



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE. DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y  
BIOLOGÍA CELULAR

# Estudio de la interacción de factores ambientales y genéticos durante el desarrollo embrionario de ratón.

---

Thesis for Doctoral Degree

**Beatriz López-Escobar Rituerto**

Sevilla, 2017  
Universidad Pablo de Olavide





Dra. PATRICIA YBOT GONZÁLEZ, Investigadora principal y jefa del grupo de Neurodesarrollo en el Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Investigaciones Biomédicas de Sevilla (HUVR/IBIS), como directora de la Tesis Doctoral y Dr. JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ ALCÁZAR, Profesor titular del área de Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide, como tutor de la Tesis Doctoral,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la licenciada Beatriz López-Escobar Rituerto titulado "*Estudio de la interacción de factores ambientales y genéticos durante el desarrollo embrionario de ratón*", ha sido realizado por ella bajo su dirección y supervisión en el Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Investigaciones Biomédicas de Sevilla (HUVR/IBIS), y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor con mención Internacional por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expiden el presente certificado.

Tutor:

Directora:

Jose A. Sánchez Alcázar

Patricia Ybot González



# Summary

During embryogenesis the developing embryo is not isolated from its environment, this being a fundamental part of organism's life cycle and plays an important role in determining the phenotype. The embryogenesis is tightly regulated by different signalling pathways too. Any variation of the environmental or genetic factors can alter the development and leads to embryonic malformations, which can be enhanced if combined. In this work we have focused on maternal diabetes as an environmental risk factor. Congenital malformations in diabetic pregnancy are still a major health concern despite the improvements in glycaemic control strategies. Embryopathies produced as a consequence of maternal diabetes have been studied intensely in both experimental and clinical scenarios. Despite the numerous studies made in diabetic mice, is necessary to establish the best strain as well as the most appropriate diabetes induction protocol. In our study we tested different protocols in females from different strains, and we established the most effective protocol for each one.

As it is well known, abnormalities in maternal folate and diabetes during pregnancy have both been shown to induce neural tube defects (NTDs) in humans and animal models. However, the possible interaction between these two factors in the development of NTDs remains unclear. *Folr1* is a membrane receptor that mediates the high affinity internalization and delivery of folate to the cytoplasm of the cell. Functional defect in this gene produce severe abnormalities in embryos, including cranial NTDs. It has been demonstrated that *Folr1* embryonic mRNA was decreased under maternal diabetes. The methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key enzyme involved in folate metabolism that converts 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate. Mutation in the 677C→T in the *Mthfr* gene is the most common genetic cause of hyperhomocysteinemia and is associated with NTDs and pregnancy complications. We analysed the combination of maternal diabetes and mutations of *Folr1* and of *Mthfr* using mouse embryo culture and mouse models, and we observed that hyperglycaemia in combination with the alteration of folic acid metabolism seems to increase the incidence of congenital malformations in the embryos with majority of them being NTDs.

Moreover, hyperglycaemia has been also shown to downregulate the expression of elements in the non-canonical Wnt-PCP pathway, such as the *Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1)* and *Vangl2*. *Daam1* is a formin that is essential for actin polymerization and for cytoskeletal reorganization, and it is expressed strongly in certain

## Summary

organs during mouse development, including the eye, neural tube and heart. *Daam1<sup>gt/gt</sup>* and *Daam1<sup>gt/+</sup>* embryos develop ocular defects (anophthalmia or microphthalmia) that are similar to those detected as a result of hyperglycaemia. Indeed, studying the effects of maternal diabetes on the Wnt-PCP pathway demonstrated that there was strong association with the *Daam1* genotype, whereby the embryopathies observed in *Daam1<sup>gt/+</sup>* mutant embryos of diabetic dams was more severe. There was evidence that embryonic exposure to glucose *in vitro* diminishes the expression of genes in the Wnt-PCP pathway, leading to altered cytoskeletal organization, cell shape and cell polarity in the optic vesicle. Hence, the Wnt-PCP pathway appears to influence cell morphology and cell polarity, events that drive the cellular movements required for optic vesicle formation and that, in turn, are required to maintain the fate determination. We also observed a number of *Daam1<sup>+/gt</sup>* from diabetic mothers that presented NTDs. These finding shows, although without a statistical significance, a possible interaction between the diabetes and the Wnt-PCP signalling pathway in the development of NTDs. However, to confirm this hypothesis it would be necessary to make more studies.

# Índice

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Embryonic development .....</b>	<b>1</b>
1.1 Early embryonic development in mammals .....	1
1.1.1 Gastrulation. Germ layers and primitive streak formation .....	2
1.2 Later embryonic development.....	4
1.2.1 Nervous system formation .....	4
1.2.2 Development of the vertebrate eye.....	8
2. Genetic regulation of development .....	14
2.1. Wnt signalling pathway .....	14
2.2 Folate metabolism pathway.....	17
2.3 <i>Pax</i> genes.....	19
3. Environmental regulation of development.....	20
3.1 Diabetes during pregnancy.....	20
3.2 Maternal folate metabolism malfunction .....	21
4. Gene-environment interactions (GxE) .....	22
<b>Objectives .....</b>	<b>25</b>
<b>Materials and methods.....</b>	<b>29</b>
1. Mouse strains.....	29
2. Embryo genotyping .....	30
3. Diabetes induction .....	32
4. General morphology, histological analysis and expression study of embryos and Foetuses .....	32
4.1 Tissue preservation .....	32
4.2 Analysis of external malformations:.....	32
4.3 Histological analysis.....	33
4.4 <i>In-situ</i> hybridization:.....	33
4.5 X-gal staining: .....	33
4.6 Immunohistochemistry .....	33
5. Embryo culture .....	34
6. RNA extraction and quantitative RT-PCR .....	35
7. Statistical analysis .....	36
<b>Resultados .....</b>	<b>37</b>

<b>Objetivo 1: Estudio de la efectividad y de la respuesta a diferentes protocolos de inducción de la diabetes en diferentes cepas de ratón.....</b>	<b>39</b>
Introducción.....	39
Resultados.....	41
1. Descripción de los protocolos utilizados.....	41
2. Evaluación de la efectividad de los protocolos de inducción de diabetes en función del fondo genético de las hembras.....	43
3. Evaluación de la efectividad de los protocolos de inducción de diabetes en función del tiempo de desarrollo de la diabetes, de la obtención de TM y del número de camadas obtenidas en cada fondo genético.....	48
Discusión.....	51
<b>Objetivo 2: Estudio de la interacción de la diabetes y las alteraciones del metabolismo del ácido fólico durante el desarrollo embrionario. ....</b>	<b>53</b>
Introducción.....	53
Resultados.....	54
1. Efecto de las altas concentraciones de glucosa y homocisteína en el desarrollo de embriones de ratón <i>in vitro</i> .....	54
1.1 <i>Estudio morfológico de los embriones cultivados</i> .....	55
1.2 <i>Estudio del neuroporo posterior</i> .....	59
2. Estudio <i>in vivo</i> del efecto de la interacción entre la diabetes durante el embarazo y mutaciones en los genes del metabolismo del ácido fólico, <i>Folr1</i> y <i>Mthfr</i> .....	71
2.1 <i>Estudio de la interacción de la diabetes y la mutación del gen Mthfr</i> .....	71
2.2 <i>Estudio de la interacción de la diabetes y la mutación del gen Folr1</i> .....	75
3. Estudio del efecto de la STZ sobre el desarrollo embrionario.....	88
Discusión.....	89
<b>Objetivo 3: Estudio de la interacción entre la diabetes y mutaciones de la vía Wnt-PCP durante el desarrollo embrionario. ....</b>	<b>96</b>
Introducción.....	96
Resultados.....	97
1. Estudio de la interacción entre mutantes <i>Daam1</i> y la diabetes durante el desarrollo embrionario.....	97
1.1 <i>Efecto de la diabetes en el desarrollo de embriones de la cepa C57Bl/6</i> .....	97
1.2 <i>Expresión de los componentes de la vía Wnt-PCP durante el desarrollo del ojo</i> ..	100
1.3 <i>Defectos oculares en mutantes de Daam1 in vivo</i> .....	101
1.4 <i>Defectos oculares en mutantes de Daam1 de madres diabéticas in vivo</i> .....	105
1.5 <i>Otras embriopatías observadas</i> .....	107

1.6 Efectos embrionarios en mutantes de <i>Daam1</i> expuestos a elevados niveles de glucosa <i>in vitro</i> .....	109
1.7 Estudio del efecto de la glucosa sobre la vía <i>Wnt-PCP</i> y el citoesqueleto durante el desarrollo ocular.....	112
1.8 Inducción de defectos oculares por afectación de la vía <i>Wnt-PCP in vitro</i> .....	115
1.9 Estudio del efecto de la glucosa sobre la expresión de <i>Pax6</i> .....	118
2. Estudio de la interacción entre mutantes <i>Vangl2</i> y la diabetes durante el desarrollo embrionario. ....	121
2.1 Expresión de los componentes de la vía <i>Wnt-PCP</i> durante el cierre del neuroporo posterior .....	121
2.2 Defectos embrionarios en mutantes de <i>Vangl2 in vivo</i> .....	122
2.3 Defectos del tubo neural en embriones mutantes de <i>Vangl2</i> de madres diabéticas <i>in vivo</i> (cepa <i>C3H</i> ).....	123
2.4 Defectos del tubo neural en mutantes de <i>Vangl2</i> de madres diabéticas <i>in vivo</i> (cepa <i>CBA</i> ) .....	124
2.5 Defectos embrionarios en mutantes de <i>Vangl2</i> expuestos a elevados niveles de glucosa <i>in vitro</i> .....	125
Discusión. ....	129
<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>137</b>
<b>General conclusions.....</b>	<b>141</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>145</b>



# Introduction



# Introduction

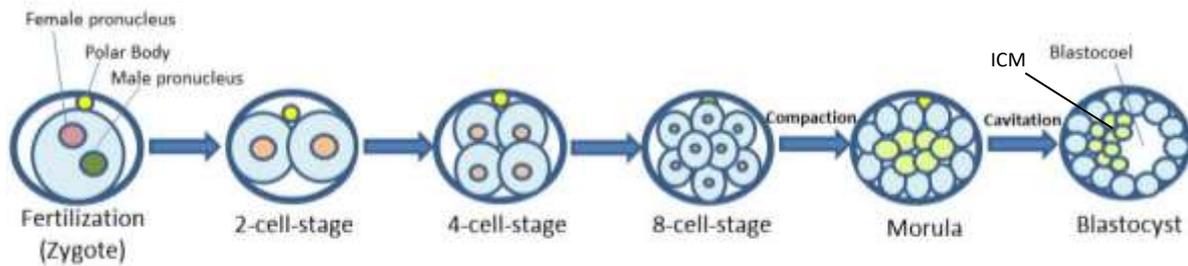
Embryogenesis is the process by which the embryo forms and develops. With the proliferation, organization and differentiation of the cells, the embryo, and then the foetus, starts to grow and to form all the tissues that continue growing up until the formation of functional and mature organs. The developing embryo is not isolated from its environment. The environment is a fundamental part of organism's life cycle and plays an important role in determining the phenotype. The embryogenesis is tightly regulated by different signalling pathways too. Any variation of the environmental or genetic factors can alter the development and leads to embryonic malformations, which can be enhanced if combined.

In this work we have focused on maternal diabetes as an environmental risk factor. Diabetes has been thoroughly studied for its importance in human health. During pregnancy, diabetes is known to affect important signalling pathways and the expression of specific genes that are crucial for organogenesis. These alterations lead to congenital malformations (Pavlinkova et al., 2009; Sato et al., 2008; Wentzel et al., 2005).

## **1. Embryonic development**

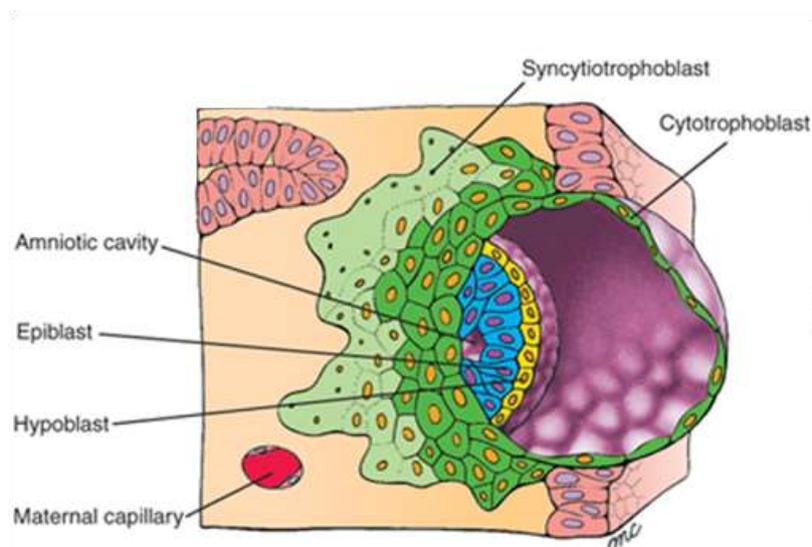
### **1.1 Early embryonic development in mammals**

Fertilization is the process by which the male and female gametes fuse to create a new organism with genetic potentials derived from both parents (Gilbert, 2000). After fertilization, the zygote goes through a series of mitotic divisions leading to smaller and nucleated cells called blastomeres, which give rise to all the embryonic and extra-embryonic tissues (Gilbert, 2000; Zernicka-Goetz, 2005). At 8-cell stage, blastomeres start to maximize the contact between them by forming a solid ball through the process of compaction. The cells at the 8-cell stage divide and form the morula (16-cell stage), which presents cells inside and outside. The external cells of the morula give rise to the trophoblast that produces no embryonic structures. The inner cells of the morula forms the inner cell mass that generates the embryo proper (figure 1).



**Figure 1. Development of a mammal embryo from fertilization to blastocyst.** After the fusion of the female and male pronucleus starts the cleavage process.

The inner cell mass segregates into a bilaminar embryonic disc that consists of two epithelial layers, epiblast (dorsal) and hypoblast (ventral, figure 2). The hypoblast gives rise to the extraembryonic endoderm, the precursor of the yolk sac. At this stage the trophoblast has differentiated in 2 layers: the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast, the precursors of the extraembryonic membranes (Gilbert, 2000; Sadler and Langman, 2012; Zernicka-Goetz, 2005).



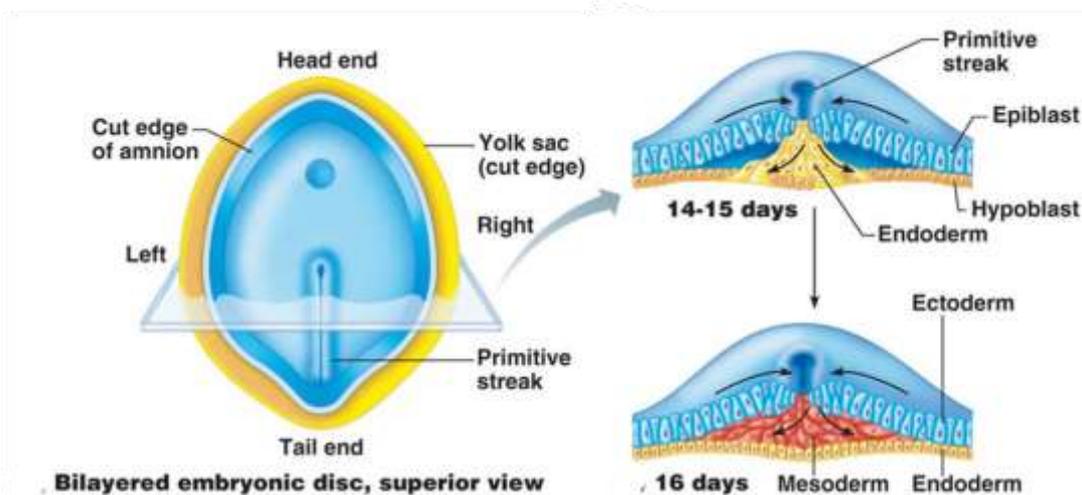
**Figure 2. Implantation of the blastocyst in the uterus.** Adapted from (Schoenwolf et al., 2014)

### 1.1.1 Gastrulation. Germ layers and primitive streak formation

Gastrulation is the process by which the three germ layers (endoderm, ectoderm and mesoderm) are established. The establishment of the head-tail axis is an important step in generating the body plan of vertebrates. In mammals, this axis is marked by the primitive streak, which appears first during gastrulation as a thickening of the epiblast in the posterior region of the embryo. The primitive streak is formed by the ingression of endodermal

precursors from the epiblast into the blastocoel and by migration of cells from the lateral epiblast to the centre (figure 3) (Gilbert, 2000; Tam and Behringer, 1997).

The Node (Hensen's node) is localized at the anterior end of the primitive streak (Ferrer-Vaquer et al., 2010; Gilbert, 2000). The first cells to ingress through the primitive streak become endodermal cells. Once in the blastocoel these cells replace the hypoblast cells. Then ingress the cells destined to form the mesodermal layer and the next migrating cells are destined to become notochord. Cells remaining in the epiblast will form the ectoderm.



**Figure 3. Migration through the primitive streak in a human embryo at 14-16 days of gestation.** Formation of the three germ layers endoderm, ectoderm and mesoderm. Adapted from (Marieb and Hoehn, 2013).

The germ layers are the precursors of many different structures during organogenesis (Arkel and Tam, 2012; Gilbert, 2000):

- Ectoderm: This layer originates the central nervous system (brain and spinal cord), the peripheral nervous system, the sensory epithelia of the eye, ear and nose, the epidermis and the mammary and subcutaneous glands.

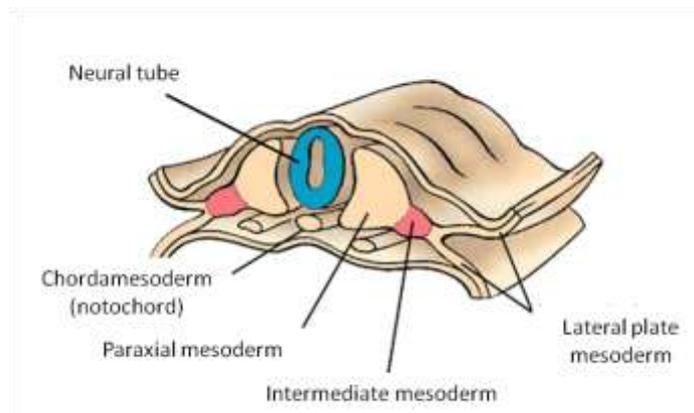
- Mesoderm: This layer is divided in:

- a) Intermediate mesoderm, which forms the urogenital system, kidneys, gonads and their respective duct systems.

b) Lateral plate mesoderm, which gives rise to the circulatory system, contributes to the smooth muscle and connective tissues of the respiratory and digestive organs, bones, ligaments, and connective tissue of the limbs, among others.

c) Paraxial mesoderm, which forms the somites that subdivide and differentiate to give rise to the precursors of the axial skeleton, muscles of the trunk, dermis of the skin, specific skull bones and skeletal muscles of the head and neck regions. Paraxial mesoderm contributes, also, to heart development.

d) Chordamesoderm, which is the precursor of the notochord.



**Figure 4. Types of mesoderm.** Section of a human embryo of 23 days of gestation showing the paraxial, intermediate and lateral mesoderm and choramesoderm (notochord). Adapted from (Schoenwolf et al., 2014).

- Endoderm: This layer will form, among others, the epithelial lining of the gastrointestinal and respiratory tracts, parenchyma of tonsils, liver, pancreas, lung, thymus, thyroid, parathyroid and yolk sac.

## 1.2 Later embryonic development

### 1.2.1 Nervous system formation

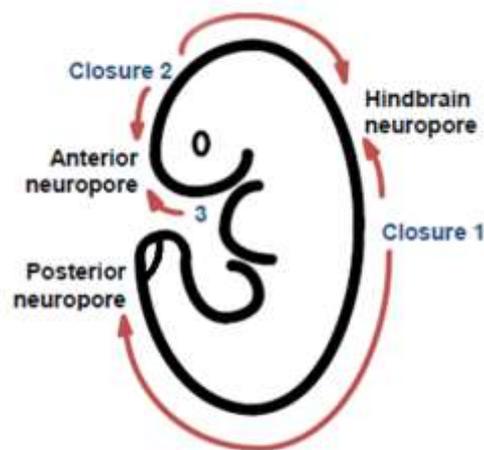
The neurulation is the process by which the neural tube, the precursor of the adult central nervous system, is formed. The neurulation is divided in two phases: primary neurulation and secondary neurulation. During the primary neurulation, the neural plate is formed and, through different morphogenetic movements, is transformed into the neural tube (NT). Secondary neurulation follows primary neurulation by elongating the neural tube through cavitation of an epithelial cord. In birds and mammals, the brain and the trunk level of the

spinal cord are formed by primary neurulation, whereas the tail spinal cord is formed by secondary neurulation (Schoenwolf and Smith, 2000).

A) Primary neurulation can be divided into the following stages:

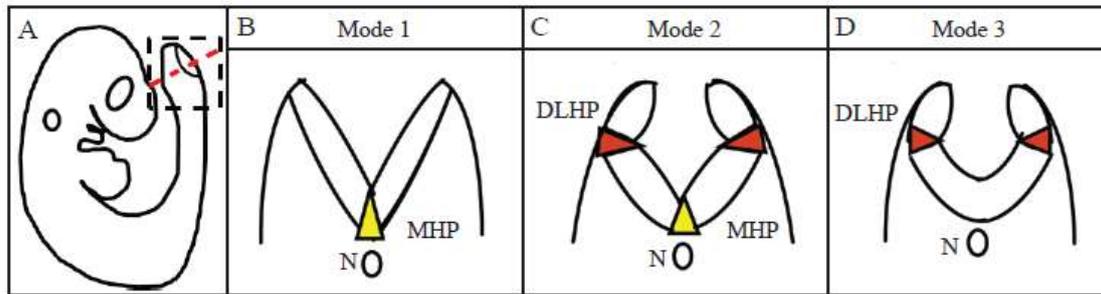
1. Formation and shaping of the neural plate: The neural plate is formed at the end of gastrulation as a thickening of the dorsal ectoderm. The node, an embryonic organizer, located at the rostral end of the primitive streak will induce the neural plate formation by suppressing the epidermal fate of the ectoderm (Jessell and Sanes, 2000; Stern, 2005). Chormesodermal cells emerge from the node and intercalate in the midline, as the notochordal plate narrows to form the notochord. The cells of the neural plate converge on the midline and extend rostrocaudally through the convergent extension process (Sulik et al., 1994; Ybot-Gonzalez et al., 2007b). All these processes give rise to the neural folds through elevation of the edges of the neural plate. A neural groove dividing the future right and left sides of the embryo appears in the centre of the neural plate.
2. Bending of the neural plate: This stage involves the formation of the hinge points, one at the midline of the neural plate called medial hinge point (MHP) and two other in the dorsal region of the neural plate that connects with the surface ectoderm, called dorsolateral hinge points (DLHPs). The MHP cells become anchored to the notochord beneath them and form a hinge, which, in turn, forms a furrow at the dorsal midline. The notochord induces the MHP cells to reduce their height and become wedge-shaped. The DLHPs cells remain anchored to the surface ectoderm of the neural folds and acquire a wedge-shape too, contributing to the longitudinal furrowing of the neural plate (Gilbert, 2000; Shum and Copp, 1996; Ybot-Gonzalez and Copp, 1999). The cell wedging requires changes in the cell shape that involve microtubules and microfilaments, as well as changes in the nuclei position and cell number. Neuroepithelial cells within the median hinge point (MHP) contain basally located nuclei and undergo relatively slow proliferation. In contrast, cells in the dorsolateral neuroepithelium, including the DLHP, exhibit nuclei distributed throughout the apico-basal axis and undergo rapid proliferation (Escuin et al., 2015; McShane et al., 2015).
3. Closure of the neural tube: to initiate the neural tube closure, neural folds need to contact to each other in the dorsal midline and fuse. Fusion establishes the roof of the neural tube and separates it from the surface ectoderm through the process of disjunction. Neural tube closure in mammals is initiated at multiple sites (Golden and Chernoff, 1993). In mice,

the first one occurs between the rhombencephalon and the spinal cord (closure 1). This closure advances bidirectionally both rostral and caudal. The second site of closure starts between the prosencephalon and the mesencephalon (closure 2) and advances bidirectionally too. The third closure site initiates at the rostral end of the neural plate (closure 3) and advances unidirectionally, only caudally. There are three open areas during the neural tube closure process called neuropores that gradually become shortened and leading to complete closure of the neural tube. One of these neuropores is localized in the anterior zone (anterior neuropore), a second one between closures 2 and 3 (hind brain neuropore), and another one in the caudal zone (posterior neuropore, figure 3) (Copp et al., 2003; Donkelaar et al., 2006; Gilbert, 2000). In human embryos, at 17-18 days post-fertilization, neural tube closure initiates in a site that resembles closure 1 in mice, followed by the closure from the extreme rostral end of the neural plate (comparable to closure 3 in mice. (Copp and Greene, 2013)). In humans, the closure of the PNP and completion of primary neurulation occur at 26-28 day post-fertilization.



**Figure 5. Diagrammatic representation of the closure points and neuropores during neural tube closure in mice.** Adapted from (Copp and Greene, 2010).

During neural tube closure, the analysis of transversal sections through the rostral end of the posterior neuropore in mice embryos of increasing developmental stage reveals 3 different modes of closure. At late E8.5, the neural plate bends at the MHP, whereas its lateral regions are straight showing a V-shaped cross section (Mode 1. Figure 4B). At early E9.5, the PNP shown paired DLHPs and a sharp MHP (Mode 2. Figure 4C). In E10 embryos, towards the end of primary neurulation, the neural plate only maintains the bending at DLHPs (Mode 3. Figure 4D) (Shum and Copp, 1996).



**Figure 6. Diagrammatic representation of transversal sections through the rostral end of the posterior neuropore.** Representation of a mouse embryo with the PNP area into the box (A). Transverse sections of the PNP were taken at the level indicated by the dashed line in A. Mode 1 characterized by the presence of the MHP (yellow area) and by the V shape of the neural tube (B). Mode 2 characterized by the presence of the MHP (yellow area) and DLHPs (red areas) and by the diamond shape of the NT (C). Mode 3 characterized by the absence of the MHP, the presence of DLHPs (red areas) and by the circular shape of the NT (D). N: notochord. Adapted from (Ybot-Gonzalez et al., 2007).

- B) Secondary neurulation: In mice, this process involves the condensation of a population of tail bud-derived cells to form an epithelial rod. Through the canalization of this epithelium, a secondary neural tube is formed, and its lumen is continuous with that of the primary neural tube (reviewed by (Greene and Copp, 2009)). In humans secondary neurulation starts at Carnegie stage 12 (around 26 days post-fertilization). During this step of neurulation, the caudal part of the neural tube differentiates from an ectoderm-covered mass of pluripotent tissue (caudal eminence) without the intermediate phase of a neural plate. The caudal eminence forms the neural cord, which is a solid cellular mass, the precursor of the caudal nervous system.

#### 1.2.1.1 Neural tube defects (NTDs)

Neural tube defects (NTDs) result when neural tube closure fails to occur and are among the most common human birth defects. NTDs have a worldwide prevalence of 1 per 1000 births (Mitchell, 2005), although it varies considerably by geographic areas. In Europe, the NTD prevalence is around 9 per 10.000 births (Zaganjor et al., 2016).

If the closure of the neural tube is not completed, the neuroepithelium remains exposed to the environment and degenerates. The level of the body axis where the neural tube closure fails results in different defects:

- a) Failure to initiate closure 1 leads to craniorachischisis, the most severe NTD. In this case, the neural tube remains open along the entire embryo body axis apart from the most cranial region. This defect is not compatible with postnatal life.
- b) Failure to complete closure 2 leads to exencephaly, where the neural tissue protrudes outside the surface of the cranial area of the embryo. The degeneration of the exposed neural tissue results in anencephaly. As with craniorachischisis, anencephaly is not compatible with postnatal life.
- c) Failure in the PNP closure leads to spina bifida. The spina bifida phenotype can be divided into spina bifida occulta, characterized by affected bony vertebral arches and intact spinal cord covered by skin, and spina bifida cystica (open spina bifida), when the neural tissues are exposed producing severe neurological deficits.

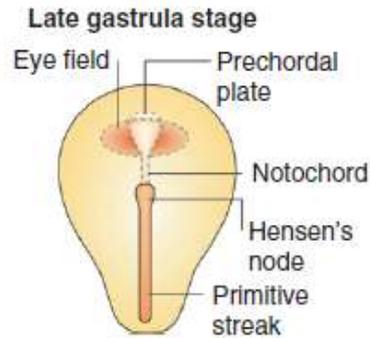
NTDs are an example of a complex disease with a multifactorial aetiology. Family studies reveal that the incidence of NTDs is highest among relatives of the affected patients. In mice, NTDs have a polygenic nature, and a large number of genetic mutations that disrupt normal neurulation and lead to NTDs have been identified (Donkelaar et al., 2006; Sadler and Langman, 2012).

### **1.2.2 Development of the vertebrate eye**

The vertebrate eye is a complex organ whose formation depends on highly organized processes, and where mutations in key genes lead to severe congenital malformations (reviewed by (Graw, 2010; Heavner and Pevny, 2012))

Eye development can be divided into the following steps:

1. Formation of the eye field: During gastrulation, the eye is organized as a single eye field in the centre of the developing forebrain (figure 7). A set of eye field transcription factors, highly conserved throughout vertebrates, is expressed in the eye field. In mammals, the eye field transcription factors include Pax6, Rax, Six and Lhx2.



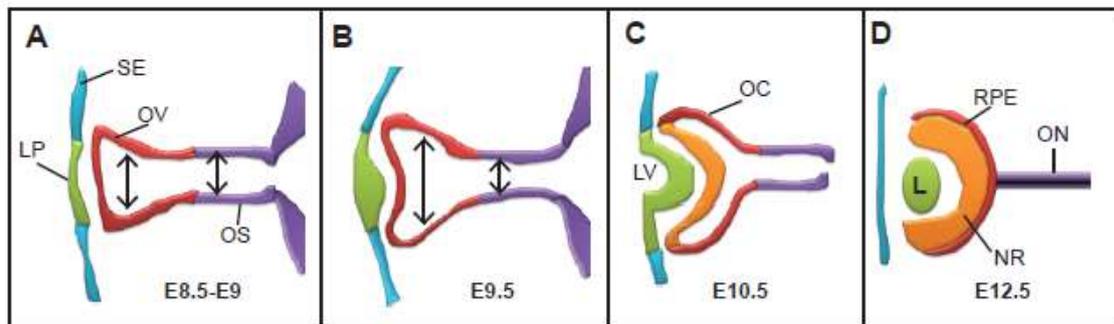
**Figure 7. Localization of the eye field during late gastrula stage.** Adapted from (Graw, 2010).

Haploinsufficiency mutations of *Pax6* locus lead to small eye phenotype. Humans with mutations in one copy of *PAX6* often present aniridia (abnormal iris development) and sometimes microphthalmia (one or both eyes are abnormally small). Homozygous loss of *Pax6* in mice and humans causes anophthalmia (absence of eye structure).

2. Division of the eye field: In mice, the first sign of eye field development is the formation of the two lateral indentations, called optic pits, in the future forebrain at E8. In this morphogenetic process, at least two molecules have been shown to be implicated, *Shh* and *Six3*. *Shh* is important for the formation of the midline and therefore also for the separation of the eye field into two. *Six3* regulates *Shh* expression in the ventral midline of the rostral diencephalon. Both, target disruption of *Shh* in mice, and loss-of-function mutations in *SHH* or *SIX3* in humans, give rise to cyclopia (one eye centrally placed in the face, (Heavner and Pevny, 2012)).

3. Formation of the optic vesicle and optic cup: In mice, at E8.5-E9, a bilateral evagination of the diencephalon forms the optic vesicles. The optic vesicles come into close contact with the surface ectoderm inducing a thickening of this layer that leads to the formation of the lens placode, which is considered to be the first step in the lens development (figure 8A). Each optic vesicle presents stem cells that give rise to all the neuroectoderm-derived cells of the eye. These stem cells are distributed along the dorso-distal/proximal-ventral axis prior to optic cup formation. Regions along these axes correspond to the future neural retina, retinal pigment epithelium and optic stalk (figures 8B and 8C). The optic vesicles are connected to the lumen of the primitive forebrain through the optic stalk that will give rise to the later optic nerve. After the formation of the optic vesicle, a coordinated invagination of the lens placode and the optic vesicle gives rise to the lens vesicle and the bilayered optic cup. The optic cup presents an

inner layer and an outer layer, which will form the neural retina and the retinal pigmented epithelium respectively at E12.5 (figure 8D).

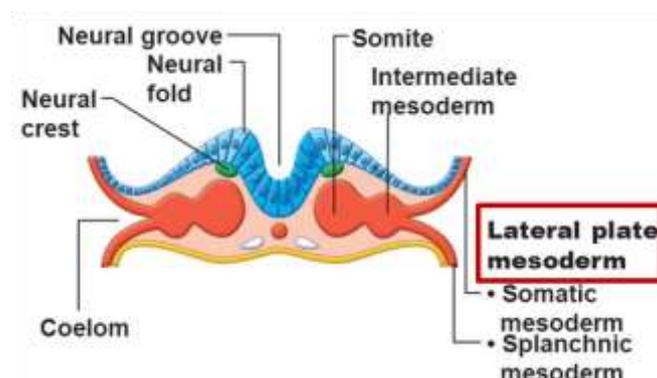


**Figure 8. Schematic view of the early stages of eye development.** Main structures indicated: SE, surface ectoderm; OV, optic vesicle; OS, optic stalk; OC, optic cup; LV, lens vesicle; L, lens; RPE, retinal pigmented epithelium; NR, neural retina; ON, optic nerve. Double headed arrows in panel A and B indicate the luminal diameter.

### 1.2.3 Heart Development.

In humans, the vascular system appears during the third week and is the first functional unit in the developing embryo. The circulatory system consists of heart, blood cells and blood vessels system.

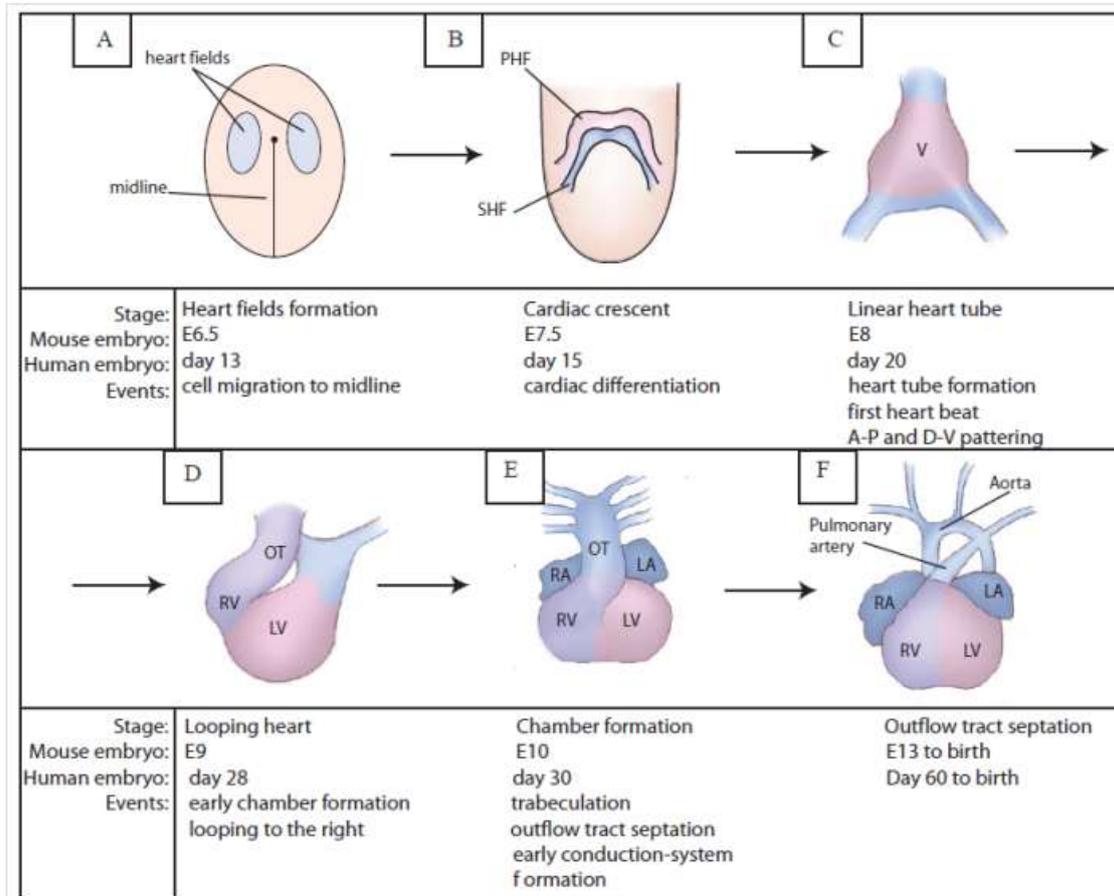
In both sides of the intermediate mesoderm resides the lateral plate mesoderm (figures 4 and 9). Each plate is divided horizontally into the dorsal somatic (or parietal) mesoderm and into the ventral splanchnic (or visceral) mesoderm. The space between these layers is the coelom, which gives rise to the pleural, pericardial and peritoneal cavities.



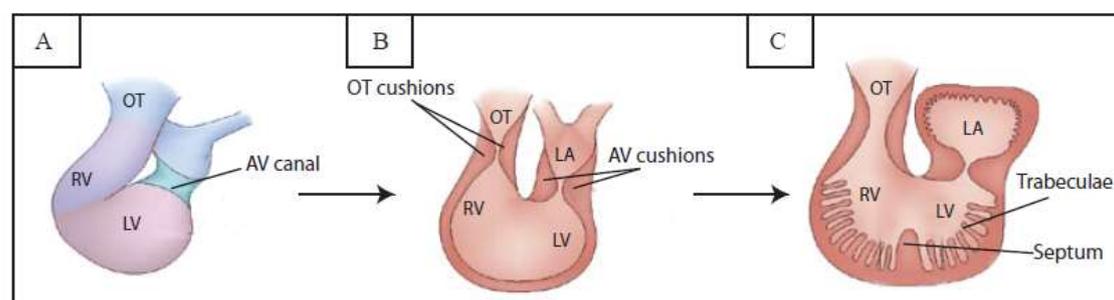
**Figure 9. Localization of the lateral plate mesoderm.** Adapted from (Marieb and Hoehn, 2013).

The vertebrate heart derives from two different regions of the splanchnic mesoderm that interact with adjacent tissue to become specified for heart development (Gilbert, 2000). In the mouse embryo at E6.5, cardiac progenitor cells migrate in an anterior-lateral direction under the head folds to form two groups of cells on each side of the midline (Figure 10A, reviewed by (Xin et al., 2013)). The first population of cells to migrate to the heart-forming region, called the primary heart field, further extends across the midline to form the cardiac crescent at E7.5 in mice and at day 15 of gestation in humans (figure 10B). The primary heart field contributes to the left ventricle formation. Cells in the secondary heart field appear in the extracrescent tissue and beside medial-anterior to the primary heart field, forming a beating heart tube that contains cardiomyocytes and underlying endothelial cells (figure 10C). The SHF contributes to the right ventricle and later to the outflow tract, sinus venosus and left and right atria (reviewed by (Bruneau, 2008; Xin et al., 2013)).

The heart tube gives rise to a looped structure with primitive atrium, primitive ventricle and primitive outflow tract (figure 10D). In mouse and chicken, the heart looping is divided in two phases: c-looping, in which the heart tube bends ventrally and rotates to the right, and s-looping, where the primitive ventricle moves to its definitive position (caudal) and the distance between the outflow tract and the atrium becomes shorten. The looping direction is mediated by asymmetric expression of different genetic and molecular markers (i.e Nodal) and influenced by extrinsic forces from the adjacent tissues ((Sadler and Langman, 2012) and reviewed by (Andres-Delgado and Mercader, 2016; Goenezen et al., 2012)). After that, the process of heart remodeling starts.



**Figure 10. Heart development.** Schematic view of the stages of heart development indicating the main structures: primary heart field (PHF), secondary heart field (SHF), ventricle (V), left ventricle (LV), right ventricle (RV), outflow tract (OT), left atria (LA) and right atria (RA). Adapted from (Bruneau, 2008; High and Epstein, 2008).



**Figure 11. Steps of heart remodeling.** Schematic view of the stages of heart remodeling indicating the main structures: left ventricle (LV), right ventricle (RV), outflow tract (OT), left atria (LA), right atria (RA), atrioventricular (AV). Adapted from (Bruneau, 2008; High and Epstein, 2008).

Heart remodeling involves a complex series of steps: **i)** Formation of the atrioventricular canal, which forms a boundary between the future atrial and ventricular regions of the heart tube (figure 11A). **ii)** Formation of endocardial cushions (the outflow tract and atrioventricular cushions, figure 11B), which will act as the precursors of the heart valves (aortic, pulmonic, tricuspid and mitral valves). **iii)** Development of trabeculae in the walls of the heart chambers (Figure 11C). **iv)** Septation of the atria and ventricles (figure 11C). **v)** Remodeling of the outflow tract to form the walls of each of the aorta and pulmonary artery (figure 10F).

### **1.2.3.1 Cardiovascular defects (CVDs)**

Congenital heart defects are the most common type of birth defect. They affect 1% of live births (Triedman and Newburger, 2016). Approximately 2% of heart defects are due to environmental factors, but most are caused by a complex interaction between genetic and environmental agents. Maternal diabetes, alcohol, rubella virus or thalidomide have been linked to cardiac defects (Sadler and Langman, 2012). The most common complex defects include the following, among others (Sidney et al., 2013):

- Tetralogy of Fallot: Congenital malformation that includes 4 defects: ventricular septal defect characterized by a hole between the two ventricles, pulmonary stenosis produced by a narrowing of the exit from the right ventricle, right ventricular hypertrophy, and aorta dextraposition, which allows blood from both ventricles to enter the aorta.
- Transposition of the great arteries: characterized by a ventricle-arterial discordance, in which the aorta arises from the right ventricle and the pulmonary artery arises from the left ventricle.
- Double outlet right ventricle (DORV): In this case, the aorta connects to the right ventricle instead of to the left ventricle, and both arteries flow out of the right ventricle.
- Atrioventricular septal (canal) defects: Produced by a defect during the atrioventricular canal. It is possible for blood to travel from the left side of the heart to the right side, or the other way around.
- Coarctation of the aorta: Congenital condition whereby the aorta is narrow giving rise to an increase in the left ventricle activity in order to force enough blood through the aorta to deliver blood to the lower part of the body. When the narrowing is severe enough, it results in a lack of blood to the lower part of the body.

- Hypoplastic left heart syndrome: Defect that affects normal blood flow through the heart due to a malformation of the left side of the heart. The left ventricle is underdeveloped, the mitral and the aortic valves are not formed or are small and the ascending portion of the aorta is underdeveloped or small.

## 2. Genetic regulation of development

Animal development depends on the differential expression of a constant genome to produce diverse cell types during embryogenesis. The genomic program for development operates primarily through the regulated expression of genes encoding transcription factors and components of cell signalling pathways. There are important pathways during embryo development whose impairment leads to a great variety of embryopathies.

### 2.1. Wnt signalling pathway

The Wnt signalling pathway is an evolutionarily conserved pathway that regulates crucial aspects of cell fate determination, cell migration, cell polarity, neural patterning, and organogenesis during embryonic development. The extra-cellular Wnt signal stimulates several intra-cellular signal transduction cascades, including the canonical or Wnt/ $\beta$ -catenin dependent pathway and the non-canonical or Wnt-PCP pathway.

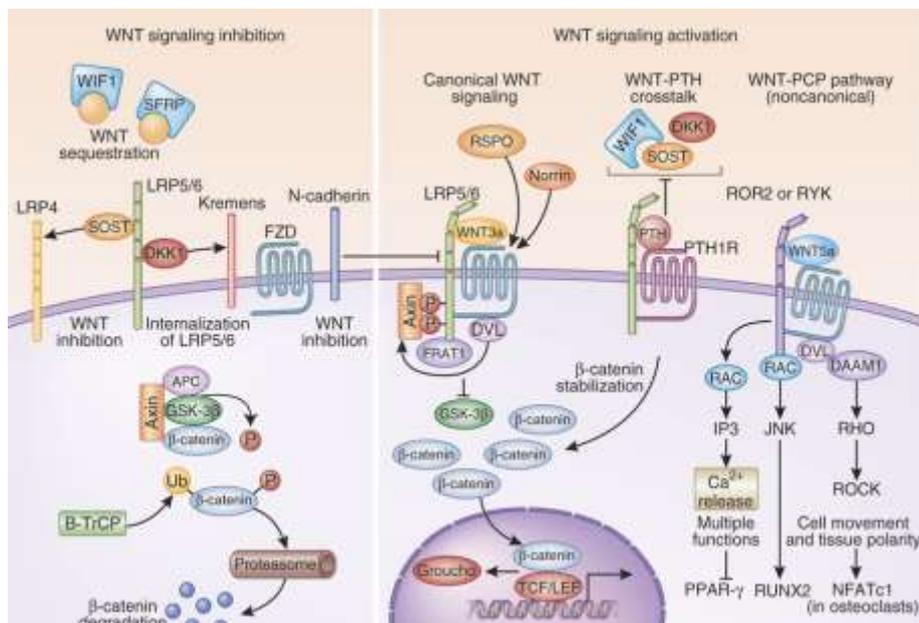


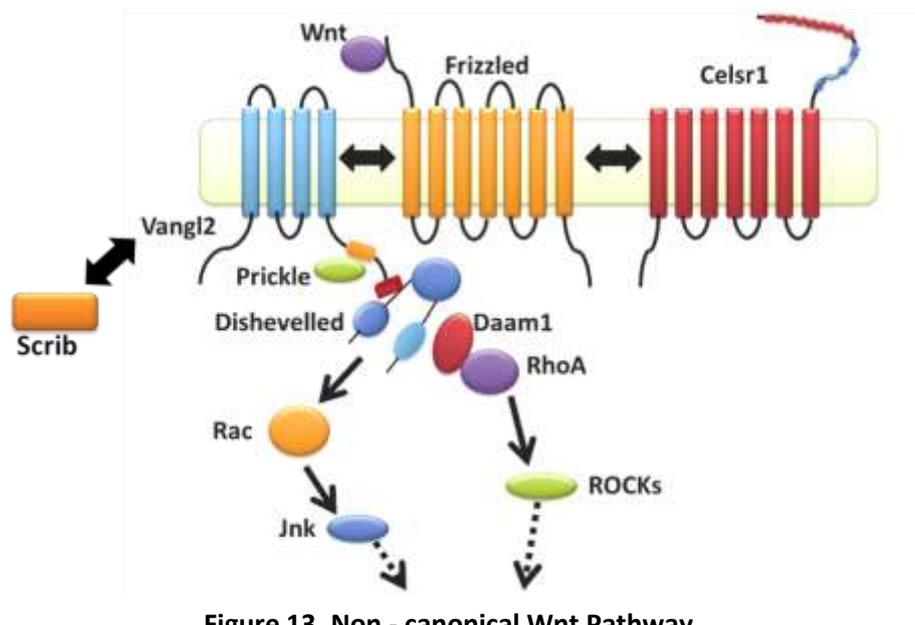
Figure 12. Wnt signalling pathway (Baron and Kneissel, 2013).

### 2.1.1 Canonical Wnt pathway

This pathway stabilizes  $\beta$ -catenin and regulates stem cell pluripotency and cell fate decisions during development. The binding of Wnt to the *Fz/LRP5/6* complex induces the membrane translocation of a key negative regulator of signalling *Axin*, which binds to a conserved sequence in the cytoplasmic tail of *LRP5/6*. This leads to the activation of *Dishevelled* (Dvl) through sequential phosphorylation, poly-ubiquitination, and polymerization. Stabilized  $\beta$ -catenin is translocated to the nucleus via *Rac1* and other factors, where it binds to *LEF/TCF* transcription factors, displacing co-repressors and recruiting additional co-activators to activate the expression of Wnt target genes.

### 2.1.2 Non-canonical Wnt pathway

Many tissues need cellular polarization for its function and development. In the epithelia, cells acquire apico-basal polarity and are also polarized within the epithelial plane (planar cell polarity, PCP). The Wnt-PCP pathway reorganizes the actomyosin cytoskeleton, and governs cell polarity alignment during tissue morphogenesis. Therefore, disruption of this pathway can lead to diverse embryopathies such as neural tube or heart defects (reviewed by (Munoz-Soriano et al., 2012; Simons and Mlodzik, 2008)).



**Figure 13. Non - canonical Wnt Pathway.**

The evolutionary conserved genes that constitute the core PCP pathway were initially identified in *Drosophila*. These are: *Van Gogh/Strabismus* (*Vang*, *Vangl1/2* in vertebrates) (Taylor et al., 1998; Wolff and Rubin, 1998), *Frizzled* (*Fz*) (Djiane et al., 2000; Vinson et al.,

1989), *Flamingo/Starry Night/Clsr* (Chae et al., 1999; Curtin et al., 2003a; Usui et al., 1999); *Prickle* (Pk) (Divecha and Charleston, 1995; Gubb et al., 1999), *Dishevelled* (*Dsh/Dvl*) (Perrimon and Mahowald, 1987; Sussman et al., 1994) and *Diego* (*Dgo*)/*inversin* (Feiguin et al., 2001; Morgan et al., 1998). *Scribble/Scrib* is localized out of the core PCP proteins in both fly and vertebrates (Montcouquiol et al., 2003), and it is a member of the leucine-rich repeat and PDZ family proteins required for a high number of processes regulated by the PCP pathway. The PCP pathway downstream of *Dsh* consists of small GTPases of the Rho subfamily, the Rho-associated kinase (ROK) and the JNK-type mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade. On the Rho-dependent pathway, Daam1, a member of the formin protein family, plays a crucial role associating with *Dsh* (Habas et al., 2001) to activate ROCK and promote migration through the formation of actin stress fibers and focal adhesion maturation (figures 6 y 7) (Chihara et al., 1997).

PCP pathway and convergent extension in vertebrates: Convergent extension (CE) is a group of highly conserved movements that shape the germ layers during vertebrate gastrulation. This convergent extension movements involve narrowing (converge) of the mediolateral aspect and elongation (extension) of the anterior-posterior aspect of the vertebrate embryo, setting up its morphological and functional polarity (reviewed by (Keller, 2002)). The PCP pathway regulates the CE movements that establish and maintain the polarity in the plane in epithelial and non-epithelial tissues.

PCP mutants and NTDs: Studies made in Zebrafish with mutants of *Wnt11/Wnt5* ligands showed an alteration of the CE process characterized by a shorter anterior-posterior and broader mediolateral axes (Heisenberg et al., 2000b; Kilian et al., 2003). In the same way, PCP-dependent CE in the midline is necessary for neural tube formation in mouse embryos. Failure in this pathway impairs the formation of the thin and long midline in the newly formed neuroectoderm, leading to a broad midline area. The wide midline increases the space between neural folds, making the fusion required for neural tube closure impossible (Ybot-Gonzalez et al., 2007b). Studies made in mice carrying mutations of the PCP, revealed the presence of severe NTDs. For example, mutations in transmembrane proteins such as *Vangl2* (Greene et al., 1998; Kibar et al., 2001b; Murdoch et al., 2001), *Clsr1* (Curtin et al., 2003b), *Ptk7* (Lu et al., 2004) and *Fzd3/6* (double mutants, (Wang et al., 2006)), or in cytoplasmatic proteins, like *Dvl* (Hamblet et al., 2002) or *Scrib* (Murdoch et al., 2003), give rise to craniorachischisis. Studies made in humans affected by NTDs also present missense variants in PCP genes. All

these data taken together emphasizes the importance of the PCP pathway during neural tube formation (reviewed by (Copp et al., 2013)).

PCP mutants and heart defects: Studies made in *circletail* mice (knockout of *Scrib*) revealed an abnormal distribution of cardiomyocytes as well as disorganization of important junctional proteins, such as N-cadherin or  $\beta$ -catenin. Similar results were obtained in studies of *Wnt11* null mice. *Loop-tail* (*Vangl2* mutants) embryos present a thinner myocardium when compared with control embryos, and the analysis of the developing cardiomyocytes revealed that they remained spherical in mutant embryos while in the control ones they were beginning to elongate. The PCP pathway seems to be involved in the remodeling of the cardiac outflow tract too. *Loop-tail* mutants, as well as mice carrying mutations in *Dvl1-3*, *Celsr1* or *Wnt11*, among others, present double-outlet right ventricle. They show a failure in the directional migration of cardiomyocytes into the outflow tract (reviewed by (Henderson and Chaudhry, 2011)). *Daam1*<sup>gt/gt</sup> mice mutants exhibit multiple heart defects, including ventricular non-compactation, double outlet right ventricles and ventricular septal defects (Li et al., 2011)

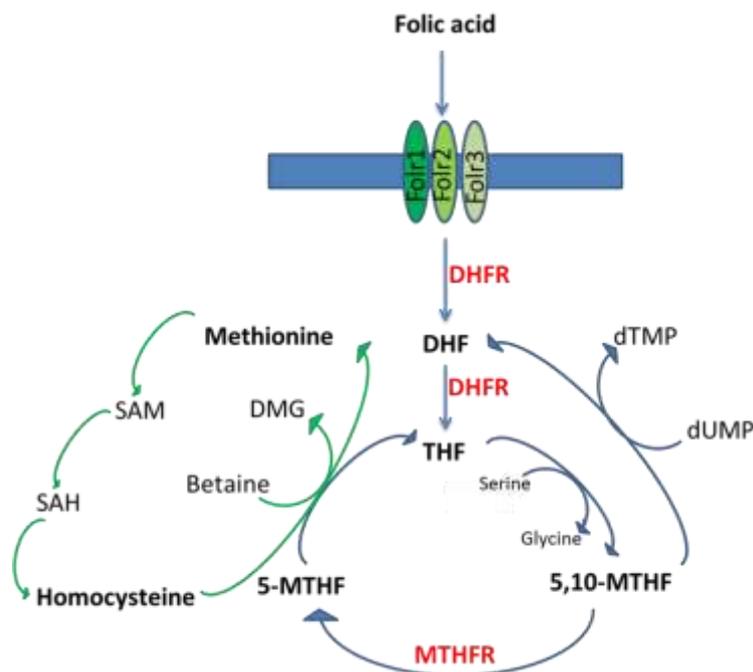
PCP mutants and eye defects: Gain- and loss-of function studies in different vertebrate animal models demonstrate that the Wnt-Frizzled pathway is involved in crucial processes during ocular development. Studies made in *Zebrafish* showed that ectopic *Wnt11* induces bigger eyes, while loss of function results in severe defects, such as partial fusion of the eye field. In *Xenopus*, absence of *Wnt4* gene expression produces loss of the eye field markers *Rx* and *Pax6* (reviewed by (Fuhrmann, 2008)). In addition, the defective cell alignment and suture formation in the lens of *Vangl2* and *Celsr1* mutant mice indicates that this process is regulated by PCP signalling (Sugiyama et al., 2010).

## 2.2 Folate metabolism pathway

Folate or vitamin B<sub>9</sub>, is a water-soluble B vitamin present in green leafy vegetables. The term “folate” is usually applied to the stable form of the vitamin, and the “folic acid” refers to the synthetic form, which should be converted into tetrahydrofolate (THF) at the beginning of the folate metabolism (Figure 8). The conversion of THF to 5,10-Methyltetrahydrofolate is a critical step that employs the 3-carbon of serine as a major carbon source. A one-carbon unit is transferred from serine to THF to form 5,10-methylene-THF and glycine. The 5,10-methylene-THF will form 5-methyl-THF through methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR). The n-5-methyl group of the 5-methyl-THF is transferred to homocysteine which results in the

regeneration of methionine (Figure 14; reviewed in (Bailey and Gregory, 1999) and (Blom et al., 2006)).

Folic acid gets inside the cell through folic binding receptors (FR in humans and Folr in mice. Figure 14), which present a specific tissue/cell expression pattern. One of these receptors is the Folr1 in mice and FR- $\alpha$  in humans. *Folr1* mRNA is mainly detected in placenta, choroidal plexus and renal membrane (Holm et al., 1991; Prasad et al., 1994; Selhub and Franklin, 1984), and in developing mouse embryos, it was detected in the neural folds, neural tube and yolk sack (Saito et al., 2003).



**Figure 14. Folate metabolism**

Folate metabolism and NTDs: Studies in mice revealed that *Folr1* has a critical role in folate homeostasis during development, and functional defects in this gene produce severe embryopathies. *Folr1*<sup>-/-</sup> (nullizygous) embryos present a severely developmental delay and fail anterior neural tube closure. These embryos usually die by gestational day 10. *Folr1*<sup>+/-</sup> (heterozygous) mice do not present any kind of defect or developmental delay (Piedrahita et al., 1999). Genetic inactivation of *Folr2* does not cause embryopathies and the nullizygous embryos have a normal development (Piedrahita et al., 1999). However, *Folr2*<sup>-/-</sup> mutants are very sensitive to develop congenital malformations, in particular exencephaly, under the exposure to environmental teratogens like arsenic (Włodarczyk et al., 2001).

Studies in mice carrying mutation in *Mthfr* gene revealed that heterozygous and *Mthfr* homozygous mice have elevated plasma homocysteine levels. Homozygous mutants have reduced survival, delayed development and cerebellar abnormalities, such as an important reduction in the cerebellar size and a presence of alterations in the distribution of the Purkinje and granule cells. The most common variant of *MTHFR* in humans is associated with decreased enzyme activity, which is similar to that observed in *Mthfr* heterozygous mice models. For that reason *Mthfr* mutant mice are good animal models for individuals that are homozygous for the 677T variant (Chen et al., 2001).

### 2.3 Pax genes

*Pax* genes form an evolutionary conserved family of transcription factors that have important functions during development, tissue homeostasis and disease. Studies of mutants of *Pax* genes and the identification of mutations in human syndromes have revealed the importance of this family in development and disease. In vertebrates, Pax proteins are classified into 4 subfamilies according to the presence of a complete or partial homeodomain and/or an octapeptide sequence involved in the recruiting of a co-repressor complex:

- Group I: includes *PAX1* and 9.
- Group II: includes *PAX2*, 5 and 8.
- Group III: includes *PAX3* and 7.
- Group IV: includes *PAX4* and 6.

Most *Pax* genes are involved in the patterning of the nervous system and are key regulators of neural crest cells. Specifically *Pax2* and *Pax8* have important functions in the urogenital system, *Pax4* controls pancreas development, *Pax3* and *Pax7* genes are regulators of the skeletal muscle lineage and *Pax6* has an important role during eye development (reviewed by (Relaix, 2015)).

Pax3 and NTDs: *Pax3* is expressed in the developing somites, dorsal spinal cord, mesencephalon, and neural crest derivatives. *Pax3* expression is restricted to the dorsal NT in mouse embryos and is inhibited by *Shh* overexpression mediated by *Zic2* in the ventral zone of the NT ((Sanchez-Ferras et al., 2014) and reviewed by (Relaix, 2015)). Mutation of *Pax3* has been related to the Splotch phenotype in mice, where homozygous die at gestational day E14 and develop spina bifida and exencephaly. Mutations of *PAX3* in humans give rise to the

Waardenburg syndrome. Humans affected by this syndrome shown numerous defects in neural crest-derived tissues.

### **3. Environmental regulation of development**

Maternal factors (socioeconomic status, lifestyle, health, medication, genotype...) determine the intrauterine environment during the embryogenesis and could act as risk factors in the development of embryopathies.

#### **3.1 Diabetes during pregnancy**

One of the most studied environmental factor during pregnancy due to its incidence of congenital malformations is maternal diabetes (Barisic et al., 2014; Evers et al., 2004; Garne et al., 2012; Newham et al., 2013; Salbaum and Kappen, 2012; Vinceti et al., 2014; Wei and Loeken, 2014). Diabetes has a global prevalence of 8.5% (World Health Organization, 2016) and affects 1 of all pregnancies with a consistently increasing prevalence in women of childbearing age (Ornoy et al., 2015). Diabetes during pregnancy produces congenital malformations that can affect different organ systems, these being the most commonly observed NTDs (spina bifida, anencephaly or encephalocele) and cardiovascular defects. All these defects are usually induced before the 7th gestational week (reviewed by (Zabihi and Loeken, 2010)) during organogenesis. Factors responsible for the abnormalities caused by the disturbances in the maternal carbohydrate metabolism have not been delineated, but there is a correlation between the severity and duration of the mother's disease and the incidence and severity of malformations (Sadler and Langman, 2012).

Diabetes during pregnancy can be divided into:

- Pregestational diabetes mellitus (PGDM): when women present diabetes mellitus type 1 or 2 (T1DM or T2DM) before pregnancy. Defective control of PGDM before and during pregnancy, especially in the first trimester, increases the risk of congenital anomalies in children three to four times when compared with those of non-diabetic mothers, and has been reported to be as high as 80% in long-standing disease (Sadler and Langman, 2012). This kind of hyperglycemia is associated with birth defects in 5-10% of pregnancies and with spontaneous abortion in 15-20% of pregnancies (reviewed by (Ornoy et al., 2015)).
- Gestational diabetes (GDM): when hyperglycemia appears during pregnancy, especially during the second half. Unlike PGDM, gestational diabetes is associated with pregnancy

complications like macrosomia, perinatal complications or increased prenatal and perinatal mortality, but it is not associated with the increase of congenital defects (reviewed by (Ornoy et al., 2015)).

Maternal hyperglycemia, especially pregestational diabetes mellitus, causes different alterations. On the one hand, it stimulates the fetal pancreas leading to  $\beta$ -cell hypertrophy and hyperplasia with an increase of insulin in uterus. On the other hand, hyperinsulinemia in uterus affects diverse organ systems including the placenta (Reviewed by (Schwartz and Teramo, 2000)). In addition high glucose levels during pregnancy elevate the production of reactive oxygen species (ROS) generating oxidative stress which was associated with malformations in diabetic offspring (reviewed by (Gabbay-Benziv et al., 2015; Yang et al., 2015)).

Maternal diabetes also affects the activity of critical developmental pathways like hypoxia (*Hif1 $\alpha$* ), folic acid metabolism (*Folr1*), Wnt- $\beta$ -catenin (*GSK3 $\beta$* ,  *$\beta$ -catenin*) or Wnt-PCP pathways (*Daam1*, *Vangl2*, *Wnt5a*...) (Pavlinkova et al., 2009; Sato et al., 2008; Wentzel et al., 2005). Moreover hyperglycemia reduces the expression of *Pax3* that, as mentioned before, is an important gene implicated in the neurulation process. All these factors could contribute to the developmental defects commonly associated with diabetes.

### **3.2 Maternal folate metabolism malfunction**

Folate has an essential role in normal embryonic development, and its deprivation could lead to embryopathies (reviewed by (Zhu et al., 2009)). A diet supplemented with folic acid (400 $\mu$ g/day) at least 3 months before and during early pregnancy have shown to reduce the NTDs incidence by 50% to 70%, including diabetic pregnancies (Oyama et al., 2009; Sadler and Langman, 2012), but there is a percentage of NTD-affected pregnancies that are not preventable with a folic acid supplemented diet.

It has been shown that elevated homocysteine levels are an indicator of dysfunction of folate metabolism, and have been related to birth defects, including NTDs (Jakubowski, 2004). In different disease models, high homocysteine levels have been related to increased immune responsiveness and have also been shown to have teratogenic effects during pregnancy. Folic acid supplementation reduces homocysteine levels (Megahed and Taher, 2004; Wald et al., 2001), which could be one potential mechanism that could explain its efficacy in the prevention of NTDs. However, the mechanism underlying the beneficial effects of folic acid during organogenesis remains unclear.

#### 4. Gene-environment interactions (GxE)

The biological definition of “gene-environment interaction” (GxE) refers to the coparticipation of gene and environment in the same mechanism to promote disease development. Maternal genotype, the intrauterine environment of the developing embryo, and also the genetic characteristics of the embryo can favour the appearance of developmental abnormalities. The study of GxE interactions is necessary to understand the biological mechanisms and pathological processes that contribute to the development of embryopathies (reviewed by (Zhu et al., 2009)). It is important to know that multiple interaction effects may occur simultaneously. Maternal environmental exposure could interact with either the mother's or the embryo's affected genes and increase the risk for birth defects. Moreover there could be interactions between the mother's and the embryo's genotype, which could lead to maternal-embryo gene-gene interactions (GxG) (Tai et al., 2015). An example of GxG interaction was described by Philip J. Lupo *et al* in a study of maternal genes associated with metabolic conditions and its influence in the risk of neural tube defects. They show that maternal genes associated with hyperglycemia and insulin resistance interact with foetal metabolic genes involved in glucose homeostasis, which increases the risk of NTDs (Lupo et al., 2014).

GxE interactions have been reported for several birth defects, including neural tube defects (NTDs) or congenital heart defects (CHDs), but in most cases the biological mechanisms underlying these interactions remain unclear. Some genetic mutations do not manifest with embryopathies unless there is an additional stress factor, such as exposure to environmental factors. For that reason, studies of GxE interactions are necessary to better understand the pathology of the embryopathies produced by a combination of different risk factors.

## **Objectives**



# Objectives

The aim of this thesis is to highlight the importance of the interaction of risk factors during embryogenesis, which increase the incidence of congenital defects, as well as to expand the knowledge of the underlying causes of the embryopathies produced by this kind of combinations. The common risk factor analysed during this project is going to be the maternal diabetes as environmental factor.

The main objectives are:

- To study different protocols of diabetes induction in different mouse strains and their effect in pregnancy.
- To investigate the interaction between maternal diabetes and mutations of the folic acid metabolism genes in embryogenesis.
- To examine the interaction between maternal diabetes and mutations of the Wnt-PCP pathway genes during embryogenesis.



## **Materials and Methods**



# Materials and methods

## 1. Mouse strains

All procedures involving any experimental animals were performed in compliance with local animal welfare laws, guidelines and policies.

**1.1 *Daam1* gene trap:** mutant mouse strain obtained from Baygenomics (cell N<sup>o</sup> RRT390) and kept on C57BL/6 background. This mouse strain carries a mutation that causes incomplete loss of function due to the alternate gene splicing (Li et al., 2011). (MGI: 1914596)

**1.2 *Loop-tail (Vangl2 Lp)*:** inbred mouse strain which carries the *Vangl2* mutation. Originally obtained from Jackson Laboratories and kept on a CBA and on a C3H background. (MGI: 2135272)

**1.3 *Folr1*:** The heterozygous *Folr1* mutant mice were obtained from Dr. Richard Finnell's laboratory and were kept in a Swiss-Vancouver (SWV) or on a LM/Bc mice background (Tang et al., 2004). (MGI: 95568)

**1.4 *Mthfr* knockout mice:** Originated from Dr. Rima Rozen's laboratory and kept in a Swiss-Vancouver mice background in the Dr. Richard Finnell's Laboratory. (MGI: 106639)

**1.5 CD1:** This strain was obtained from Charles River and was used for *in-situ* hybridization and embryo culture.

All mice were housed in clear polycarbonate micro-isolator cages and maintained on a 12-hour light: 12-hour dark cycle (lights on from 07:00–19:00), with *ad libitum* access to food (Global Diet 2014S, Harlan-Teklad) and water. *Daam1*, *Vangl2* and CD1 mice were maintained in the vivarium of the Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) and *Folr1* and *Mthfr* mice were maintained in the Vivarium at the Dell Pediatric Research Institute, Austin, Texas (EEUU). After overnight mating, dams were checked for vaginal plugs the following morning, and the day on which a copulation plug was found was designated as E0.5. Litters were collected at intervals between E11.5 and E17.5, dissected from the uterus in phosphate buffered saline (PBS) or in 37°C warm Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Life technologies) supplemented with 10% heat inactivated Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco Life technologies), and immersed in fixative solutions or placed in culture.

## 2. Embryo genotyping

DNA was extracted from yolk sac adding to each sample 100  $\mu$ l of the DNA lysis buffer (50mM tris pH=8; 5mM EDTA pH=8; 100mM NaCl and 0.5% SDS) and 5 $\mu$ l of proteinase K (10 mg/ml. P2308 Sigma-Aldrich). Samples were incubated at 55°C O/N. Proteinase K inactivation was performed adding 40 $\mu$ l of a saturated NaCl solution and the DNA was precipitated using EtOH. The DNA was resuspended on ddH<sub>2</sub>O and 2-5  $\mu$ l were used for PCR genotyping.

- **Daam1:**

Fw primer: AGC ATT CTG AAA GTC ATC GTC TTT

Rv primer 1: CCA AAT TTA GAA CAC AGT ATA GCA CA

Rv primer 2: TAT GCA GTG CTG CCA TAA CC

PCR protocol: BIOTAQ (BIO-21060 Bioline)

	Stock concentration	Final concentration	Volume per sample
Buffer	10X	1X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.5mM	0.75 $\mu$ l
dNTPs	100mM	4mM	1 $\mu$ l
Fw primer	40 $\mu$ M	0.32 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
Rv primer 1	40 $\mu$ M	0.32 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
Rv primer 2	40 $\mu$ M	0.32 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
BioTaq			0.25 $\mu$ l
Water			15.15 $\mu$ l
		DNA	5 $\mu$ l
		Final volumen	25 $\mu$ l

PCR conditions: 94°C 5min; 30 cycles: 94°C 30sec, 58°C 30sec, 72°C 1min; 72°C 10min.

Electrophoresis conditions: 2% agarose gel

- **Vangl2:**

Fw primer: AGA ATC TGA CTT ACC CAT GGT

Rv primer 1: GAG GGA GAA GAA TTA TGT CTG

PCR protocol: BIOTAQ (BIO-21060. Bioline)

PCR conditions: 94°C 4'; 30 cycles: 94°C 1', 58°C 1', 72°C 1'; 72°C 10'.

Electrophoresis conditions: 5% agarose gel

- **Folr1:**

Wt allele primers: 5'- AAG TGC AAG GCT GCA TGT GG -3' and 5'- CAT TCC GAT GTC ATA GTT CCG C -3'.

Null allele primers: 5'- ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTTGA C -3' and 5'- TGC ATT CCG ATG TCA TAG TTCCG -3'.

PCR protocol: Crimson Taq DNA polymerase (M0324S New England BioLabs)

	Stock concentration	Final concentration	Volume per sample
Buffer	5X	1X	2.5 µl
dNTPs	10mM	4mM	1 µl
Fw primer	10µM	0.32µM	0.2 µl
Rv primer	10µM	0.32 µM	0.2 µl
BioTaq			0.25 µl
Water			15.15 µl
		DNA	5ul
		Final volumen	25 µl

PCR conditions: 95°C 30''; 30 cycles: 95°C 30'', 60°C 30'', 68°C 1'; 68°C 5'.

Electrophoresis conditions: 2% agarose gel

- **Mthfr:**

Wt allele primers: 5'-GAC TAC CTG GCT ATC CTC TCA TCC-3' and 5'-GAA GCA GAG GGA AGG AGG CTT CAG-3'

Mutant allele primers: 5'-GAC TAC CTG GCT ATC CTC TCA TCC-3' and 5'-AGC CTG AAG AAC GAG ATC AGC AGC-3'

PCR protocol: Crimson Taq DNA polymerase (M0324S New England BioLabs)

PCR conditions: 95°C 30''; 30 cycles: 95°C 30'', 60°C 30'', 68°C 1'; 68°C 5'

Electrophoresis conditions: 2% agarose gel

### 3. Diabetes induction

Diabetes was induced using different protocols of STZ injection for each mice background, as described in Chapter 1. STZ was prepared fresh in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5) to a final concentration of 7.5 mg/ml (Tesch and Allen, 2007). Blood glucose levels were monitored 10 days after the last STZ injection using a commercial glucometer (Accu-Chek Aviva Nano, Roche Diagnostics). Mice with fasting blood glucose above 240 mg/dl (Pavlinkova et al., 2008) were considered diabetic mice. Diabetic and age-matched control female mice were mated with heterozygous males for each mutation (*Folr1*<sup>+/-</sup> or *Mthfr*<sup>+/-</sup> for objective 2 and *Daam1*<sup>+/gt</sup> and *Vangl2*<sup>+/Lp</sup> for objective 3).

### 4. General morphology, histological analysis and expression study of embryos and Foetuses

Embryos were collected at E8.5-17 and were used for different porpoises.

#### 4.1 Tissue preservation

- **For histological analysis:** fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) for 1 hour or in Bouins solution (Sigma Aldrich HT1032) for 1h to 12h and storing in 70%-Ethanol at 4°C.

- **For immunohistochemistry:** embryos were fixed in 4% PFA for 1h at 4°C, washed in PBS, stored in 15% sucrose solution during 12h, embedded in gelatine (15% sucrose and 7.5% gelatine in PBS) and cryo-sectioned at thicknesses of 10/50 µm on a Leica CM1950 cryostat.

- **For *in-situ* hybridization:** embryos were fixed in 4% PFA for 12h at 4°C, washed in PBS, serially dehydrated to 100% MetOH and stored at -20°C until use.

**4.2 Analysis of external malformations:** Embryos collected for each experiment were first analysed for external malformations and photographed by using a stereomicroscope (SteREO Discovery V8+AxioCam Erc8, Zeiss).

**4.3 Histological analysis:** After fixation with 4% PFA, the embryos were stored in 70% ethanol, serially dehydrated and embedded in paraffin wax. Microtome sections (7  $\mu\text{m}$ ; Leica RM2255) from at least three different embryos of each experiment were stained with Ehrlich's haematoxylin and eosin for histological analysis and mounted with Hydromount (HS-106, National Diagnostics). Representative sections were selected and photographed by using an Olympus (Tokyo, Japan) BX-61 photomicroscope.

**4.4 *In-situ* hybridization:** To study mRNA expression, whole mount *in-situ* hybridization was performed using sense and antisense riboprobes prepared with a digoxigenin RNA labelling kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. At least three mouse E9.5 embryos (25-30 somites) were analysed per probe, as described previously (Ybot-Gonzalez et al., 2005). Selected embryos, labelled for *Daam1* (Ybot-Gonzalez et al., 2007b), *glypican4* (Ybot-Gonzalez et al., 2005), *Wnt5a* (Gavin et al., 1990), *Pax3* (Tajbakhsh et al., 1997) or *Shh* (Greene et al., 1998), were embedded in a gelatin-sucrose-albumin and glutaraldehyde solution, and vibratome sections (50  $\mu\text{m}$ ) of the embryos were photographed by using an Axiophot (Zeiss, Jena, Germany) photomicroscope.

**4.5 X-gal staining:** Embryos at E11.5 and E12.5 were fixed in 4% PFA, and they were immediately whole mount stained using the X-Gal method (Carroll et al., 2003). Eosin counterstained paraffin sections (7  $\mu\text{m}$ ) were examined.

**4.6 Immunohistochemistry:** Sections of at least three different embryos per primary antibody were blocked with PBT (PBS, 10% Triton and 1% BSA) and incubated overnight at 4°C with the primary antibody. After primary antibody sections were washed 3 times in PBS and incubated with appropriate secondary antibody for 1h at R.T. Then were washed 3 times in PBS, mounted with Hydromount (HS-106, National Diagnostics), and then photographed by using an Olympus (Tokyo, Japan) BX61 microscope or a confocal microscope (TCS-SP2-AOBS, Leica).

Primary Antibodies	Source	Dilution	Reference
Zo1	Rabbit	1:150	40-2200 Invitrogen
myosin heavy chain II-B	Rabbit	1:150	PRB-445P, Covance
$\beta$ -catenin	Mouse	1:200	610153 BD-bioscience
Pax6	Mouse	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Vangl2	Rabbit	0,5:150	A kind gift from M. Montcouquiol, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France (Belotti et al., 2012)
<b>Secondary antibodies</b>			
anti-rabbit FITC conjugated	Goat	1:250	ab6717 Abcam
anti-mouse CyTM3 conjugated IgG	Goat	1:300	115-165-166 Jackson ImmunoResearch
<b>Others</b>			
Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate	----	2:1000	P1951, Sigma-Aldrich

## 5. Embryo culture

- **Daam1 embryos** at E9, with their embryonic membranes intact, were cultured in the presence of D-glucose dissolved in PBS (10 mM, 20 mM or 30 mM), or with cytochalasin D (CytD, 0.05  $\mu$ g/ml, 1233, Tocris Bioscience) and Y-27632 (10  $\mu$ M, 688000; Calbiochem). Embryos were maintained at 37°C in culture for 7 hours (in the presence of glucose) or 6 hours (for the CytD and Y-27632 treatment), as described previously (Copp et al., 2000).
- **Vangl2 embryos** were cultured in the presence of D-glucose. Embryos were maintained at 37°C in culture for 18 hours.
- **CD1 embryos** at E8.5 were cultured in the presence of D-glucose dissolved in PBS (20mM), and with L-homocysteine thiolactone (H6503 Sigma-Aldrich). Embryos were maintained at 37°C in culture for 18 hours (Copp et al., 2000).

In each experiment, control embryos were cultured in parallel in the presence of the vehicle solution alone. After culture yolk sac circulation and the heartbeat of the embryos had been assessed, only apparently healthy embryos were studied further to assess external malformations and subsequently fixed in 4% PFA.

## 6. RNA extraction and quantitative RT-PCR

The expression of genes in the Wnt-PCP pathway and *Pax3* gen was analysed by using QRT-PCR. Cultured 22-to 23-somite embryos were preserved in RNA-later (Ambion) until total RNA was extracted with the TRIsure reagent (Bioline) according to the manufacturer's recommendations. The One-Step SYBR Prime Script RT-PCR kit (TaKara, Otsu, Shiga, Japan) was used to synthesize first-strand cDNA from 40ng of the total RNA. QRTPCR analyses were performed using the ViiA7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The primers were as follows:

Primer name	Fw 5'-3'	Rv 5'-3'	Ref.
<i>Daam1</i>	GAAGAGTTGCGGGATATTCC	TCTGAGAAGGTGAAGCTAGC	(Lopez-Escobar et al., 2015)
<i>Vangl2</i>	TACTACGAGGAAGCCGAGCATGA	GCAGCCGCATGACGAACTTAT GT	(Chen et al., 2013)
<i>Pax3</i>	AAAAGGCTAAACACAGCATCGAT	TCGGAGCCTTCATCTGACTGA	(Chang et al., 2003a)
<i>Hmbs</i>	CCATACTACCTCCTGGCTTACTATTG	GGTTTTCCCGTTTGCAGATG	(Hidalgo-Figueroa et al., 2012)
S18	TTCGGAAGTGGAGCCATGAT	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT	(Zhao et al., 2016)

The primer set used for quantitative RT-PCR analyses of *Daam1* was validated. *Hmbs* and *S18* were expressed stably under the experimental conditions used. The reactions were run in triplicate and repeated on several independent samples for each genotype. The fold change in gene expression was determined using the Ct method (Livak and Schmittgen, 2001), normalizing expression to the housekeeping target gene and to a control untreated sample.

## 7. Statistical analysis

**Objective 2:** Comparisons of percentages of number of resorptions and comparisons of averages of number of embryos/litter were analyzed using a proportion comparison test (Epidat 4.1 software). Categorical variables, including the number of affected *Mthfr* embryos from diabetic dams, were evaluated using a Fisher's exact test. Affected *Folr1* embryos from diabetic dams were evaluated using Fisher's exact test with Mid-p correction.

**Objective 3:** Categorical variables, including the number of affected embryos from diabetic dams and the number of affected *Daam1* mutants, were evaluated using a Fisher's exact test. Quantitative variables, including litter size, the number of resorptions and the fold-change values were evaluated using a U Mann–Whitney test. Global comparisons for cell circularity were evaluated using the H-Kruskal-Wallis non-parametric test. Multiple comparisons for cell circularity analysis were evaluated using a U-Mann–Whitney test attending to the Bonferroni correction ( $P < 0.0125$ ). The software used for statistical analysis was IBM SPSS Statistics 19.

## **Resultados**



## **Objetivo 1: Estudio de la efectividad y de la respuesta a diferentes protocolos de inducción de la diabetes en diferentes cepas de ratón.**

### **Introducción**

Los modelos animales han supuesto una enorme contribución científica en el estudio de la diabetes ya que han brindado la oportunidad a los investigadores de poder analizar *in vivo* los factores genéticos y ambientales que pueden dar lugar al desarrollo de la enfermedad así como conocer las complicaciones a las que puede dar lugar; de esta manera se ha podido recabar información necesaria para desarrollar tratamientos para la diabetes en humanos.

Existen diferentes modelos animales para el estudio de la diabetes mellitus, tanto de la DMT1 como de la DMT2, en función de cómo desarrollen la enfermedad (de forma espontánea, mediante manipulación genética, por eliminación quirúrgica de una parte o de todo el páncreas, por administración de determinados compuestos químicos...). Una de las formas más utilizadas para la inducción de una diabetes similar a la tipo 1 en modelos animales ha sido mediante inyecciones de streptozotocina (STZ).

La STZ [2-deoxy-2-(3-metil-3-nitrosourea)-D-glucopiranosido] es una nitrosourea sintetizada por el *Streptomyces achromogenes*. Tras su administración intraperitoneal entra en las células  $\beta$ -pancreáticas mediante los transportadores GLUT-2 y provoca la alquilación y posterior fragmentación del ADN. Esto conlleva a la activación de la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) y a la depleción de  $\text{NAD}^+$ , reducción del ATP celular y la consiguiente inhibición de la producción de insulina (Sandler and Swenne, 1983). Además la STZ es una fuente de radicales libres que pueden contribuir al daño del ADN y a la muerte de la célula  $\beta$ -pancreática (Szkudelski, 2001). La STZ puede ser administrada en una única dosis alta o a dosis bajas durante varios días consecutivos.

Otra forma de inducción de la diabetes es la descrita por Mary Loeken (Fine et al., 1999). Esta inducción consiste en la inyección subcutánea de D-glucosa durante el embarazo para conseguir una hiperglucemia en un momento determinado, de forma que se afecte a un proceso concreto del desarrollo.

Debido al incremento en el número de nuevas cepas de ratón para su uso como modelos animales en la investigación científica, los protocolos de inducción de diabetes disponibles actualmente han de ser probados para poder seleccionar los más adecuados en función de la

cepa, ya que la respuesta a cada protocolo puede variar notablemente dependiendo del fondo genético escogido. En este objetivo nos planteamos el estudio de los diferentes protocolos de inducción de la diabetes con STZ y D-glucosa en distintas cepas de ratón (C57B/L6, CD1, SWV, CBA, LM/Bc y C3H) para su uso posterior en el estudio de la interacción de factores (ver capítulos 2 y 3).

## Resultados

### 1. Descripción de los protocolos utilizados

#### A) Inyección de STZ a las hembras previo a la gestación

En función de la concentración de STZ utilizada se realizaron los siguientes protocolos:

- i) Dosis baja: Este protocolo está basado en el protocolo facilitado por la AMDCC (*Animal Models of Diabetic Complications Consortium*). Consiste en la administración intraperitoneal de STZ en múltiples inyecciones a una concentración de 50mg/Kg durante 5 días consecutivos y es uno de los protocolos más usados en la bibliografía. En nuestro estudio la concentración de STZ inyectada utilizando este protocolo variará entre 40mg/Kg y 50mg/Kg en función de las cepas utilizadas.
- ii) Dosis media: 80mg/kg durante 3 días consecutivos. Este protocolo se utilizó en aquellas hembras en las que la respuesta al protocolo Ai inducía infertilidad en las hembras.

Una semana después de la última inyección se midió el valor de glucosa en sangre. Si la hembra presentaba valores de glucemia superiores a 240mg/dl se consideró como diabética y comenzó a cruzarse con el macho. En el caso de presentar una glucemia con un valor inferior a 240mg/dl, se repitieron las mediciones de glucemia cada 2 días hasta obtener un valor indicativo de hiperglucemia. Si pasado 1 mes desde la última inyección las hembras no presentan valores elevados de glucosa estas fueron reinyectadas siguiendo las indicaciones establecidas en el protocolo de la AMDCC.

#### B) Inyección de STZ a las hembras en diferentes momentos de la gestación

En las cepas en las que los protocolos Ai y Aii no resultaron efectivos debido a la aparición de infertilidad en las hembras tras el tratamiento, se probó a inducir la diabetes durante la gestación. Decidimos probar diferentes dosis de manera que la dosis final de STZ a inyectar fuera desde 130mg/kg hasta 200mg/kg. Estas concentraciones fueron más bajas que las empleadas en el protocolo Ai y Aii debido a que las hembras, al ser inyectadas durante la gestación, podían desarrollar más fácilmente la hiperglucemia con una dosis de STZ menor, ya que, durante el embarazo, se produce una resistencia a la insulina de forma natural, lo que se asemeja a lo que ocurre en la diabetes (Sonagra et al., 2014).

En función de la concentración de STZ utilizada se llevaron a cabo los siguientes protocolos:

- i) Dosis baja: 65mg/kg durante 2 días consecutivos.

- ii) Dosis media: 80mg/kg durante 2 días consecutivos.
- iii) Dosis media-alta: 100mg/kg durante 2 días consecutivos.

### **C) Una única inyección de STZ a dosis alta antes de la gestación**

Este protocolo está basado en el protocolo facilitado por la AMDCC (*Animal Models of Diabetic Complications Consortium*) utilizado para inducir una diabetes similar a la DMT1 mediante la administración intraperitoneal de una inyección de STZ a dosis alta. Para determinar la concentración de STZ a utilizar nos basamos en el artículo publicado por (Oyama et al., 2009) en el que inyectan una dosis de 240mg/kg de STZ.

### **D) Otros protocolos**

En aquellas cepas en las que ninguno de los protocolos anteriores resultaron efectivos, se trató de inducir la diabetes mediante el uso de otros protocolos.

- i) Inducción de la diabetes mediante inyecciones de glucosa en momentos concretos del desarrollo: Para llevar a cabo este protocolo nos basamos en el artículo publicado por Mary Loeken (Fine et al., 1999). En este protocolo la diabetes es inducida en las ratonas durante el embarazo (en edad gestacional E7.5) mediante inyecciones subcutáneas de glucosa al 12.5% en solución de fosfato salino (PBS). Las hembras embarazadas son más sensibles a la glucosa y producen más insulina en respuesta a los cambios en la concentración de glucosa.
- ii) Combinación de protocolo de una única inyección de STZ con inyecciones de glucosa en un momento determinado del desarrollo: En resultados obtenidos con los protocolos anteriormente descritos hemos observado que, en ocasiones, la diabetes produce infertilidad en las hembras. Por otro lado, como se describe más adelante, al utilizar el protocolo de inyecciones de glucosa durante el embarazo no se consiguió mantener elevada la glucemia más que de forma momentánea. Por todo ello decidimos probar a inducir la diabetes una vez iniciado el embarazo mediante inyecciones de STZ y comprobar la glucemia en los momentos de interés del embarazo, como durante el cierre del TN (E7'5). Si en este momento la glucemia era baja se utilizó el protocolo D.i. De esta forma, consideramos que, al haber inyectado también STZ, se conseguiría una elevación más eficaz y permanente de la glucemia hasta el momento de la extracción de los embriones (E11.5).

## **2. Evaluación de la efectividad de los protocolos de inducción de diabetes en función del fondo genético de las hembras.**

Las cepas que se describen a continuación fueron elegidas en base a los estudios de interacción de factores que se tratarán en los objetivos 2 y 3.

**2.1 CD1:** Esta cepa es una de las más utilizadas en investigación para diversos estudios gracias a su versatilidad, por lo que nos pareció una cepa idónea para el estudio de embriopatías producidas por la diabetes materna. Para analizar la respuesta de estas hembras al protocolo de inducción Ai se utilizaron 5 hembras. En este caso la dosis de STZ utilizada fue de 40mg/kg. Todas las hembras presentaron valores de hiperglucemia entre 7 y 10 días después de la última inyección de STZ, 4 de ellas presentaron TM tras el cruce con los machos pero solo 3 presentaron embriones en el momento de la disección. Decidimos probar en 5 hembras el mismo protocolo pero inyectando 4 días en vez de 5, para ver si desarrollaban la diabetes con la misma eficacia pero sin el efecto negativo de ausencia de embriones tras observar el TM. Curiosamente estas ratonas tardaron lo mismo en desarrollar la diabetes que aquellas inyectadas 5 días consecutivos, pero el número de TM tras el cruce con los machos fue menor y en el momento de la extracción de los embriones estas presentaron solamente reabsorciones. Otro de los protocolos testados en esta cepa para tratar de aumentar el número de hembras embarazadas fue el Aii, para ello se utilizaron 4 hembras. Estas ratonas desarrollaron diabetes rápidamente, presentando unos valores de glucemia muy altos ( $\geq 600$ mg/dl) tan solo 4 días tras la última inyección de STZ. Los elevados niveles de glucosa fueron letales, muriendo todas las ratonas a los pocos días de haber terminado el protocolo de inducción. Este hecho indica que esta cepa es muy susceptible a protocolos de inducción con mayor concentración de STZ en menos tiempo. Otros protocolos probados en esta cepa fueron las inyecciones de STZ en edades tempranas de la gestación: Bii a 1 ratona en los días de gestación E1.5 y E2.5 y Biii a 2 ratonas en los días de gestación E0.5 y E1.5. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que, a pesar de desarrollar rápidamente la diabetes (4 días post-inyección), no se obtuvieron embriones. Esto parece indicar que las inyecciones de STZ en edades tan tempranas de la gestación afecta negativamente al desarrollo provocando la pérdida de los embriones. Por último, en 1 hembra CD1 se probó el protocolo Di. La ratona embarazada fue inyectada con glucosa hasta en 9 ocasiones, consiguiendo un valor máximo de 400mg/dl que no duró más de 1 hora. Al día siguiente la hembra presentaba glucemia normal, al igual que en el momento de la extracción de embriones (E11.5). Este protocolo requiere numerosas inyecciones subcutáneas que inducen edemas transitorios debido a que la solución

de glucosa tarde bastante en absorberse, lo que eleva el estrés de las hembras y puede ocasionar el aumento de abortos. Además resultó muy difícil aumentar y mantener los niveles hiperglucémicos durante el momento del desarrollo embrionario de interés. Es por ello que este protocolo no fue probado en el resto de cepas, salvo cuando se realizó en combinación de inyecciones de STZ (protocolo Dii).

**2.2 SWV:** Una de nuestras líneas de investigación se centra en el estudio de la interacción entre la diabetes y el metabolismo del ácido fólico en la aparición de embriopatías (Objetivo 2). Uno de los mutantes utilizados fue *Folr1*, desarrollado en el fondo genético SWV. Esta cepa tiene como característica principal que las hembras mayores de 8 meses de edad desarrollan polidipsia con poliuria hereditaria muy similar a la diabetes nefrogénica insípida (Virgo and Miller, 1974) lo que podría hacerlas más sensibles a los protocolos de inducción de diabetes. En 9 hembras SWV se probaron de forma simultánea 3 protocolos diferentes para averiguar cuál era el más efectivo. Por una parte, 3 hembras de esta cepa fueron inducidas mediante el protocolo Ai utilizando la concentración de 40mg/kg, ya que, al poder ser más susceptibles al tratamiento decidimos utilizar la menor de las concentraciones. Las 3 hembras desarrollaron diabetes entre 7 y 10 días tras la última inyección de STZ, todas presentaron TM tras el cruce con los machos así como camada viva. Por otra parte 3 hembras fueron inducidas utilizando el protocolo C. A los 4 días post-inyección 2 hembras fueron sacrificadas debido a que presentaban mal estado de salud. La hembra restante presentó una elevada glucemia (en torno a 580mg/dl) y su aspecto era saludable, por lo que fue puesta en cruce con un macho de la misma cepa. A pesar de obtener TM tras el cruce con el macho, esta hembra no presentó ningún embrión en el momento de la disección. Por último, 2 hembras de esta cepa fueron utilizadas para la inducción de la diabetes mediante el protocolo Dii utilizando una concentración de STZ de 80mg/kg a edades gestacionales E4.5 y E5.5. En este caso sólo se necesitó inyectar glucosa a E7.5 a una de las dos hembras, ya que la otra hembra ya presentó valor de glucemia elevado. En el momento de la extracción de los embriones, ambas hembras presentaron valores de hiperglucemia así como embriones. Este estudio previo nos indicó que el protocolo Ai era el más adecuado ya que ofreció buenos resultados y requirió menos manipulación de las hembras que el protocolo D.ii.

**2.3 LMBc:** Esta cepa es otra de las utilizadas para desarrollar la mutación de *Folr1*. Decidimos probar en ella el protocolo Ai en paralelo a las pruebas realizadas en la cepa SWV. Se indujo la diabetes a 3 hembras utilizando la STZ a una concentración de 40mg/kg. Estas hembras desarrollaron la enfermedad entre 7 y 16 días tras la última inyección, todas presentaron TM tras el cruce con los machos y todas tenían embriones en el momento de la extracción. Los

valores de hiperglucemia presentados por esta cepa no superaron los 390mg/dl. A pesar de la buena respuesta obtenida en estas hembras, decidimos utilizar la cepa SWV para nuestros estudios de interacción entre diabetes y el metabolismo del ácido fólico ya que las hembras de la cepa SWV presentaron una mejor respuesta a los protocolos de inducción probados mostrando unos valores de glucemia mayores.

**2.4 C57BL/6:** Otra de nuestras líneas de investigación se centra en el estudio de la interacción de la diabetes materna y la vía Wnt-PCP en la aparición de defectos embrionarios (Objetivo 3). Los ratones utilizados en este estudio son la línea *Daam1* con fondo genético C57BL/6. Esta cepa de ratón es una de las más utilizadas en investigación. Presentan una alta susceptibilidad al desarrollo de obesidad y de diabetes tipo 2 inducidos por la dieta (Glastras et al., 2017; Yorek et al., 2015). Debido a su amplia utilización para el estudio de los efectos de la diabetes, decidimos utilizarla para nuestros experimentos. En primer lugar se indujo la diabetes a 29 hembras mediante el protocolo Ai. De las 29 hembras inducidas, 21 desarrollaron diabetes entre 10 y 30 días tras la última inyección de STZ y las 21 presentaron TM tras ser cruzadas con los machos. 19/21 hembras presentaron camadas, 2 de las cuales presentaron solamente reabsorciones. Para tratar de disminuir el tiempo que tardaron en desarrollar la diabetes, factor que podría estar influyendo en la fertilidad de las hembras así como en el número de reabsorciones, decidimos probar en esta cepa el protocolo de inducción Aii. Este protocolo se utilizó en 4 hembras, pero los resultados obtenidos no fueron los esperados. Las 4 hembras desarrollaron diabetes rápidamente (entre 4 y 6 días post-inyección), pero ninguna se quedó embarazada tras el cruce con los machos, y finalmente murieron debido a los elevados valores de glucemia presentados. Otro de los protocolos que fue testado en esta cepa de ratón fue el de la inducción de la diabetes durante la gestación mediante 2 inyecciones de STZ a una concentración de 100mg/kg en los días de gestación E4.5 y E5.5 en combinación con inyecciones de glucosa 12'5% a E7.5 (protocolo Dii). Este protocolo se testó en 2 hembras de esta cepa, pero de nuevo los resultados obtenidos no fueron los esperados. La glucemia solo se consiguió elevar de forma momentánea tras las inyecciones de glucosa a E7.5 y en el momento de la extracción de los embriones, ninguna de las hembras resultó estar embarazada. Debido al bajo éxito de este protocolo y a la elevada manipulación de las hembras requerida para llevarlo a cabo, decidimos no aumentar el número de hembras para verificar su posible eficacia.

**2.5 CBA/Ca:** Otro de los mutantes utilizados para nuestro estudio de la interacción de la vía Wnt-PCP y la diabetes materna en el desarrollo de embriopatías es el mutante *Looptail*

(mutante de Vangl2) desarrollado en el fondo genético CBA/Ca. Los machos de esta cepa de ratón tienen la característica de que desarrollan con la edad un síndrome de diabetes y obesidad caracterizado por la presencia de hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Esto nos hizo pensar en que podría ser una buena cepa para la inducción de la diabetes, ya que, probablemente, la desarrollarían con más facilidad. En primer lugar utilizamos el protocolo Ai para inducir la diabetes a 6 hembras de esta cepa. De estas 6 hembras sólo 4 desarrollaron la diabetes entre 5 y 10 días tras la última inyección alcanzando unos valores de glucemia muy elevados (valor medio=531 mg/dl). A pesar de que 3 de las 4 hembras diabéticas presentaron TM tras el cruce con los machos, finalmente ninguna de ellas presentó embriones en el momento de la extracción. Para tratar de obtener mejores resultados, se utilizó el protocolo de inducción Aii en 8 hembras. Con este protocolo las 8 hembras se volvieron diabéticas, 4 de ellas presentaron TM tras el cruce con el macho. De 3 de las 4 hembras embarazadas se obtuvo camada mientras que 1 de ellas no presentó embriones. Finalmente, las 4 hembras restantes fueron sacrificadas debido a que presentaban elevados valores de glucemia que se acompañaron de una elevada pérdida de peso y de fertilidad (nunca presentaron TM tras el cruce con los machos), así como un mal estado general de salud. En paralelo a la prueba del protocolo Dii en la cepa C57BL/6, en una hembra CBA de utilizó dicho protocolo inyectando STZ a una concentración de 65mg/kg en los días de gestación E4.5 y E5.5 junto con inyecciones de glucosa a E7.5. Así como se observó en las hembras C57BL/6, la subida de la glucemia fue sólo momentánea y no superó los 400mg/dl. Esta hembra finalmente presentó embriones en el momento de la disección pero no era diabética, por lo que este protocolo tampoco resultó ser efectivo para nuestro objetivo.

**2.6 C3H:** Los mutantes *Looptail* también se encuentran desarrollados en este fondo genético, por lo que decidimos utilizarla para testar los protocolos de inducción a diabetes. Se indujo la diabetes a 8 hembras de esta cepa mediante el protocolo Ai. Debido a que no sabíamos cómo sería la respuesta que obtendríamos al utilizar esta cepa y en base a lo observado anteriormente en el resto de cepas utilizadas, decidimos inyectar la STZ a una concentración de 40mg/Kg. 3 de ellas desarrollaron diabetes entre 12 y 20 días tras la última inyección, pero las 5 restantes tras un mes desde la última inyección de STZ, mantenían valores normales de glucemia, por lo que fueron inyectadas de nuevo siguiendo las recomendaciones establecidas en el protocolo de la AMDCC. Finalmente las 5 ratonas desarrollaron diabetes entre 4 y 5 días tras la última inyección, alcanzando valores más elevados que las ratonas inyectadas la primera vez. Las 8 ratonas inducidas presentaron embriones en el momento de la extracción.

## Resultados. Objetivo 1

Cepa	n	Protocolo	[STZ]	TDD	HD	HP	camadas	HM	Glucemia (mg/dl)
CD1	5	A.i	40mg/kg	7-10 días	5	4	3	0	V. Max: ≥600 V. Medio: 524
	5	A.i <sup>++</sup>	40mg/kg	7-10 días	5	3	0*	0	V. Max: ≥600 V. Medio: 578
	4	A.ii	80mg/kg	4 días ***	4	0	0	4	V. Max: ≥600 V. Medio: 564
	1	B.ii	80mg/kg	4 días	1	---	0	0	V. Max: ≥600
	2	B.iii	100mg/kg	4 días	2	---	0	0	V. Max: ≥600
	1	D.i	-----	-----	0	0	0	0	V. Max: ≥400
SWV	3	A.i	40mg/kg	7-10 días	3	3	3	0	V. Max: ≥600 V. Medio: 527
	3	C	240mg/kg	4 días	3	1	0	2	V. Max: ≥600
	2	D.ii	80mg/kg	-----	2	-----	2	0	V. Max: 498 V. Medio: 419
LMBc	3	A.i	40mg/kg	Entre 7 y 16 días	3	3	3	0	V. Max: 389 V. Medio: 337
C57BL/6	29	A.i	50mg/kg	10-30	21	21	19 <sup>+</sup>	2	V. Max: 588 V. Medio: 342
	4	A.ii	80mg/kg	4- 6	4	0	0	4	V. Max: 571 V. Medio: 471
	2	D.ii	100mg/kg	-----	0	---	0	0	V. Max: ≥400
CBA/Ca	6	A.i	50mg/kg	5- 10 días	6	3	0	0**	V. Max: ≥600 V. Medio: 531
	8	A.ii	80mg/kg	8-10 días	8	4	3	0**	V. Max: ≥600 V. Medio: 452
	1	D.ii	65mg/kg	-----	0	---	0	0	V. Max: ≥400
C3H	3	A.i	40mg/kg	12-20 días	3	3	3	0	V. Max: 511 V. Medio: 287
	5	A.i x2	40mg/kg	5 días	5	5	5	0	V. Max: >600 V. Medio: 533

**Tabla 1: Respuesta de las diferentes cepas a los distintos protocolos de inducción por múltiples inyecciones de STZ.** TDD: tiempo de desarrollo de la diabetes tras la última inyección; HD: número hembras diabéticas; HP: número hembras preñadas; HM: número hembras muertas. (+) Indica que 2 de las 21 hembras que habían presentado TM solamente tenían reabsorciones. (++) Indica que estas hembras solo fueron inyectadas durante 4 días. (\*)Indica que sólo se obtuvieron reabsorciones. (\*\*) Indica que ninguna de las hembras murió durante el experimento, pero fueron sacrificadas ya que presentaron altos valores de glucemia que se acompañó con una gran pérdida de peso y pérdida de fertilidad (6 de las 13 hembras no llegaron a presentar tapón mucoso durante el tiempo que estuvieron en cruce). (\*\*\*) Indica que 4 días post-inyección los valores de glucemia ya eran demasiado altos ( $\geq 600\text{mg/dl}$ ). (\*) Indica que durante las reinyecciones con STZ se midió la glucemia en el 5º día del protocolo, sólo aquella ratona que presentó una glucemia por debajo de  $200\text{mg/dl}$  fue reinyectada ese 5º día, el resto superaban los  $200\text{mg/dl}$  y sólo fueron reinyectadas 4 días.

### **3. Evaluación de la efectividad de los protocolos de inducción de diabetes en función del tiempo de desarrollo de la diabetes, de la obtención de TM y del número de camadas obtenidas en cada fondo genético.**

a) Efectividad de los protocolos para la inducción de la diabetes (tabla 2): nuestros resultados muestran que los únicos protocolos que no indujeron la diabetes de manera efectiva fueron el protocolo de inducción mediante una única inyección a dosis alta (protocolo C) y el protocolo de inducción mediante inyecciones de glucosa (protocolo Di). El protocolo C, a pesar de que produjo una rápida subida de la glucemia, provocó unos valores muy elevados causando la muerte de las hembras. Por otro lado, el protocolo Di sólo resultó ser efectivo en el caso de la cepa SWV, en la cual se consiguió elevar la glucemia hasta el momento de la extracción de los embriones cuando se combinó el protocolo Di con inyecciones de STZ (protocolo Dii). En este último caso, en base a los resultados mostrados por esta cepa con los otros protocolos probados, es probable que no hubiera sido necesaria la inyección de glucosa para elevar la glucemia, puesto que es posible que se hubieran obtenido valores de glucemia altos solamente con las inyecciones de STZ.

En conclusión, las cepas más susceptibles al desarrollo de la diabetes con los distintos protocolos utilizados fueron: CBA/Ca $\geq$ CD1 $\geq$ SWV $\geq$ LMBc>C57BL/6>C3H. A pesar de que en el caso de la cepa C57BL/6 hubiera un porcentaje de hembras que no desarrollaron la diabetes tras el tratamiento, consideramos que su respuesta fue más efectiva que la observada en la

cepa C3H ya que el porcentaje de hembras C57BL/6 que desarrollaron la diabetes (72%) fue mayor que en el caso de las C3H (37,5%), las cuales requirieron ser reinyectadas para desarrollar hiperglucemia. Es posible que las hembras de la cepa C3H respondan de manera más efectiva utilizando una dosis de STZ mayor y aumentando el número de días de inyección.

Cepa	Protocolo A		Protocolo B			Protocolo C	Protocolo D	
	A.i	A.ii	B.i	B.ii	B.iii		D.i	D.ii
C57BL/6	√√	√√	---	---	---	---	---	X
CBA/Ca	√√	√√	---	---	---	---	---	X
CD1	√√	√√	---	√√	√√	---	X	---
SWV	√√	---	---	---	---	X	---	√√
C3H	√	---	---	---	---	---	---	---
LMBc	√√	---	---	---	---	---	---	---

**Tabla 2. Utilidad de los protocolos utilizados en base a la capacidad de inducción de la diabetes en cada una de las cepas testadas.** (√√) indica que el protocolo ha funcionado correctamente y se han obtenido hembras diabéticas. (X) Indica que el protocolo no ha permitido la obtención de hembras diabéticas. (√) Indica que se requirió una reinyección de las hembras para conseguir que fueran diabéticas.

b) Número de TM observados tras el protocolo de inducción (tabla 3): nuestros resultados muestran que el protocolo más efectivo en casi todas las cepas utilizadas fue el Ai, ya que el resto de protocolos provocaron un gran porcentaje de infertilidad en las cepas testadas.

Cepa	Protocolo A		Protocolo C
	Ai	Aii	
C57BL/6	√	X	---
CBA/Ca	√	√	---
CD1	√	X	---
SWV	√√	---	X
C3H	√√	---	---
LMBc	√√	---	---

**Tabla 3. Utilidad de los protocolos utilizados para la obtención de TM en cada una de las cepas testadas.** (√√) indica que el protocolo ha funcionado correctamente y se han obtenido hembras diabéticas con TM. (X) Indica que el protocolo no ha permitido la obtención de TM. (√) Indica que hubo hembras que no presentaron TM, por lo que la eficacia no fue del 100%.

c) Número de camadas obtenidas tras la aplicación de los diferentes protocolos de inducción de la diabetes (tabla 4): el protocolo que mejores resultados mostró fue el Ai en casi todas las cepas en las que se utilizó.

Cepa	Protocolo A		Protocolo B			Protocolo C	Protocolo D	
	A.i	A.ii	B.i	B.ii	B.iii		D.i	D.ii
C57BL/6	√	X	---	---	---	---	---	X
CBA/Ca	X	√	---	---	---	---	---	X
CD1	√	X	---	X	X	---	X	---
SWV	√√	---	---	---	---	X	---	√√
C3H	√√	---	---	---	---	---	---	---
LMBc	√√	---	---	---	---	---	---	---

**Tabla 4. Utilidad de los protocolos utilizados en base al número de camadas obtenidas de hembras diabéticas.** (√√) indica que el protocolo ha funcionado correctamente y se han obtenido hembras diabéticas con camadas. (X) Indica que el protocolo no ha permitido la obtención de camadas. (√) Indica que hubo hembras que no presentaron camada, por lo que la eficacia del protocolo no fue del 100%.

Con todo esto se puede concluir que, para estudios del efecto de la diabetes en el desarrollo de embriopatías en modelo animal de ratón la cepa más adecuada es la SWV, ya que responde bien a los protocolos de inducción. Del mismo modo, el protocolo de inducción que ofrece mejores resultados en la mayoría de las cepas estudiadas es el de inducción mediante múltiples inyecciones de STZ a dosis baja (40-50mg/kg).

## Discusión

La inducción de diabetes mediante inyecciones de STZ en modelos animales lleva empleándose en el campo de la investigación desde hace más de 40 años. Esta técnica ofrece una opción muy rentable y rápida para el desarrollo de la diabetes. A pesar de ello, la bibliografía disponible hasta la fecha sobre esta técnica es bastante variable en cuanto al uso de diferentes cepas de roedores, así como, en ocasiones, resulta incompleta en la descripción de los procedimientos empleados. La respuesta a la STZ puede variar en función del género, de la cepa animal e, incluso, del laboratorio de procedencia de los animales (Graham et al., 2011). Esto hace necesario estipular el protocolo más adecuado para cada cepa antes de realizar cualquier experimento. Además se ha de tratar de reducir el número de animales utilizados para cada experimento, así como tratar de garantizar el bienestar animal.

Nuestro objetivo consiste en el estudio del efecto de la diabetes gestacional en el desarrollo de embriopatías. Para ello necesitamos una cepa que desarrolle hiperglucemia con facilidad pero que continúe siendo fértil. En este aspecto la bibliografía existente sobre la inducción de diabetes y la infertilidad que esta causa no es muy extensa y, generalmente, hace referencia a estudios realizados en ratas macho (Khaki et al., 2010; Navarro-Casado et al., 2010).

Para determinar que cepa de ratón y que protocolo de inducción eran los más efectivos para el desarrollo de nuestro objetivo, decidimos establecer las siguientes categorías en función de los resultados: inducción más efectiva, mayor número de T.M obtenidos tras el tratamiento y mayor número de camadas obtenidas tras el tratamiento. Nuestros resultados reflejaron que el protocolo más efectivo en la mayoría de las cepas fue el de inducción mediante múltiples inyecciones de STZ a concentración de 40mg/kg (protocolo Ai), por el contrario los protocolos que requieren las inyecciones múltiples de glucosa sólo resultaron efectivos cuando se combinaron con inyecciones de STZ en la cepa SWV. El protocolo de inducción mediante una única inyección de STZ a dosis alta (protocolo C) había sido descrito en la bibliografía previamente y se habían obtenido buenos resultados en ratón, pudiéndose obtener embriones de las hembras inducidas (Oyama et al., 2009) aunque no determina el número de ratonas inyectadas en total. En este protocolo solamente fue testado en la cepa SWV, y es posible que la predisposición de esta cepa a desarrollar diabetes nefrogénica insípida provocara una respuesta en ellas más exacerbada de lo esperado.

La obtención de TM indica la existencia de cópula y suelen ser señal de que la hembra está embarazada. El TM se forma por la combinación del semen con secreciones producidas por la

hembra. En nuestro estudio hemos observado una disminución en la obtención de TM en las hembras diabéticas, especialmente con el protocolo de inducción de la diabetes mediante inyecciones de STZ a dosis de 80mg/kg (protocolo Aii) cuando se utilizó en hembras con fondo genético C57BL/6 y CD1. Además, en las hembras con fondo genético CBA/Ca también se obtuvo un alto porcentaje de hembras que no presentaron TM tras el cruce con los machos. Este hecho podría ser debido a que los elevados valores de glucemia provocan cambios en el ciclo menstrual de las hembras que imposibilitarían la formación del TM, o incluso reducirían el ratio de cópula con el macho. Por otro lado se observó una alta tasa de hembras que no presentaron embriones aun habiendo presentado TM. Esto podría ser debido a que los elevados valores de glucemia provocan la pérdida temprana de los embriones ((Cundy et al., 2007; Wahabi et al., 2012) y revisado por (Castori, 2013)).

La gran variabilidad en la respuesta observada entre las distintas cepas a un mismo protocolo de inducción de diabetes pone de manifiesto la importancia de la realización de estudios piloto para determinar las condiciones óptimas para desarrollar cada experimento.

## **Objetivo 2: Estudio de la interacción de la diabetes y las alteraciones del metabolismo del ácido fólico durante el desarrollo embrionario.**

### **Introducción**

La diabetes durante el embarazo es un factor de riesgo para el desarrollo de malformaciones congénitas como los defectos del tubo neural (DTNs) o los defectos del sistema cardiovascular (Mitanchez et al., 2014; Zabihi and Loeken, 2010). La hiperglucemia materna crea un entorno desfavorable para el embrión en desarrollo ya que, entre otras cosas, aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno que provocan estrés oxidativo y altera vías de señalización cruciales para el desarrollo. Todo esto puede afectar a órganos y sistemas fetales en desarrollo y dar lugar a patologías postnatales (Pavlinkova et al., 2009; Salbaum and Kappen, 2012; Schwartz and Teramo, 2000; Torchinsky and Toder, 2007).

Del mismo modo, tanto en humanos como en modelos animales, se ha observado que las alteraciones del metabolismo del ácido fólico están relacionadas con el aumento de embriopatías. Se ha comprobado que la suplementación periconcepcional con ácido fólico puede reducir hasta en un 70% la aparición de DTN incluso aquellos provocados por la diabetes materna (Oyama et al., 2009; Wentzel et al., 2005). Por otro lado, estudios realizados sobre la afectación de la expresión genética por la diabetes gestacional han demostrado que una de las vías afectadas es la del ácido fólico (Pavlinkova et al., 2009; Sato et al., 2008; Wentzel et al., 2005).

Para analizar en detalle el papel del metabolismo del ácido fólico en las embriopatías diabéticas, se han analizado *in vitro* e *in vivo* las consecuencias de la combinación de estos dos factores de riesgo en el desarrollo embrionario.

## Resultados

### 1. Efecto de las altas concentraciones de glucosa y homocisteína en el desarrollo de embriones de ratón *in vitro*

Una de las consecuencias del malfuncionamiento del metabolismo del folato es el aumento de la concentración de homocisteína ((Jakubowski et al., 2009) y revisado por (Hague, 2003; Taparia et al., 2007)). Para simular una gestación de una mujer diabética y con alteraciones del metabolismo del ácido fólico, los embriones fueron expuestos *in vitro* a elevados niveles de glucosa y homocisteína. El cultivo de embriones es una técnica muy útil ya que permite centrarse en una ventana concreta del desarrollo embrionario, además de exponer a los embriones a diferentes condiciones perfectamente controladas, pudiendo así evaluar el efecto de las mismas.

Se utilizaron embriones en edad gestacional correspondiente a E8.5. En este momento el embrión se encuentra en un estadio intermedio del proceso de cierre del tubo neural. En el extremo rostral del embrión el neuroporo anterior se está cerrando, los pliegues neurales craneales se encuentran elevados en vías de fusión y, a nivel caudal, el neuroporo posterior muestra una morfología de cierre correspondiente al modo 1 (con forma de V). A su vez, se está produciendo el giro del embrión sobre sí mismo. El hecho de que aún no se haya cerrado por completo el tubo neural a esta edad, hace que sea el momento idóneo para analizar el efecto de la glucosa y la homocisteína sobre el cierre tanto a nivel craneal como del neuroporo posterior.

En un estudio piloto se probaron tres concentraciones de glucosa en cultivo (10, 20 y 30mM); la concentración de 30mM resultó ser embriotóxica ya que se produjo la pérdida del latido cardíaco y de la circulación del saco vitelino, mientras que a concentraciones de 10mM y 20mM los embriones fueron viables. Por ello, para este estudio, se utilizó la mayor concentración de glucosa a la que los embriones eran viables (20mM). La concentración de homocisteína se seleccionó en base al artículo publicado por Greene *et.al.*, siendo la de 0.5mM la concentración más alta utilizada que no presentaba efectos embriotóxicos pero a la que si se observaban defectos en el desarrollo embrionario. Así los embriones fueron divididos en cuatro grupos de estudio según el tratamiento empleado durante el cultivo (Tabla 5):

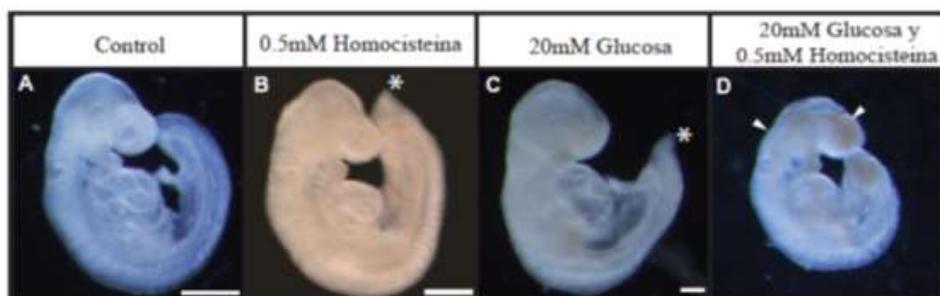
- a) Condiciones control.
- b) 20mM de glucosa.

- c) 0.5mM de homocisteína.
- d) Combinación de 20mM de glucosa y 0.5mM de homocisteína.

Tras 24h de cultivo sólo aquellos embriones que presentaban circulación en el saco embrionario y latido cardíaco fueron analizados.

### 1.1 Estudio morfológico de los embriones cultivados

Lo primero que se realizó tras el cultivo fue un análisis macroscópico de los embriones. En este estudio se analizó el cierre del tubo neural craneal, la presencia de malformaciones en la zona caudal del embrión y defectos en los somitas. Las malformaciones embrionarias en la zona caudal pueden ser indicativas de posibles defectos del tubo neural espinal. Las anomalías de los somitas, las cuales se han descrito que aparecen en presencia de homocisteína (Greene et al., 2003), pueden relacionarse con malformaciones a nivel del mesodermo paraxial. Durante la formación del tubo neural este recibe señales de los tejidos adyacentes, entre los que se encuentra el mesodermo paraxial, por lo que alteraciones a este nivel pueden afectar al desarrollo del tubo neural (Begemann et al., 2001; Schoenwolf et al., 2014). Es importante destacar que los somitas son indicadores de la edad embrionaria (Michos et al., 2004), por lo que los defectos a este nivel pueden causar dificultades a la hora de identificar correctamente la edad de los embriones. Una de las patologías más comunes observadas, tanto por causa de la diabetes como por causa de malfuncionamiento del ciclo del ácido fólico, son los defectos cardíacos (Ornoy et al., 2015; Xuan et al., 2014; Zhu et al., 2007). En los embriones cultivados no han podido ser descritos ya que en estadios tan tempranos no se puede saber si se trata de un defecto que dará lugar a una patología o si es causa del estadio de desarrollo del embrión.



**Figura 15. Estudio macroscópico de los embriones expuestos a las diferentes condiciones de cultivo.** Embriones procedentes del cultivo en condiciones control (A), en presencia de 0.5mM de homocisteína (B), 20mM de glucosa (C) o en presencia de glucosa y homocisteína (D).

	Nº embriones totales	Protuberancia en la zona caudal	Defectos en los somitas	Embriones con nº somitas ≥19	NTD craneal <sup>†</sup>
Control	39	0/39 (0%)	0/39 (0%)	23/39	0/23(0%)
Homocisteína 0.5mM	25	5/25(20%)*	11/25 (44%)*	18/25	0/18 (0%)
Glucosa 20mM	34	6/34 (17.6%)*	2/34 (5.9%)**	17/34	3/17(17.6%)
Glucosa 20mM y Homocisteína 0.5mM	40	6/40 (15%)*	9/40 (22.5%)*	21/40	3/21 (14.3%)

**Tabla 5. Defectos embrionarios observados en el análisis macroscópico en cada uno de los grupos estudiados.** (†) Se consideró DTN craneal en aquellos embriones que tenían la cabeza abierta con un número de somitas  $\geq 19$ . (\*) Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se compara con el grupo control (prueba de diferencia de proporciones). (\*\*) Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se compara con los grupos de homocisteína y glucosa+homocisteína (prueba de diferencia de proporciones, Epidat 4.2).

- a) **Grupo control:** Como era de esperar estos embriones no presentaron malformaciones significativas.
- Tubo neural: Estos embriones presentaban el cierre del tubo neural a nivel craneal completo a partir de 19 somitas, de forma que se estableció este momento como referencia para comparar con los embriones pertenecientes a los otros grupos de estudio (figura 15A).
  - Formación de la zona caudal: En el grupo control los embriones presentaban esta zona bien desarrollada, con una morfología alargada y que comienza a estrecharse en la zona más caudal en torno al neuroporo posterior (figura 15A). Esto coincide con lo observado en embriones no cultivados en el mismo estadio de desarrollo.
  - Somitas: Los somitas de los embriones de este grupo estaban bien definidos y presentaban una morfología similar a la que presentan embriones en el mismo estadio no cultivados, siendo fácil reconocerlos y contabilizarlos. Además el número de somitas que presentaban, tomándose como referencia el número de somitas que presentaban

los embriones no cultivados, se correspondía con lo esperado atendiendo al tiempo de cultivo.

**b) Grupo 0.5mM homocisteína:**

- Defectos del tubo neural: En este grupo no se observaron defectos del tubo neural a nivel craneal.
- Malformación de la zona caudal: un 20% de los embriones presentaron una protuberancia en la zona más caudal del embrión (figura 15B), lo cual resultó estadísticamente significativo al compararlo con lo observado en el grupo control ( $p=0.015$ , tabla 5). Además, alguno de los embriones analizados presentaron la zona caudal más corta y ancha en comparación con los embriones control, lo que podría indicar una afectación del mecanismo de elongación del embrión. Debido a la variabilidad y dificultad para contabilizar el número de somitas, no fue posible realizar un análisis estadístico de estos datos.
- Defectos de los somitas: el 44% de los embriones obtenidos mostraban defectos en los somitas caudales haciendo indistinguibles los últimos 2-3 somitas. En comparación con lo observado en el grupo control este aumento de malformaciones a nivel de los somitas fue estadísticamente significativo ( $p=0.000$ , tabla 5).

**c) Grupo 20mM glucosa:** estos embriones mostraron diversos defectos entre los que destacan:

- Defectos del tubo neural: El 17.6% de los embriones presentaron el tubo neural craneal abierto en estadios a los que los embriones del grupo control habían completado el cierre ( $\geq 19$  somitas; Tabla 5).
- Malformación de la zona caudal: En este grupo el 17.6% de los embriones presentó una protuberancia en la zona más caudal del PNP (figura 15C). En comparación con el grupo control resultó ser una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0208$ , tabla 5). Además se observó una alteración en la morfología de la zona caudal, ya que algunos embriones presentaban la zona caudal con una apariencia más ancha y corta que lo observado en los embriones del grupo control (comparar figuras 15A y C). Esto podría ser indicativo de una afectación del proceso de elongación embrionario. Así como se observó en los embriones expuestos a homocisteína, la alta variabilidad del número de somitas impidió realizar un análisis estadístico de los datos.
- Defectos en los somitas: El 5.9% de los embriones presentaron anomalías en los somitas más caudales que dificultaban su identificación y conteo. En comparación

con el grupo control no se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.4139$ , tabla 5).

**d) Grupo 20mM de glucosa y 0.5mM de homocisteína:**

- Defectos del tubo neural: Los embriones expuestos a la combinación de factores presentaron en un 14.3% de los casos el tubo neural a nivel craneal abierto. Uno de ellos mostraba una alteración más acusada del cierre del tubo neural a nivel craneal, presentando los pliegues neurales deformados y plegados uno sobre el otro (figura 15D). No se observaron diferencias significativas en comparación con el grupo control ni con el grupo de embriones expuestos a glucosa ( $p=0.200$  y  $p=0.8691$ , respectivamente. Tabla 5).
- Malformación de la zona caudal: Así como se observó en los embriones expuestos a glucosa y homocisteína por separado, los embriones de este grupo mostraron en un 15% presencia de una protuberancia en la zona caudal, lo cual resultó ser estadísticamente significativo en comparación con el grupo control ( $p=0.0365$ ) pero no en comparación con los grupos de embriones expuestos a glucosa y a homocisteína por separado ( $p= 0.8415$  y  $p= 0.9822$  respectivamente, tabla 5). De nuevo se observó que algunos embriones presentaban una zona caudal más corta y ancha en comparación con los embriones del grupo control (figura 15D).
- Defectos en los somitas: El 22.5% de los embriones analizados presentó defectos en los somitas caudales, siendo estos más pequeños y difíciles de contabilizar. En comparación con el grupo control se observó un aumento estadísticamente significativo ( $p=0.0052$ ), mientras que en comparación con el grupo de embriones expuestos a glucosa y en el grupo de embriones expuestos a homocisteína, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.094$  y  $p=0.1209$  respectivamente, tabla 5).

Además de las anomalías descritas, se observaron también otros defectos como los defectos oculares en los embriones expuestos a glucosa o a la combinación de glucosa y homocisteína. El 27.3% de los embriones expuestos a glucosa mostraron defectos oculares, incluyendo retraso en el desarrollo de una de las vesículas ópticas en comparación con la otra o falta de una de ellas (anoftalmia). En el caso de los embriones expuestos a glucosa y homocisteína se observaron defectos oculares en un 17.5% de los casos, correspondiendo todos ellos a un retraso del desarrollo de una de las vesículas en comparación con la otra. Las diferencias observadas entre estos dos grupos no resultaron ser estadísticamente significativas, por lo que

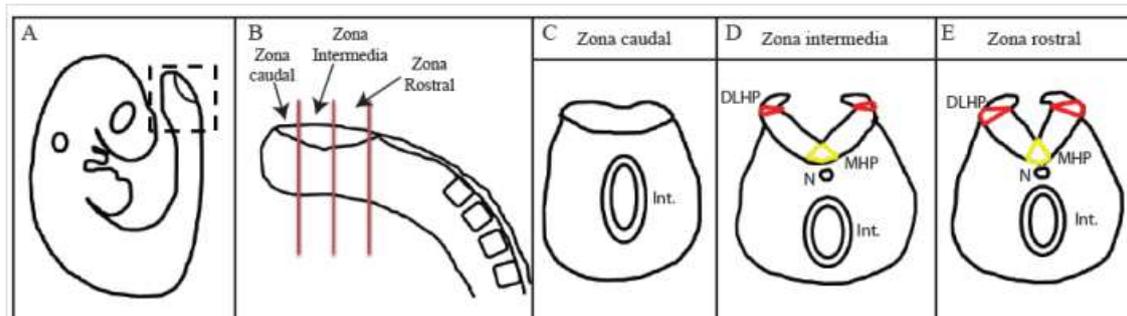
los defectos oculares observados son debidos a la elevada concentración de glucosa. Los defectos oculares provocados por la elevada concentración de glucosa serán tratados en detalle en el capítulo 3 de la presente tesis.

En esta primera parte del estudio, los resultados obtenidos en el análisis macroscópico muestran un aumento de las embriopatías en los embriones expuestos a glucosa y a homocisteína por separado, mientras que la combinación de ambos factores no parece incrementar estos índices de embriopatías. Esto puede deberse a que el efecto producido por las elevadas concentraciones de glucosa y homocisteína por separado es tal que no puede verse aumentado en presencia de ambos factores de manera simultánea durante el cultivo.

### 1.2 Estudio del neuroporo posterior

En el análisis morfológico de los embriones se observó que uno de los órganos más afectados era la zona caudal del embrión. Se sabe que la diabetes durante el embarazo o el mal funcionamiento del ciclo del ácido fólico pueden dar lugar a defectos del tubo neural tales como la espina bífida. Así, para poder ver el efecto de las diversas condiciones de cultivo sobre el cierre del PNP en comparación con el grupo control, se analizó en detalle el PNP en diferentes momentos del desarrollo, incluyendo su tamaño, histología y expresión genética.

Para facilitar el seguimiento de los estudios realizados durante el cierre del neuroporo posterior, en la siguiente figura se puede observar la localización de la zona de interés así como las secciones transversales obtenidas en función de la zona del PNP seccionada que van a ser tenidas en cuenta a la hora de describir los resultados.

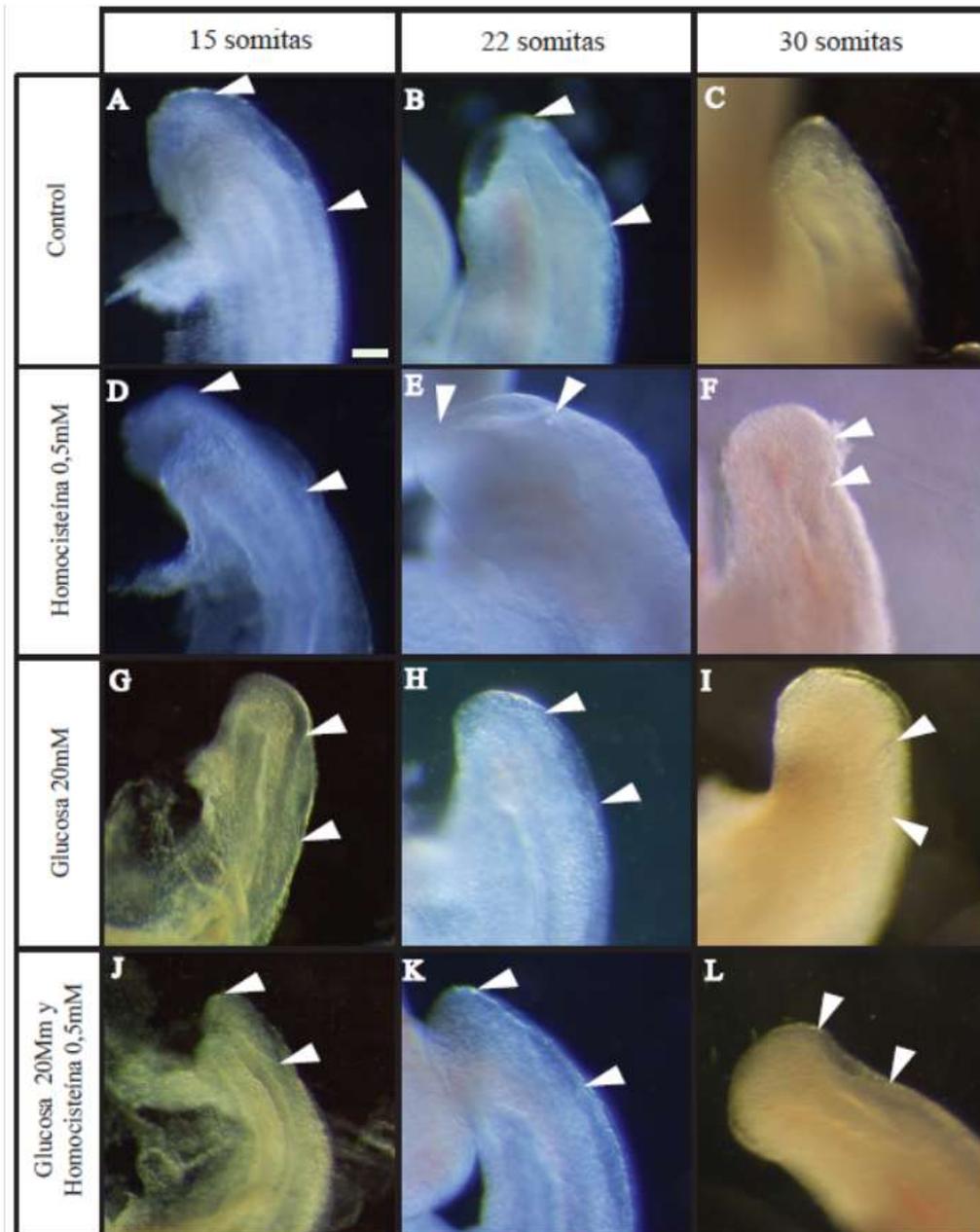


**Figura 16. Esquema de la zona del neuroporo posterior y de las secciones transversales obtenidas.** Representación de un embrión E9'5 donde se observa la localización del PNP (recuadro línea discontinua (A)). Representación de las zonas caudal, intermedia y rostral en el PNP (B). Secciones transversales obtenidas de las zonas caudal (C), intermedia (D) y rostral (E) del neuroporo posterior. Principales zonas indicadas: Intestino (Int), Notocorda (N), punto de pliegue dorsal (DLHP, zona roja) y punto de pliegue medio (MHP, zona amarilla).

### 1.2.1 Estudio del cierre del neuroporo posterior

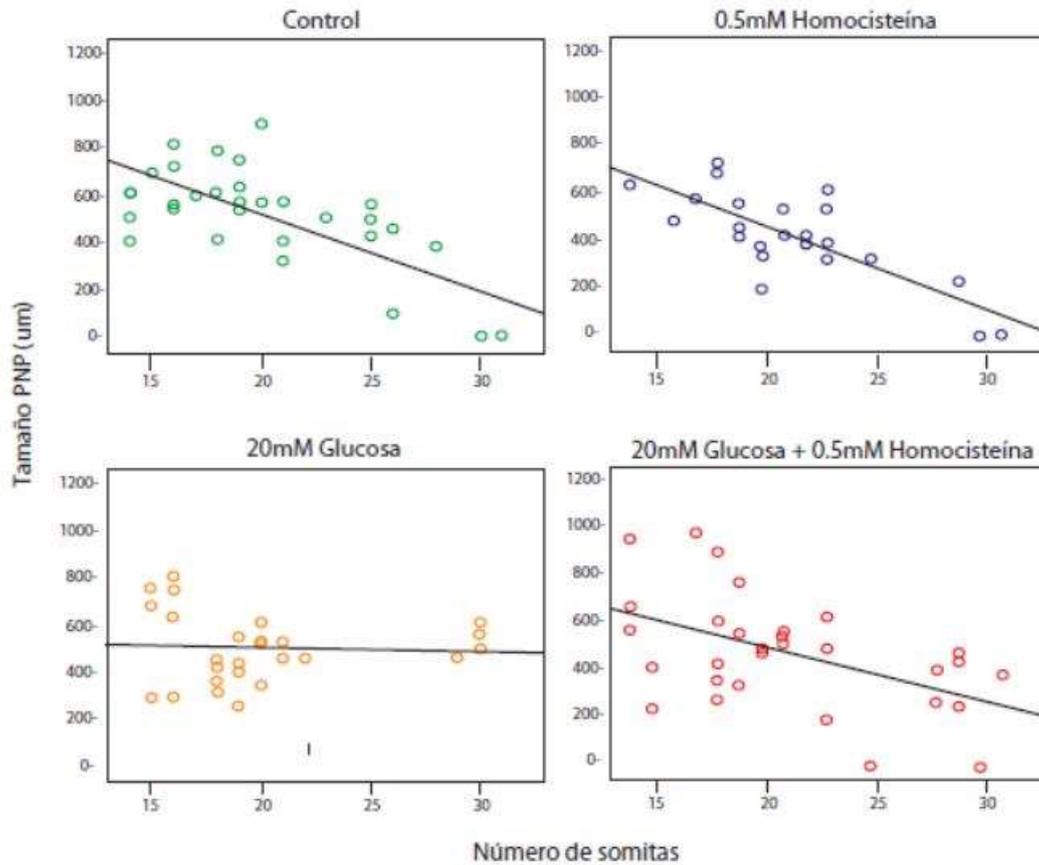
Al inicio de la neurulación el PNP está abierto y presenta un tamaño que va disminuyendo a medida que avanza este proceso hasta quedar cerrado, lo cual marca el final de la neurulación primaria (Greene and Copp, 2009; Sadler, 2005). Para analizar el efecto de las diferentes condiciones de cultivo sobre el cierre del neuroporo posterior, se tomaron medidas del tamaño del PNP en función del número de somitas (Tabla 2).

Tras medir el neuroporo posterior, en los embriones del grupo control, se observó una clara tendencia al cierre del mismo conforme aumentaba el número de somitas. A partir de los 29 somitas el PNP estaba cerrado (Figura 17A-C). Los embriones expuestos a 0.5mM de homocisteína mostraron una clara tendencia al cierre del PNP aunque con algo más de retraso cuando se comparaban con los embriones del grupo control (figura 17D-F). Los embriones expuestos a 20mM de glucosa además de no mostrar la misma tendencia a cerrar el PNP que los embriones del grupo control o expuestos a homocisteína, presentaron un PNP aún más grande que a edades más tempranas, lo cual parece indicar que el proceso de cierre se detiene y, conforme la parte caudal del embrión continúa creciendo, el PNP aumenta de tamaño (figura 17G-I). Por último, los embriones expuestos a 20mM de glucosa y 0.5 de homocisteína también parecen tener una tendencia al cierre del PNP conforme aumenta el número de somitas e incluso algunos de estos embriones presentan PNP de menor tamaño comparado con los embriones control cuando se compara el mismo grupo de somitas (figura 17J-L), a pesar de ello se observaron embriones procedentes de este grupo con el PNP abierto con más de 29 somitas, momento en el que el grupo control presenta el PNP cerrado, lo que indica un efecto de la combinación de las altas concentraciones de glucosa y homocisteína sobre el momento del cierre del PNP. De todos modos los embriones presentan una alta variabilidad en las medidas individuales del PNP que se hace patente cuando se representan de forma gráfica (figura 18).



**Figura 17. Efecto de las distintas condiciones de cultivo sobre el cierre del PNP.**

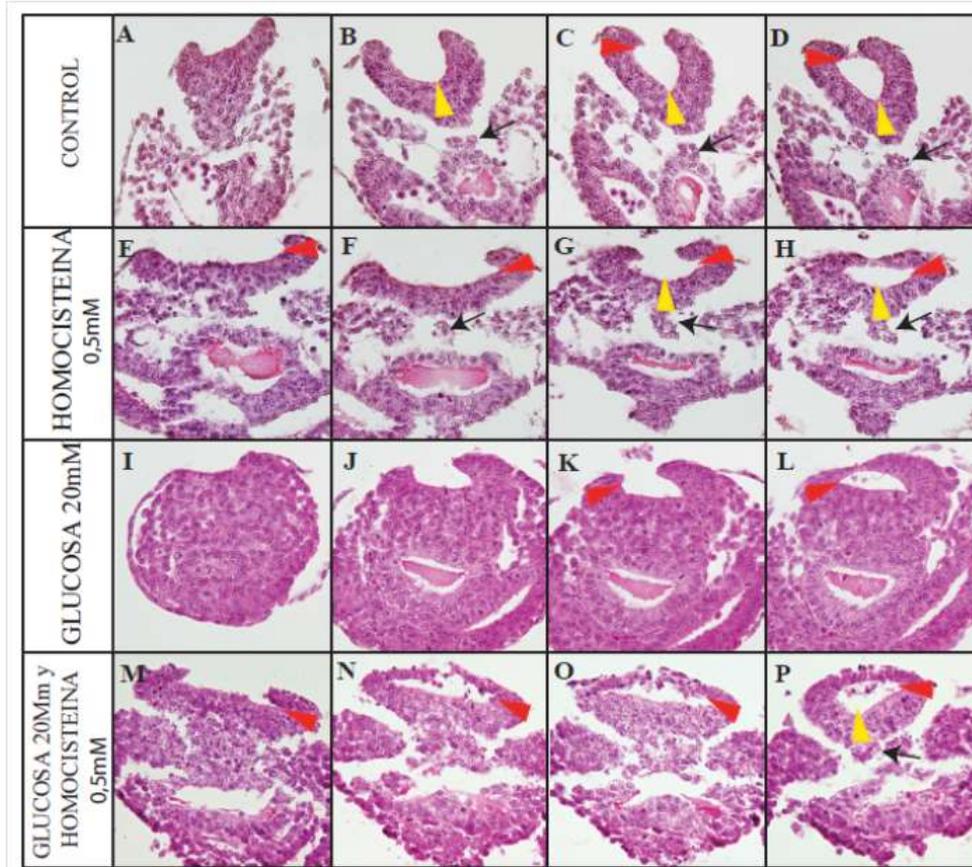
Detalle del cierre del PNP en función del número de somitas (15 somitas A, D, G y J; 22 somitas B, E, H y K; 30 somitas C, F, I y L) y de las condiciones de cultivo de cada embrión (control A-C; Homocisteína 0'5mM D-F; Glucosa 20mM G-I y Glucosa 20mM+Homocisteína J-L). Cabezas de flecha blanca indican zona abierta del PNP. Escala en A: 100µm, aplicable a B-L.



**Figura 18. Representación gráfica de las medidas del PNP en función del número de somitas.** Diagrama de dispersión en base a las medidas del PNP tomadas a cada embrión según las condiciones de cultivo y el número de somitas. Pueden observarse las líneas de ajuste correspondientes a cada condición de cultivo.  $R^2$  lineal control: 0.516;  $R^2$  lineal Homocisteína: 0.6;  $R^2$  lineal glucosa: 0.004;  $R^2$  lineal glucosa+homocisteína: 0.254.

### 1.2.2 Estudio de la morfología del neuroporo posterior durante el cierre

A medida que la neurulación avanza a lo largo de la región espinal del embrión, se pueden identificar 3 modos de cierre del tubo neural en función de la localización de los puntos de pliegue (*Hinge points*, figura 6). De esta forma en el modo de cierre 1 el punto de pliegue se da en solo en la zona media del neuroepitelio (MHP). En el modo 2 se mantiene el punto de pliegue MHP y aparecen dos nuevos puntos en cada pliegue neural en la zona dorsal (DLHPs). Por último, en el modo de cierre 3 solo quedan los DLHP (Shum and Copp, 1996; Ybot-Gonzalez et al., 2002). Para saber si las condiciones de estudio afectaban a la morfología del neuroporo posterior se realizó un análisis histológico de los embriones cultivados, de forma que pudiéramos centrarnos en el paso del modo de cierre 1 al modo 2.



**Figura 19. Afectación de la morfología del PNP durante el cierre en las diferentes condiciones de cultivo.** Secciones transversales del PNP de embriones de entre 14 y 16 somitas expuestos a diferentes condiciones de cultivo (control (A-D); Homocisteína 0.5mM (E-H); Glucosa 20mM (I-L) y Glucosa + homocisteína (M-P)). Paneles A, E, I y M corresponden a las secciones más caudales del embrión. Paneles B, C, F, J, K, N y O corresponden con secciones intermedias del PNP. Paneles D, G, H, L y P corresponden con la zona rostral del PNP. Estructuras indicadas: flecha negra indica presencia de notocorda (n). Cabezas de flecha roja indican DLHP. Cabeza flecha amarilla indican MHP.

El análisis histológico del PNP en los diferentes grupos de estudio reflejó lo siguiente:

- Grupo control: En las secciones de la zona más caudal, que se encuentra en un estadio de desarrollo más temprano que la zona rostral, no se observan puntos de pliegue y la notocorda no se reconoce (figura 19A). En las secciones histológicas de la zona intermedia, no se observan los puntos de pliegue laterales (DLHP), pero si puede distinguirse el punto de pliegue medio (MHP), lo que confiere al PNP una forma de "V" (figura 19B). En este punto podía comenzar a distinguirse la notocorda bajo el MHP. En las secciones histológicas más rostrales, que corresponden con la zona más

avanzada en el desarrollo, se podían reconocer tanto el punto de pliegue medio como los puntos de pliegue laterales que confieren al PNP la forma de diamante característica del modo 2 (figuras 19C y D). Esto indica que la transición del modo 1 al modo 2 se ha producido de forma correcta durante el cultivo embrionario en condiciones control. Además, la notocorda podía distinguirse bajo el MHP en estas secciones con una estructura más definida acorde al grado de desarrollo de la zona más rostral del PNP (figura 19D).

- Grupo expuesto a 0.5mM de Homocisteína: Estos embriones mostraron una morfología muy similar a la descrita en los embriones control. En las secciones más caudales no se observaban puntos de pliegue reconocibles (figura 19E), al igual que no se distinguía claramente la notocorda debido a que esta zona se encuentra en un estadio de desarrollo más temprano que las zona rostral del PNP. En las secciones correspondientes a la zona intermedia del PNP podían observarse los puntos de pliegue laterales así como la presencia de la notocorda bajo el MHP (figura 19F). Por último, en las secciones más rostrales del PNP se podía observar la forma de diamante característica del modo 2 con presencia de MHP, DLHP así como de la notocorda bajo el MHP (figuras 19G y H).
  
- Grupo expuesto a 20mM de glucosa: Estos embriones mostraron una morfología alterada en comparación con los embriones control. En las secciones histológicas más caudales no se reconocían puntos de pliegue o presencia de notocorda (figura 19I), según se avanzaba a una zona intermedia del PNP sólo comenzaban a distinguirse los puntos de pliegue laterales (figuras 19J-L), por lo que el cierre del PNP en estos embriones se asemejaba al modo 3 característico de estadios más avanzados en el desarrollo.
  
- Grupo expuesto a 20mM de glucosa y 0.5mM de homocisteína: En comparación con lo observado en los embriones del grupo control, el PNP de estos embriones mostraba una desorganización celular que se hacía patente por la presencia de células desprendiéndose de los pliegues neurales e invadiendo el lumen del tubo, principalmente en las secciones más rostrales (figura 19O). Al igual que en los embriones expuestos a glucosa, en las secciones histológicas más caudales no se observó presencia de MHP mientras que si presentaban DLHPs característicos del

modo de cierre 3 (figura 19M y N). Además, en estas secciones no podía distinguirse la presencia de notocorda.

Estos resultados muestran una clara afectación de la morfología y el momento de cierre del PNP principalmente en aquellos embriones expuestos a glucosa sola y a glucosa y homocisteína simultáneamente.

### 1.2.3 Estudio de la expresión de Pax3

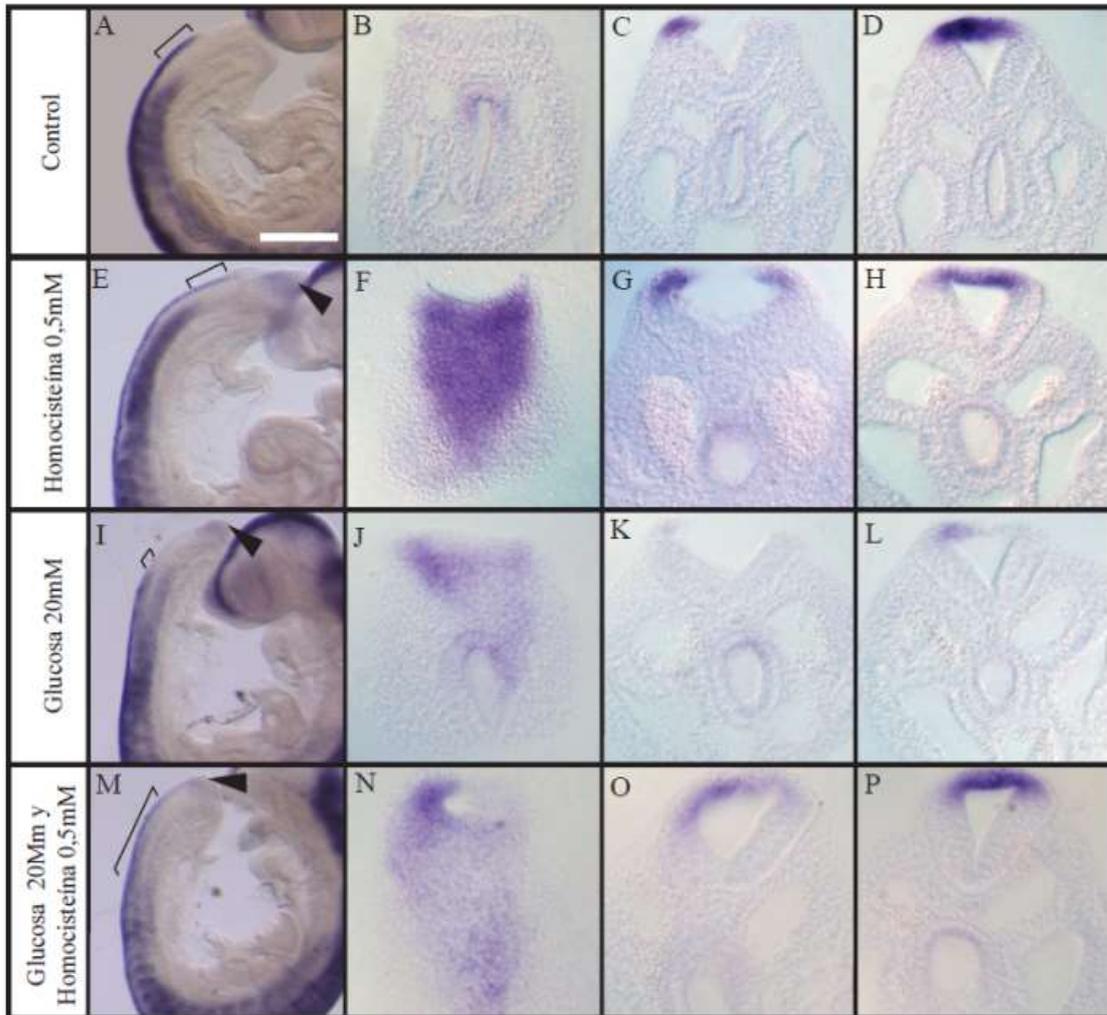
Como se ha comentado previamente, la diabetes gestacional puede provocar un aumento del estrés oxidativo, lo cual se ha observado también cuando hay una elevación de los niveles de homocisteína durante el embarazo (Lappas et al., 2011; Micle et al., 2012; Zhu et al., 2015). El estrés oxidativo causa alteraciones de la expresión de genes como por ejemplo *Pax3*, un gen importante en el desarrollo del tubo neural (Chang et al., 2003b; Fine et al., 1999; Li et al., 2005; Morgan et al., 2008). Para corroborar esta hipótesis en nuestro sistema de cultivo, y para analizar si la interacción entre los altos niveles de glucosa y homocisteína altera en mayor medida la expresión de *Pax3*, decidimos analizar su expresión en embriones de las 4 condiciones de cultivo.

1.2.3.1 Hibridación *in-situ*: Primero se procedió al análisis de los embriones completos y luego se analizaron las secciones de 50µm obtenidas con el vibratomo.

- Grupo control: Los embriones completos mostraron un patrón de expresión de Pax3 muy definido a lo largo del eje antero-posterior (rostro-caudal, figura 20A). La señal procedente del tubo neural terminaba en el inicio del neuroporo posterior, mientras que la señal procedente de los somitas y el intestino terminaba a una altura más rostral que la procedente del tubo neural (corchete en figura 20A). En el análisis de las secciones correspondientes a la parte caudal del embrión se observó presencia de señal en el punto de fusión de los pliegues neurales y en el mesodermo paraxial. La señal de *Pax3* se mantiene en la parte más dorsal de los pliegues neurales (figura 20D) y gradualmente va desapareciendo conforme se avanza en dirección caudal del PNP (figuras 20By C).
- Grupo expuesto a 0.5mM de homocisteína: El análisis de los embriones completos no mostró alteraciones en el patrón de expresión en comparación con el grupo control, pero se observó un dominio de expresión ectópica de *Pax3* en la zona más caudal del embrión

(cabeza de flecha negra en figura 20E). El patrón se confirmó con el análisis de las secciones obtenidas con el vibratomo, en las que se observó la señal concentrada en el punto de fusión de los pliegues así como en las secciones que corresponden con el PNP abierto (figuras 20G y H). Esta señal desaparece de los pliegues neurales según se avanza en dirección caudal. En las secciones más caudales puede observarse de nuevo señal (Figuras 20F) correspondiendo con la señal ectópica observada en la zona más caudal del embrión completo.

- Grupo expuesto a 20mM de glucosa: En el análisis de estos embriones, a diferencia de lo observado en el grupo control, la expresión de *Pax3* en el tubo neural y en los somitas e intestino se prolongaban prácticamente hasta el mismo punto (corchete figura 20I). Al igual que en los embriones expuestos a homocisteína, en la parte más caudal se detectó señal ectópica de *Pax3*, mientras que en los embriones control esta zona no parece presentar señal positiva (cabeza de flecha negra en figura 20I). En el análisis de las secciones confirmaron el patrón observado en el embrión completo, mostrando expresión en las secciones más caudales y en la zona más dorsal del tubo neural de las secciones intermedias y rostrales (figuras 20J-L).
  
- Grupo expuesto a 20mM de glucosa y 0.5mM de homocisteína: En estos embriones la distancia entre la expresión de *Pax3* en el tubo neural y en los somitas e intestino era mayor que la observada en el resto de embriones (corchete figura 20M). Como ya se había observado en los grupos expuestos a glucosa y homocisteína por separado, se detectó expresión ectópica de *Pax3* en la zona más caudal del embrión (figura 20M). El análisis de las secciones confirmó el patrón observado en el embrión completo con expresión de *Pax3* en las secciones más caudales a diferencia del grupo control (figuras 20N-P).



**Figura 20. Efecto de las diferentes condiciones de cultivo sobre la expresión de *Pax3*.** Hibridación *in-situ* de *Pax3* en embriones completos expuestos a las diferentes condiciones de cultivo (A: Control; E: Homocisteína 0.5mM; I: Glucosa 20mM y M: Glucosa + homocisteína) y sus correspondientes secciones transversales obtenidas en el vibratomo (B-D: Control; F-H: Homocisteína 0.5mM; J-L: Glucosa 20mM y N-P: Glucosa + homocisteína). Corchete en figuras A, E, I y M indica separación entre las señales de *Pax3* en el tubo neural y en la zona del intestino. Cabeza de flecha negra indica expresión ectópica de *Pax3* en zona caudal. Barra de escala en A: 200 $\mu$ m aplicable a E, I y M.

1.2.3.2 QPCR: Debido a que la técnica de la hibridación no es cuantitativa, decidimos completar el estudio de la expresión de *Pax3* con una PCR cuantitativa a tiempo real para poder detectar si realmente los embriones expuestos a glucosa y homocisteína presentan alteraciones en la expresión de este gen. Se observó una disminución en la expresión de *Pax3* en los embriones expuestos a glucosa, homocisteína y a glucosa y homocisteína simultáneamente (n=3, media del *fold-change*: 3.4, 4.62 y 3.65 respectivamente) en

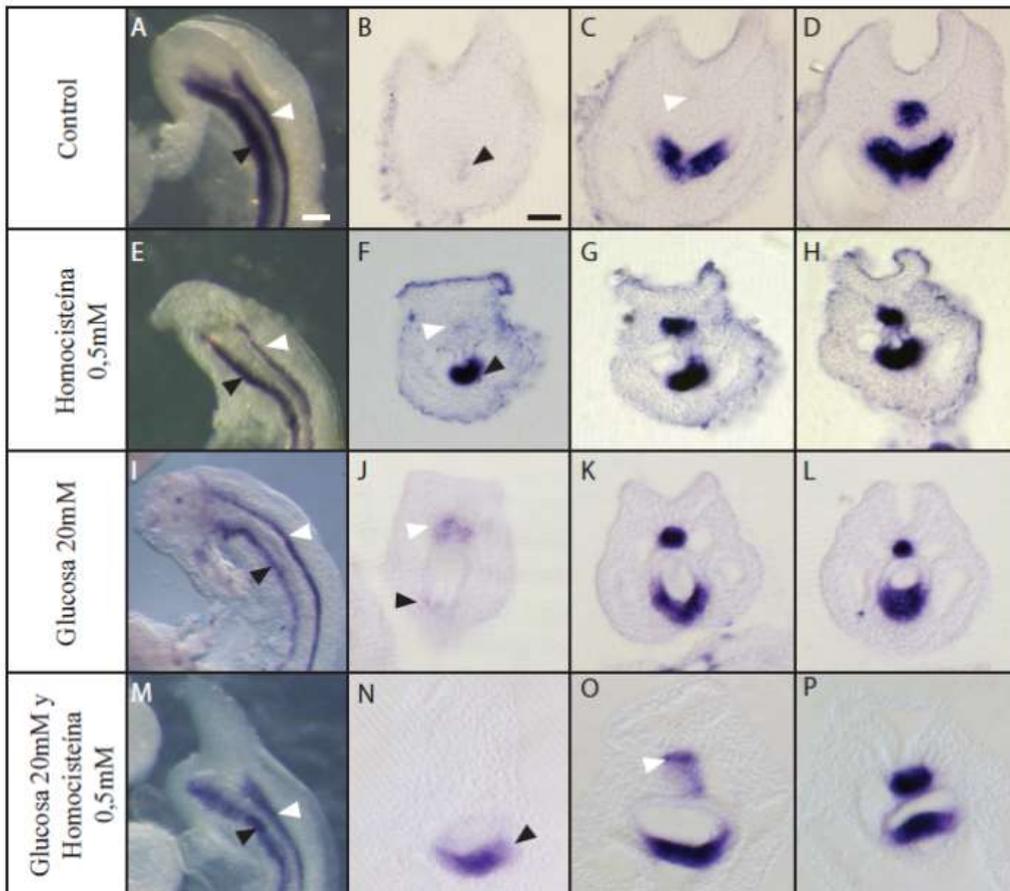
comparación con los embriones del grupo control (*fold-change*: 5.96). Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas pero a pesar de ello se observa una tendencia a disminuir la expresión de *Pax3* en presencia de elevadas concentraciones de glucosa y homocisteína. Es importante recalcar que los embriones sólo estuvieron expuestos a estas condiciones durante un periodo de 18h, por lo que es probable que la disminución de la expresión de *Pax3 in vivo* sea mayor ya que los embriones están expuestos a condiciones de hiperglucemia o hiperhomocisteinemia durante todo el desarrollo.

Estos resultados muestran que la expresión de *Pax3* a nivel caudal se ve afectada por la exposición a elevadas concentraciones de glucosa y homocisteína, tanto de forma separada como simultáneamente. Esto podría ser debido a que en estas condiciones se produce una desorganización a nivel celular durante el crecimiento de la zona caudal del embrión.

**1.2.4 Estudio de la expresión de *Shh*:** Tras observar en el análisis histológico la ausencia de notocorda, así como una pérdida del punto de pliegue medio en los embriones expuestos a condiciones de glucosa y glucosa+homocisteína, decidimos analizar la expresión de *Sonic hedgehog (Shh)*. La formación del pliegue medio (MHP) depende de la secreción de *Shh* por la notocorda, mientras que la inhibición de *Shh* estimula la formación de los pliegues laterales (DLHP) (Ybot-Gonzalez et al., 2002). Además *Shh* embrionario se ha visto afectado por la diabetes materna y el estrés oxidativo (Salbaum and Kappen, 2010; Xiao et al., 2015). La expresión de *Shh* fue analizada en los embriones expuestos a las diferentes condiciones de cultivo para determinar si la afectación de su expresión podía ser la causa de los defectos observados durante el cierre del PNP.

- Grupo control: En estos embriones la expresión de *Shh* fue detectada en el intestino y a lo largo de la notocorda. En la zona más caudal del embrión se prolongaba la señal procedente del intestino mientras que la señal de la notocorda dejaba de observarse (Figura 7A). En el análisis de los cortes obtenidos en el vibratomo del neuroporo posterior de estos embriones se puede observar como las secciones más caudales presentan únicamente señal en el intestino posterior (figura 21B). Conforme se avanza hacia secciones intermedias del neuroporo posterior comienza a aparecer señal en la notocorda (figura 21C) que se mantiene y aumenta en intensidad en las secciones más rostrales (figura 21D). En las secciones intermedias, la señal de *Shh* en el intestino se concentra principalmente en la zona ventral mientras que en las secciones más rostrales el dominio de expresión se expande hacia zonas más dorsales.

- Grupo expuesto a 0.5mM de homocisteína: En estos embriones se observó un patrón de expresión muy similar al observado en los embriones control. La señal de *Shh* fue detectada en la notocorda y en el intestino en desarrollo (figura 21E). En el intestino la señal parecía ser menos intensa que la observada en los embriones control (comparar figuras 21A y E). Este patrón fue confirmado en el análisis de las secciones de vibratomo, donde la expresión de *Shh* en la zona ventral del intestino podía detectarse en las secciones más caudales acompañado de una mínima señal en la notocorda (figura 21F). En secciones intermedias podía observarse una señal más intensa procedente de la notocorda y del intestino que se mantenía en secciones más rostrales (figuras 21G y H).
- Grupo expuesto a 20mM de glucosa: En estos embriones se detectó una disminución en la intensidad de la señal de *Shh* cuando se comparaba con los embriones control, principalmente en el intestino (figura 21I). Una vez seccionado el embrión se observó como la señal de la notocorda comenzaba a detectarse en secciones más caudales, además a esta altura podía observarse una ligera señal en la zona ventral del intestino. En las secciones intermedias podía observarse la señal de *Shh* en la notocorda y en la zona basal del intestino muy definida e intensa, al igual que se observó en las secciones más rostrales.
- Grupo expuesto a 20mM de glucosa y 0.5mM de homocisteína: Al igual que en los embriones expuestos a glucosa, en este grupo se observó una disminución en la intensidad de la señal en la zona caudal, principalmente en la señal correspondiente al intestino en desarrollo. Como puede observarse en la figura 21M, la señal procedente del intestino presenta menor intensidad cuando se compara con los embriones control (figura 21A). En el análisis de las secciones del neuroporo posterior pudo observarse como en las secciones más caudales sólo aparecía señal procedente del intestino, mientras que en secciones intermedias podía observarse la señal procedente de la expresión de *Shh* en la notocorda, aunque esta ocupaba un área mayor que lo observado en los embriones expuestos al resto de condiciones de cultivo (figura 21O). En las secciones más rostrales *Shh* se detectó tanto en la notocorda como en la zona basal del intestino en desarrollo.



**Figura 21. Efecto de las diferentes condiciones de cultivo sobre la expresión de *Shh* durante el cierre del neuroporo posterior.** Detalle de la zona caudal de los embriones expuestos en cultivo a condiciones control (A), presencia de 0.5mM de homocisteína (E), presencia de 20mM de glucosa (I) y presencia de glucosa + homocisteína y sus correspondientes secciones transversales del neuroporo posterior obtenidas en el vibratomo a 50 $\mu$ m (control B-D, expuestos a homocisteína F-H, expuestos a glucosa J-L y expuestos a glucosa + homocisteína N-P). Cabeza de flecha negra indica expresión de *Shh* en el intestino en desarrollo. Cabeza de flecha blanca indica expresión de *Shh* en la notocorda. Barras de escala: A: 100 $\mu$ m aplicable a E, I y M. B: 100 $\mu$ m aplicable a C, D, F-H, J-L y N-P.

Así como ocurre con la desregulación de la expresión de *Pax3*, hemos observado una desregulación en la expresión de *Shh* especialmente en aquellos embriones expuestos a glucosa sola y a la combinación de glucosa y homocisteína, lo que podría dar lugar a las embriopatías descritas previamente.

## **2. Estudio *in vivo* del efecto de la interacción entre la diabetes durante el embarazo y mutaciones en los genes del metabolismo del ácido fólico, *Folr1* y *Mthfr***

Gracias a la técnica del cultivo embrionario se pudieron simular las condiciones en las que se desarrollaría un embrión si la gestante padeciera diabetes (elevados niveles de glucosa) y malfuncionamiento del ciclo del ácido fólico (incremento de los niveles de homocisteína); en la segunda parte de este objetivo se pretende ir un paso más allá y, utilizando un modelo *in vivo*, se estudiará la interacción entre la diabetes y la mutación de dos genes del metabolismo del ácido fólico con la diferencia de que, en este caso, también se podrá observar la interacción a nivel embrionario ya que los embriones analizados presentarán también las mutaciones en los genes de estudio. Además los embriones estarán expuestos a condiciones de hiperglucemia e hiperhomocisteinemia durante todo el desarrollo, en vez de estarlo solo durante un momento concreto como ocurre en el cultivo embrionario.

### **2.1 Estudio de la interacción de la diabetes y la mutación del gen *Mthfr***

Los ratones *Mthfr*<sup>+/-</sup> no presentan alteraciones morfológicas y son viables, teniendo una tasa de mortalidad durante el desarrollo muy similar a los *Mthfr*<sup>+/+</sup>. Por otro lado la tasa de supervivencia de los ratones *Mthfr*<sup>-/-</sup> suele ser menor que los ratones salvajes y, de los que nacen, un alto porcentaje muere en las primeras semanas. Estos mutantes no presentan defectos del tubo neural (Chen et al., 2001). Con el propósito de analizar el efecto entre la hiperglucemia materna y la mutación de *Mthfr* (tanto de las hembras como de las crías) se indujo la diabetes mediante inyecciones intraperitoneales durante 5 días consecutivos de 40mg/kg de STZ (protocolo más adecuado para esta cepa, como quedó establecido anteriormente en el capítulo 1) a 19 hembras de la cepa SWV heterocigotas para *Mthfr* y se mantuvo un grupo de hembras heterocigotas a las que se les inyectó solamente el buffer como grupo control (n=15). Todas las hembras fueron puestas en cruce con machos heterocigotos para *Mthfr* y los embriones fueron extraídos a edades gestacionales E11.5-E12.5 y E18.5. Estas edades fueron seleccionadas ya que la organogénesis se ha completado y pueden verse los efectos de la combinación de factores con más claridad.

Cuando se analizó el tamaño de las camadas procedentes de hembras diabéticas con respecto a las procedentes de hembras control (Control=145 deciduas y STZ=204 deciduas) se observó una diferencia significativa en el porcentaje de embriones vivos (Control=95.8% vs STZ=89.2%, p=0.022) así como en el porcentaje de reabsorciones en cada grupo de estudio (Control=3.45% vs STZ=9.9%, p=0.022), mientras que no se observó diferencia significativa

cuando se comparó el tamaño medio de las camadas obtenidas en cada condición ( $p=0.55$ ; tabla 6).

	Información tamaño camada				Media EV/camada
	D	R	EM	EV	
Grupo control	145	5	1	139	13±1.7
Grupo STZ	204	20*	2	182*	11.3±1.4

**Tabla 6. Detalle de las camadas procedentes de hembras del grupo control y del grupo STZ (hembras diabéticas).** D= número de deciduas, R= número de reabsorciones, EM = número de embriones muertos; EV = número de embriones vivos; \*Indica diferencia significativa cuando se compara con el grupo control (Comparación de proporciones independientes  $p<0.05$ . Epidat 4.1).

### 1.1.1 Estudio morfológico de los embriones obtenidos

Lo primero que se realizó fue un análisis morfológico de los embriones para poder describir las malformaciones macroscópicas. Los resultados obtenidos en los cultivos de embriones con glucosa y homocisteína en altas concentraciones mostraron un efecto sobre el desarrollo de la zona caudal del embrión, especialmente sobre el cierre del PNP. Por ello, en el análisis macroscópico de los embriones obtenidos de los grupos control y STZ se prestó especial atención al desarrollo del tubo neural. Además se analizó el estadio de desarrollo de los embriones atendiendo a su longitud cráneo-caudal (C-R acrónimo por sus siglas en inglés *Crown-Rump length* (Greene et al., 2003)).

		n	DTNs
C	Mthfr +/+	31	0
	Mthfr +/-	84	0
	Mthfr -/-	24	0
STZ	Mthfr +/+	47	1 (2.13%)
	Mthfr +/-	101	7 (6.93%)*
	Mthfr -/-	34	4 (11.76%)

**Tabla 7. DTNs observados en los embriones procedentes de hembras del grupo control y del grupo STZ.** C= grupo control; STZ= grupo hembras diabéticas. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.026$  Test exacto de Fisher).

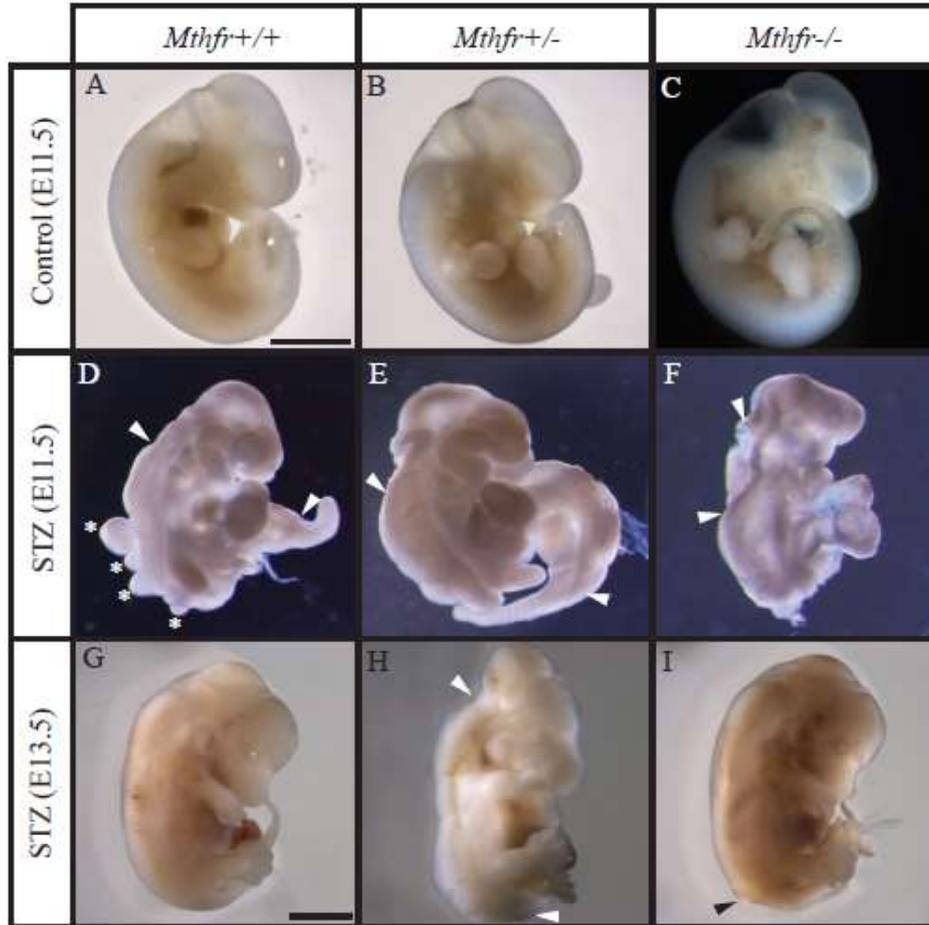
a) Defectos del tubo neural:

- Grupo control: En este grupo ninguno de los embriones obtenidos presentó DTN (tabla 7).

- Grupo STZ:

- Embriones *Mthfr*<sup>+/+</sup>: 1 de los 47 embriones extraídos presentaba el tubo neural completamente abierto en el punto de cierre 1 (cranioraquisquisis), además presentaba protuberancias que salían entre los pliegues neurales (figura 22D. Tabla 7). Es importante destacar que el tubo neural a nivel craneal y rostral (cierres 2 y 3 respectivamente) y a nivel caudal estaba cerrado, además la morfología craneal era similar a la presentada por el resto de embriones *Mthfr*<sup>+/+</sup> procedentes de madres control.
- Embriones *Mthfr*<sup>+/-</sup>: en este caso se observaron DTN en 7 de los 101 embriones extraídos (tabla 7). Los fenotipos observados en este grupo fueron los siguientes: presencia de un meningocele en el rombencéfalo o en una región más caudal (3 de los 7 embriones afectados), tubo neural abierto a nivel del rombencéfalo (1 de los 7 embriones afectados) y, por último, cranioraquisquisis en los otros 3 embriones (figuras 22G y H).
- Embriones *Mthfr*<sup>-/-</sup>: 4 de los 34 embriones analizados presentaron defectos del tubo neural (tabla 7). De estos, 2 presentaban el tubo neural abierto en la zona del rombencéfalo (figura 22F) mientras que los otros 2 tenían un pequeño meningocele en la región del rombencéfalo o en la zona caudal (figura 22I).

b) Desarrollo embrionario: El estudio realizado de la longitud C-R no reveló diferencias significativas entre los embriones procedentes del grupo control y del grupo de hembras diabéticas (grupo STZ), por lo que la diabetes en combinación con la mutación del gen *Mthfr* no parece alterar el desarrollo embrionario.



**Figura 22. Efecto de la combinación entre la diabetes gestacional y la mutación de *Mthfr* durante el desarrollo embrionario.** Embriones E11.5 (A-F) y E13.5 (G-I) de madres control (A-C) y madres diabéticas (D-I) *Mthfr*<sup>+/+</sup> (A, D y G), *Mthfr*<sup>+/-</sup> (B,E y H) y *Mthfr*<sup>-/-</sup> (C, F e I). Cabezas de flecha blancas indican zona del tubo neural abierta. Cabeza de flecha negra indica presencia de meningocele. Barras de escala: A: 1000µm aplicable a paneles B-F; G: 1000µm aplicable a paneles H e I.

Nuestros resultados muestran un incremento en la aparición DTNs en los embriones *Mthfr*<sup>+/-</sup> y *Mthfr*<sup>-/-</sup> procedentes de hembras diabéticas. Esto indicaría una interacción entre ambos factores en el aumento de los DTNs.

## 2.2 Estudio de la interacción de la diabetes y la mutación del gen *Folr1*

Las mutaciones del gen *Folr1* han sido muy estudiadas por su implicación en el desarrollo de malformaciones embrionarias. Los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup> son viables, fértiles y generalmente no presentan ninguna anomalía, aunque tienen un riesgo más elevado de padecer DTNs tales como exencefalia o espina bífida (revisado por (Juriloff and Harris, 2000)). Los embriones homocigotos para *Folr1* son incompatibles con una morfogénesis normal (presentan el tubo neural completamente abierto) y mueren en torno al día 10 de gestación (Piedrahita et al., 1999; Spiegelstein et al., 2004). La suplementación periconcepcional de estos mutantes con ácido fólico puede incluso revertir el fenotipo de los *Folr1*<sup>-/-</sup> (Piedrahita et al., 1999).

El objetivo de esta parte del estudio consiste en la evaluación de la interacción de la diabetes con la mutación de *Folr1* sobre el desarrollo de embriopatías. Además se estudiará el posible efecto beneficioso de la suplementación con ácido fólico en la reducción del índice de embriopatías. La diabetes fue inducida mediante múltiples inyecciones de STZ a una concentración de 40mg/kg como se describe en el objetivo 1. Además, a un grupo de hembras control y un grupo de hembras diabéticas se les administró una dieta suplementada con ácido fólico (10ppm (partes por millón)) dos semanas antes de inducir la diabetes y de la puesta en cruce con los machos, y se mantuvo durante todo el embarazo. Para la realización de este estudio se dividieron 30 hembras SWV-*Folr1*<sup>+/-</sup> y 3 hembras SWV-*Folr1*<sup>+/+</sup> en los siguientes grupos:

- a) Grupo control: 5 hembras *Folr1*<sup>+/-</sup>.
- b) Grupo control + suplemento ácido fólico: 5 hembras *folr1*<sup>+/-</sup>.
- c) Grupo STZ en *Folr1*<sup>+/+</sup>: 3 hembras *folr1*<sup>+/+</sup>.
- d) Grupo STZ en *Folr1*<sup>+/-</sup>: 8 hembras *folr1*<sup>+/-</sup>.
- e) Grupo STZ + suplemento de ácido fólico: 9 hembras *Folr1*<sup>+/-</sup>.
- f) Grupo inducidas no diabéticas: 2 hembras *Folr1*<sup>+/-</sup> a las que se les inyectó con STZ pero que no desarrollaron la diabetes. Estas hembras se utilizaron como control del efecto de la STZ en el desarrollo embrionario y los resultados obtenidos se tratarán en un punto a parte al final de este apartado.

Estas hembras fueron cruzadas con machos *Folr1*<sup>+/-</sup> y los embriones resultantes de estos cruces fueron extraídos en estadio gestacional E11.5-12.5, momento en el cual el cierre del tubo

neural se ha completado y las embriopatías provocadas por la interacción de factores pueden ser estudiadas con mayor detalle.

	Dieta	Hembras	Información tamaño camada				
			D	R	EM	EV	Media EV/camada
C	No FA	Folr1 +/-	50	14	4	32	9±4.1
	FA		48	5	0	43*	10.75±1
STZ	No FA	Folr1 +/+	30	2	1	27	9±3.5
		Folr1 +/-	70	21	0	49	9.8±1.3
	FA	Folr1 +/-	104	8**	4	80	10.2±2.4

**Tabla 8. Descripción de las camadas obtenidas en los diferentes grupos de hembras.** C= grupo hembras control; STZ= Grupo hembras diabéticas; No FA= dieta normal; FA= dieta suplementada; D= número de deciduas, R= número de reabsorciones, EM= número de embriones muertos; EV= número de embriones vivos; \*Indica diferencia significativa cuando se compara con el grupo control; \*\*Indica diferencia significativa cuando se comparan con el grupo STZ con dieta normal (Comparación de proporciones independientes  $p < 0.05$ . Epidat 4.1).

Cuando se analizaron las camadas procedentes de hembras control con respecto a las procedentes de hembras diabética, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de embriones vivos (Control=64% vs STZ=70%, Control + dieta FA=89.6% vs STZ+FA=76.9%.  $p > 0.05$ , tabla 8) ni en el porcentaje de reabsorciones en cada grupo de estudio (Control=28% vs STZ=30%, Control+FA=10.42% vs STZ+FA=7.7%.  $p > 0.05$ , tabla 8). Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar el tamaño medio de las camadas en cada una de las condiciones de estudio. Al comparar los resultados de las camadas obtenidas de las hembras control con o sin dieta suplementada con FA, se observó una diferencia significativa en el número de embriones vivos obtenidos (Control=64% vs Control + dieta FA=89.6%,  $p = 0.006$ , tabla 8), mientras que al comparar el grupo de diabéticas con o sin dieta suplementada con FA la diferencia no resultó estadísticamente significativa (STZ=70% vs STZ+FA=76.9%,  $p > 0.05$ , tabla 8).

Como se ha comentado, los embriones *Folr1*<sup>-/-</sup> no son viables más allá del estadio E10, esto explicaría el gran número de reabsorciones obtenidas en los grupos con dieta normal (en torno a 29%, tabla 8) y la gran reducción observada en los grupos con dieta suplementada (en torno al 9%, tabla 8). La diferencia obtenida al comparar el porcentaje de reabsorciones entre los grupos de madres diabéticas con dieta normal y suplementada resultó estadísticamente significativa (STZ=30% vs STZ+FA=7.86%,  $p=0.0006$ ).

### 1.1.2 Estudio morfológico de los embriones obtenidos

Los embriones obtenidos en cada grupo de estudio se analizaron macroscópicamente para describir las malformaciones que presentaban con más detalle. Los defectos más destacables fueron los que afectaban al tubo neural y al estadio de desarrollo embrionario (atendiendo a su longitud C-R). De este modo se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 9):

#### a) Defectos del tubo neural:

- Grupo control: Como era de esperar en este grupo todos los embriones, tanto *Folr1*<sup>+/+</sup> como *Folr1*<sup>+/-</sup> tenían el tubo neural completamente cerrado y su morfología era normal (Figuras 23A y B. Tabla 9).
- Grupo control+FA:
  - Embriones *Folr1*<sup>+/+</sup>: Estos embriones mostraron el tubo neural completamente cerrado y una morfología normal propia del estadio de desarrollo en el que se encontraban (figura 23G. Tabla 9).
  - Embriones *Folr1*<sup>+/-</sup>: de los 22 embriones obtenidos ninguno presentó defectos del tubo neural (tabla 8).
  - Embriones *Folr1*<sup>-/-</sup>: el 100% de estos embriones (n=8) presentaron el tubo neural a nivel craneal abierto (exencefalia, figura 23I. Tabla 9).
- Grupo STZ en hembras *Folr1*<sup>+/+</sup>:
  - Embriones *Folr1*<sup>+/+</sup>: En este grupo 1 de los 13 embriones obtenidos (8.33%) presentó una protuberancia en la zona espinal del tubo neural (figura 23C. Tabla 9).
  - Embriones *Folr1*<sup>+/-</sup>: En este grupo 2 de los 14 embriones obtenidos (14.3%) presentaron defectos del tubo neural incluyendo presencia de una protuberancia en el rombencéfalo y el cierre incompleto del tubo neural a nivel espinal (figura 23D y 24F. Tabla 9).

- Grupo STZ en hembras *Folr1<sup>+/-</sup>*:
  - Embriones *Folr1<sup>+/+</sup>*: En este grupo 3 de los 15 embriones analizados presentaron defectos del tubo neural. Los fenotipos observados fueron: cranioraquisquisis (2/3; figura 23E) y defecto del cierre del tubo neural a nivel espinal (1/3. Tabla 9).
  - Embriones *Folr1<sup>+/-</sup>*: 1 de los 34 embriones analizados mostró el cierre del tubo neural incompleto a nivel espinal (figura 23F. Tabla 9).
  
- Grupo STZ+FA:
  - Embriones *Folr1<sup>+/+</sup>*: se detectó un 12% de DTNs, entre los que se incluían: tubo neural abierto a nivel del punto de cierre 1 (cranioraquisquisis, 2/3. Figura 23J), presencia de ampolla en el rombencéfalo (1/3. Tabla 9).
  - Embriones *Folr1<sup>+/-</sup>*: estos embriones presentaron DTN en un 12.3% de los casos siendo los fenotipos observados: cranioraquisquisis (1/7), tubo neural abierto a nivel craneal (exencefalia, 3/7. Figura 23K) y del rombencéfalo (2/7), tubo neural con una zona abierta a nivel espinal (1/7. Tabla 9).
  - Embriones *Folr1<sup>-/-</sup>*: el 100% de estos embriones (n=11) presentaron el tubo neural a nivel craneal abierto (exencefalia, figura 23L. Tabla 9).
  
- b) Desarrollo embrionario: El estudio realizado de la longitud C-R no reveló diferencias significativas entre los embriones procedentes de cada uno de los grupos de estudio, salvo en el caso de los embriones *Folr1<sup>-/-</sup>* que presentaron todos ellos menor longitud C-R que el resto de los grupos.

	Dieta	Hembras	Genotipo EV	n	Defectos del tubo neural			
					Cranioraquisquisis	Espinal	Exencefalia	Meningocele
C	No FA	<i>Folr1</i> +/-	+/+	10	0	0	0	0
			+/-	22	0	0	0	0
			-/-	0	---	---	---	---
	FA		+/+	10	0	0	0	0
			+/-	22	0	0	0	0
			-/-	8	0	0	8 (100%)	0
STZ	No FA	<i>Folr1</i> +/+	+/+	13	0	0	0	1 (8.3%)
			+/-	14	0	1 (7.1%)	0	1 (7.1%)
		<i>Folr1</i> +/-	+/+	15	2 (13.3%)	1 (6.6%)	0	0
			+/-	34	0	1 (2.9%)	0	0
			-/-	0	---	---	---	---
	FA	<i>Folr1</i> +/-	+/+	25	2 (8%)	0	0	1 (4.5%)
			+/-	57	1 (1.7%)	1 (1.7%)	<b>5 (8.8%)*</b>	0
			-/-	11	0	0	11 (100%)	0

**Tabla 9. Defectos del tubo neural observados en cada grupo de estudio.** C= grupo hembras control; STZ= Grupo hembras diabéticas; No FA = dieta normal; FA = dieta suplementada con ácido fólico. EV= embriones vivos. (\*) Indica diferencia estadísticamente significativa en comparación con el total de los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup> procedentes de madres diabéticas con dieta no suplementada (n=48; *p*=0.043 Test exacto de Fisher con corrección Mid-p).

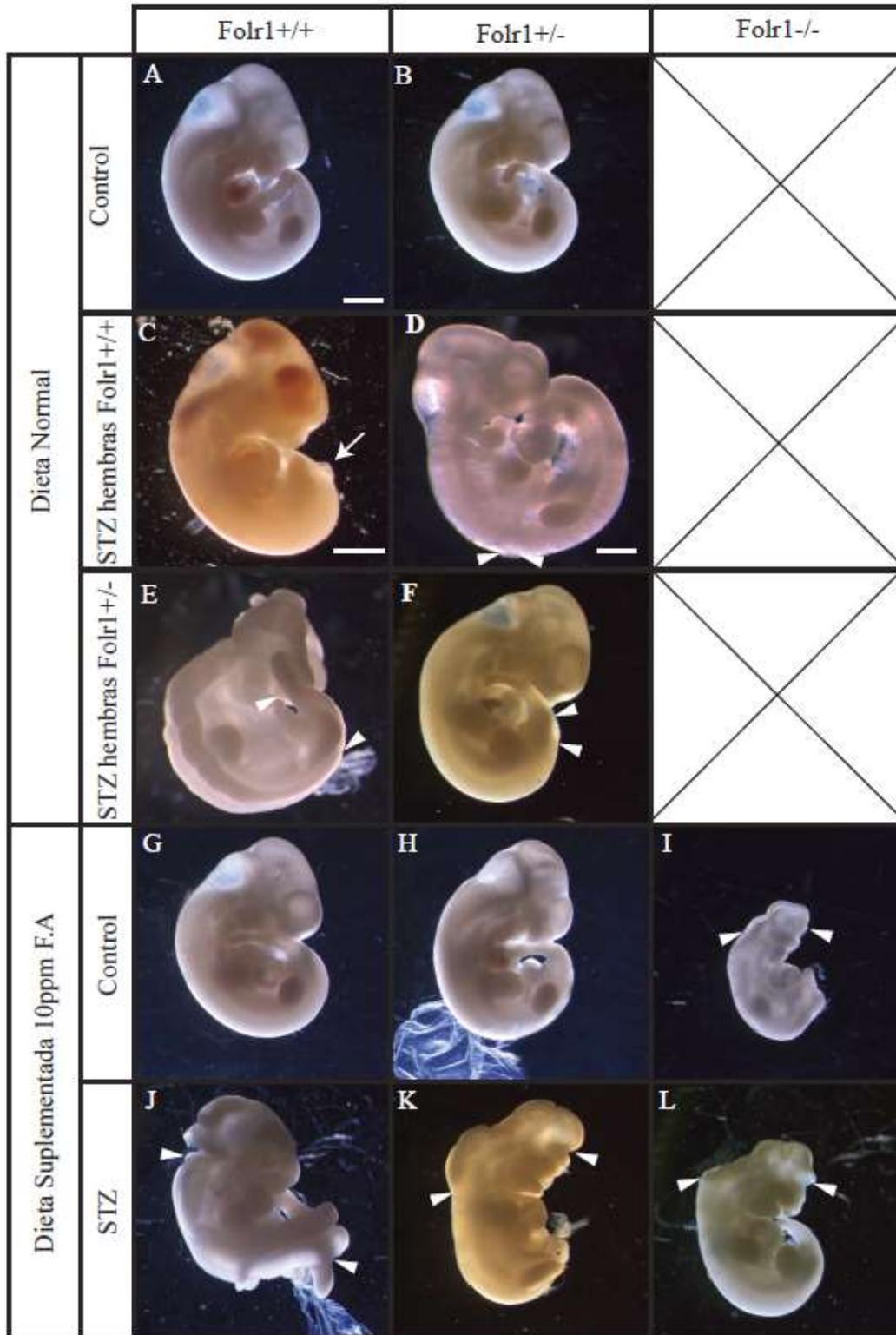


Figura 23. Efecto de la combinación de la diabetes gestacional y la mutación en *Folr1* sobre el desarrollo embrionario. Embriones E11.5 de: madres control con dieta normal (A: *Folr1*<sup>+/+</sup>, B: *Folr1*<sup>+/-</sup>) y con dieta suplementada (G: *Folr1*<sup>+/+</sup>, H: *Folr1*<sup>+/-</sup>, I: *Folr1*<sup>-/-</sup>); de madres diabéticas *Folr1*<sup>+/+</sup> con dieta normal (C: *Folr1*<sup>+/+</sup>, D: *Folr1*<sup>+/-</sup>); de madres diabéticas *Folr1*<sup>+/-</sup> con dieta normal (E: *Folr1*<sup>+/+</sup>, F: *Folr1*<sup>+/-</sup>) y con dieta suplementada (J: *Folr1*<sup>+/+</sup>, K: *Folr1*<sup>+/-</sup>, L: *Folr1*<sup>-/-</sup>). Cabezas de flecha blancas indican zona del tubo neural abierta. Flecha blanca en (C) señala protuberancia tubo neural. Barras de escala: A: 1000µm aplicable a B y F-L. C: 1000µm. D: 500µm aplicable a E.

### 1.1.3 Estudio histológico de los embriones obtenidos:

Para describir más en detalle los defectos observados en los embriones *Folr1* en las distintas condiciones de estudio se procedió a su análisis histológico. Los embriones se analizaron prestando especial atención al estado del tubo neural, y del corazón, ya que, como se ha descrito a lo largo de esta tesis, son los órganos más afectados por la diabetes materna así como en los mutantes de *Folr1*. Se analizaron histológicamente aquellos embriones de cada genotipo que mostraron alguna malformación en el análisis macroscópico, así como embriones que no presentaron ninguna alteración.

- a) Grupo control (n=2 *Folr1*<sup>+/+</sup> y 2 *Folr1*<sup>+/-</sup>):
  - c) Tubo neural: Tanto en los embriones *Folr1*<sup>+/+</sup> como *Folr1*<sup>+/-</sup> presentaban pliegues neurales bien formados y fusionados en todo el recorrido del tubo neural (figuras 24A, a, B y b).
  - d) Corazón: Los diferentes embriones analizados, tanto salvajes como heterocigotos, mostraron un miocardio bien desarrollado, con un epitelio ventricular grueso y bien definido con presencia de numerosas trabéculas. Las aurículas también presentaban un epitelio perfectamente desarrollado así como un tamaño normal acorde a la edad gestacional. En el canal auriculoventricular se observa claramente la presencia de la almohadilla endocárdica. (Figura 25A y B)
  
- b) Grupo control + FA (n=2 *Folr1*<sup>+/+</sup> y 2 *Folr1*<sup>+/-</sup>):
  - e) Tubo neural: Al igual que lo observado en el grupo de embriones de madre control con dieta no suplementada, tanto los embriones *Folr1*<sup>+/+</sup> como los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup>, mostraron el tubo neural completamente cerrado a lo largo de todo el eje cráneo-caudal (Figuras 24C, c, D y d).
  - f) Corazón: Tanto los embriones *Folr1*<sup>+/+</sup> como los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup> mostraron un miocardio bien desarrollado con tejido trabecular abundante así como con un tamaño y morfología acorde a su estado de desarrollo embrionario (Figuras 25C y D).
  
- c) Grupo STZ en *Folr1*<sup>+/+</sup> (n=3 *Folr1*<sup>+/+</sup> y 3 *Folr1*<sup>+/-</sup>):
  - g) Tubo neural:
    - *Folr1*<sup>+/+</sup>: Se analizaron 3 embriones, de los cuales uno de ellos presentó un defecto a nivel espinal en el análisis macroscópico (Figuras 23C, 26A y B). El análisis histológico de los dos embriones que macroscópicamente no presentaron anomalías mostró un tubo neural bien formado y completamente

cerrado a lo largo de todo el eje rostro-caudal. En el análisis del defecto espinal observado en el otro embrión se pudo ver como el tubo neural a ese nivel estaba cerrado pero sobre la zona de fusión de los pliegues neurales podía observarse una estructura tubular que desaparecía al analizar secciones anteriores y posteriores (figura 26C).

- Folr1<sup>+/-</sup>: En este grupo, el embrión que en el análisis macroscópico presentó un fallo en el cierre a nivel espinal (figuras 23D y 24F), en el análisis histológico mostró una morfología convexa de los pliegues neurales, los cuales, además, no estaban elevados como se observó en los embriones control (comparar figura 24f con 24e). El análisis de los otros dos embriones no reveló ninguna anomalía.

h) Corazón:

- Folr1<sup>+/+</sup>: Ninguno de los embriones analizados presentó defectos cardíacos. Todos ellos mostraban un miocardio bien desarrollado con una densidad de trabéculas similar a la observada en los embriones control.
- Folr1<sup>+/-</sup>: de los 3 embriones analizados en este grupo, solo 1 presentó un miocardio con morfología similar a la observada en los embriones control (figura 24F y f). Los 2 embriones restantes presentaban un retraso en el desarrollo general, por lo que el miocardio se encontraba aun en la etapa previa a la remodelación del corazón, en la que comienzan a diferenciarse ambos ventrículos pero el septo y las trabéculas aún no se han formado.

d) Grupo STZ en Folr1<sup>+/-</sup> (n=5 Folr1<sup>+/+</sup> y 5 Folr1<sup>+/-</sup>):

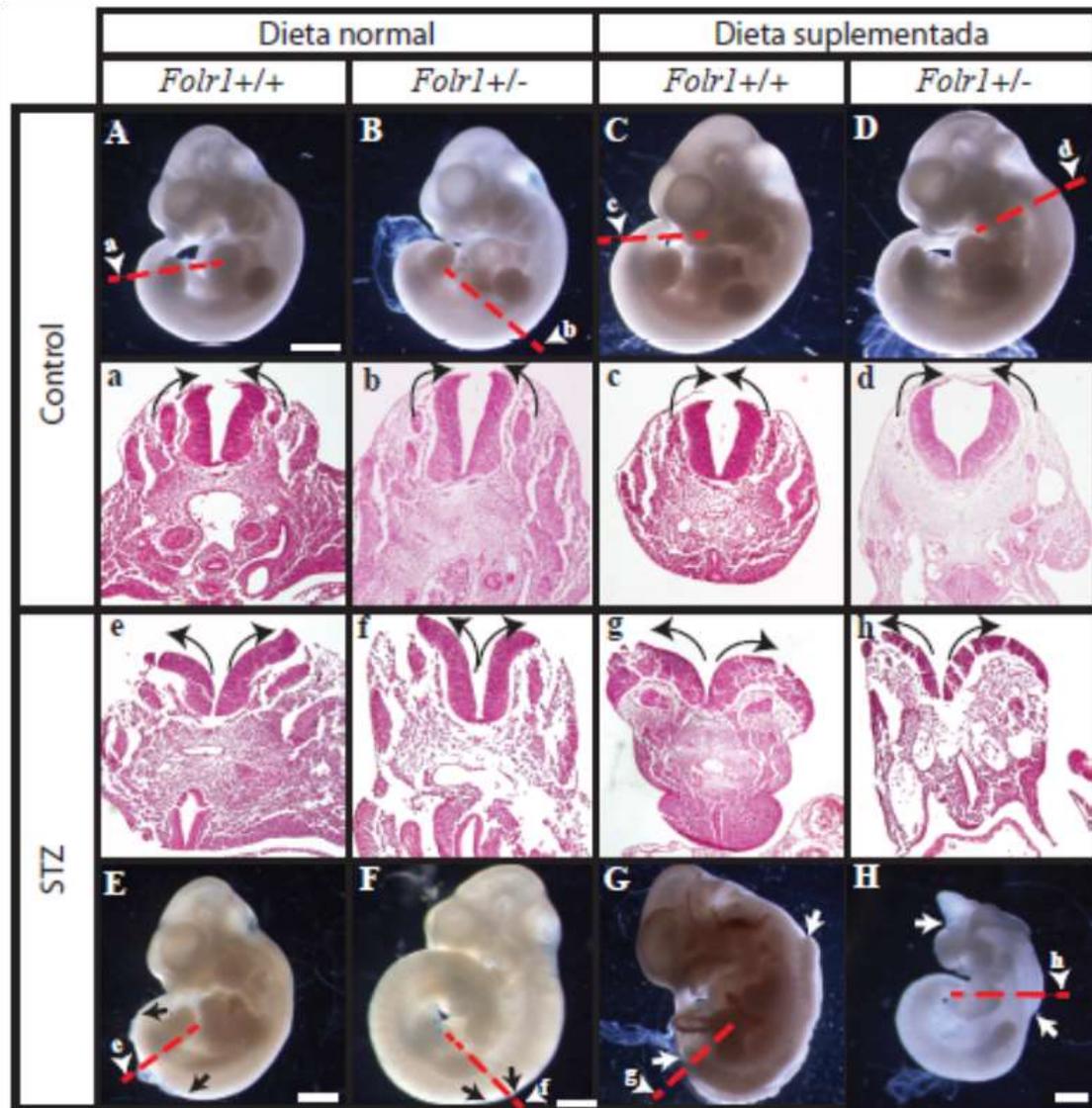
- i) Tubo neural: Como se ha descrito en el análisis macroscópico, un 20% de los embriones Folr1<sup>+/+</sup> y un 2,9% de los embriones Folr1<sup>+/-</sup> presentaron DTN.
  - Folr1<sup>+/+</sup>: Los embriones que en el análisis macroscópico no mostraron defectos del tubo neural, en el análisis histológico no mostraron alteración alguna del tubo neural, los pliegues neurales estaban bien formados y se fusionaban en la zona más dorsal de los mismos dando lugar al tubo neural cerrado. Los embriones que presentaron cranioraquisquisis en el análisis macroscópico, en el análisis histológico mostraron una morfología convexa de los pliegues neurales y ausencia de la elevación de los mismos. El análisis histológico de los embriones que presentaron defectos del tubo neural a nivel espinal mostraron claramente una serie de secciones en las que el tubo neural estaba abierto con una morfología de los pliegues convexa (figuras 24E y e).

- Folr1<sup>+/-</sup>: En este grupo aquellos embriones que en el análisis macroscópico mostraron DTN, en el análisis histológico mostraron una morfología muy similar a la observada en los embriones Folr1<sup>+/+</sup> expuestos a diabetes materna con defecto espinal, ya que los pliegues neurales presentaban una morfología convexa con ausencia de la rigidez y la elevación observada en los embriones del grupo control.
- j) Corazón:
- Folr1<sup>+/+</sup>: estos embriones no mostraron afectación evidente del corazón, el epitelio de la pared de los ventrículos presentaba un grosor y una densidad de trabéculas similar a lo observado en los embriones control (figura 25E).
  - Folr1<sup>+/-</sup>: en estos embriones no se observaron anomalías cardíacas en los embriones analizados (figura 25F). Solamente aquellos que en el análisis de la medida cráneo-caudal mostraron un retraso en el desarrollo, presentaron una histología patológica, con una alta disgregación celular en la mayoría de los tejidos incluyendo el corazón. Esto podría indicar que, a pesar de que en el momento de la extracción de los embriones el corazón aun latía, estos embriones se estaban muriendo.
- e) Grupo STZ + suplemento ácido fólico (n=3 Folr1<sup>+/+</sup> y 5 Folr1<sup>+/-</sup>):
- k) Tubo neural:
- Folr1<sup>+/+</sup>: De estos embriones, aquellos que macroscópicamente presentaron DTN, en el análisis histológico mostraron el tubo neural a nivel dorsal completamente abierto (figura 24G) con ausencia de la rigidez y la elevación de los pliegues neurales observada en los embriones control. Los embriones que macroscópicamente no presentaron ninguna anomalía visible, en el análisis histológico mostraron una morfología normal.
  - Los embriones Folr1<sup>+/-</sup> con DTN analizados presentaron el tubo neural a nivel craneal y al inicio de la zona dorsal completamente abierto (figuras 24H y 26D) así como cranioraquisquisis (figura 26H). El análisis histológico de estos embriones reveló una morfología similar a la ya observada en los embriones de madres diabéticas con dieta normal, ya que los pliegues neurales tenían forma convexa así como ausencia de elevación y rigidez (figuras 24h, 26E e I). Además algunos de ellos mostraron una morfología del cierre del tubo neural a nivel caudal diferente a la observada en los embriones del grupo control, ya que presentaban restos de tejido en la luz del tubo que parecen provenir de una

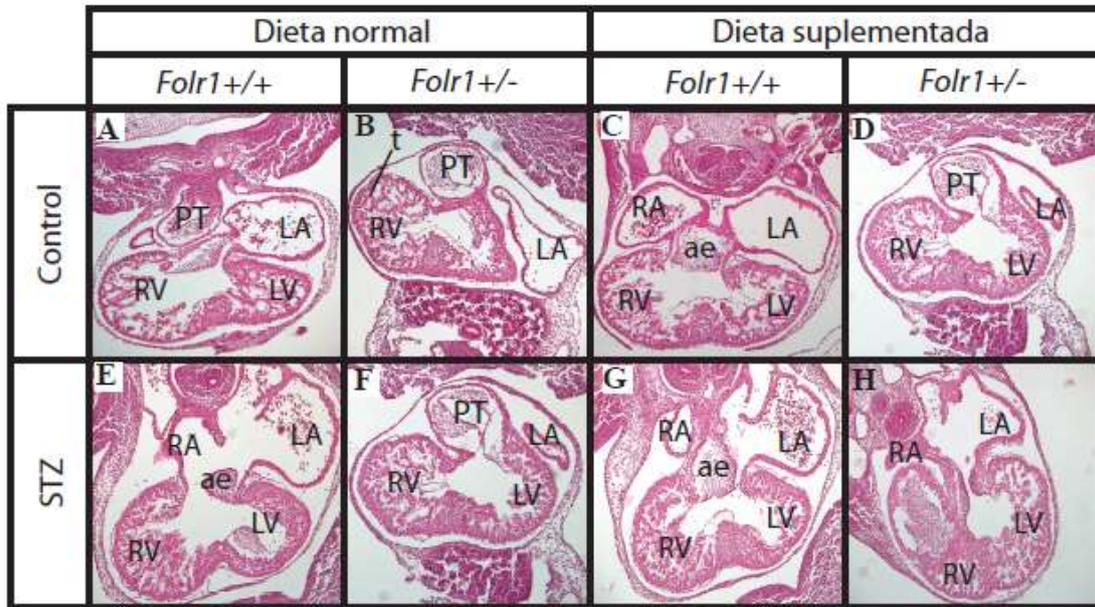
“invasión” por uno de los pliegues neurales (Figura 26G) o bien presentaban los pliegues neurales fusionados pero invaginados hacia el lumen confiriendo al tubo neural una forma acorazonada (Figura 26K).

l) Corazón:

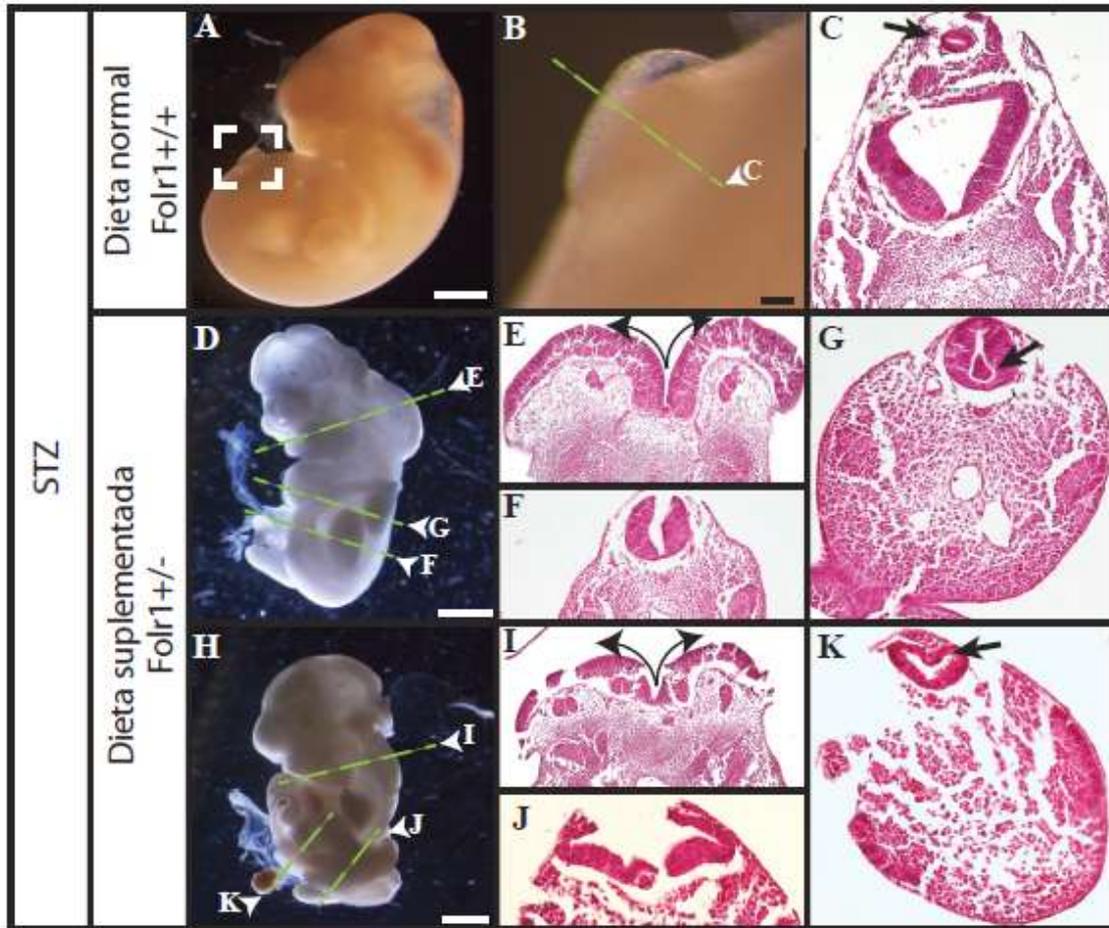
- Folr1<sup>+/+</sup>: estos embriones no mostraron ninguna alteración cardíaca evidente. El miocardio estaba bien desarrollado así como presentaban gran cantidad de trabéculas (figura 25G).
- Folr1<sup>+/-</sup>: 4 de los 5 embriones analizados no presentaron el miocardio afectado, mostrando una morfología similar a la observada en los embriones control (figura 25H). Sólo se observó afectación del miocardio en uno de los embriones analizados, el cual presentaba además exencefalia y retraso en el desarrollo. Esto último podría explicar el patrón observado ya que presentó un corazón menos desarrollado con menos densidad trabecular en el miocardio.



**Figura 24. Estudio histológico del efecto de la combinación de factores sobre el desarrollo del tubo neural.** Embriones E12 *Folr1*<sup>+/+</sup> (A, C, E y F) y *Folr1*<sup>+/-</sup> (B, D, F y H) procedentes de madres control (A-D) y de madres diabéticas (STZ; E-H) con dieta normal (A, B, E, F) y dieta suplementada con ácido fólico (C, D, G, H) y sus respectivas secciones transversales en parafina teñidas con hematoxilina-eosina (a-h). Dirección de corte representada con línea discontinua roja en paneles A-H. Flechas curvas negras en paneles a-h indican apertura o cierre de los pliegues neurales. Flechas negras en E y F y flechas blancas en G y H indican zona del tubo neural abierta. Barras de escala: A: 1000µm aplicable a B-D. E: 1000µm aplicable a G. F y H: 500µm.



**Figura 25. Estudio histológico del efecto de la combinación de factores sobre el desarrollo del corazón.** Secciones transversales en parafina teñidas con hematoxilina-eosina de embriones E12 *Folr1*<sup>+/+</sup> (A, C, E y F) y *Folr1*<sup>+/-</sup> (B, D, F y H) procedentes de madres control (A-D) y de madres diabéticas (E-H) con dieta normal (A, B, E, F) y dieta suplementada con ácido fólico (C, D, G, H). Principales estructuras cardíacas señaladas: RV: ventrículo derecho (Right ventricle); LV: ventrículo izquierdo (left ventricle); RA: aurícula derecha (Right atrium); LA: aurícula izquierda (Left atrium); PT: tronco pulmonar (pulmonary trunk); t: trabéculas; ae: almohadilla endocárdica.



**Figura 26. Detalle de los defectos del tubo neural provocados por la diabetes y por la combinación de diabetes y mutación de *Folr1*.** Embriones E12 *Folr1*<sup>+/+</sup> (A) y *Folr1*<sup>+/-</sup> (D) procedentes de madres diabética con dieta normal (A) y con dieta suplementada con ácido fólico (D y H) y sus respectivas secciones transversales en parafina teñidas con hematoxilina-eosina (B, C, E-G e I-K). Panel B muestra detalle del DTN recuadrado en panel A. Dirección de corte representada con línea discontinua verde en paneles B, D y H. Flechas negras en paneles C, G y K señalan aberraciones encontradas durante el cierre del tubo neural. Flechas curvas negras en E e I indican apertura de los pliegues neurales. Barras de escala: (A, D y H): 1000µm. (B): 100µm.

Estos resultados indican que la interacción entre la diabetes materna y la mutación embrionaria en *Folr1* provoca la aparición de DTN a nivel craneal (exencefalia) en los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup>, fenotipo que sólo había sido descrito en los embriones *Folr1*<sup>-/-</sup>.

### 3. Estudio del efecto de la STZ sobre el desarrollo embrionario

Tras el protocolo de inducción de la diabetes por inyecciones de STZ, 2 de las 10 hembras inducidas no desarrollaron diabetes, por lo que decidimos utilizarlas como control del efecto de la STZ en el desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 10.

	Dieta	Información tamaño camada				Media embriones/camada
		D	R	EM	EV	
Grupo STZ	N	25	7	0	18	9±4.24

**Tabla 10. Información sobre el tamaño de camada obtenido en las hembras del grupo control y grupo inyectadas con STZ no diabéticas.** D= número de deciduas, R= número de reabsorciones, EM= número embriones muertos, EV= número embriones vivos, N = dieta normal.

Al analizar el porcentaje de embriones vivos (72%, Tabla 10) y de reabsorciones (28%) presentado por estas hembras, los datos obtenidos fueron similares a los observados en los grupos control (EV= 64%; R=28%, ver tabla 8). En este grupo ninguno de los embriones obtenidos mostró malformaciones o alteraciones en el desarrollo. Estos resultados indicarían que la STZ no tiene un efecto embriotóxico.

## Discusión.

Tanto a la diabetes gestacional como a las alteraciones del ciclo del ácido fólico se les ha prestado especial atención debido a su relación con el aumento del riesgo de malformaciones congénitas en la descendencia. En este objetivo hemos observado como la hiperglucemia sumada al mal funcionamiento del ciclo del folato aumentan el riesgo de padecer embriopatías, especialmente defectos del tubo neural.

Estudios epidemiológicos han demostrado los efectos beneficiosos de la suplementación con ácido fólico durante el embarazo en la prevención de los defectos del tubo neural así como de otras anomalías. A pesar de ello aún existe un porcentaje de embriopatías que no pueden ser prevenidas mediante la suplementación con ácido fólico, lo cual ha llevado al estudio, entre otros, de la presencia de mutaciones o polimorfismos en genes asociados con el metabolismo y transporte del folato como posibles factores de riesgo en el desarrollo de dichas embriopatías.

*Efecto de la exposición de los embriones a una alta concentración de homocisteína y glucosa en el cierre del PNP in vitro:* Tanto en humanos como en modelos animales, se ha descrito que elevados niveles de homocisteína durante el embarazo pueden dar lugar a efectos teratogénicos (Fathe et al., 2015; Hague, 2003; Mills et al., 1995). Estudios realizados en embriones de pollo han descrito que, tras la exposición a elevadas concentraciones de homocisteína en cultivo, desarrollan DTN (Rosenquist et al., 1996), mientras que en embriones de ratón y rata cultivados en presencia de homocisteína no han mostrado los mismos resultados, obteniéndose sólo alguna malformación de los somitas caudales (Greene et al., 2003; Vanaerts et al., 1994). En nuestro estudio hemos observado que la exposición embrionaria a alta concentración de homocisteína no aumenta el riesgo de padecer defectos del tubo neural, aunque sí afecta a la morfología de la zona caudal, ya que produce la aparición de una protuberancia. Además hemos observado que los embriones expuestos a estas condiciones mostraban una afectación de la morfología de los somitas caudales. En estos embriones la morfología del PNP era similar a la observada en los embriones del grupo control, así como no presentaron afectación del momento del cierre del PNP. Todo esto sugiere que, como se había observado en estudios realizados por Greene *et. al*, la homocisteína no causa DTN en embriones de ratón. Por otro lado, nuestros resultados reflejan que los embriones expuestos a alta concentración de glucosa en cultivo presentan diversas embriopatías, como DTN a nivel craneal, defectos de los somitas y malformación de la zona caudal con presencia de protuberancias en esta zona. Estos embriones mostraron una clara tendencia del PNP a

permanecer abierto, ya que la medida del tamaño del mismo aumentaba conforme avanzábamos en el estadio embrionario. Esto es un claro indicativo de que la glucosa a altas concentraciones afecta al cierre del PNP y puede dar lugar a espina bífida al no producirse el correcto cierre del mismo. Los embriones expuestos a elevadas concentraciones de glucosa y homocisteína simultáneamente, presentaron defectos del tubo neural a nivel craneal, malformación de la zona caudal y de los somitas, así como presencia de protuberancia en la zona caudal, aunque estos defectos no pudieron asociarse a la combinación de factores debido a que las diferencias con los embriones cultivados en presencia de glucosa y de homocisteína por separado no resultaron ser estadísticamente significativas. Cuando se analizó la morfología del PNP mediante un análisis histológico, los embriones expuestos a glucosa y homocisteína simultáneamente mostraron una tendencia al cierre del PNP aunque algunos embriones tenían tendencia a cerrar el PNP más deprisa que lo observado en los embriones control, mientras que en otros el PNP permanecía abierto con un número de somitas en el que los controles ya presentaban el tubo neural cerrado. Al analizar la histología de estos PNP se observó que presentaban una morfología característica de embriones en estadio más tardío. Estos embriones mostraban un PNP en modo de cierre 3, caracterizado por la presencia de DLHPs y ausencia de MHP, lo que confiere una forma redondeada al tubo neural. Además en estos embriones la notocorda resultó más difícil identificarla en las secciones histológicas. De esta forma parece que las altas concentraciones de glucosa y homocisteína provocan una desregulación en la morfología y en el momento del cierre del PNP.

*Pax3* es un factor de transcripción esencial para la formación del tubo neural que se encuentra expresado en el mesodermo paraxial y en la cresta neural en las etapas más tempranas del desarrollo. Tanto la diabetes gestacional como el malfuncionamiento del metabolismo del ácido fólico se han relacionado con el aumento del estrés oxidativo y con la alteración de la expresión de *Pax3* (Chang et al., 2003b; Fine et al., 1999; Li et al., 2005; Morgan et al., 2008). El análisis del patrón de expresión de *Pax3* mostró una alteración del mismo bajo condiciones de hiperglucemia, lo cual confirma los resultados ya descritos en la literatura (Chang et al., 2003a; Phelan et al., 1997). Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de *Pax3* mediante Q-RT-PCR corroboraron la disminución de la expresión de *Pax3* en las distintas condiciones de cultivo en comparación con los embriones control. Además, los embriones expuestos a glucosa y homocisteína por separado y a glucosa y homocisteína simultáneamente, mostraron expresión ectópica de *Pax3* en la zona más caudal del embrión. Esta expresión podría indicar una desregulación en el desarrollo de la zona caudal del embrión

provocado por la alteración de *Pax3*, ya que este gen está implicado en el cierre del PNP y en el proceso de elongación del embrión.

Durante el cierre del PNP, la notocorda es la responsable de activar la señalización de diversos factores de inducción, entre los que se encuentra *Shh*, necesarios para la formación de la MHP. En la formación de los DLHPs está implicado el ectodermo de superficie, mientras que la activación de *Shh* en la notocorda inhibe su formación (Ybot-Gonzalez et al., 2002; Ybot-Gonzalez et al., 2007a). En condiciones de hiperglucemia se ha observado una fuerte disminución de la expresión de *Shh* (Salbaum and Kappen, 2010). Nuestros resultados mostraron una ausencia de notocorda y de MHP en los embriones expuestos a glucosa sola y a glucosa y homocisteína simultáneamente, además se observó una disminución de la expresión de *Shh* en los embriones cultivados bajo dichas condiciones. Esto parece indicar que la malformación de las estructuras necesarias para la correcta expresión de *Shh*, como la notocorda, provoca una desregulación de este gen.

*Efecto de la alteración de la expresión de Pax3 y Shh durante el cierre del PNP in vitro:* Durante el desarrollo del tubo neural se genera un gradiente de expresión dorsoventral. En la zona ventral del tubo la señal de *Shh* procedente de la notocorda inhibe la expresión de la señal de *Pax3*. De la misma forma la expresión dorsal de *Pax3* evita la expresión en esta zona de señales específicas de la zona ventral (Lin et al., 2016; Litingtung and Chiang, 2000; Martinelli and Fan, 2007; Tremblay et al., 1996). En el control de la señal de *Pax3* por *Shh* interviene *Zic2*. *Zic2* se expresa a lo largo del eje dorso-ventral en la zona caudal del embrión. Su activación induce la expresión de *Pax3* en la zona dorsal, mientras que su inhibición por parte de *Shh* inhibe la expresión de *Pax3* en la zona ventral del tubo neural. Se ha observado que mutantes de *Shh* presentan una extensión ventral de la expresión de *Pax3* (Martinelli and Fan, 2007) así como la sobreexpresión de *Zic2* induce expresión ectópica de *Pax3* (Sanchez-Ferras et al., 2014). La alteración de la expresión de *Shh* por la diabetes materna y el estrés oxidativo podría dar lugar a una sobreexpresión de *Zic2*, el cual induciría la expresión ectópica de *Pax3* en la zona más caudal del embrión observada en nuestros experimentos.

Se ha demostrado que existe una parte del tejido neural que no proviene de la placa neural, si no que deriva de células bipotentes localizadas en la zona más caudal del embrión denominadas progenitores neuromesodermnales (NMPs), las cuales pueden diferenciarse en neuroectodermo posterior o mesodermo paraxial para generar, posteriormente, la médula espinal y los somitas respectivamente. Las células que darán lugar al linaje neural expresan *Sox2* mientras que las que darán lugar al linaje mesodérmico expresan *T* (*Brachyury*;

(Wymeersch et al., 2016) y revisado por (Wilson et al., 2009)). Por otro lado, se ha observado que la alteración de la expresión de *Wnt3a* por la hiperglucemia da lugar a un acortamiento de la zona caudal en los embriones (Chan et al., 2002; Leung et al., 2004). Nuestros resultados muestran que, tras la exposición de los embriones a condiciones de hiperglucemia, se obtienen embriones con una zona caudal más corta en comparación con los embriones control. *Wnt3a*, en la zona caudal del embrión, activa la señal de *T*, la cual es esencial para la activación de otros genes de la familia T-box como *Tbx-6*, necesarios para la elongación del embrión (Ciruna and Rossant, 2001). Una desregulación de *Wnt3a* por la hiperglucemia provocaría la desregulación de *T* lo que originaría una alteración en el patrón de diferenciación de los NMPs. Además, la protuberancia observada en alguno de los embriones expuestos a las distintas condiciones de cultivo podría ser debida al crecimiento descompasado de la zona dorsal con respecto a la zona ventral ocasionado por la alteración de la expresión de los genes implicados tanto en la elongación como en el establecimiento del eje dorso-ventral en la zona caudal. Sería necesario realizar un estudio más exhaustivo de la protuberancia observada, pudiendo ser interesante la realización de un estudio de la expresión de genes implicados en la elongación y formación del eje dorso-ventral en esta zona mediante un *microarray* para averiguar las causas de la formación de esta anomalía.

Efecto de la combinación de la diabetes materna y la mutación en *Mthfr* en el desarrollo embrionario *in vivo*: Una vez analizados los efectos embrionarios provocados por la exposición de los embriones *in vitro* a la combinación de elevadas concentraciones de glucosa y homocisteína, decidimos realizar el estudio *in vivo* utilizando hembras diabéticas mutantes *Mthfr*<sup>+/-</sup>. En humanos la variante más estudiada del gen *MTHFR* ha sido el polimorfismo 677C→T por su relación con la aparición de DTNs. Este polimorfismo consiste en una sustitución de alanina por valina lo que conlleva a una reducción en la actividad enzimática de hasta el 60% y, por tanto, al aumento de los niveles de homocisteína en sangre ((Eskes, 1998; van der Put and Blom, 2000) y revisado por (Zhu et al., 2009)). En el estudio *in vivo* con mutantes *Mthfr* observamos la aparición de defectos del tubo neural en los embriones procedentes de madres diabéticas. Este porcentaje de defectos del tubo neural fue mayor en los embriones heterocigotos y homocigotos para *Mthfr* que en los embriones *Mthfr*<sup>+/+</sup>. Estudios realizados en ratones mutantes para *Mthfr* no han descrito presencia de DTN ni en los mutantes *Mthfr*<sup>+/-</sup> ni en los *Mthfr*<sup>-/-</sup> (Chen et al., 2001). Por ello, el incremento observado en nuestro estudio en la aparición de DTN en el grupo de madres diabéticas en los embriones mutantes con respecto a los salvajes, denota una clara interacción entre la diabetes y la mutación de *Mthfr* durante el desarrollo del tubo neural.

Importancia del genotipo embrionario en el desarrollo de embriopatías: Los efectos observados en los embriones procedentes de madres *Mthfr*<sup>+/-</sup> diabéticas fueron, como era de esperar, más severos que lo observado cuando los embriones fueron expuestos en cultivo a altas concentraciones de glucosa y homocisteína *in vitro*, lo que evidencia la importancia del genotipo embrionario, así como el tiempo de exposición a los factores de riesgo. En el caso de los cultivos se utilizaron embriones salvajes procedentes de la cepa CD1, mientras que en el modelo *in vivo* los embriones procedían del cruce entre hembras SWV-*Mthfr*<sup>+/-</sup> con machos SWV-*Mthfr*<sup>+/-</sup>, por lo que los embriones obtenidos podían ser salvajes, heterocigotos u homocigotos para la mutación en *Mthfr*. En un modelo *in vivo* la exposición a las condiciones de estudio son continuas durante todo el embarazo por lo que los resultados observados *in vitro* pueden verse exacerbados. A pesar de esto, el cultivo embrionario resulta útil para la realización del estudio preliminar de la posible interacción de factores pudiendo observar a que órganos en desarrollo afecta, de forma que, *in vivo*, puedan prestarse mayor atención a estos órganos y delimitar el tiempo de gestación de interés.

Efecto de la combinación de la diabetes materna y la mutación en *Folr1*, así como de la suplementación con FA en el desarrollo embrionario *in vivo*: Los ratones *Folr1*<sup>+/-</sup> son normales y fértiles, mientras que los *Folr1*<sup>-/-</sup> presentan anomalías morfológicas severas como exencefalia, además de un claro retraso en el desarrollo cuando se comparan con embriones *Folr1*<sup>+/+</sup>. Estos embriones mueren en torno al estadio de gestación E10 (Piedrahita et al., 1999). Como ya se sabe, la suplementación con ácido fólico durante el embarazo en ratones con diabetes ha demostrado reducir la aparición de anomalías embrionarias (Oyama et al., 2009; Wentzel et al., 2005). En nuestro estudio observamos como la diabetes materna aumenta el número de defectos del tubo neural en los embriones salvajes, mientras que cuando las hembras *Folr1* diabéticas eran tratadas con suplemento de ácido fólico antes y durante el embarazo, el porcentaje de DTN en los embriones salvajes disminuía claramente (20% de DTN en *Folr1*<sup>+/+</sup> de madres diabéticas vs 12% DTN en *Folr1*<sup>+/+</sup> de madres diabéticas con dieta suplementada). Por tanto nuestros resultados confirmaron el efecto beneficioso del ácido fólico en la reducción del riesgo de padecer DTN en embarazos diabéticos. Por otro lado, diversos estudios realizados en ratón han demostrado que la suplementación con ácido fólico en los mutantes *Folr1* evita la muerte prematura de los embriones y, dependiendo de la concentración administrada a las madres, pueden dar lugar a crías sanas que, en condiciones normales, hubieran presentado defectos importantes (revisado por (Taparia et al., 2007)). En nuestro estudio, la suplementación con 10ppm de ácido fólico permitió observar el fenotipo de los embriones *Folr1*<sup>-/-</sup>, presentando todos ellos defectos del tubo neural a nivel craneal así como un severo

retraso en el desarrollo en comparación con el resto de embriones analizados. Cuando analizamos los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup> procedentes de madres diabéticas, curiosamente, sólo encontramos un 2.9% de embriones que presentaban algún DTN, mientras que los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup> de madres diabéticas con dieta suplementada presentaron defectos en un 12.3% de los casos. Esto, junto con el elevado número de reabsorciones encontradas en las hembras diabéticas con respecto a las hembras diabéticas con dieta suplementada, nos llevó a pensar que la diabetes y la mutación de *Folr1* interaccionaban aumentando los defectos en los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup> de una forma tan severa que, así como ocurre de forma normal en los embriones *Folr1*<sup>-/-</sup>, no sobrevivían hasta los estadios en los que los embriones fueron extraídos (E11.5-E12.5). El hecho de que la mayor parte de los defectos del tubo neural observados en los embriones *Folr1*<sup>+/-</sup> de madres diabéticas con dieta+FA fueran craneales, mientras que en los embriones *Folr1*<sup>+/+</sup> eran de tipo espinal, podría indicar que la diabetes, junto con la mutación de *Folr1* en heterocigosis, “fenocopia” el fenotipo observado en los embriones *Folr1*<sup>-/-</sup>. Se ha descrito en la bibliografía que uno de los genes cuya expresión se ve afectada en condiciones de hiperglucemia es *Folr1* (Pavlinkova et al., 2009; Sato et al., 2008; Wentzel et al., 2005). La desregulación de la expresión de *Folr1* en embriones heterocigotos podría explicar la aparición de un fenotipo similar a los embriones *Folr1*<sup>-/-</sup> observado en estos embriones, ya que es probable que, bajo estas condiciones, la expresión del gen sea más similar a la que presentan los embriones homocigotos que los heterocigotos. Todo esto evidencia la interacción existente entre ambos factores. Además, esto podría explicar también el hecho de que la suplementación con ácido fólico sólo redujera la incidencia de los DTN en los embriones salvajes de madres diabéticas, ya que estos son causados únicamente por la hiperglucemia materna. Además el porcentaje de defectos del tubo neural en *Folr1*<sup>+/-</sup> y *Folr1*<sup>-/-</sup> seguía siendo elevado en los embriones de madres diabéticas suplementadas observándose sólo una reducción en el número de reabsorciones, probablemente debido al rescate del fenotipo por parte del ácido fólico.

Importancia del genotipo materno en el desarrollo de embriopatías: El genotipo materno ejerce una gran influencia sobre el fenotipo de la descendencia. Estudios realizados sobre embriotoxicidad ejercida por arsénico en mutantes *Mthfr* demuestran que la sensibilidad embrionaria a la exposición a arsénico es mayor en las hembras *Mthfr*<sup>-/-</sup> que en las *Mthfr*<sup>+/+</sup> (Wlodarczyk et al., 2014). En nuestro estudio obtuvimos resultados similares, ya que los defectos embrionarios obtenidos en hembras diabéticas *Folr1*<sup>+/+</sup> fueron menos severos que los observados en los embriones procedentes de hembras diabéticas *Folr1*<sup>+/-</sup>. Los embriones salvajes procedentes de madres diabéticas *Folr1*<sup>+/+</sup> presentaron DTN sólo en un 7.7% de los

casos mientras que en el caso de los embriones salvajes procedentes de madres diabéticas *Folr1<sup>+/-</sup>* el porcentaje de DTN observados fue del 20%. Esto muestra efecto del genotipo materno en el aumento del riesgo de aparición de embriopatías, así como en el aumento de la severidad de las mismas.

Todo esto demuestra la importancia de los estudios multifactoriales para poder entender y prevenir la aparición de defectos embrionarios.

### **Objetivo 3: Estudio de la interacción entre la diabetes y mutaciones de la vía Wnt-PCP durante el desarrollo embrionario.**

#### **Introducción.**

La hiperglucemia afecta a vías de señalización que son cruciales para el correcto desarrollo embrionario, como la vía Wnt-PCP (*planar cell polarity*). Se ha observado que genes como *Daam1* o *Vangl2* presentan una disminución de su expresión en presencia de elevadas concentraciones de glucosa (Pavlinkova et al., 2009). Estos genes son importantes para el correcto desarrollo de órganos como el tubo neural, el corazón o el ojo.

En este capítulo nos planteamos el estudio, *in vivo* e *in vitro*, de las embriopatías producidas por la interacción entre la diabetes gestacional y la vía de señalización Wnt-PCP.

## Resultados.

### 1. Estudio de la interacción entre mutantes *Daam1* y la diabetes durante el desarrollo embrionario.

#### 1.1 Efecto de la diabetes en el desarrollo de embriones de la cepa C57Bl/6.

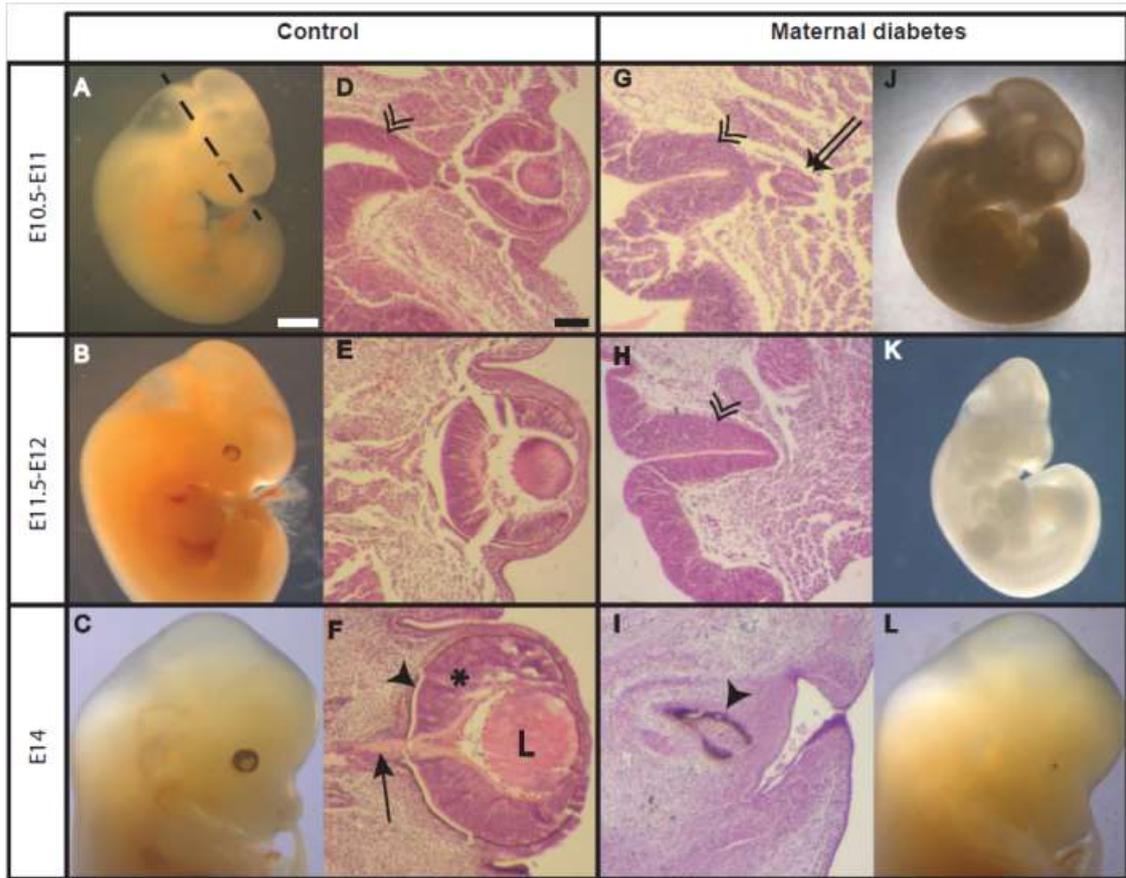
Para analizar el efecto de la diabetes sobre los embriones de la cepa en la que se desarrolló una de las mutaciones estudiadas (*Daam1*), decidimos inducir la diabetes a un grupo de hembras de la cepa C57Bl/6. La diabetes fue inducida, como se ha descrito previamente en el objetivo 1, mediante múltiples inyecciones de STZ a baja concentración. Además se mantuvo un grupo de hembras control a las que no se les indujo la diabetes. Una vez que las hembras presentaron valores de hiperglucemia, fueron puestas en cruce con machos de la misma cepa *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> y los embriones fueron extraídos a diferentes edades, desde E10.5 a E14, con el fin de poder observar los efectos de la diabetes materna en diferentes momentos del desarrollo al terminar la organogénesis. No se obtuvieron diferencias significativas ni en el tamaño de la camada ni en el número de reabsorciones obtenidas en las hembras diabéticas en comparación con las hembras control.

##### 1.1.1 Análisis macroscópico de los embriones obtenidos.

En primer lugar se analizaron macroscópicamente los embriones con el fin de poder describir cualquier anomalía.

- a) Grupo Control: Como era de esperar no se observó ninguna clase de anomalía en los 30 embriones analizados procedente de las hembras control. Todos ellos presentaban un grado de desarrollo acorde a la edad gestacional estudiada. En todos ellos el tubo neural se encontraba cerrado y presentaban los ojos bien desarrollados con una morfología aparentemente normal. Se podía observar cómo, a medida que los embriones estudiados eran de edades más tardías, el tejido pigmentario del globo ocular ocupaba un área mayor que en los estadios más tempranos (figuras 27A-C).
- b) Grupo STZ: De los 63 embriones analizados, 16 presentaron alguna anomalía ocular (25.4%). El 25% de ellos (4 de 16) presentó anoftalmia asimétrica, ya que presentaban sólo una de las dos vesículas ópticas; el 43.75% (7 de 16) presentaron anoftalmia completa (falta de ambas vesículas) y el 31.25% restante (5 de 16) desarrollaron microftalmia

(presencia de estructuras oculares de menor tamaño. Figuras 27J-L). En este grupo tampoco se observaron defectos del tubo neural, presentando todos los embriones el tubo neural cerrado.



**Figura 27. Efecto de la diabetes materna sobre el desarrollo del ojo.** Embriones de edades E10.5-E11 (A, D, G y J), E11,5-12 (B, E, H y K), y de E14 (C, F, I y L). Embriones de hembras control (A-C) y las correspondientes secciones transversales de parafina teñidas con hematoxilina-eosina (D-F). Embriones de madres diabéticas (J-L) y las correspondientes secciones transversales de parafina teñidas con hematoxilina-eosina (G-I). Las secciones transversales fueron obtenidas al nivel indicado por la línea discontinua en A. Principales estructuras oculares indicadas: lente (L), Nervio óptico (flecha negra), tallo óptico (doble cabeza de flecha), copa óptica rudimentaria (doble flecha), retina neural (asterisco), epitelio pigmentario de la retina (cabeza de flecha negra). Barras de escala. 1000 $\mu$ m (A, aplicable a B, C, J-L); 100 $\mu$ m (D, aplicable a E-I).

	Ojos normales	Defectos oculares	Total
Embriones madres control	30	0	0/30 (0%)
Embriones madres diabéticas	47	16	16/63 (25.4%)*

**Tabla 10. Defectos oculares observados en embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> obtenidos de madres control y madres diabéticas.** \*Indica diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de embriones de madres diabéticas (16/63) con respecto al grupo de embriones de madres control (0/30). Test exacto de Fisher;  $p=0.0011$

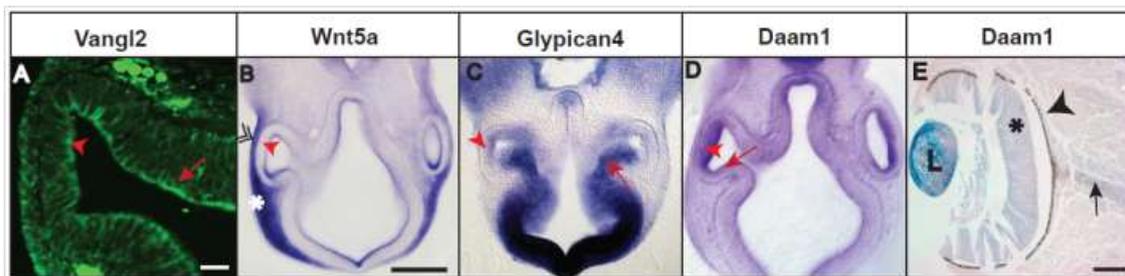
### 1.1.2 Análisis histológico de los embriones obtenidos.

- a) Grupo Control: El análisis histológico de estos embriones entre las edades E11-14, mostró una copa óptica bien desarrollada, con presencia de las capas interna o neural (futura capa nerviosa de la retina) y externa (futura capa pigmentaria de la retina). Además, según se avanzaba de los estadios más tempranos a los más tardíos del desarrollo, se podía observar un estrechamiento de la unión entre la vesícula óptica y el diencefalo, la cual corresponde con el desarrollo del tallo óptico (futuro nervio óptico). La lente estaba presente en todos ellos en el centro de la copa óptica, estaba bien desarrollada y presentaba una morfología redondeada y bien definida (figura 27D-F).
- b) Grupo STZ: Los embriones que en el estudio macroscópico presentaron alguna anomalía ocular, en el estudio histológico mostraron una clara alteración de las estructuras oculares. La copa óptica, en aquellos embriones que presentaron microftalmia, era más pequeña y rudimentaria; además la distancia entre la copa óptica y el diencefalo era menor que la observada en los embriones control y el tallo óptico estaba más engrosado (figura 27G comparada con 27D). En otros casos sólo podía distinguirse un grupo de células pigmentarias pero ningún otro tipo de estructura ocular (figura 27I). En el caso de los embriones que presentaron anoftalmia, presentaron una clara falta de estructuras oculares como la copa o lente, pudiéndose distinguir solo el tallo óptico emergiendo desde el diencefalo (figura 27H).

La aparición de defectos oculares en aquellos embriones procedentes de madres diabéticas sugiere que la diabetes altera el desarrollo de las estructuras oculares.

### 1.2. Expresión de los componentes de la vía Wnt-PCP durante el desarrollo del ojo.

La vía de señalización Wnt-PCP se ha visto implicada en el desarrollo del ojo, especialmente en la formación de la lente ((Chen et al., 2008; Lee et al., 2006; Sugiyama et al., 2010) y revisado por (Poliakov and Wilkinson, 2006)). Esto podría indicar que alteraciones en esta vía podrían ser la causa de las malformaciones oculares observadas en los embriones de madres diabéticas. Los defectos oculares se observaron entre los estadios embrionarios E11 y E14, aunque probablemente su origen se encuentre en estadios más tempranos en los que las estructuras comienzan a aparecer (E8.5 a E9.5). Para analizar la implicación de esta vía en los estadios tempranos del desarrollo ocular, decidimos estudiar el patrón de expresión de algunos de los genes más importantes de la vía Wnt-PCP en embriones en edad gestacional E9'5, ya que en este momento pueden reconocerse las estructuras del ojo en desarrollo. De esta forma se analizó el patrón de expresión de los siguientes elementos de la vía Wnt-PCP:



**Figura 28. Expresión de los elementos de la vía Wnt-PCP durante el desarrollo ocular.**

Localización mediante inmunofluorescencia de Vangl2 en criosecciones transversales de la cabeza de un embrión E9'5 (A). Hibridación *in-situ* en embriones de E9'5 mostrando la distribución del mRNA en secciones de vibratomo de: *Wnt5a* (B), *Glypican4* (C) y *Daam1* (D). Tinción de X-gal para detectar *Daam1* en la cabeza de un embrión *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> a E12.5 (E). Vesícula óptica (cabeza de flecha roja), tallo óptico (flecha roja), ectodermo de superficie (doble cabeza de flecha), plexo vascular perióptico (asterisco blanco), lente (L), retina neural (asterisco negro), epitelio pigmentado de la retina (cabeza flecha negra) y nervio óptico (flecha negra). Barra escala: 100 μm (A, E), 1000 μm (B, aplicable a C,D)

- Vangl2, proteína transmembrana que pertenece al núcleo de la vía PCP (Gao et al., 2011; Montcouquiol et al., 2006). Debido a que en la hibridación *in-situ* no se obtuvo señal de *Vangl2* en el ojo, decidimos analizar el patrón de expresión de Vangl2 mediante inmunohistoquímica.

Esta proteína fue detectada en la zona apical de la vesícula óptica, indicando una posible actividad de Vangl2 en estas células (figura 28A).

- *Wnt5a*, proteína de unión al receptor *Frizzled* exclusiva de la vía Wnt-PCP. La expresión del mRNA se detectó en el ectodermo de superficie, de donde deriva la placa de la lente, y en el plexo vascular (figura 28B).

- Glypican 4 pertenece a la familia de los proteoglicanos de heparán sulfato que se encuentran en la superficie celular y que interaccionan con ligandos de la vía Wnt-PCP como son *Wnt5a* o *Wnt11*, además se ha descrito en *Xenopus* que actúa como regulador positivo de esta vía (Ohkawara et al., 2003). Su expresión se detectó en el neuroepitelio del futuro telencéfalo, en el tallo óptico y en la copa óptica (figura 28C).

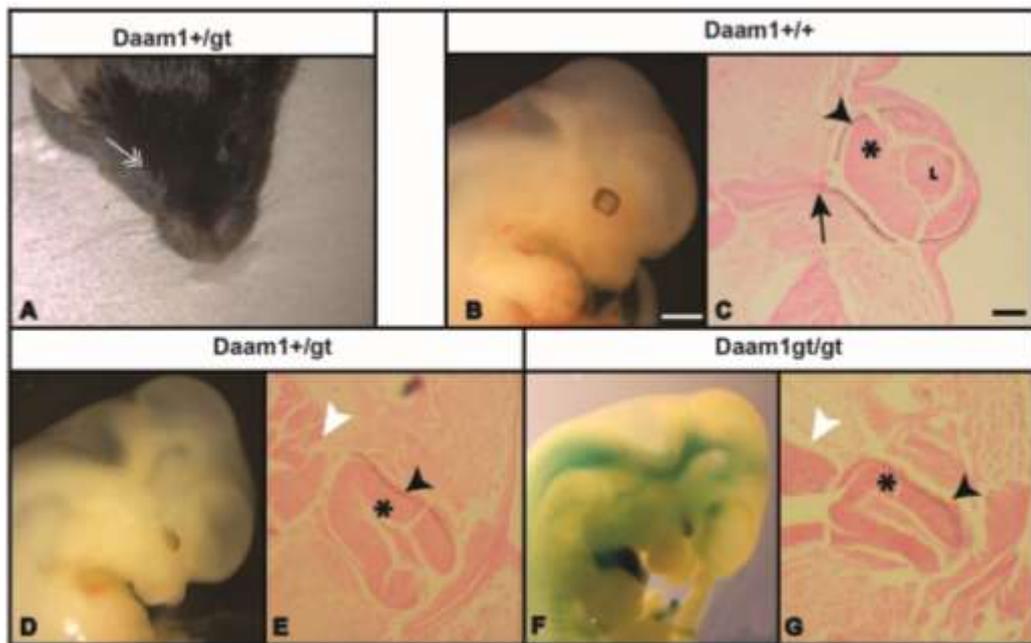
- *Daam1*: Se detectó en la vesícula óptica, especialmente en la región dorsal, así como en la placa de la lente. Además se observó expresión en el tallo óptico y en el neuroepitelio del futuro diencefalo. Se ha descrito una implicación de *Daam1* en el desarrollo del ojo en *Xenopus* (Lee et al., 2006) y se sabe que es uno de los genes alterados por la diabetes materna (Pavlinkova et al., 2009), por todo esto, unido a los resultados obtenidos en el análisis del patrón de expresión de *Daam1*, decidimos analizar la expresión de *Daam1* en estadios de desarrollo más tardíos. En embriones en edad gestacional de E12'5 *Daam1* se detectó en el epitelio cuboidal de la capsula de la lente, en el nervio óptico y en las capas pigmentaria y nerviosa de la retina (figura 28D).

El patrón de expresión de estos genes en las etapas iniciales del desarrollo ocular sugiere que la vía Wnt-PCP juega un papel muy importante en el desarrollo del ojo.

### **1.3. Defectos oculares en mutantes de *Daam1* in vivo.**

Los mutantes de *Daam1* presentan un *gene trap* que disminuye la expresión del gen en vez de silenciarlo completamente, por lo que en análisis de RT-PCR se observa, en ocasiones, algo de expresión en los embriones homocigotos (Li et al., 2011). Estos mutantes son viables y fértiles, tanto los heterocigotos como un bajo porcentaje de los homocigotos. Durante el establecimiento de la línea en nuestro laboratorio, se detectaron ocasionalmente defectos oculares en ratones adultos *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> (3 ratones de un total de 42 *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> presentaron falta de uno de los dos ojos (anoftalmia asimétrica)). Decidimos analizar el desarrollo ocular en estadios más tempranos del desarrollo (E10.5 – E12.5) con el fin de identificar el origen de las

anomalías observadas en los ratones adultos. Los embriones obtenidos fueron analizados macroscópica e histológicamente.



**Figura 29. Defectos oculares producidos por la mutación de Daam1.** Adulto  $Daam1^{+/gt}$  que presenta defecto ocular (flecha blanca doble cabeza en A). Embrión E12.5  $Daam1^{+/+}$  con ojo normal (B) y su correspondiente sección transversal en parafina teñida con hematoxilina-eosina (C). Embrión E12.5  $Daam1^{+/gt}$  con microftalmia (D) y su correspondiente sección transversal en parafina teñida con hematoxilina-eosina (E). Embrión E12.5  $Daam1^{gt/gt}$  con microftalmia (F) y su correspondiente sección transversal en parafina teñida con hematoxilina-eosina (G). Principales estructuras oculares indicadas: Lente (L), nervio óptico (flecha negra), tallo óptico (cabeza de flecha blanca), retina neural (asterisco), epitelio pigmentario de la retina (cabeza flecha negra). Barras escala: 1000 $\mu$ m (B, aplicable a D y F); 100 $\mu$ m (C, aplicable a E y G).

	Ojos normales	Defectos oculares	Total defectos oculares	Total defectos oculares salvajes vs mutantes*.
<b>Embriones</b> <i>Daam1<sup>+/+</sup></i>	64	0	0/64 (0%)	0/107
<b>Adultos</b> <i>Daam1<sup>+/+</sup></i>	43	0	0/43 (0%)	
<b>Embriones</b> <i>Daam1<sup>+/gt</sup></i>	64	2	2/66 (3%)	6/127
<b>Embriones</b> <i>Daam1<sup>gt/gt</sup></i>	18	1	1/19 (5.3%)	
<b>Adultos</b> <i>Daam1<sup>+/gt</sup></i>	39	3	3/42 (7.1%)	

**Tabla 11. Defectos oculares observados en embriones *Daam1<sup>+/+</sup>*, *Daam1<sup>+/gt</sup>* y *Daam1<sup>gt/gt</sup>* procedentes de madres no diabéticas. \*Indica diferencia estadísticamente significativa entre los *Daam1<sup>+/+</sup>* en comparación con los mutantes *Daam1<sup>+/gt</sup>* y *Daam1<sup>gt/gt</sup>*. Test exacto de Fisher,  $p=0.033$ .**

#### a) Estudio macroscópico:

- Adultos *Daam1<sup>+/+</sup>*: No se observó ninguna anomalía ocular en estos ratones.
- Adultos *Daam1<sup>+/gt</sup>*: De los 42 adultos analizados, 3 presentaron anoftalmia asimétrica (7.1%; Figura 29A).
- Embriones *Daam1<sup>+/+</sup>*: Estos embriones no mostraron ninguna anomalía, presentando ambos globos oculares de un tamaño y morfología acorde a su edad gestacional. Alrededor del globo ocular se encontraba dispuesto de manera homogénea el tejido pigmentario, y en el centro se podía distinguir la lente (figura 29B).

- Embriones *Daam1<sup>+gt</sup>*: 2 de los 66 embriones analizados mostraron anomalías oculares. Uno de ellos mostró una anoftalmia asimétrica y el otro embrión presentó microftalmia (globo ocular de menor tamaño en comparación con los embriones *Daam1<sup>+/+</sup>*, figura 29D).
- Embriones *Daam1<sup>gt/gt</sup>*: En este grupo se observaron anomalías oculares en 1 de los 19 embriones analizados. Este embrión presentó microftalmia, además de un retraso en el desarrollo cuando se comparó con los embriones de su misma camada (figura 29F).

**b) Estudio histológico:** Los embriones fueron analizados histológicamente para obtener un estudio detallado de las anomalías observadas en el análisis macroscópico. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Embriones *Daam1<sup>+/+</sup>*: Así como se describió en los embriones control procedentes de hembras C57, los embriones *Daam1<sup>+/+</sup>* no presentaron ninguna anomalía ocular durante el análisis histológico, pudiéndose distinguir las estructuras principales como la copa óptica, las capas pigmentaria y neural de la retina, la lente y el tallo óptico (figura 29C).
- Embriones *Daam1<sup>+gt</sup>*: Los embriones que en el análisis macroscópico mostraron microftalmia, en el análisis histológico mostraron una malformación de la copa óptica ya que, en comparación con los embriones *Daam1<sup>+/+</sup>*, tenía un menor tamaño y su morfología era menos redondeada que en el caso de los embriones control. El tallo óptico de estos embriones era más ancho y corto haciendo que la estructura de la copa óptica se mantuviera más cercana al diencéfalo. Además, estos embriones no presentaban el estrechamiento característico del área del ectodermo superficial que invagina para dar lugar a la lente, de forma que esta no podía distinguirse y presentaban en su lugar tejido mesenquimático (figura 29E). En el caso de los embriones que macroscópicamente presentaron anoftalmia el estudio histológico reveló una estructura muy rudimentaria en la que no se distinguían estructuras oculares de forma clara.
- Embriones *Daam1<sup>gt/gt</sup>*: En el análisis histológico del embrión que presentó microftalmia se observó una morfología muy similar a la observada en los embriones *Daam1<sup>+gt</sup>*, aunque algo más exacerbada (figura 29G).

Estos resultados, junto con lo observado al analizar el patrón de expresión de *Daam1*, indican la importancia de este gen y, por tanto, de la vía Wnt-PCP, durante el desarrollo ocular.

#### 1.4 Defectos oculares en mutantes de *Daam1* de madres diabéticas in vivo.

Debido a que los defectos observados en los embriones mutantes para *Daam1* eran muy similares a los observados en el análisis del efecto de la diabetes en la cepa C57, decidimos estudiar la combinación de ambos factores durante el desarrollo embrionario. Para este estudio se utilizó el mismo procedimiento que en el análisis del efecto de la diabetes en C57, se indujo la diabetes a 7 hembras mediante inyecciones consecutivas de STZ a baja concentración, y se mantuvo un grupo control formado por 4 hembras a las cuales no se les indujo la diabetes. Una vez que las hembras inducidas mostraron valores altos de glucosa en sangre, se procedió al cruce de las hembras con machos *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> para obtener embriones a una edad gestacional de E10.5-E12.5. Se realizó un análisis macroscópico de los embriones seguido por un estudio histológico de los mismos.

	Madres control	Madres diabéticas
Embriones <i>Daam1</i> <sup>+/<i>+</i></sup> con defectos oculares	0/20 (0%)	7/41 (17.1%)
Embriones <i>Daam1</i> <sup>+/<i>gt</i></sup> con defectos oculares	1/11 (9.1%)	3/11 (27.3%)

**Tabla 12. Defectos oculares observados en embriones *Daam1*<sup>+/*+*</sup> y *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> procedentes de madres control y madres diabéticas.**

##### a) Estudio macroscópico:

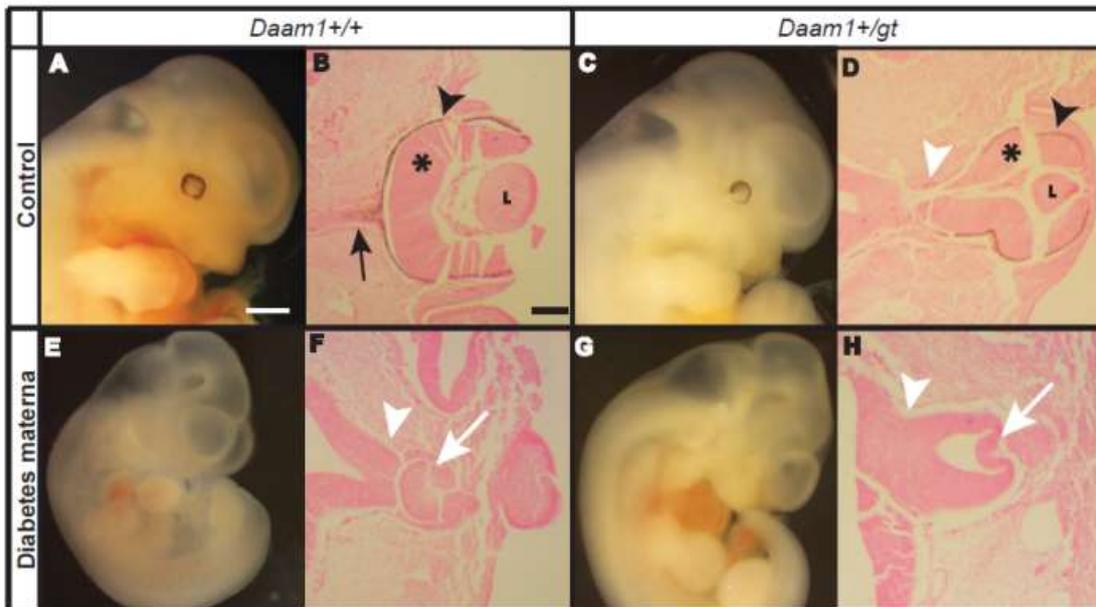
##### i. Grupo hembras control:

- Embriones *Daam1*<sup>+/*+*</sup>: No se observó ningún tipo de defecto en estos embriones. Todos ellos mostraron una morfología y estado de desarrollo acorde a la edad gestacional (figura 30A).
- Embriones *Daam1*<sup>+/*gt*</sup>: En este grupo 1 de los 11 embriones obtenidos (9.1%) mostró microftalmia asimétrica (figura 30C). El resto de los embriones obtenidos en este grupo no mostraron ningún defecto y su estado de desarrollo era acorde a la edad gestacional.

##### ii. Grupo hembras diabéticas:

- Embriones *Daam1*<sup>+/*+*</sup>: 7 de los 41 embriones extraídos (17.1%) presentaron defectos oculares incluyendo microftalmia y anoftalmia (figura 30E).

- Embriones *Daam1*<sup>+/*gt*</sup>: en este grupo 3 de los 11 embriones obtenidos (27.3%) presentaron defectos oculares como microftalmia y anoftalmia (figura 30G).



**Figura 30. Defectos oculares producidos por la combinación de mutaciones en *Daam1* y la diabetes materna.** Embriones E12.5: *Daam1*<sup>+/*+*</sup> de madre control con ojos normales (A), *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> de madre control con defecto ocular (C), *Daam1*<sup>+/*+*</sup> de madre control con anoftalmia (E) y *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> con anoftalmia (G). Secciones de parafina cortadas transversalmente y teñidas con hematoxilina-eosina correspondientes a cada embrión (B, D, F y H). Principales estructuras oculares indicadas: lente (L), retina neural (asterisco), epitelio pigmentario de la retina (cabeza de flecha negra), nervio óptico (flecha negra), copa óptica rudimentaria (flecha blanca), tallo óptico rudimentario (cabeza flecha blanca). Barras de escala: 1000µm (A; aplicable a C, E y G); 100µm (B; aplicable a D, F y H).

## b) Estudio histológico:

### i. Grupo hembras control:

- Embriones *Daam1*<sup>+/*+*</sup>: Del mismo modo que se describió en los embriones del grupo control del estudio del efecto de la diabetes y de la mutación de *Daam1* por separado, los embriones *Daam1*<sup>+/*+*</sup> no presentaron ningún tipo de malformación en el análisis histológico. A nivel ocular todas las estructuras propias de la edad gestacional estaban presentes y bien formadas (figura 30B).
- Embriones *Daam1*<sup>+/*gt*</sup>: En este caso el embrión al que se le detectó microftalmia asimétrica en el estudio macroscópico, en el análisis histológico se pudieron reconocer todas las

estructuras oculares pero claramente afectadas. El tamaño de la copa óptica era menor en comparación con la del grupo control, además el tallo óptico estaba engrosado. Por otro lado, aunque se podía distinguir presencia de la lente, esta no tenía una morfología característica, si no que era más pequeña y menos redondeada que lo observado en los embriones *Daam1<sup>+/+</sup>* (figura 30D comparada con 30B).

## ii. Grupo hembras diabéticas:

- Embriones *Daam1<sup>+/+</sup>*: en el caso de los embriones que en el estudio macroscópico mostraron anoftalmia, en el estudio histológico se podían observar solo algunas estructuras ópticas pero muy rudimentarias. Estos embriones no presentaban nervio óptico ni lente, y la copa óptica a penas se había desarrollado y se mantenía unida al diencéfalo (figura 30F). Los embriones que en el estudio macroscópico mostraron microftalmia presentaron una histología en la que podían observarse las estructuras oculares de menor tamaño y con una morfología afectada en comparación con los embriones control.
- Embriones *Daam1<sup>+/gt</sup>*: En este grupo, los embriones que presentaron anoftalmia en el estudio macroscópico, a nivel histológico no se pudo distinguir ninguna estructura óptica, siendo el fenotipo a este nivel mucho más exacerbado que el observado en los embriones *Daam1<sup>+/+</sup>* que presentaban el mismo defecto a nivel macroscópico (figura 30H). En el caso de los embriones que presentaron microftalmia, en el análisis histológico mostraron defectos muy similares a los observados en los embriones *Daam1<sup>+/+</sup>* de madres diabéticas.

El fenotipo más severo se obtuvo en los embriones *Daam1<sup>+/gt</sup>* procedentes de madres diabéticas, lo cual indica una interacción entre estos dos factores de riesgo en la inducción de defectos oculares. El hecho de que las embriopatías inducidas por la diabetes materna presenten un sinergismo con el genotipo de *Daam1* sugiere que la hiperglucemia materna afecta a la vía Wnt-PCP provocando la exacerbación de las anomalías oculares inducidas por la diabetes.

### 1.5 Otras embriopatías observadas

La diabetes gestacional se considera un factor de riesgo en la aparición de malformaciones congénitas en la descendencia, entre las que destacan los defectos del tubo neural y del sistema cardiovascular. Además, como se ha comentado a lo largo de este capítulo, la diabetes

provoca alteraciones en la expresión de los genes de la vía Wnt-PCP, la cual está implicada en la formación del tubo neural y del corazón. Se ha descrito que las mutaciones en esta vía provocan defectos del tubo neural como craneoquisquisis así como, a nivel cardíaco, dan lugar a problemas en la alineación de las arterias con los ventrículos (ej. doble salida del ventrículo derecho, DORV), defectos en el septo ventricular y afectación de la maduración cardíaca. Por todo ello decidimos analizar la presencia de defectos del tubo neural y del corazón en los embriones obtenidos en nuestro estudio. De esta forma se observó un pequeño porcentaje de defectos del tubo neural, así como del corazón. Estos últimos fueron hallados al realizar el análisis histológico de los embriones obtenidos.

#### **a) Análisis macroscópico (estudio defectos del tubo neural):**

##### **i. Grupo hembras control:**

- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: No se observó ningún tipo de defecto en estos embriones.
- Embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>: No se observaron defectos en estos embriones.

##### **ii. Grupo hembras diabéticas:**

- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: En este grupo se observaron defectos del tubo neural en 9 de los 31 embriones analizados (8/31 presentaron exencefalia y 1/31 retraso en el cierre del neuroporo posterior (espina bífida)).
- Embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>: En este grupo 2 de los 16 embriones analizados presentó algún tipo de defecto del tubo neural (1/16 presentó exencefalia y 1/16 craneoquisquisis).

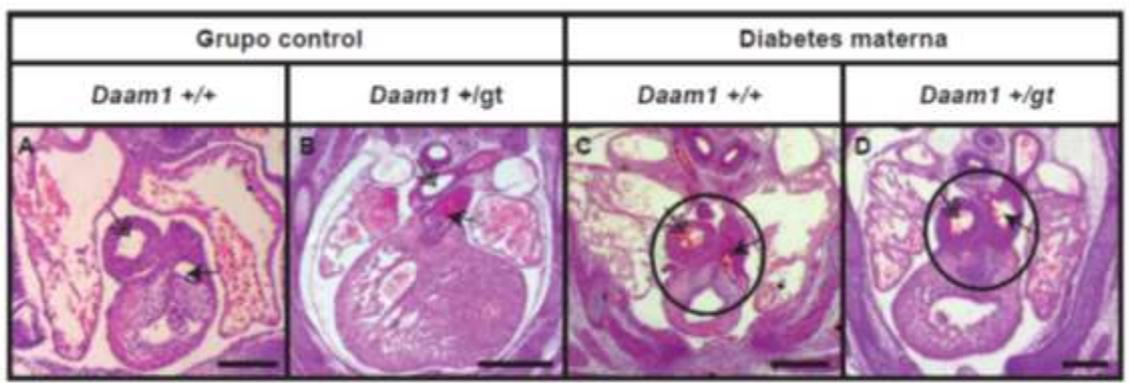
#### **b) Análisis histológico (Estudio defectos cardiovasculares):**

##### **i. Grupo hembras control:**

- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: A nivel cardíaco no se observó ninguna alteración. Los embriones analizados presentaban el miocardio ventricular bien desarrollado, así como las aurículas y arterias mostraban una morfología normal (Figura 31A).
- Embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>: Al igual que los embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>, los embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup> no mostraron ninguna alteración cardíaca. Presentaron una morfología normal de todas las estructuras acorde a la edad gestacional estudiada (Figura 31B).

## ii. Grupo hembras diabéticas:

- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: Se observaron malformaciones cardíacas en 4 de los 5 embriones analizados, 2/4 presentaron defectos en el *septum* y 2/4 presentaban doble salida en el ventrículo derecho (DORV por su acrónimo en inglés *double outlet right ventricle*; Figura 31C).
- Embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>: Se observaron malformaciones cardíacas en 4 de los 4 embriones analizados, 1/4 presentó defectos en el septum y 3/4 DORV (Figura 31D).



**Figura 31. Análisis histológico de los defectos cardíacos producidos por la mutación de *Daam1* en combinación con la diabetes materna.** Secciones transversales de parafina teñidas con hematoxilina y eosina de embriones E13-14. Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> y *Daam1*<sup>+/gt</sup> de madre control (A y B respectivamente). Embriones E12.5 *Daam1*<sup>+/+</sup> y *Daam1*<sup>+/gt</sup> de madre diabética (C y D respectivamente). Estructuras señalizadas: DORV (círculo en paneles C y D); tronco de la arteria aorta (flecha doble cabeza), tronco arteria pulmonar (flecha negra). Barras de escala: A: 200  $\mu$ m; B: 500  $\mu$ m; C y D: 250  $\mu$ m

El hecho de haber observado en los embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup> de madres diabéticas presencia de craneoraquisquisis así como el desarrollo de DORV, defecto solamente descrito en embriones *Daam1*<sup>gt/gt</sup>, indica que existe una interacción entre la diabetes y la vía Wnt-PCP.

### 1.6 Efectos embrionarios en mutantes de *Daam1* expuestos a elevados niveles de glucosa *in vitro*

Para estudiar más en profundidad la interacción entre la diabetes y la desregulación de la vía Wnt-PCP durante el desarrollo ocular, decidimos utilizar la técnica de cultivo embrionario. Para

ello embriones en estadio gestacional E9 fueron expuestos en cultivo durante 7h a 20mM de glucosa y se compararon con embriones que se mantuvieron en condiciones control.

	Condiciones Control	20mM Glucosa
Embriones <i>Daam1</i> <sup>+/+</sup> con defectos oculares	0/19 (0%)	3/22 (13.6%)
Embriones <i>Daam1</i> <sup>+/gt</sup> con defectos oculares	0/5 (0%)	5/14 (35.7%)

**Tabla 13. Defectos oculares observados en embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> y *Daam1*<sup>+/gt</sup> en presencia y ausencia de glucosa *in vitro*.**

#### a) Estudio macroscópico.

##### i. Grupo control:

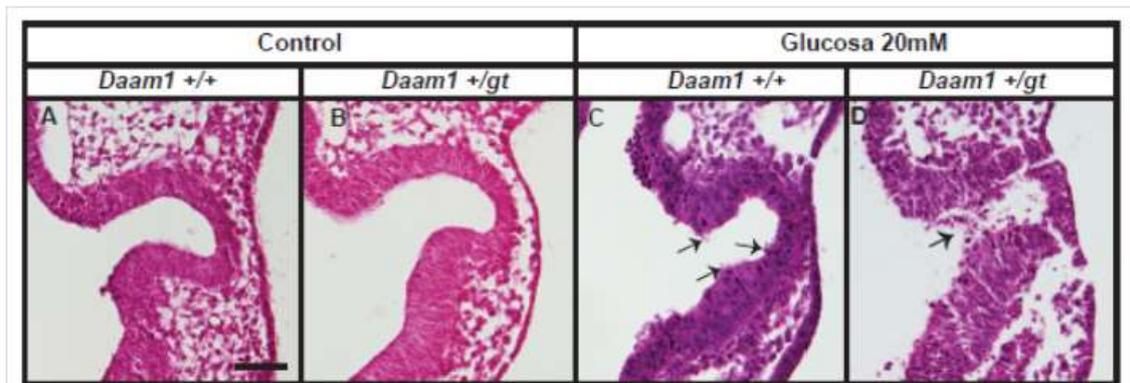
- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: Estos embriones se desarrollaron con normalidad mostrando, al finalizar el cultivo, una morfología y tamaño acorde a la edad gestacional (n=19).
- Embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>: Así como en el caso de los embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>, estos embriones tampoco mostraron ningún tipo de anomalía (n=5).

##### ii. Grupo expuesto a glucosa:

- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: En este grupo 3 de los 22 embriones (13.6%) obtenidos mostraron un retraso en el desarrollo de una de las vesículas ópticas con respecto a la otra, aunque su estado de desarrollo y morfología general era acorde a su edad gestacional.
- Embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>: 5 de los 14 embriones (35.7%) de este grupo presentaron algún tipo de malformación ocular evidente (retraso en el desarrollo de una o ambas vesículas ópticas o incluso falta de una o ambas vesículas ópticas). Así como se observó en el caso de los embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> expuestos a glucosa, estos embriones presentaban un estado de desarrollo y morfología general acorde a su edad gestacional.

**b) Estudio histológico:** Antes de realizar el estudio histológico se establecieron una serie de criterios para determinar las características propias de una vesícula óptica normal. De este modo aquellos embriones que no presentaran 2 o más de las siguientes características presentarían una malformación ocular. Los criterios de clasificación establecidos fueron:

1. La vesícula óptica se encuentra separada del diencefalo.
2. El diámetro del lumen de la vesícula óptica comienza a aumentar mientras que el diámetro del lumen del tallo óptico disminuye progresivamente.
3. Tanto la vesícula óptica como el tallo óptico presentan un epitelio bien organizado a nivel celular.



**Figura 32. Análisis histológico del desarrollo ocular en embriones expuestos a 20mM de glucosa *in vitro*.** Cortes transversales en parafina teñidos con Hematoxilina y Eosina de embriones control (A y B) y embriones expuestos a glucosa (C y D). Flechas negras en C y D indican disgregación celular en la vesícula óptica. Barra de escala en A: 100 $\mu$ m aplicable al resto.

#### i. Grupo control:

- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: Todos los embriones pertenecientes a este grupo mostraron una morfología ocular que cumplía los criterios estipulados para definir una vesícula óptica desarrollada normalmente (figura 32A).
- Embriones *Daam1*<sup>+/-</sup>: Así como se determinó en el análisis macroscópico, en el análisis histológico de estos embriones no se observó ninguna alteración morfológica ya que todos cumplían los criterios estipulados para clasificar el desarrollo de la vesícula óptica como normal, aunque si se detectó, en un pequeño porcentaje de estos embriones, un ligero retraso en el desarrollo de una de las vesículas ópticas en comparación con la otra (figura 32B).

**ii. Grupo expuesto a glucosa:**

- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: Los embriones que ya en el estudio macroscópico mostraron defectos oculares, a nivel histológico presentaron defectos morfológicos importantes de la vesícula óptica determinados por una evidente desorganización celular de la zona apical del neuroepitelio, presentando incluso algunas células disgregadas. Por otro lado estos embriones presentaron la vesícula óptica más redondeada y pequeña que las observadas en los embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> cultivados en condiciones control (figura 32C).
- Embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>: El fenotipo presentado por estos embriones en el estudio histológico era similar al presentado por los embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> cultivados en presencia de glucosa, pero más exacerbado. El tallo óptico se encontraba muy poco desarrollado, el epitelio de la vesícula óptica estaba muy desorganizado y había gran cantidad de células disgregadas en el interior del lumen (figura 32D).

Estos resultados indican que la diabetes parece afectar al desarrollo temprano de la vesícula óptica. Además, el fenotipo más severo se observó en los embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup> expuestos a concentraciones elevadas de glucosa, lo que apoya la hipótesis de la existencia de una interacción entre la diabetes y la vía Wnt-PCP en el desarrollo de defectos oculares.

**1.7 Estudio del efecto de la glucosa sobre la vía Wnt-PCP y el citoesqueleto durante el desarrollo ocular**

Como se ha observado en el análisis histológico de los embriones cultivados en presencia de glucosa, la vesícula óptica muestra una clara desorganización celular. La vía Wnt-PCP está implicada en la organización del citoesqueleto, por lo que alteraciones en esta vía dan lugar a una desorganización del citoesqueleto que conlleva pérdida de la polaridad celular y malformación tisular (Revisado por (Simons and Mlodzik, 2008)). Para determinar si la elevada concentración de glucosa induce malformaciones oculares a través de la alteración de los elementos de la vía Wnt-PCP, estudiamos la expresión de dos de los miembros de esta vía (*Daam1* y *Vangl2*), así como de los componentes del citoesqueleto, actina y miosina, en los embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> cultivados en presencia de alta concentración de glucosa.

**i. Expresión de *Vangl2*:**

- a) Análisis inmunohistoquímico: en los embriones control este análisis reveló una localización de *Vangl2* en la zona más apical de las células del epitelio de la vesícula óptica (Figura 33A). Los

embriones expuestos a glucosa mostraron una clara disminución de la expresión de *Vangl2*, siendo además el patrón mucho más difuso, en comparación con el obtenido en los embriones control (comparar paneles E y A en figura 33).

b) RT-PCR: se realizó una RT-PCR en la que se compararon 4 embriones control con 5 embriones expuestos a glucosa. 3 de los embriones expuestos mostraron una pequeña disminución en la expresión de *Vangl2* (media *fold-change*= 0.98) en comparación con los embriones control (media *fold-change*=2.14). Los otros dos embriones presentaron una reducción más débil de la expresión de *Vangl2* (media *fold-change*=1.37) en comparación con los embriones control. A pesar de que estos valores no resultaron estadísticamente significativos (figura 33J), se puede observar una tendencia a la disminución de la expresión de *Vangl2* en condiciones de diabetes.

#### ii. Expresión de *Daam1*:

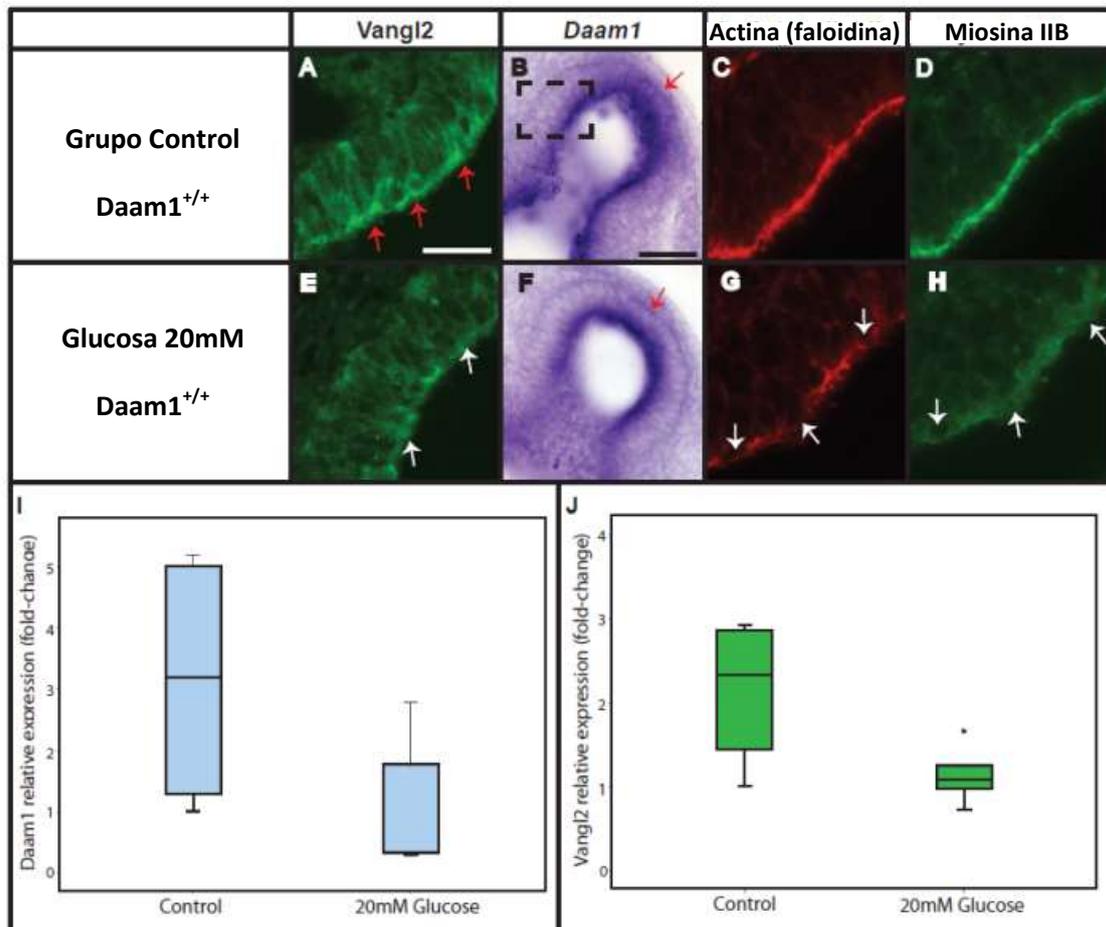
a) Análisis *hibridación in-situ*: En los embriones control se pudo observar que el patrón de expresión de *Daam1* se encontraba principalmente concentrado en la vesícula óptica, sobre todo en la zona que contacta con el epitelio superficial para inducir la invaginación de la lente (figura 33B). En los embriones expuestos a glucosa la expresión de *Daam1* disminuyó claramente en la zona distal de la vesícula óptica cuando se comparó con la expresión obtenida en los embriones control (comparar paneles F y B en figura 33).

b) RT-PCR: En este análisis, los 3 embriones expuestos a glucosa que presentaron una disminución en la expresión de *Vangl2* mostraron una clara disminución en la expresión de *Daam1* (media *fold-change*=0.32) en comparación con los embriones control (media *fold-change*=3.14). Los otros dos embriones expuestos a glucosa, al igual que ocurrió en el análisis de *Vangl2*, mostraron una menor disminución en la expresión de *Daam1* (media *fold-change*=2.27). De nuevo estos datos no resultaron ser estadísticamente significativos (figura 33I), pero mostraron una tendencia a la disminución de la expresión de *Daam1* en condiciones de diabetes.

iii. **Expresión de Actina:** En los embriones cultivados en condiciones control la actina se pudo detectar en la zona apical de las células de la vesícula óptica formando un cordón continuo por toda la zona interior de la vesícula (Figura 33C). En los embriones expuestos a glucosa el

cordón de actina estaba claramente desorganizado y era discontinuo, presentando zonas en las que no se detectaba expresión de actina (comparar paneles G y C en figura 33).

**iv. Expresión de Miosina:** Del mismo modo que la actina, la miosina se detectó en la parte interna de la vesícula óptica formando un cordón continuo (figura 32D). Los embriones expuestos a glucosa presentaron una clara reducción de la expresión de la miosina mostrando un aspecto discontinuo del cable de miosina con zonas sin expresión (comparar paneles H y D en figura 33).



**Figura 33. Análisis de la expresión de los elementos de la vía Wnt-PCP durante desarrollo ocular en embriones expuestos a 20mM de glucosa *in vitro*.** Cortes transversales en criosecciones (A, C, D, E, G y H) o secciones de vibratomo (B, F) de embriones control (A-D) y embriones expuestos a glucosa (E-H). Expresión de Vangl2 (A, F), de mRNA de *Daam1* (B, G), de actina mediante tinción con faloidina (C, H) y de Miosina (D, I). Flechas blancas en F, H e I indican discontinuidad en la señal de la inmunohistoquímica. Flechas rojas en A indican señal de Vangl2 en la parte apical de las células de la vesícula óptica. Barras de escala: 25µm (A, aplicable a C-F y H, I), 50µm (B, aplicable a G).

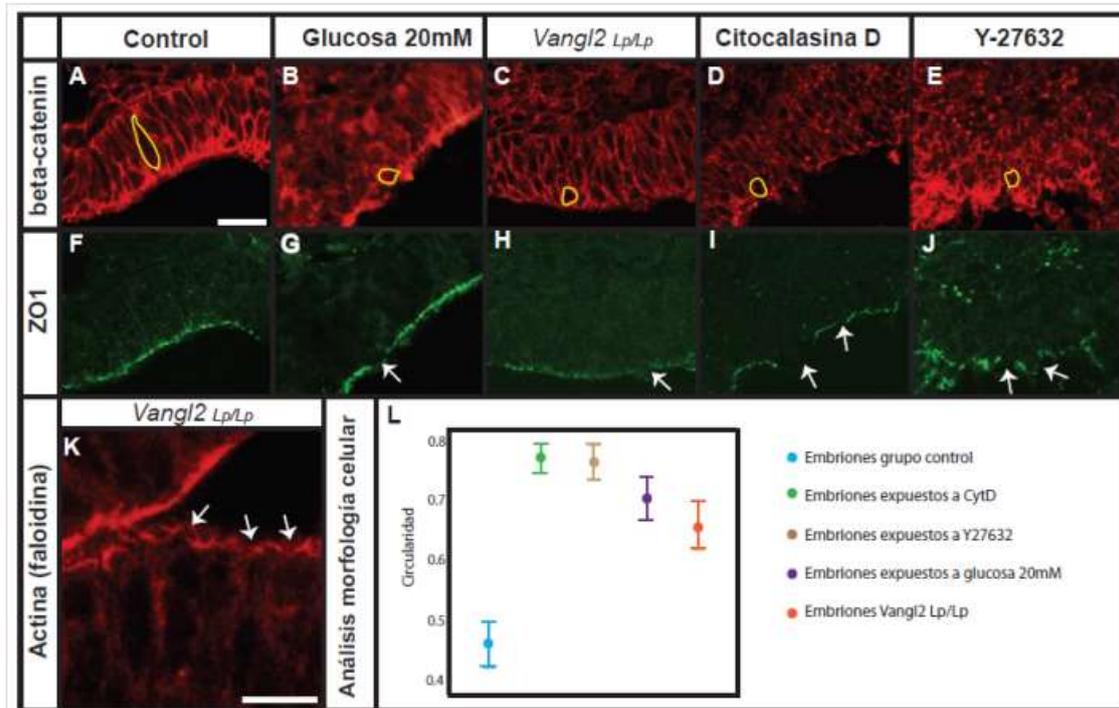
Estos resultados indican que la diabetes afecta la expresión de componentes importantes de la vía Wnt-PCP lo que podría causar la desorganización del citoesqueleto de las células de la vesícula óptica provocando los defectos oculares descritos a lo largo de este estudio.

### **1.8 Inducción de defectos oculares por afectación de la vía Wnt-PCP in vitro**

La vía Wnt-PCP controla la organización del citoesqueleto mediante la regulación de la polimerización de los filamentos de actina. Para verificar que la alteración en la morfología celular de la vesícula óptica observada en los embriones expuestos a glucosa podría ser consecuencia de un malfuncionamiento de la vía Wnt-PCP, decidimos analizar los embriones mutantes de *Vangl2* y aquellos tratados con citocalasina-D (inhibidor de la polimerización de los microfilamentos de actina) e Y-27632 (inhibidor de ROCK, miembro de la vía Wnt-PCP). En todos los embriones se realizó un análisis inmunohistoquímico mediante la tinción con  $\beta$ -catenina y ZO1, así como un análisis de la circularidad celular. La circularidad define cuanto se aproxima el ancho y largo de una célula a un círculo. Para llevar a cabo el análisis de circularidad se midió la superficie apical de las células de la vesícula óptica de cada condición:

- Embriones control, se midieron 200 células en 6 criosecciones de 50  $\mu\text{m}$  de 4 embriones pertenecientes a 2 camadas diferentes.
- Embriones expuestos a glucosa, se midieron 100 células en 10 criosecciones de 10  $\mu\text{m}$  pertenecientes a 5 embriones de 2 camadas diferentes.
- Embriones expuestos a Citocalasina-D, se midieron 280 células en 5 criosecciones de 50  $\mu\text{m}$  de 5 embriones pertenecientes a 2 camadas diferentes.
- Embriones expuestos a Y-27632, se midieron 150 células en 4 criosecciones de 50  $\mu\text{m}$  de 4 embriones pertenecientes a 2 camadas diferentes.
- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup>, se midieron 150 células en 3 criosecciones de 50  $\mu\text{m}$  de 3 embriones pertenecientes a 2 camadas diferentes.

Al menos en 10 células por criosección de cada embrión fueron analizadas con el software ImageJ (National Institutes of Health). La circularidad se calcula utilizando la siguiente fórmula:  $\text{circularidad} = 4\pi (\text{área}/\text{perímetro}^2)$ , donde un círculo perfecto tiene un valor de circularidad = 1.



**Figura 34. Análisis del efecto de la alteración de elementos de la vía Wnt-PCP sobre el desarrollo ocular.** Cortes transversales en criosecciones de embriones control (A y F) y embriones expuestos a: glucosa (B y G), citocalasina D (C y I), Y-27632 (E y J). Embrión *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup> (C, H y K). Expresión de beta-catenina (A-E), ZO1 (F-J) y faloidina (K). Gráfica de la circularidad presentada por las células de la vesícula óptica en cada condición de cultivo (L). Las células fueron trazadas individualmente como se representa mediante el trazo amarillo en cada panel. Flechas blancas en G-J indican discontinuidad en la señal de ZO1 a lo largo de la vesícula óptica. Barras de escala: 25µm (A, aplicable B-J); 12.5µm (K).

#### i. Expresión de $\beta$ -catenina y ZO1:

- Embriones control: en estos embriones la  $\beta$ -catenina reveló que las células que forman la vesícula óptica mostraban una morfología alargada (figura 33L) en el eje apico-basal con constricciones en la zona apical y basal. ZO1 presentó una distribución uniforme a lo largo de toda la luz de la vesícula óptica (figuras 34A y F).

- Embriones expuestos a glucosa: en la inmunohistoquímica con  $\beta$ -catenina se pudo observar que las células de la vesícula óptica presentaban una morfología completamente diferente a la observada en los embriones control, en este caso las células eran pequeñas y redondeadas. Además el patrón de ZO1 no presentaba la misma continuidad a lo largo de toda la luz de la

vesícula óptica, si no que podían observarse la presencia de zonas sin expresión de ZO1 (figuras 34B y G).

- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup>: Estos embriones mostraron una alteración de la morfología del epitelio así como una disminución en la expresión de ZO1 con zonas de discontinuidad a lo largo de la luz de la vesícula óptica (figuras 34C y H).

- Embriones expuestos a citocalasina-D: En estos embriones, en comparación con lo descrito en los embriones que fueron cultivados en condiciones control, el patrón de  $\beta$ -catenina reveló una clara alteración en la morfología celular y del tejido de la vesícula óptica, ya que se encontraba muy desorganizado y disgregado (figura 33D). ZO1 mostró una clara disminución en su expresión así como una clara interrupción de la expresión en numerosas zonas a lo largo de toda la vesícula óptica (figura 34I).

- Embriones expuestos a Y-27263: El efecto observado en los embriones expuestos a este inhibidor era aún más acusado que el observado en presencia de citocalasina-D. Se observó una alteración de la morfología celular y la expresión de ZO1 no mostró ningún patrón claro, lo que denotaba la clara desorganización observada del epitelio de la vesícula óptica (figuras 34E y J).

## ii. Análisis de la circularidad:

- Embriones control: Como se ha descrito en el análisis de expresión de  $\beta$ -catenina, las células de la vesícula óptica presentaban una morfología alargada correspondiente a un valor de circularidad de  $0.49 \pm 0.048$  (figura 34L).

- Embriones expuestos a glucosa: el valor de circularidad presentado por las células de la vesícula óptica en este grupo de embriones fue de  $0.71 \pm 0.049$ ,  $P < 0.001$  (figura 34L).

- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup>: Estas células, al igual que en el resto de grupos expuestos a las diferentes condiciones de estudio mostraron una morfología redondeada ( $0.65 \pm 0.05$ ,  $P < 0.0001$ ) y con un área menor que lo observado en los embriones control (figura 34L).

- Embriones expuestos a citocalasina-D: En comparación con lo observado en los embriones control, las células de la vesícula óptica de estos embriones eran redondeadas y pequeñas ( $0.78 \pm 0.041$ ,  $P < 0.0001$ ; figura 34L).

- Embriones expuestos a Y-27263: De nuevo las células de la vesícula óptica en los embriones tratados presentaban una morfología redondeada ( $0.78 \pm 0.048$ ,  $P < 0.0001$ ) y un área menor en comparación con las células del resto de grupos estudiados (figura 34L).

**iii. Expresión de actina:** En los embriones *Vangl2<sup>Lp/Lp</sup>* también se estudió el patrón de actina y se pudo observar un cordón discontinuo de expresión a lo largo de la vesícula óptica (figura 34K).

Estos resultados muestran que la alteración de la vía Wnt-PCP da lugar a alteraciones a nivel celular en la vesícula óptica muy similares a las observados en los embriones expuestos a elevadas condiciones de glucosa. Esto sugiere que la desregulación de la vía Wnt-PCP por la diabetes materna puede ser la causa de la aparición de defectos oculares.

### **1.9 Estudio del efecto de la glucosa sobre la expresión de Pax6**

Pax6 es un factor de transcripción que tiene un papel esencial durante el desarrollo del ojo. Se ha descrito que, ratones que presentan una mutación para Pax6, desarrollan microftalmia o incluso anoftalmia (Revisado por (Gehring, 2002)). Para determinar como la mutación de *Daam1* y la exposición a los altos niveles de glucosa podrían afectar a *Pax6* decidimos realizar un estudio inmunohistoquímico de la expresión de este gen en embriones cultivados en condiciones control y expuestos a glucosa. Además se estudió el patrón de expresión de ZO1 para detectar posibles anomalías en la polaridad y distribución celular del epitelio. Las imágenes fueron tomadas mediante un microscopio confocal y se analizaron las proyecciones máximas obtenidas a partir de los cortes para cada embrión analizado.

#### **ii. Grupo control:**

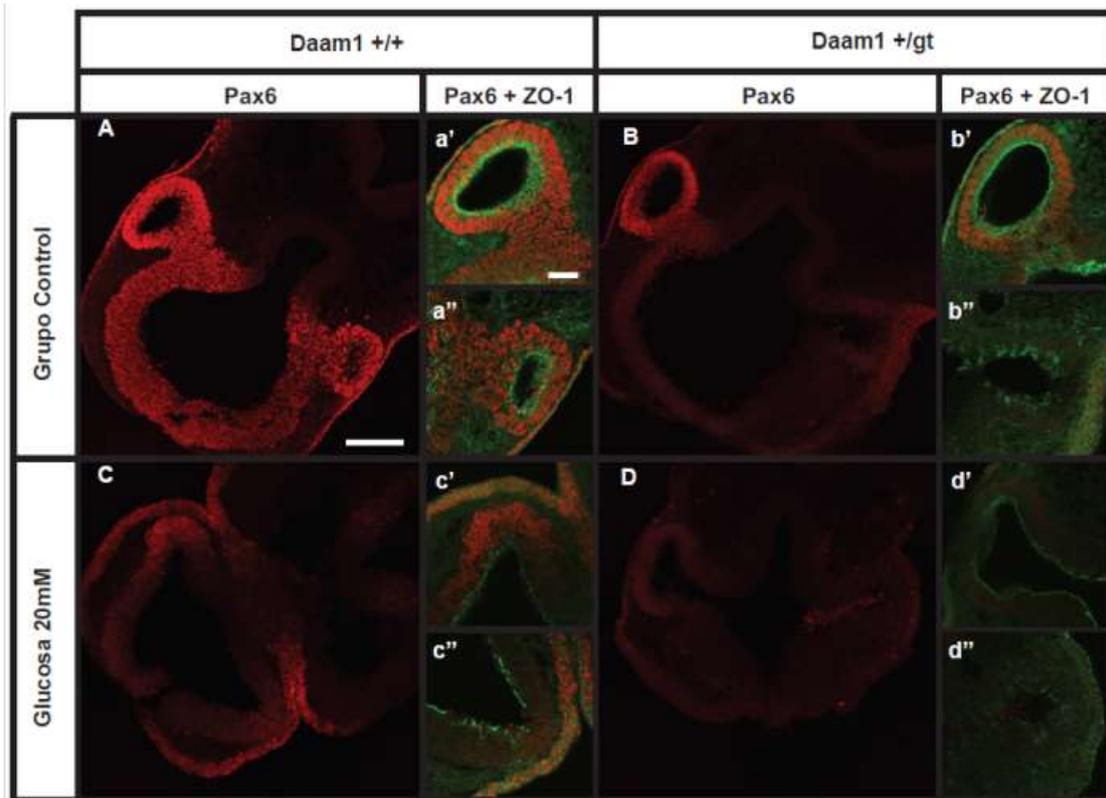
- Embriones *Daam1<sup>+/+</sup>*: La proyección máxima realizada a cada uno de estos embriones mostró una distribución homogénea de *Pax6* en toda la vesícula óptica y en el área del ectodermo de superficie (que dará lugar a la futura lente, figura 34A). Además estos embriones presentaron un epitelio bien estructurado como evidenciaba una expresión continua de ZO1 en todo el área apical del epitelio (figuras 35a' y 35a'').
- Embriones *Daam1<sup>+gt</sup>*: 2 de los 3 embriones analizados mostraron una notable disminución de la expresión de *Pax6* en una de las dos vesículas ópticas, mientras que la expresión en el ectodermo de superficie no se vio alterada (figura 34B). Además esta disminución de la

expresión iba acompañada de una alteración en el patrón de expresión de ZO1 (figuras 35b' y 35b'').

**ii. Grupo expuesto a glucosa:**

- Embriones *Daam1*<sup>+/+</sup>: En este caso 1 de los 4 embriones analizados reveló un patrón muy similar al observado en los embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup> ya que la expresión de Pax6 disminuía en una de las vesículas ópticas pero se veía inalterada en el ectodermo de superficie (figura 34C). De nuevo la expresión de ZO1 se vio alterada en las zonas en las que la expresión de Pax6 era menor (figuras 35c' y 35c'').
- Embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>: El fenotipo observado en los embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup> cultivados en condiciones control y en los embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> cultivados en presencia de glucosa, se vio exacerbado en 3 de los 4 embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup> cultivados con glucosa. La expresión de Pax6 estaba disminuida en ambas vesículas ópticas (figura 35D) y el patrón de expresión de ZO1 evidenció una clara desorganización del ectodermo de superficie (figuras 35d' y 35d'').

La disminución de la expresión de *Pax6* en embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> expuestos a altas concentraciones de glucosa, embriones *Daam1*<sup>+/gt</sup>, y bajo la combinación de ambos factores, podría reflejar el importante papel que la vía Wnt-PCP juega durante la especificación de las estructuras oculares.



**Figura 35. Estudio de la expresión de Pax6 durante el desarrollo ocular en embriones expuestos a glucosa *in vitro*.** Proyecciones máximas obtenidas en el microscopio confocal a partir de criosecciones transversales de 50µm de embriones a edad E9 expuestos a condiciones control (A, B) o a 20mM de glucosa (C,D). Las secciones de embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> (A,C) y *Daam1*<sup>+/-gt</sup> (B,D) fueron teñidas con Pax6 (rojo, A-D) y con ZO1 (a'-d' y a''-d''). Barras de escala: 1000µm (A, aplicable a B-D); 100µm (a', aplicable a b'-d' y a''-d''). Todas las imágenes fueron adquiridas usando los mismos parámetros en el microscopio confocal.

## **2. Estudio de la interacción entre mutantes *Vangl2* y la diabetes durante el desarrollo embrionario.**

En el capítulo 2 de esta tesis se observó que, así como había sido descrito anteriormente en la bibliografía (revisado por (Zabihi and Loeken, 2010)), la diabetes provoca el aumento de los defectos del tubo neural en la descendencia. A pesar de ello y como se ha descrito previamente, en el estudio realizado en con los mutantes de *Daam1* sólo obtuvimos un pequeño porcentaje, lo cual pudo deberse a la resistencia que presenta la cepa C57BL/6 a desarrollar defectos del tubo neural inducidos por diabetes (Pani et al., 2002). Por ello, para analizar la posible interacción entre la diabetes y las mutaciones de la vía Wnt-PCP durante el cierre del tubo neural, utilizamos otras cepas disponibles en nuestro laboratorio que presentaba la mutación de *Vangl2*.

### **2.1 Expresión de los componentes de la vía Wnt-PCP durante el cierre del neuroporo posterior**

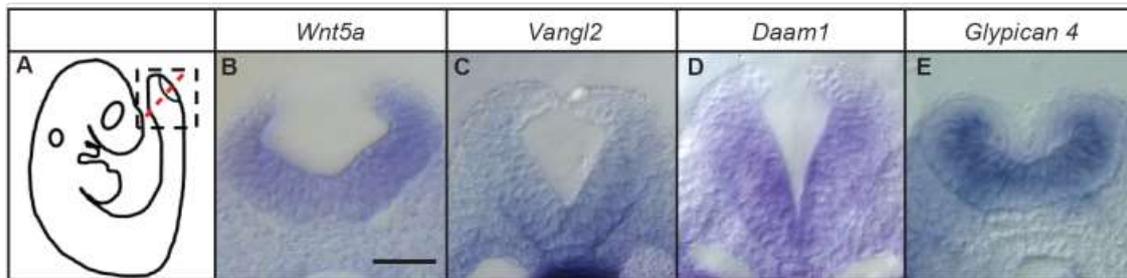
Diversos miembros de la vía de señalización Wnt-PCP han sido asociados con el correcto cierre del tubo neural. Mutaciones en esos genes han sido descritas como causa de defectos del tubo neural, como craneoquisquisis o espina bífida (Copp et al., 2003). A pesar de la asociación de las mutaciones en la vía Wnt-PCP con la aparición de espina bífida, los procesos celulares y moleculares que tienen lugar en la zona más caudal del tubo neural no han sido esclarecidos. En este apartado nos centramos en estudiar la implicación de la vía Wnt-PCP durante la última etapa de la neurulación primaria. En primer lugar decidimos determinar mediante hibridación *in-situ* que componentes de esta vía se expresaban en el tejido adecuado y en el momento específico del cierre del neuroporo posterior (PNP).

- *Wnt5a*: Se observó expresión en la zona lateral y dorsal de los pliegues neurales (figura 36B).

- *Vangl2*: Su expresión fue detectada en la zona lateral de los pliegues neurales del neuroporo posterior mientras que en la zona más dorsal de los pliegues neurales no se observó señal (figura 36C).

- *Daam1*: mostró un patrón similar al observado en *Vangl2*, concentrándose la señal únicamente en la zona lateral de los pliegues neurales del neuroporo posterior (figura 36D).

- *Glypican 4*: Se observó expresión en la zona lateral de los pliegues neurales del neuroporo posterior, mientras que, como ocurrió en el caso de *Vangl2* y *Daam1*, no se detectó señal en la parte más dorsal (figura 36E).



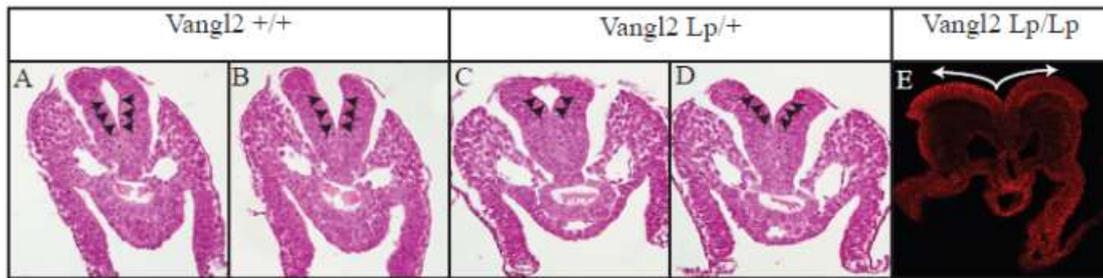
**Figura 36. Expresión de los elementos de la vía Wnt-PCP durante el cierre del PNP.** Secciones transversales obtenidas en el vibratomo de la zona caudal (cuadrado línea discontinua figura A) de embriones de E9'5 días de gestación. Línea roja discontinua en panel A representa nivel de corte anteroposterior. Se muestra expresión de mRNA de *Wnt5a* (B), *Vangl2* (C), *Daam1* (D) y *Glypican 4* (E). Barra escala: 50µm (B, aplicable a C-E).

El patrón de expresión observado al estudiar los elementos de la vía Wnt-PCP sugiere que esta vía juega un papel importante durante el cierre del PNP.

## 2.2 Defectos embrionarios en mutantes de *Vangl2* in vivo

*Loop-tail* es una mutación semidominante del gen *Vangl2*. Los mutantes heterocigotos de *Vangl2* se caracterizan por la presencia de un rizo en la cola. A pesar de esto son viables y fértiles. En homocigosis los mutantes presentan el tubo neural abierto desde el rombencéfalo hasta la zona más caudal del embrión (cranioraquisquisis) por fallo del punto de cierre 1. Estos embriones mueren intraútero o al nacer (Copp et al., 1994; Kibar et al., 2001a). El análisis morfológico de estos embriones *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup> a E8'5 muestra un marcado ensanchamiento de la placa neural y de la notocorda lo que imposibilita la elevación de los pliegues neurales y por tanto impide el cierre del tubo neural (Greene et al., 1998).

El análisis histológico del neuroporo posterior de los embriones E9'5 *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> estudiados, en comparación con embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup> (figuras 37A y B), mostró una dismorfología de los pliegues neurales con pérdida de rigidez (figuras 37C y D), malformación que no inhibe el cierre del tubo neural. En los embriones *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup> el tubo neural estaba abierto y los pliegues neurales presentaban una morfología convexa (figura 37E).



**Figura 37. Comparación de la morfología durante el cierre del neuroporo posterior.** Secciones transversales de la zona caudal de embriones E9.5 *Vangl2*<sup>+/+</sup> (A, B), *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> (C,D) y *Vangl2*<sup>Lp/Lp</sup> (E) en parafina teñidas con hematoxilina-eosina (A-D) o teñida con beta-catenina (E). Cabezas de flecha negras en paneles A-D indican morfología de los pliegues neurales. Flechas blancas en panel E indican apertura del tubo neural.

### **2.3 Defectos del tubo neural en embriones mutantes de *Vangl2* de madres diabéticas in vivo (cepa C3H)**

Para analizar la posible interacción entre la diabetes y las mutaciones de la vía Wnt-PCP durante el desarrollo embrionario decidimos inducir la diabetes a un grupo de hembras de la cepa C3H y mantener otro grupo de hembras control (no inducidas). Las hembras fueron cruzadas con machos de la cepa C3H-*Vangl2*<sup>Lp/+</sup> y se obtuvieron los embriones a edad gestacional E11'5-E12'5. Como se ha descrito en el capítulo 1, las hembras a las que se les indujo la diabetes (n=8), desarrollaron hiperglucemia lentamente y 5 de ellas tuvieron que ser reinducidas para que desarrollaran la diabetes. Además, los valores de glucemia registrados sólo fueron realmente altos (>600mg/dl) en 2 de las 8 hembras inducidas (ambas reinducidas) mientras que en el resto los valores rondaron entre 300 y 400 mg/dl. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (tabla 14).

	Madres control	Madres diabéticas
Embriones <i>Vangl2</i> <sup>+/+</sup>	0/10 (0%)	0/31 (0%)
Embriones <i>Vangl2</i> <sup>+/Lp</sup>	2/10 (20%)	1/27 (3.7%)

**Tabla 14. Embriones obtenidos de madres control y diabéticas cepa C3H con defectos del tubo neural.**

**i. Grupo hembras control:**

- Embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup>: En este grupo de embriones no se observó ningún tipo de anomalía, presentando todos ellos un grado de desarrollo acorde a su edad gestacional.
- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup>: En este grupo 2 de los 10 embriones obtenidos (20%) presentaron defectos del tubo neural (1/10 anencefalia y 1/10 espina bífida). El resto de embriones no presentaron ningún tipo de embriopatía.

**ii. Grupo hembras diabéticas:**

- Embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup>: En este grupo de embriones, así como en los embriones del grupo control, no se observó ningún tipo de anomalía. Todos los embriones obtenidos presentaban un grado de desarrollo acorde a su edad gestacional.
- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup>: En este grupo, 1/27 embriones obtenidos (3.7%) presentó anencefalia. Además se obtuvieron 2 embriones (7.4%) que no presentaban signos de viabilidad (poco latido cardíaco y evidente retraso en el desarrollo).

Como se puede observar sólo se obtuvieron defectos del tubo neural en embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup>, tanto procedentes de hembras control como de hembras diabéticas, por lo que los defectos observados en el grupo de hembras diabéticas no pueden ser asociados a la diabetes materna.

**2.4 Defectos del tubo neural en mutantes de *Vangl2* de madres diabéticas in vivo (cepa CBA)**

Como se ha descrito en el capítulo 1 de la presente tesis, las hembras de la cepa CBA son muy susceptibles al tratamiento para el desarrollo de la diabetes con STZ y desarrollan infertilidad debido a los altos valores de glucemia. En este estudio el número de hembras inducidas que desarrollaron diabetes y tuvieron camadas fue muy reducido (3 de 8 hembras). Ninguno de los embriones obtenidos de las madres control y de madres diabéticas presentó embriopatías destacables. De todos modos, debido al bajo número de embriones obtenidos, no se puede afirmar que la diabetes no tiene efecto sobre el desarrollo embrionario de los embriones portadores de la mutación *Vangl2* en esta cepa.

## **2.5 Defectos embrionarios en mutantes de *Vangl2* expuestos a elevados niveles de glucosa *in vitro***

Para estudiar el efecto de la glucosa en alta concentración durante el cierre del neuroporo posterior, y al no haber obtenido embriones suficientes para el estudio de embriopatías cuando se trabajó con hembras de la cepa CBA, decidimos realizar el estudio *in vitro*. De este modo los embriones fueron expuestos a altas concentraciones de glucosa (20mM) durante el cierre del neuroporo posterior (edad gestacional E9.5).

### **a) Estudio macroscópico:**

#### **i. Grupo control:**

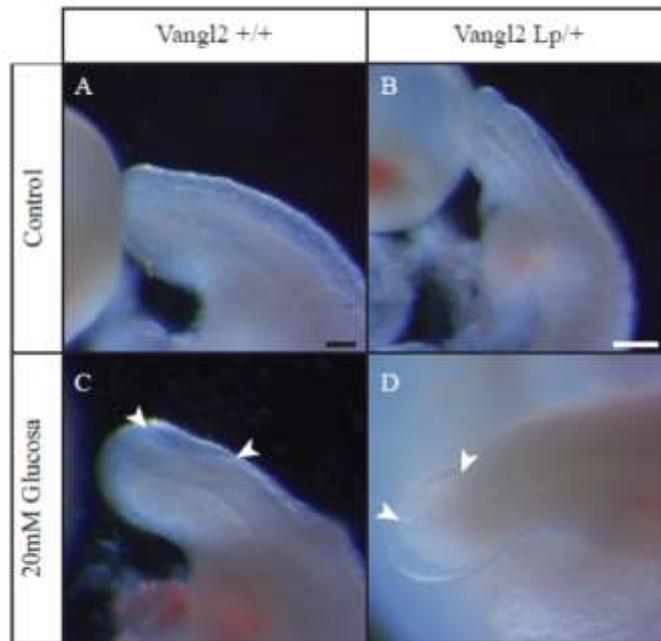
- Embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup>: Como era de esperar ninguno de estos embriones mostró alteraciones en el desarrollo ni malformaciones evidentes (n=9). La mayoría de estos embriones presentaban el neuroporo posterior cerrado a partir de los 27 somitas (n=3, figura 38A).
- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup>: En este grupo tampoco se observaron anomalías en ninguno de los embriones estudiados (n=6). El neuroporo posterior estaba cerrado en los embriones que presentaron 28 somitas o más (n=3, figura 38B), mostrando un ligero retraso en comparación con los embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup>.

Estas observaciones coinciden con un estudio realizado en embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup> y *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> (n=19 y n=16 respectivamente) no cultivados en el que también observamos un ligero retraso en el cierre del PNP de los embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> con respecto a los *Vangl2*<sup>+/+</sup>, así como corrobora el estudio publicado por Copp, *et al.* (1994).

#### **ii. Grupo 20mM glucosa:**

- Embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup>: En este grupo 3 de los 7 embriones obtenidos presentaron un número de somitas igual o superior a 28. 1 de estos 3 embriones (33%) mostró el neuroporo aun abierto con 30 somitas (figura 38C), mientras que en ese momento los embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup> del grupo control y no cultivados ya lo tenían cerrado.
- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup>: En este grupo 5 de los 14 embriones obtenidos presentaron un número de somitas igual o superior a 28. De estos 2 embriones, de 29 y 30 somitas, presentaron el neuroporo posterior abierto (40%; figura 38D), mientras que los

embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> cultivados en condiciones control y no cultivados ya lo presentaban cerrado.



**Figura 38. Cierre del tubo neural a nivel caudal en embriones control y cultivados con glucosa.** Detalle de la zona caudal de embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup> (A, C) y *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> (B, D) cultivados en condiciones control (A, B) y en presencia de 20mM de glucosa (C, D). Cabezas de flecha blanca en C y D indican apertura del PNP. Barras de escala: A: 100 $\mu$ m, aplicable a C y D; B: 200 $\mu$ m.

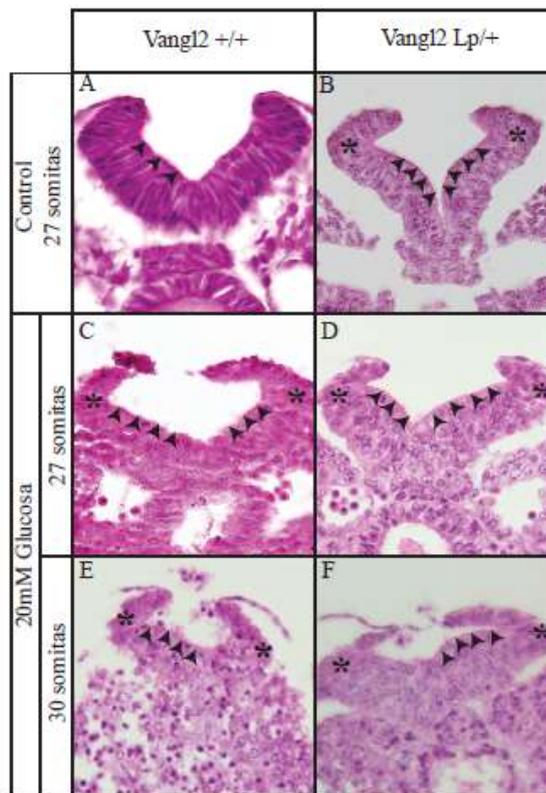
## b) Estudio histológico.

### i. Grupo control:

- Embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup>: Estos embriones mostraron el neuroporo posterior con una morfología propia de su edad gestacional. Como era de esperar, y corroborando lo observado en el análisis macroscópico, aquellos embriones que presentaban un número de somitas <28 podía observarse que en las secciones más caudales aún no se había completado el cierre del tubo neural (figura 39A), mientras que en los embriones con un número de somitas  $\geq 28$  el cierre si se había completado.
- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup>: Así como se observó en el grupo de embriones control, los embriones con un número de somitas  $\geq 28$  mostraron el tubo neural cerrado. En estos embriones se podía observar una exacerbación del ángulo de los puntos de pliegue dorsolaterales de los pliegues neurales característico de estos mutantes (figura 39B).

**ii. Grupo 20mM glucosa:**

- Embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup>: Los embriones con un número de somitas <28 mostraron una morfología del PNP alterada en comparación con los embriones control, con una exacerbación de los DLHP así como una mayor apertura de los pliegues neurales que confería mayor diámetro a la luz del tubo neural (figura 39C). En embriones con un número de somitas ≥28 que en el análisis macroscópico presentaban abierto el PNP, se observó una zona ventral del PNP (figura 39E) similar a la observado en los embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup>.
- Embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup>: Los embriones con un número de somitas <28 presentaron una dismorfología similar a la observada en los embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> control pero más severa, ya que mostraban un ángulo de pliegue de los DLHP mucho más acentuado (figura 39D). Esta dismorfología también se observó en los embriones con un número de somitas ≥28 (figura 39F).



**Figura 39. Cierre del PNP en embriones control y cultivados con glucosa.** Cortes histológicos transversales teñidos con hematoxilina-eosina de la zona caudal de embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup> (A, C, E) y *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> (B, D, F) de 27 (A-D) y 30 somitas (E, F) cultivados en condiciones control (A, B) y en presencia de 20mM de glucosa (C-F). Cabezas de flecha negras representan morfología del pliegue neural del PNP. Asteriscos en paneles B-F indican exacerbación de los DLHP.

Como se ha comentado anteriormente, los mutantes de *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> pueden presentar, en un bajo porcentaje de los casos, espina bífida. Debido a ello, y al bajo número de embriones obtenidos hasta el momento, nuestros resultados no nos permiten asignar el retraso en el cierre del PNP en estos mutantes a la combinación de la glucosa y la mutación de *Vangl2* en heterocigosis.

#### **2.5.1 Otras embriopatías observadas**

Además del efecto sobre el cierre del tubo neural a nivel caudal, en los embriones expuestos a glucosa en cultivo se observaron defectos oculares. 1 de los 7 embriones *Vangl2*<sup>+/+</sup> presentó un retraso en el desarrollo de ambas vesículas ópticas en comparación con *Vangl2*<sup>+/+</sup> del grupo control que presentaban el mismo número de somitas. 5 de los 14 embriones *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> analizados mostraron defectos oculares, 1 de ellos presentó anoftalmia y los otros 4 retraso en el desarrollo de una vesícula óptica con respecto a la otra.

## Discusión.

Como se ha mencionado anteriormente, la diabetes materna ha sido muy estudiada debido a su implicación en el desarrollo de embriopatías durante el desarrollo embrionario, especialmente aquellas que afectan al desarrollo del sistema nervioso o al sistema cardiovascular. A pesar de todo, los mecanismos moleculares y las vías de señalización que se ven afectados por la hiperglucemia aún no están claros. En este capítulo hemos observado que la diabetes materna provoca un alto porcentaje de anomalías oculares, causa alteraciones en el cierre de la zona caudal del tubo neural y afecta al desarrollo cardíaco. Todas estas anomalías se vieron incrementadas en embriones que presentaban una mutación de la vía Wnt-PCP.

El análisis de expresión de diferentes componentes de la vía Wnt-PCP realizado durante el cierre del tubo neural y del desarrollo ocular, confirmó la implicación de esta vía en estos dos procesos embrionarios. Además, se observó que, los mutantes de *Vangl2* o *Daam1*, dos genes pertenecientes a esta vía, presentaban un alto porcentaje de alteraciones embrionarias durante el cierre del tubo neural o el desarrollo del ojo, respectivamente.

*Efecto de la diabetes durante el desarrollo ocular:* En el estudio de la interacción entre la diabetes y la mutación en uno de los componentes de la vía de Wnt-PCP, *Daam1*, observamos un claro incremento en el desarrollo de malformaciones oculares. Se ha descrito anteriormente que la diabetes materna provoca anomalías oculares como anoftalmia y microftalmia tanto en niños (Atasay et al., 2002; James et al., 2007) como en experimentos realizados en embriones de ratón (Machado et al., 2001; Oyama et al., 2009; Torchinsky et al., 1997). Nuestros resultados mostraron que la diabetes materna provoca una desorganización del citoesqueleto en embriones en estadios tempranos que habían sido cultivados en presencia de glucosa. En embriones en estadios más tardíos obtenidos en los estudios realizados *in vivo*, se observó una malformación de la vesícula óptica, con un tallo óptico engrosado, la retina poco desarrollada e incluso ausencia de lente. En ratón la vesícula óptica se origina como una evaginación bilateral del diencefalo que va creciendo progresivamente hasta contactar con el ectodermo superficial, con el cual establece una serie de conexiones necesarias para la formación de la placa de la lente gracias al estrechamiento del epitelio. Nuestros resultados nos llevan a pensar que la diabetes afecta al paso del desarrollo ocular previo al establecimiento del contacto entre la vesícula óptica y el ectodermo de superficie, lo cual daría lugar a un daño en el desarrollo de la copa óptica y de la lente, provocando los fenotipos observados en nuestros experimentos *in vivo*.

Efecto de la diabetes sobre la vía Wnt-PCP: Entre los genes cuya expresión se ve afectada en presencia de altas concentraciones de glucosa se encuentran genes implicados en el desarrollo ocular como son los genes de la vía Wnt- $\beta$ -catenina o la Wnt-PCP. Esto sugiere que este efecto sobre la expresión genética podría ser la causa de los defectos oculares observados en los embriones obtenidos de madres diabéticas. Para corroborar la existencia de una desregulación de los componentes de la vía de Wnt-PCP, decidimos analizar otros órganos en cuyo desarrollo esta vía está muy implicada, como son el corazón y el tubo neural. Durante el desarrollo cardiovascular el malfuncionamiento de la vía Wnt-PCP da lugar a diferentes anomalías cardíacas, incluyendo el mal alineamiento de las arterias y los ventrículos, malformación del septo o problemas en la maduración del miocardio ventricular. Todos estos defectos se han descrito en mutantes de la vía Wnt-PCP como son *loop-tail* (mutante de *Vangl2*), *Crash* (mutante de *Celsr1*), mutantes de *Dsh* o de *Daam1* (Hamblet et al., 2002; Henderson and Chaudhry, 2011; Li et al., 2011; Phillips et al., 2005; Phillips et al., 2007). En humanos también hay evidencias de que la desregulación de esta vía ocasiona defectos del corazón (Dauber et al., 2013; Palomino Doza et al., 2013). En nuestro estudio, los embriones *Daam1*<sup>+/+</sup> y *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> que fueron expuestos a hiperglucemia, desarrollaron diferentes defectos cardíacos, siendo el más común la presencia de doble salida del ventrículo derecho (DORV), mientras que no se observó ningún defecto en los embriones procedentes de madres no diabéticas (Control). El desarrollo de DORV en los embriones *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> de madres diabéticas demuestra la interacción entre la diabetes y la vía Wnt-PCP, ya que este defecto se había descrito solamente en embriones *Daam1*<sup>*gt/gt*</sup> (Li et al., 2011). Por otro lado, el porcentaje de defectos del tubo neural observado en estos mutantes fue muy bajo, obteniendo únicamente un embrión *Daam1*<sup>+/*gt*</sup> procedente de madre diabética con cranioraquisquisis. El bajo índice de defectos del tubo neural observado pudo deberse a que la cepa utilizada para el estudio de la mutación *Daam1* (C57BL/6) es resistente a desarrollar defectos del tubo neural como consecuencia de la diabetes materna (Pani et al., 2002). Para saber si la diabetes en combinación con la mutación del gen *Daam1* aumenta el riesgo de padecer defectos del tubo neural, sería necesario realizar los estudios utilizando otra cepa de ratón.

La vía Wnt-PCP y su implicación durante el desarrollo ocular: Estudios realizados en *Xenopus*, pez cebra y *medaka* sugieren que la vía Wnt-PCP es necesaria durante el desarrollo ocular controlando los movimientos morfogénicos que se producen. En el pez cebra, la presencia de Wnt11 ectópico (ligando de la vía Wnt-PCP), induce la expresión ectópica de *Pax6* y la formación de ojos de mayor tamaño, mientras que, los mutantes de *Wnt11* (mutación de *silberblick*), presentan una fusión parcial del área ocular, posiblemente debida a una alteración

de los movimientos morfogénicos (Cavodeassi et al., 2005; Heisenberg et al., 2000a). El uso de morfolinós en *Xenopus* ha demostrado que para el control de los movimientos de los progenitores de la retina en el área ocular se necesitan miembros de la vía de Wnt-PCP como por ejemplo *Dsh* o *Daam1*, así como la interacción con EfrinaB1. La efrinaB1 es un ligando transmembrana que promueve la migración celular a través de la activación de la vía Wnt-PCP por medio de la interacción con CNK1 y Dsh (Lee et al., 2006). De igual forma, *Wnt4* (ligando de la vía Wnt-PCP) en *Xenopus* se expresa en una zona adyacente al área ocular, y su desregulación provoca la pérdida específica de los marcadores oculares *Rx* y *Pax6* (Maurus et al., 2005). Fdz3, uno de los receptores de *Wnt4*, se ha descrito que es necesario y suficiente para la formación del ojo en *Xenopus*, y su sobreexpresión induce la expresión de *Pax6* (Rasmussen et al., 2001). A diferencia de todo esto, en ratón no existe una evidencia clara de la implicación de la vía Wnt-PCP en el desarrollo ocular, a pesar de que los mutantes de *Vangl2* y *Celsr1* presentan alterado el alineamiento celular afectando a la morfología de la lente (Sugiyama et al., 2010). De todos modos, la incidencia de microftalmia y anoftalmia observada en nuestro estudio como consecuencia de la mutación de *Daam1* junto con la detección de varios de los componentes de la vía de Wnt-PCP en las principales estructuras oculares (ej. Plexo perióptico, copa óptica, nervio óptico o la lente), muestra una fuerte relación entre esta vía y el desarrollo ocular.

En este capítulo hemos observado que las células de la vesícula óptica presentaban una dismorfología en embriones con la vía Wnt-PCP alterada, mostrando una alteración en la polaridad y una morfología redondeada en comparación con los embriones control. Además del análisis de expresión realizado y de las evidencias obtenidas sobre la interacción entre la mutación de *Daam1* y la diabetes materna, un alto porcentaje de alteraciones morfológicas y de defectos en la polaridad apico-basal fueron obtenidos en los embriones expuestos a glucosa *in vitro*. Estos defectos celulares se asociaron con la alteración del citoesqueleto de actina, miosina y de la distribución de ZO1. Resultados similares se obtuvieron en el análisis de la vesícula óptica de embriones *Vangl2<sup>Lp/Lp</sup>*, lo que nos hizo pensar en la existencia de una fuerte implicación de la vía Wnt-PCP en el establecimiento de la polaridad y distribución celular en las primeras etapas del desarrollo ocular. Además, la vía Wnt-PCP está asociada con el sistema Rho-ROCK y se ha observado que la alteración de ROCK exacerba los defectos del tubo neural en ratones mutantes para alguno de los componentes de la vía Wnt-PCP. Con nuestros resultados observamos que, la inhibición de un efector directo de *RhoA* (ROCK) mediante el uso del inhibidor Y-27632, daba lugar a vesículas ópticas con una morfología que fenocopiaba la observada en los embriones cultivados en presencia de glucosa o en el análisis de los

embriones *Vangl2<sup>Lp/Lp</sup>*. En un estudio usando células madre embrionarias derivadas del neuroepitelio de la vesícula óptica de ratón, el proceso de formación de la copa óptica fue dividido en 4 fases (Eiraku et al., 2011): la evaginación de una monocapa columnar de células epiteliales para formar una vesícula (fase 1), reducción del grosor de la porción distal de la vesícula (fase 2), el ajuste del ángulo en la unión entre la retina neural y el epitelio pigmentario mediante pliegue y constricción celular (fase 3) y la expansión del epitelio neural de la retina como una estructura convexa que va formando progresivamente formando la copa óptica por invaginación (fase 4). La tercera fase de este proceso está regulada por el sistema Rho-ROCK, lo cual es consistente con nuestras observaciones. Los microfilamentos de actina son reguladores internos de la morfogénesis epitelial, y normalmente están regulados por el sistema Rho-ROCK (Sawyer et al., 2010). En el tubo neural Rho se acumula cerca de la región apical del neuroepitelio, solapándose con los filamentos de actina y demostrando la implicación de Rho en la constricción apical y la reorganización del citoesqueleto. El bloqueo de la polimerización de actina en nuestro estudio mediante el uso de citocalasina-D, provocaba efectos muy similares a los observados al inhibir Rock. Además se ha observado que la perturbación de la morfología y de la polaridad celular es consecuencia de la alteración de la vía Wnt-PCP o del sistema Rho-ROCK en otros modelos animales (Gray et al., 2013; Ybot-Gonzalez et al., 2007b).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que los defectos celulares observados en la vesícula óptica de los embriones *Daam1<sup>+gt</sup>* y en aquellos expuestos a glucosa, se acompañaban de una reducción en la expresión de Pax6 en la vesícula óptica. Pax6 es crucial en el desarrollo ocular. Los ratones “*small eye*” son homocigotos para la mutación de Pax6 y se ha descrito que no presentan lente, un fenotipo similar al obtenido en los embriones *Daam1<sup>+gt</sup>* expuestos a glucosa. Esta disminución de la expresión de Pax6 en la vesícula óptica podría reflejar el papel de la vía Wnt-PCP en la determinación del desarrollo ocular. Como se ha descrito anteriormente, la pérdida de la función de Wnt4 en *Xenopus* da lugar a la pérdida específica de la expresión de Pax6 (Maurus et al., 2005). Por lo tanto, la vía Wnt-PCP está directamente implicada en la determinación del área ocular ya que controla la expresión de genes específicos. De manera inversa, si la vesícula óptica depende de un epitelio bien estructurado y de movimientos celulares específicos inducidos por la vía Wnt-PCP, cuando este proceso es inhibido, puede producirse una pérdida parcial del carácter epitelial de la vesícula óptica junto con la pérdida de marcadores específicos oculares como es Pax6. La inhibición parcial de la vía Wnt-PCP sólo afecta a la expresión de Pax6 en la vesícula óptica y no en el ectodermo superficial, por ello creemos que el desarrollo ocular depende de los movimientos

celulares guiados por la vía Wnt-PCP en la vesícula óptica para mantener su carácter epitelial, el cual es crucial para alcanzar su destino.

Efecto de la diabetes sobre la vía Wnt-PCP durante el cierre del tubo neural: Durante la neurulación la vía Wnt-PCP tiene un papel muy importante ya que se encarga de establecer y controlar la polaridad celular, así como de regular el proceso de extensión convergente (Wallingford and Harland, 2002). Diversos mutantes de esta vía, como por ejemplo los mutantes de *Vangl2*, *Clsr1*, *Ptk7*, *Dvl* o los dobles mutantes de *Fdz3/6* desarrollan craneorquisis. Además, estudios realizados en humanos que presentaban defectos del tubo neural mostraban alteraciones en los genes de la vía Wnt-PCP (revisado por (Copp et al., 2013)), todo ello demuestra la implicación de esta vía durante el establecimiento de la línea media de la placa neural y la iniciación del proceso de cierre del tubo neural. Nuestros resultados sugieren que la desregulación de la vía Wnt-PCP por la diabetes materna da lugar al aumento de embriopatías. El hecho de no haber observado un porcentaje relevante de embriopatías en las camadas obtenidas en los estudios *in vivo* realizados en la cepa C3H, puede deberse a la diferente respuesta que cada cepa ofrece ante el mismo tratamiento. En esta cepa solo se observó un pequeño porcentaje de defectos del tubo neural en embriones *Vangl2<sup>Lp/+</sup>* tanto en embriones procedentes de madres control como de madres diabéticas, por ello no puede asociarse la presencia de embriopatías con la diabetes materna. Debido a la elevada sensibilidad de la cepa CBA a la inducción de diabetes mediante inyecciones de STZ, el efecto de la hiperglucemia en esta cepa se estudió mediante cultivos embrionarios. En los embriones cultivados en presencia de altas concentraciones de glucosa se observó una dismorfología del neuroporo posterior, así como un retraso en el cierre del mismo. En nuestro laboratorio hemos observado la alta implicación que presenta la vía Wnt-PCP durante el cierre del PNP y hemos demostrado como la desregulación de esta vía provoca defectos importantes en la morfología del neuroporo posterior (artículo en preparación) muy similares a los observados en los embriones expuestos a glucosa. A pesar de ello sería necesario continuar realizando estudios en embriones mutantes de la vía Wnt-PCP para determinar si, a nivel caudal, la interacción entre la diabetes y esta vía provoca un aumento en la aparición de embriopatías.

Como se ha comentado previamente, la vía de señalización Wnt-PCP tiene un papel relevante durante el desarrollo embrionario, especialmente durante la formación de estructuras como el neuroporo posterior, el ojo o el corazón. Nuestros resultados sugieren que la diabetes materna podría provocar una desregulación de la vía Wnt-PCP, lo que conllevaría a la aparición de embriopatías.



## **Conclusiones generales**



# Conclusiones generales

1. Para el estudio de embriopatías producidas por diabetes materna la cepa de ratón que ofrece mejor respuesta es la SWV.
2. El protocolo más adecuado para estudios durante el embarazo que presenta mejor respuesta de las cepas de ratón es el de inducción de diabetes mediante múltiples inyecciones de STZ a baja dosis.
3. La elevada concentración de glucosa *in vitro* provoca un retraso del cierre del neuroporo posterior.
4. La combinación de elevadas concentraciones de glucosa y homocisteína *in vitro* altera la morfología del PNP provocando una desregulación en el momento del cierre.
5. La exposición de los embriones a elevadas concentraciones de glucosa y homocisteína provoca una alteración en el patrón de expresión de *Pax3* y *Shh* lo cual podría dar lugar a la alteración del mecanismo de cierre del PNP.
6. La diabetes junto con la mutación de *Mthfr* *in vivo* provoca la aparición de DTN.
7. La interacción entre la diabetes y la mutación de *Folr1* *in vivo* provoca la aparición de DTN a nivel craneal, fenotipo solo observado previamente en embriones *Folr1*<sup>-/-</sup>.
8. Elementos de la vía Wnt-PCP se expresan en las estructuras oculares principales desde estadios tempranos del desarrollo, lo que demostraría que esta vía está implicada en el desarrollo ocular.
9. Los defectos oculares observados en embriones de madres diabéticas son similares a los observados cuando la vía Wnt-PCP está alterada. Esto sugiere que la desregulación de la vía Wnt-PCP por la diabetes materna podría dar lugar a defectos oculares.
10. A nivel del desarrollo ocular se produce una interacción entre la diabetes y las mutaciones en la vía Wnt-PCP que podría ser la causa del aumento en la severidad de los defectos oculares.

11. En la zona más caudal del embrión se ha descrito la expresión de elementos de la vía Wnt-PCP durante el cierre del PNP, lo que sugiere que la vía Wnt-PCP ejerce un papel importante durante este proceso.

12. Para determinar el efecto de la interacción de la vía Wnt-PCP y la diabetes a nivel caudal sería necesario realizar un estudio más exhaustivo en embriones *Vangl2<sup>Lp/+</sup>* con mayor número de somitas y expuestos a elevadas concentraciones de glucosa.

13. Generalmente la causa de las embriopatías presenta un origen multifactorial, por ello, para poder entender el mecanismo subyacente de los defectos embrionarios, es necesario hacer hincapié en el estudio de la combinación de factores durante la embriogénesis.

## **General conclusions**



# General conclusions

1. To study the diabetic embryopathies, the most useful mice strain is SWV.
2. Diabetes induction by multiple low doses of STZ is the most effective protocol to study the diabetic embryopathies.
3. Exposure of embryos to a high glucose concentration *in vitro* causes a delay in the closure of the PNP.
4. Exposure of embryos to a combination of high glucose and homocysteine concentrations *in vitro* alters the morphology of the PNP producing a deregulation of the PNP closure.
5. Exposure of embryos to a combination of high glucose and homocysteine concentrations *in vitro*, causes the alteration of the *Pax3* and *Shh* expression pattern, and that could produce an alteration in the PNP closure mechanism.
6. The interaction between diabetes and *Mthfr* mutation *in vivo* provokes the appearance of NTDs.
7. The interaction between diabetes and *Folr1* mutation *in vivo* provokes the appearance of NTDs at cranial level, which is a characteristic phenotype of *Folr1*<sup>-/-</sup> mutants.
8. During eye development important elements of the Wnt-PCP signaling pathway were shown expressed in the main ocular structures. It could demonstrate that this pathway plays an important role during this process.
9. Ocular defects observed in embryos from diabetic mothers were similar to those observed in Wnt-PCP mutants. It suggests that the alteration of the Wnt-PCP signaling pathway by maternal diabetes gives rise to eye defects.
10. During eye development, the interaction between maternal diabetes and mutations in the Wnt-PCP signaling pathway could worsens the phenotype of eye defects.

11. During the closure of the PNP in the caudal zone of the embryo, important elements of the Wnt-PCP signaling pathway were found. It suggests that this pathway plays an important role during this process.

12. To determine the effect of the interaction at the caudal level between the Wnt-PCP pathway and diabetes, it would be necessary to perform a more comprehensive study on *Vangl2*<sup>Lp/+</sup> embryos with a higher number of somites exposed to high glucose concentration.

13. Usually, the origin of the embryopathies is multifactorial, for that reason, to understand the underlying mechanism of embryonic defect is necessary to increase the studies of risk factors interactions during embryo development.

## **Bibliografía**



# Bibliografía

Andres-Delgado L, Mercader N. 2016. Interplay between cardiac function and heart development. *Biochim Biophys Acta* 1863:1707-1716.

Arkell RM, Tam PP. 2012. Initiating head development in mouse embryos: integrating signalling and transcriptional activity. *Open Biol* 2:120030.

Atasay B, Günlemez A, Saadet A. 2002. Congenital Anomalies Among Infants of Diabetic Mothers. *Journal of Ankara Medical School* 55:31.

Bailey LB, Berry RJ. 2005. Folic acid supplementation and the occurrence of congenital heart defects, orofacial clefts, multiple births, and miscarriage. *Am J Clin Nutr* 81:1213S-1217S.

Bailey LB, Gregory JF, 3rd. 1999. Folate metabolism and requirements. *J Nutr* 129:779-782.

Barisic I, Odak L, Loane M, Garne E, Wellesley D, Calzolari E, Dolk H, Addor MC, Arriola L, Bergman J, Bianca S, Doray B, Khoshnood B, Klungsoyr K, McDonnell B, Pierini A, Rankin J, Rissmann A, Rounding C, Queisser-Luft A, Scarano G, Tucker D. 2014. Prevalence, prenatal diagnosis and clinical features of oculo-auriculo-vertebral spectrum: a registry-based study in Europe. *Eur J Hum Genet* 22:1026-1033.

Baron R, Kneissel M. 2013. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19:179-192.

Begemann G, Schilling TF, Rauch GJ, Geisler R, Ingham PW. 2001. The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development* 128:3081-3094.

Belotti E, Puvirajesinghe TM, Audebert S, Baudalet E, Camoin L, Pierres M, Lasvaux L, Ferracci G, Montcouquiol M, Borg JP. 2012. Molecular characterisation of endogenous Vangl2/Vangl1 heteromeric protein complexes. *PLoS One* 7:e46213.

Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. 2006. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* 7:724-731.

Bruneau BG. 2008. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 451:943-948.

Carroll EA, Gerrelli D, Gasca S, Berg E, Beier DR, Copp AJ, Klingensmith J. 2003. Cordon-bleu is a conserved gene involved in neural tube formation. *Dev Biol* 262:16-31.

Castori M. 2013. Diabetic embryopathy: a developmental perspective from fertilization to adulthood. *Mol Syndromol* 4:74-86.

Cavodeassi F, Carreira-Barbosa F, Young RM, Concha ML, Allende ML, Houart C, Tada M, Wilson SW. 2005. Early stages of zebrafish eye formation require the coordinated activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/beta-catenin pathway. *Neuron* 47:43-56.

Chae J, Kim MJ, Goo JH, Collier S, Gubb D, Charlton J, Adler PN, Park WJ. 1999. The *Drosophila* tissue polarity gene *starry night* encodes a member of the protocadherin family. *Development* 126:5421-5429.

Chan BW, Chan KS, Koide T, Yeung SM, Leung MB, Copp AJ, Loeken MR, Shiroishi T, Shum AS. 2002. Maternal diabetes increases the risk of caudal regression caused by retinoic acid. *Diabetes* 51:2811-2816.

Chang TI, Horal M, Jain SK, Wang F, Patel R, Loeken MR. 2003a. Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia* 46:538-545.

Chang TI, Horal M, Jain SK, Wang F, Patel R, Loeken MR. 2003b. Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia* 46:538-545.

Chen B, Mao HH, Chen L, Zhang FL, Li K, Xue ZF. 2013. Loop-tail phenotype in heterozygous mice and neural tube defects in homozygous mice result from a nonsense mutation in the *Vangl2* gene. *Genet Mol Res* 12:3157-3165.

Chen Y, Stump RJ, Lovicu FJ, Shimono A, McAvoy JW. 2008. Wnt signaling is required for organization of the lens fiber cell cytoskeleton and development of lens three-dimensional architecture. *Dev Biol* 324:161-176.

Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R. 2001. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 10:433-443.

Chihara K, Amano M, Nakamura N, Yano T, Shibata M, Tokui T, Ichikawa H, Ikebe R, Ikebe M, Kaibuchi K. 1997. Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J Biol Chem* 272:25121-25127.

Ciruna B, Rossant J. 2001. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 1:37-49.

Copp A, Cogram P, Fleming A, Gerrelli D, Henderson D, Hynes A, Kolatsi-Joannou M, Murdoch J, Ybot-Gonzalez P. 2000. Neurulation and neural tube closure defects. *Methods Mol Biol* 136:135-160.

Copp AJ, Checiu I, Henson JN. 1994. Developmental basis of severe neural tube defects in the loop-tail (Lp) mutant mouse: use of microsatellite DNA markers to identify embryonic genotype. *Dev Biol* 165:20-29.

Copp AJ, Greene ND. 2010. Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol* 220:217-230.

Copp AJ, Greene ND. 2013. Neural tube defects--disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:213-227.

Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. 2003. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 4:784-793.

Copp AJ, Stanier P, Greene ND. 2013. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies. *Lancet Neurol* 12:799-810.

Cundy T, Gamble G, Neale L, Elder R, McPherson P, Henley P, Rowan J. 2007. Differing causes of pregnancy loss in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30:2603-2607.

Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, Arkell RM, Cattanaach B, Copp AJ, Henderson DJ, Spurr N, Stanier P, Fisher EM, Nolan PM, Steel KP, Brown SD, Gray IC, Murdoch JN. 2003a. Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol* 13:1129-1133.

Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, Arkell RM, Cattanaach B, Copp AJ, Henderson DJ, Spurr N, Stanier P, Fisher EM, Nolan PM, Steel KP, Brown SD, Gray IC, Murdoch JN. 2003b. Mutation of *Celsr1* disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse. *Curr Biol* 13:1129-1133.

Dauber A, Golzio C, Guenot C, Jodelka FM, Kibaek M, Kjaergaard S, Leheup B, Martinet D, Nowaczyk MJ, Rosenfeld JA, Zeesman S, Zurich J, Beckmann JS, Hirschhorn JN, Hastings ML, Jacquemont S, Katsanis N. 2013. SCRIB and PUF60 are primary drivers of the multisystemic phenotypes of the 8q24.3 copy-number variant. *Am J Hum Genet* 93:798-811.

Divecha N, Charleston B. 1995. Cloning and characterisation of two new cDNAs encoding murine triple LIM domains. *Gene* 156:283-286.

Djiane A, Riou J, Umbhauer M, Boucaut J, Shi D. 2000. Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 127:3091-3100.

Donkelaar HJ, Lammens M, Hori A. 2006. Chapter 4: Neurulation and neural tube defects. *Clinical neuroembryology*. : Springer Berlin Heidelberg. p 145.

Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y. 2011. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472:51-56.

Escuin S, Vernay B, Savery D, Gurniak CB, Witke W, Greene ND, Copp AJ. 2015. Rho-kinase-dependent actin turnover and actomyosin disassembly are necessary for mouse spinal neural tube closure. *J Cell Sci* 128:2468-2481.

Eskes TK. 1998. Neural tube defects, vitamins and homocysteine. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2:S139-41.

Evers IM, de Valk HW, Visser GH. 2004. Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *BMJ* 328:915.

Fathe K, Person MD, Finnell RH. 2015. The application of a chemical determination of N-homocysteinylation levels in developing mouse embryos: implication for folate responsive birth defects. *J Nutr Biochem* 26:312-318.

Feiguin F, Hannus M, Mlodzik M, Eaton S. 2001. The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Dev Cell* 1:93-101.

Ferrer-Vaquer A, Viotti M, Hadjantonakis AK. 2010. Transitions between epithelial and mesenchymal states and the morphogenesis of the early mouse embryo. *Cell Adh Migr* 4:447-457.

Fine EL, Horal M, Chang TI, Fortin G, Loeken MR. 1999. Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes* 48:2454-2462.

Fuhrmann S. 2008. Wnt signaling in eye organogenesis. *Organogenesis* 4:60-67.

Gabbay-Benziv R, Reece EA, Wang F, Yang P. 2015. Birth defects in pregestational diabetes: Defect range, glycemic threshold and pathogenesis. *World J Diabetes* 6:481-488.

Gao B, Song H, Bishop K, Elliot G, Garrett L, English MA, Andre P, Robinson J, Sood R, Minami Y, Economides AN, Yang Y. 2011. Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev Cell* 20:163-176.

Garne E, Loane M, Dolk H, Barisic I, Addor MC, Arriola L, Bakker M, Calzolari E, Matias Dias C, Doray B, Gatt M, Melve KK, Nelen V, O'Mahony M, Pierini A, Randrianaivo-Ranjatoelina H, Rankin J, Rissmann A, Tucker D, Verellun-Dumoulin C, Wiesel A. 2012. Spectrum of congenital anomalies in pregnancies with pregestational diabetes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* .

Gavin BJ, McMahon JA, McMahon AP. 1990. Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Dev* 4:2319-2332.

Gehring WJ. 2002. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int J Dev Biol* 46:65-73.

Gilbert SF. 2000. Chapter 12. The central nervous system and the epidermis. *Developmental Biology: Sinauer Associates*.

Glastras SJ, Chen H, Tsang M, Teh R, McGrath RT, Zaky A, Chen J, Wong MG, Pollock CA, Saad S. 2017. The renal consequences of maternal obesity in offspring are overwhelmed by postnatal high fat diet. *PLoS One* 12:e0172644.

Goenezen S, Rennie MY, Rugonyi S. 2012. Biomechanics of early cardiac development. *Biomech Model Mechanobiol* 11:1187-1204.

Golden JA, Chernoff GF. 1993. Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice. *Teratology* 47:73-80.

Graham ML, Janecek JL, Kittredge JA, Hering BJ, Schuurman HJ. 2011. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med* 61:356-360.

- Graw J. 2010. Eye development. *Curr Top Dev Biol* 90:343-386.
- Gray JD, Kholmanskikh S, Castaldo BS, Hansler A, Chung H, Klotz B, Singh S, Brown AM, Ross ME. 2013. LRP6 exerts non-canonical effects on Wnt signaling during neural tube closure. *Hum Mol Genet* 22:4267-4281.
- Greene ND, Copp AJ. 2009. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenat Diagn* 29:303-311.
- Greene ND, Dunlevy LE, Copp AJ. 2003. Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos. *Anat Embryol (Berl)* 206:185-191.
- Greene ND, Gerrelli D, Van Straaten HW, Copp AJ. 1998. Abnormalities of floor plate, notochord and somite differentiation in the loop-tail (Lp) mouse: a model of severe neural tube defects. *Mech Dev* 73:59-72.
- Gubb D, Green C, Huen D, Coulson D, Johnson G, Tree D, Collier S, Roote J. 1999. The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* 13:2315-2327.
- Habas R, Kato Y, He X. 2001. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107:843-854.
- Hague WM. 2003. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17:459-469.
- Hamblet NS, Lijam N, Ruiz-Lozano P, Wang J, Yang Y, Luo Z, Mei L, Chien KR, Sussman DJ, Wynshaw-Boris A. 2002. Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure. *Development* 129:5827-5838.
- Heavner W, Pevny L. 2012. Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:10.1101/cshperspect.a008391.
- Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saude L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW. 2000a. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405:76-81.
- Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saude L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW. 2000b. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405:76-81.

Henderson DJ, Chaudhry B. 2011. Getting to the heart of planar cell polarity signaling. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91:460-467.

Hidalgo-Figueroa M, Bonilla S, Gutierrez F, Pascual A, Lopez-Barneo J. 2012. GDNF is predominantly expressed in the PV+ neostriatal interneuronal ensemble in normal mouse and after injury of the nigrostriatal pathway. *J Neurosci* 32:864-872.

High FA, Epstein JA. 2008. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet* 9:49-61.

Holm J, Hansen SI, Hoier-Madsen M, Bostad L. 1991. High-affinity folate binding in human choroid plexus. Characterization of radioligand binding, immunoreactivity, molecular heterogeneity and hydrophobic domain of the binding protein. *Biochem J* 280 ( Pt 1):267-271.

Jakubowski H. 2004. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 61:470-487.

Jakubowski H, Perla-Kajan J, Finnell RH, Cabrera RM, Wang H, Gupta S, Kruger WD, Kraus JP, Shih DM. 2009. Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J* 23:1721-1727.

James AW, Culver K, Hall B, Golabi M. 2007. Bifid tongue: a rare feature associated with infants of diabetic mother syndrome. *Am J Med Genet A* 143A:2035-2039.

Jessell TM, Sanes JR. 2000. Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol* 10:599-611.

Juriloff DM, Harris MJ. 2000. Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 9:993-1000.

Keller R. 2002. Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 298:1950-1954.

Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Maleki NA, Khamnei HJ, Ahmadi P. 2010. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytother Res* 24:1285-1291.

Kibar Z, Underhill DA, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Justice MJ, Gros P. 2001a. Identification of a new chemically induced allele (Lp(m1Jus)) at the loop-tail locus: morphology, histology, and genetic mapping. *Genomics* 72:331-337.

Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA, Gros P. 2001b. Ltap, a mammalian homolog of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nat Genet* 28:251-255.

Kilian B, Mansukoski H, Barbosa FC, Ulrich F, Tada M, Heisenberg CP. 2003. The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev* 120:467-476.

Laanpere M, Altmae S, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Yngve A, Salumets A. 2010. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutr Rev* 68:99-113.

Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Jawerbaum A. 2011. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 15:3061-3100.

Lee HS, Bong YS, Moore KB, Soria K, Moody SA, Daar IO. 2006. Dishevelled mediates ephrinB1 signalling in the eye field through the planar cell polarity pathway. *Nat Cell Biol* 8:55-63.

Leung MB, Choy KW, Copp AJ, Pang CP, Shum AS. 2004. Hyperglycaemia potentiates the teratogenicity of retinoic acid in diabetic pregnancy in mice. *Diabetologia* 47:515-522.

Li D, Hallett MA, Zhu W, Rubart M, Liu Y, Yang Z, Chen H, Haneline LS, Chan RJ, Schwartz RJ, Field LJ, Atkinson SJ, Shou W. 2011. Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) is required for heart morphogenesis. *Development* 138:303-315.

Li R, Chase M, Jung SK, Smith PJ, Loeken MR. 2005. Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E591-9.

Lin J, Wang C, Yang C, Fu S, Redies C. 2016. Pax3 and Pax7 interact reciprocally and regulate the expression of cadherin-7 through inducing neuron differentiation in the developing chicken spinal cord. *J Comp Neurol* 524:940-962.

Litingtung Y, Chiang C. 2000. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* 3:979-985.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25:402-408.

Lopez-Escobar B, Cano DA, Rojas A, de Felipe B, Palma F, Sanchez-Alcazar JA, Henderson D, Ybot-Gonzalez P. 2015. The effect of maternal diabetes on the Wnt-PCP pathway during embryogenesis as reflected in the developing mouse eye. *Dis Model Mech* 8:157-168.

Lu X, Borchers AG, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M. 2004. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 430:93-98.

Lupo PJ, Mitchell LE, Canfield MA, Shaw GM, Olshan AF, Finnell RH, Zhu H, National Birth Defects Prevention Study. 2014. Maternal-fetal metabolic gene-gene interactions and risk of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 111:46-51.

Machado AF, Zimmerman EF, Hovland DN, Jr, Weiss R, Collins MD. 2001. Diabetic embryopathy in C57BL/6J mice. Altered fetal sex ratio and impact of the splotch allele. *Diabetes* 50:1193-1199.

Marieb EN, Hoehn KN. 2013. *Pregnancy and human development*: Pearson education.

Martinelli DC, Fan CM. 2007. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes Dev* 21:1231-1243.

Maurus D, Heligon C, Burger-Schwarzler A, Brandli AW, Kuhl M. 2005. Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis*. *EMBO J* 24:1181-1191.

McShane SG, Mole MA, Savery D, Greene ND, Tam PP, Copp AJ. 2015. Cellular basis of neuroepithelial bending during mouse spinal neural tube closure. *Dev Biol* 404:113-124.

Megahed MA, Taher IM. 2004. Folate and homocysteine levels in pregnancy. *Br J Biomed Sci* 61:84-87.

Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. 2004. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 131:3401-3410.

Micle O, Muresan M, Antal L, Bodog F, Bodog A. 2012. The influence of homocysteine and oxidative stress on pregnancy outcome. *J Med Life* 5:68-73.

Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM. 1995. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 345:149-151.

Mitanchez D, Zydorczyk C, Siddeek B, Boubred F, Benahmed M, Simeoni U. 2014. The offspring of the diabetic mother - Short- and long-term implications. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* .

Mitchell LE. 2005. Epidemiology of neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C:88-94.

Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. 2003. Identification of *Vangl2* and *Scrb1* as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423:173-177.

Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, Rachel RA, Copeland NG, Jenkins NA, Bogani D, Murdoch J, Warchol ME, Wenthold RJ, Kelley MW. 2006. Asymmetric localization of *Vangl2* and *Fz3* indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci* 26:5265-5275.

Morgan D, Turnpenny L, Goodship J, Dai W, Majumder K, Matthews L, Gardner A, Schuster G, Vien L, Harrison W, Elder FF, Penman-Splitt M, Overbeek P, Strachan T. 1998. *Inversin*, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the *inv* mouse. *Nat Genet* 20:149-156.

Morgan SC, Relaix F, Sandell LL, Loeken MR. 2008. Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82:453-463.

Munoz-Soriano V, Belacortu Y, Paricio N. 2012. Planar cell polarity signaling in collective cell movements during morphogenesis and disease. *Curr Genomics* 13:609-622.

Murdoch JN, Doudney K, Paternotte C, Copp AJ, Stanier P. 2001. Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Hum Mol Genet* 10:2593-2601.

Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, Gaston-Massuet C, Phillips HM, Paternotte C, Arkell R, Stanier P, Copp AJ. 2003. Disruption of *scribble* (*Scrb1*) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Hum Mol Genet* 12:87-98.

Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Chafer-Rudilla M, de Onzono LI, Blazquez-Cabrera JA, Miralles-Garcia JM. 2010. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. *J Androl* 31:584-592.

Newham JJ, Glinianaia SV, Tennant PW, Rankin J, Bell R. 2013. Improved antenatal detection of congenital anomalies in women with pre-gestational diabetes: population-based cohort study. *Diabet Med* 30:1442-1448.

Ohkawara B, Yamamoto TS, Tada M, Ueno N. 2003. Role of glypican 4 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 130:2129-2138.

Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Miller RK. 2015. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Res C Embryo Today* 105:53-72.

Oyama K, Sugimura Y, Murase T, Uchida A, Hayasaka S, Oiso Y, Murata Y. 2009. Folic acid prevents congenital malformations in the offspring of diabetic mice. *Endocr J* 56:29-37.

Palomino Doza J, Topf A, Bentham J, Bhattacharya S, Cosgrove C, Brook JD, Granados-Riveron J, Bu'Lock FA, O'Sullivan J, Stuart AG, Parsons J, Relton C, Goodship J, Henderson DJ, Keavney B. 2013. Low-frequency intermediate penetrance variants in the *ROCK1* gene predispose to Tetralogy of Fallot. *BMC Genet* 14:57-2156-14-57.

Pani L, Horal M, Loeken MR. 2002. Polymorphic susceptibility to the molecular causes of neural tube defects during diabetic embryopathy. *Diabetes* 51:2871-2874.

Pavlinkova G, Salbaum JM, Kappen C. 2009. Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC Genomics* 10:274.

Pavlinkova G, Salbaum JM, Kappen C. 2008. Wnt signaling in caudal dysgenesis and diabetic embryopathy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82:710-719.

Perrimon N, Mahowald AP. 1987. Multiple functions of segment polarity genes in *Drosophila*. *Dev Biol* 119:587-600.

Phelan SA, Ito M, Loeken MR. 1997. Neural tube defects in embryos of diabetic mice: role of the *Pax-3* gene and apoptosis. *Diabetes* 46:1189-1197.

Phillips HM, Murdoch JN, Chaudhry B, Copp AJ, Henderson DJ. 2005. *Vangl2* acts via RhoA signaling to regulate polarized cell movements during development of the proximal outflow tract. *Circ Res* 96:292-299.

Phillips HM, Rhee HJ, Murdoch JN, Hildreth V, Peat JD, Anderson RH, Copp AJ, Chaudhry B, Henderson DJ. 2007. Disruption of planar cell polarity signaling results in congenital heart defects and cardiomyopathy attributable to early cardiomyocyte disorganization. *Circ Res* 101:137-145.

Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, van Waes J, Kamen BA, Richardson J, Lacey SW, Anderson RG, Finnell RH. 1999. Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nat Genet* 23:228-232.

Poliakov A, Wilkinson DG. 2006. Ephrins make eyes with planar cell polarity. *Nat Cell Biol* 8:7-8.

Prasad PD, Ramamoorthy S, Moe AJ, Smith CH, Leibach FH, Ganapathy V. 1994. Selective expression of the high-affinity isoform of the folate receptor (FR-alpha) in the human placental syncytiotrophoblast and choriocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1223:71-75.

Rasmussen JT, Deardorff MA, Tan C, Rao MS, Klein PS, Vetter ML. 2001. Regulation of eye development by frizzled signaling in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3861-3866.

Relaix F. 2015. Pax genes: Master regulators of development and tissue homeostasis. *Semin Cell Dev Biol* 44:62-63.

Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. 1996. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15227-15232.

Sadler TW, Langman J. 2012. *Langman's medical embryology*. 12th ed. Philadelphia. United States: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Sadler TW. 2005. Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C:2-8.

Saitsu H, Ishibashi M, Nakano H, Shiota K. 2003. Spatial and temporal expression of folate-binding protein 1 (Fbp1) is closely associated with anterior neural tube closure in mice. *Dev Dyn* 226:112-117.

Salbaum JM, Kappen C. 2012. Responses of the embryonic epigenome to maternal diabetes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94:770-781.

Salbaum JM, Kappen C. 2010. Neural tube defect genes and maternal diabetes during pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:601-611.

Sanchez-Ferras O, Bernas G, Laberge-Perrault E, Pilon N. 2014. Induction and dorsal restriction of Paired-box 3 (Pax3) gene expression in the caudal neuroectoderm is mediated by integration of multiple pathways on a short neural crest enhancer. *Biochim Biophys Acta* 1839:546-558.

Sandler S, Swenne I. 1983. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia* 25:444-447.

Sato N, Sugimura Y, Hayashi Y, Murase T, Kanou Y, Kikkawa F, Murata Y. 2008. Identification of genes differentially expressed in mouse fetuses from streptozotocin-induced diabetic pregnancy by cDNA subtraction. *Endocr J* 55:317-323.

Sawyer JM, Harrell JR, Shemer G, Sullivan-Brown J, Roh-Johnson M, Goldstein B. 2010. Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis. *Dev Biol* 341:5-19.

Schoenwolf GC, Smith JL. 2000. Mechanisms of Neurulation. In: Rocky S. Tuan, Cecilia W. Lo, editors. *Developmental Biology Protocols: Volume II: Humana Press*. p 125.

Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P, Francis-West P. 2014. *Larsen's Human Embryology*. 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier Health Sciences.

Schwartz R, Teramo KA. 2000. Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn. *Semin Perinatol* 24:120-135.

Selhub J, Franklin WA. 1984. The folate-binding protein of rat kidney. Purification, properties, and cellular distribution. *J Biol Chem* 259:6601-6606.

Shum AS, Copp AJ. 1996. Regional differences in morphogenesis of the neuroepithelium suggest multiple mechanisms of spinal neurulation in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 194:65-73.

Sidney S, Rosamond WD, Howard VJ, Luepker RV, National Forum for Heart Disease and Stroke Prevention. 2013. The "heart disease and stroke statistics--2013 update" and the need for a national cardiovascular surveillance system. *Circulation* 127:21-23.

Simons M, Mlodzik M. 2008. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet* 42:517-540.

Sonagra AD, Biradar SM, K D, Murthy DSJ. 2014. Normal pregnancy- a state of insulin resistance. *J Clin Diagn Res* 8:CC01-3.

- Spiegelstein O, Mitchell LE, Merriweather MY, Wicker NJ, Zhang Q, Lammer EJ, Finnell RH. 2004. Embryonic development of folate binding protein-1 (Folbp1) knockout mice: Effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation. *Dev Dyn* 231:221-231.
- Stern CD. 2005. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development* 132:2007-2021.
- Sugiyama Y, Stump RJ, Nguyen A, Wen L, Chen Y, Wang Y, Murdoch JN, Lovicu FJ, McAvoy JW. 2010. Secreted frizzled-related protein disrupts PCP in eye lens fiber cells that have polarised primary cilia. *Dev Biol* 338:193-201.
- Sulik K, Dehart DB, Ilangaki T, Carson JL, Vrablic T, Gesteland K, Schoenwolf GC. 1994. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev Dyn* 201:260-278.
- Sussman DJ, Klingensmith J, Salinas P, Adams PS, Nusse R, Perrimon N. 1994. Isolation and characterization of a mouse homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled*. *Dev Biol* 166:73-86.
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-546.
- Tai CG, Graff RE, Liu J, Passarelli MN, Mefford JA, Shaw GM, Hoffmann TJ, Witte JS. 2015. Detecting gene-environment interactions in human birth defects: Study designs and statistical methods. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 103:692-702.
- Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M. 1997. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89:127-138.
- Tam PP, Behringer RR. 1997. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev* 68:3-25.
- Tang LS, Wlodarczyk BJ, Santillano DR, Miranda RC, Finnell RH. 2004. Developmental consequences of abnormal folate transport during murine heart morphogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70:449-458.
- Taparia S, Gelineau-van Waes J, Rosenquist TH, Finnell RH. 2007. Importance of folate-homocysteine homeostasis during early embryonic development. *Clin Chem Lab Med* 45:1717-1727.

- Taylor J, Abramova N, Charlton J, Adler PN. 1998. Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* 150:199-210.
- Tesch GH, Allen TJ. 2007. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 12:261-266.
- Torchinsky A, Toder V. 2007. TNF $\alpha$  in the Pathogenesis of Diabetic-Induced Embryopathies: Functions and Targets. *The Review of Diabetic Studies* 4:200-208.
- Torchinsky A, Toder V, Savion S, Shepshelovich J, Orenstein H, Fein A. 1997. Immunostimulation increases the resistance of mouse embryos to the teratogenic effect of diabetes mellitus. *Diabetologia* 40:635-640.
- Tremblay P, Pituello F, Gruss P. 1996. Inhibition of floor plate differentiation by Pax3: evidence from ectopic expression in transgenic mice. *Development* 122:2555-2567.
- Triedman JK, Newburger JW. 2016. Trends in Congenital Heart Disease: The Next Decade. *Circulation* 133:2716-2733.
- Usui T, Shima Y, Shimada Y, Hirano S, Burgess RW, Schwarz TL, Takeichi M, Uemura T. 1999. Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled. *Cell* 98:585-595.
- van der Put NM, Blom HJ. 2000. Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92:57-61.
- Vanaerts LA, Blom HJ, Deabreu RA, Trijbels FJ, Eskes TK, Copius Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J. 1994. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology* 50:348-360.
- Vinceti M, Malagoli C, Rothman KJ, Rodolfi R, Astolfi G, Calzolari E, Puccini A, Bertolotti M, Lunt M, Paterlini L, Martini M, Nicolini F. 2014. Risk of birth defects associated with maternal pregestational diabetes. *Eur J Epidemiol* 29:411-418.
- Vinson CR, Conover S, Adler PN. 1989. A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* 338:263-264.
- Virgo NS, Miller JR. 1974. Hereditary vasopressin-resistant diabetes insipidus in SWV mice. *Can J Physiol Pharmacol* 52:995-1011.

Wahabi HA, Esmail SA, Fayed A, Al-Shaikh G, Alzeidan RA. 2012. Pre-existing diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes. *BMC Res Notes* 5:496-0500-5-496.

Wald DS, Bishop L, Wald NJ, Law M, Hennessy E, Weir D, McPartlin J, Scott J. 2001. Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. *Arch Intern Med* 161:695-700.

Wallingford JB, Harland RM. 2002. Neural tube closure requires Dishevelled-dependent convergent extension of the midline. *Development* 129:5815-5825.

Wang Y, Guo N, Nathans J. 2006. The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *J Neurosci* 26:2147-2156.

Wei D, Loeken MR. 2014. Increased DNA methyltransferase 3b (dnmt3b)-mediated CpG island methylation stimulated by oxidative stress inhibits expression of a gene required for neural tube and neural crest development in diabetic pregnancy. *Diabetes* 63:3512-3522.

Wentzel P, Gareskog M, Eriksson UJ. 2005. Folic acid supplementation diminishes diabetes- and glucose-induced dysmorphogenesis in rat embryos in vivo and in vitro. *Diabetes* 54:546-553.

Wilson V, Olivera-Martinez I, Storey KG. 2009. Stem cells, signals and vertebrate body axis extension. *Development* 136:1591-1604.

Wlodarczyk B, Spiegelstein O, Gelineau-van Waes J, Vorce RL, Lu X, Le CX, Finnell RH. 2001. Arsenic-induced congenital malformations in genetically susceptible folate binding protein-2 knockout mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 177:238-246.

Wlodarczyk BJ, Zhu H, Finnell RH. 2014. Mthfr gene ablation enhances susceptibility to arsenic prenatal toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 275:22-27.

Wolff T, Rubin GM. 1998. Strabismus, a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*. *Development* 125:1149-1159.

World Health Organization. 2016. Global report on diabetes.

Wymeersch FJ, Huang Y, Blin G, Cambray N, Wilkie R, Wong FC, Wilson V. 2016. Position-dependent plasticity of distinct progenitor types in the primitive streak. *Elife* 5:e10042.

- Xiao Q, Yang YA, Zhao XY, He LS, Qin Y, He YH, Zhang GP, Luo JD. 2015. Oxidative stress contributes to the impaired sonic hedgehog pathway in type 1 diabetic mice with myocardial infarction. *Exp Ther Med* 10:1750-1758.
- Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. 2013. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:529-541.
- Xuan C, Li H, Zhao JX, Wang HW, Wang Y, Ning CP, Liu Z, Zhang BB, He GW, Lun LM. 2014. Association between MTHFR polymorphisms and congenital heart disease: a meta-analysis based on 9,329 cases and 15,076 controls. *Sci Rep* 4:7311.
- Yang P, Reece EA, Wang F, Gabbay-Benziv R. 2015. Decoding the oxidative stress hypothesis in diabetic embryopathy through proapoptotic kinase signaling. *Am J Obstet Gynecol* 212:569-579.
- Ybot-Gonzalez P, Cogram P, Gerrelli D, Copp AJ. 2002. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development* 129:2507-2517.
- Ybot-Gonzalez P, Copp AJ. 1999. Bending of the neural plate during mouse spinal neurulation is independent of actin microfilaments. *Dev Dyn* 215:273-283.
- Ybot-Gonzalez P, Copp AJ, Greene ND. 2005. Expression pattern of glypican-4 suggests multiple roles during mouse development. *Dev Dyn* 233:1013-1017.
- Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, Klingensmith J, Arkell R, Greene ND, Copp AJ. 2007a. Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development* 134:3203-3211.
- Ybot-Gonzalez P, Savery D, Gerrelli D, Signore M, Mitchell CE, Faux CH, Greene ND, Copp AJ. 2007b. Convergent extension, planar-cell-polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. *Development* 134:789-799.
- Yorek MS, Obrosova A, Shevalye H, Holmes A, Harper MM, Kardon RH, Yorek MA. 2015. Effect of diet-induced obesity or type 1 or type 2 diabetes on corneal nerves and peripheral neuropathy in C57Bl/6J mice. *J Peripher Nerv Syst* 20:24-31.
- Zabihi S, Loeken MR. 2010. Understanding diabetic teratogenesis: where are we now and where are we going?. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:779-790.

Zaganjor I, Sekkarie A, Tsang BL, Williams J, Razzaghi H, Mulinare J, Sniezek JE, Cannon MJ, Rosenthal J. 2016. Describing the Prevalence of Neural Tube Defects Worldwide: A Systematic Literature Review. *PLoS One* 11:e0151586.

Zernicka-Goetz M. 2005. Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:919-928.

Zhao J, Hakvoort TB, Willemsen AM, Jongejan A, Sokolovic M, Bradley EJ, de Boer VC, Baas F, van Kampen AH, Lamers WH. 2016. Effect of Hyperglycemia on Gene Expression during Early Organogenesis in Mice. *PLoS One* 11:e0158035.

Zhu C, Yang H, Geng Q, Ma Q, Long Y, Zhou C, Chen M. 2015. Association of oxidative stress biomarkers with gestational diabetes mellitus in pregnant women: a case-control study. *PLoS One* 10:e0126490.

Zhu H, Kartiko S, Finnell RH. 2009. Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects. *Clin Genet* 75:409-423.

Zhu H, Wlodarczyk BJ, Scott M, Yu W, Merriweather M, Gelineau-van Waes J, Schwartz RJ, Finnell RH. 2007. Cardiovascular abnormalities in *Folr1* knockout mice and folate rescue. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79:257-268.



