as embryotoxicity instead of teratogenesis (26), reaffirming the "all-or-nothing" hypothesis.

The heterogeneity of the results reported in the literature can be due to: 1) the quality of the alloxan used, since it can be oxidized quickly and therefore not cause adverse effects (27); 2) the use of a different strain of animals, since different susceptibilities have been described among strains with respect to the response to alloxan (28) as well as different effects of the diabetic state on concepti (6); and/or 3) different administration regimens, since administration of the drug during different stages of gestation causes different alterations in the typical endocrine-metabolic gestational state. An exact comparison cannot be made between our results and those of other authors. Angerwall (20) administered alloxan on Day 1 but did not indicate whether it was the day the rat conceived or the day after. Our administration of alloxan on Day 4 may be compared with the study of Horii and coworkers (21), where lower doses were used than those used by us. However, that study was conducted using mice.

In conclusion, we found that alloxan-induced diabetes causes embryotoxicity rather than teratogenesis when doses of 110 mg/kg or higher are administered on Day 0 of gestation. Diabetes induction on Day 4 of pregnancy causes a delay of development or embryotoxicity. However, even though we failed to establish a model of teratogenesis, these results will permit us to design studies on the prevention of embryo developmental delay. Possible mechanisms by which developmental delay is produced, such as by hyperglycemia, or by oxidation products formed from alloxan, remain to be investigated.

Acknowledgments — This study was partially financed by a grant from CONACYT (Project 0889P-M9506). The authors would like to thank Dr. María Cristina Revilla, Head of the Central Laboratory of the Specialties Hospital of the 21st Century National Medical Center, for her help in carrying out the clinical tests related to this study. M. Palomar-Morales is a CONACYT Doctorate Fellow (Registration No. 94156).

REFERENCES

1. Buchanan TA, Kitzmiller JL. Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annu Rev Med.* 1994;45:245-69.
2. Felig P, Coustan D. Diabetes sacarina. In: Burrow GN, Ferris TF, eds. *Complicaciones médicas durante el embarazo*. 2a. Buenos Aires: Panamericana. 1989;55-81.
3. New DAT. Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol Rev.* 1978;53:81-122.
4. Eriksson UF, Borg LAH, Forsberg H, Styrd J. Diabetic embryopathy. *Diabetes.* 1991;40:94-8.
5. Kalter H. Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. *Reprod Toxicol.* 1996;10:417-38.

6. Beaudoin AR. Embryology and teratology. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbruth SH, eds. *The laboratory rat*. Vol. II. San Diego: Academic Press. 1980;75-101.
7. Gilbert SF. *Developmental biology*. 2a. Sunderland: Sinauer. 1988;153-195.
8. Barrow MV, Taylor WJ. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J Morphol*. 1969;127:291-306.
9. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*. 1969;6:24.
10. Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA. Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem*. 1972;18:673.
11. Wahlefeld AW. In: Bergmeyer HU, *Methoden der enzymatischen analyse*. 3a. Ed. Tomo II. Weinheim: Verlag-Chemie, 1979;1878.
12. Davis ME, Fugo NW, Lawrence KG. Effect of alloxan diabetes on reproduction in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1947;66:638-41.
13. Kim JN, Runge W, Welles LJ, Lazarow A. Effects of experimental diabetes on the offspring of the rat: fetal growth, birth weight, gestation period, and fetal mortality. *Diabetes*. 1969;9:396-404.
14. Sinden JA, Longwell BB. Effect of alloxan diabetes on fertility and gestation in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1949;70:607-10.
15. Lawrence AM, Contopoulos AN. Reproductive performance in the alloxan diabetic female rat. *Acta Endocrinol*. 1960;33:175-84.
16. Lazarow A, Kim JN, Wells LJ. Birth weight and fetal mortality in pregnant subdiabetic rats. *Diabetes*. 1960;9:114-7.
17. Foglia VG, Borghelli DDS, Chieri RA, Fernández-Collazo EL, Spindler I, Wesely O. Sexual disturbances in the diabetic rat. *Diabetes*. 1963;12:231-7.
18. Levi JE, Weinberg T. Pregnancy in alloxan diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1949;72:658-62.
19. Howland BE, Zebrowski EJ. Gonadotropin levels in sera and pituitary glands of female rats treated with alloxan. *Life Sci*. 1974;14:289-96.
20. Angerwall L. Alloxan diabetes and pregnancy in the rat. *Acta Endocrinol*. 1959;39(Suppl 44):1.
21. Horii K-I, Watanabe G-I, Ingalls TH. Experimental diabetes in pregnant mice: prevention of congenital malformations in offspring by insulin. *Diabetes*. 1966;15:194-204.
22. Takano K, Nishimura H. Congenital malformations induced by alloxan diabetes in mice and rats. *Anat Rec*. 1966;158:303-12.
23. Watanabe G-I, Ingalls TH. Congenital malformations in the offspring of alloxan-diabetic mice. *Diabetes*. 1963;12:66-72.
24. Deuchar EM. Embryonic malformations in rats resulting from maternal diabetes: preliminary observations. *J Embryol Exp Morphol*. 1977;41:93-9.
25. Ellison AC, Maren TH. The effects of metabolic alterations on teratogenesis. *Johns Hopkins Med J*. 1972;130:87-94.
26. Wilson JG. Current status of teratology: general principles and mechanisms derived from animal studies. In: Wilson JG, Fraser FC, eds. *Handbook of teratology: general principles and etiology*. Vol. I. New York: Plenum Press; 1977:46.
27. American Diabetes Association. Responsible use of animals for research. *Diabetes Care*. 1990;13(Suppl):38.
28. Méndez JD, Ramos HG. Modelos experimentales. In: Islas AS, Lifshitz A, eds. *Diabetes mellitus*. México, D.F.: Interamericana 1993:303.