



Inmunoexpresión de enzimas antioxidantes en embriones de rata en cultivo en presencia de una elevada concentración de glucosa y poliaminas

Chirino Galindo Gladys, Hurtado Monzón Arianna Mahely, Aguilar Amezcua Claudia Verónica, Guzmán Nava José Antonio, Palomar Morales Martín*

Universidad Nacional Autónoma de México. Laboratorio de Metabolismo de la Diabetes Mellitus, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala Avenida de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. Tlalnepantla. C.P. 54090. Estado de México.

*Autor para correspondencia: martin_palomar2004@yahoo.com.mx

Recibido:

30/mayo/2016

Aceptado:

2/agosto/2016

Palabras clave

Teratogénesis,
embrioprotección,
inmunohistoquímica

Keywords

Teratogenesis,
embryoprotection,
immunohistochemistry

RESUMEN

La diabetes mellitus complicada con gestación produce malformaciones, retraso del desarrollo y pérdida de gestación. La glucosa es el teratógeno principal, posiblemente por un mecanismo mediado por aumento del estrés oxidativo. Las poliaminas espermidina y espermina revierten casi completamente los efectos dismorfogénicos que la glucosa causa, sin cambio aparente en la actividad de enzimas depuradoras. El presente estudio se realizó para tratar de dilucidar cambios en la inmunoexpresión de las enzimas antioxidantes por efecto de glucosa y poliaminas. Se cultivaron embriones postimplantacionales de rata en presencia de glucosa con o sin poliaminas, y se recuperaron para ser cortados al micrótopo de rotación; las laminillas fueron sometidas a inmunohistoquímica para las enzimas catalasa, SOD-1 y SOD-2, y se observaron al microscopio. Los resultados indican que puede haber cambio en la inmunoexpresión de las enzimas depuradoras de radicales libres durante la dismorfogénesis embrionaria, y que las poliaminas pueden evitar parcialmente estos efectos.

ABSTRACT

Diabetes mellitus plus gestation produces malformations, delay of development and loss of pregnancy. Apparently, glucose is the main teratogen, possibly by a mechanism mediated by increased oxidative stress. The polyamines spermidine and spermine almost completely reversed the dysmorphogenic effects of glucose without change in the activity of scavenging enzymes. The present study was carried out to try to elucidate the changes in immunoexpression of enzymes by effect of glucose and polyamines. Postimplantational rat embryos were incubated in the presence of glucose with or without polyamines, and were recovered, fixed, dehydrated, and sectioned in a rotation microtome; the sections were subjected to immunohistochemistry for catalase, SOD-1 and SOD-2, and were observed under the microscope. The results indicate that there may be change in the immunexpression of these enzymes during the embryo dysmorphogenesis, and polyamines could partially prevent these effects.



Introducción

La interacción entre diabetes mellitus franca, del tipo 1 o del tipo 2, con la gestación, es una de las causas de aparición de factores de riesgo neonatal, malformaciones congénitas, retraso del desarrollo y muerte embrionaria o fetal (óbito y aborto). La influencia de las alteraciones metabólicas del estado diabético sobre el desarrollo es distinta en la gestación complicada por diabetes previa que en la DMG (Metzger, 1991), de manera que se puede distinguir entre embriopatía diabética como aquellos daños al desarrollo causados por la diabetes en etapas tempranas de la gestación (neurulación-organogénesis), y fetopatía diabética como el efecto de hipernutrición sobre el feto en etapas tardías del desarrollo (Buchanan y Kitzmiller, 1994; Reece et al., 1994; Freinkel, 1980; Freinkel et al., 1986).

Antes de la introducción de la insulina en la terapéutica médica, la coexistencia del embarazo y la DM, cuando ocurría, era causa frecuente de mortalidad materna, la que se redujo por el tratamiento profiláctico con insulina a partir de la década de los 20's (Freinkel, 1980); sin embargo este tratamiento no tuvo efecto sobre la morbilidad y mortalidad perinatal, las cuales sólo se lograron reducir a valores cercanos a los de la población general en la década de los 80's, debido a un mejor manejo con dieta e insulina, previo a la concepción (Freinkel et al., 1986; Ferris y Reece, 1994; Gabbe, 1985). Sin embargo, la incidencia de malformaciones y el retraso de desarrollo aún es de tres a cuatro veces más alta que en embarazos de mujeres no diabéticas (Buchanan y Kitzmiller, 1994; Danglot-Banck y Gómez-Gómez, 2004; Lesser y Carpenter, 1994; Reece et al., 1994).

Mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha postulado como el principal teratógeno a la glucosa (Sadler, 1980), y se ha propuesto como el principal mecanismo teratogénico el aumento en el estrés oxidativo debido a la producción incrementada de especies reactivas de oxígeno por el exceso de glucosa circulante, ya sea en la economía materna, o en el medio de cultivo (Ornoy, 2007).

Las ERO's se han encontrado elevadas en numerosas enfermedades, y particularmente, se ha propuesto que intervienen en la teratogenicidad de la diabetes en el embarazo (Hagay et al., 1995; Ornoy et al., 1999). Las ERO's pueden ser perjudiciales para las principales funciones de la célula, ya que al reaccionar con los ácidos grasos insaturados en las membranas, originan peroxidación de lípidos, lo que causa disminución en la fluidez de la membrana y la formación de aldehídos reactivos, que a su vez pueden difundir a otras partes de la célula y reaccionar con macromoléculas. Los radicales de oxígeno pueden reaccionar directamente con las

proteínas, dando como resultado, por ejemplo, entrecruzamiento del colágeno con el ADN, que causa daños tanto a las bases como a los azúcares (Cederberg et al., 2000).

Hay tres tipos de resultados que indican participación del exceso de ERO's en la embriopatía diabética. Primero, la diabetes *in vivo* y la hiperglucemia *in vitro* causan un aumento de lípidos peroxidados y radicales libres en los *concepti*. Segundo, los problemas de desarrollo observados *in vivo* en ratas diabéticas preñadas y en los embriones cultivados *in vitro* a altas concentraciones de glucosa, pueden ser inducidos por la producción enzimática de iones superóxido en los sistemas de cultivo de embriones. Por último, los antioxidantes de bajo peso molecular, al ser añadidos a la dieta, disminuyen la tasa de malformaciones en el embarazo de ratas diabéticas (Cederberg et al., 2000).

Las poliaminas son compuestos que tienen un peso molecular bajo, una estructura simple (aminas alifáticas), y se encuentran cargadas positivamente en condiciones fisiológicas. Las principales poliaminas fisiológicas son la putrescina, espermidina y espermina (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Ochoa et al., 2002).

Aunque no se conoce exactamente el papel de las poliaminas, existe evidencia de que son necesarias para la división, crecimiento, proliferación y diferenciación celular, ya que los estímulos asociados con estos eventos inducen cambios en las concentraciones intracelulares de estas, mientras que la administración de inhibidores de la síntesis de poliaminas detiene dichos procesos (Bachrach et al., 2001; Igarashi y Kashiwagi, 2000; Tabor y Tabor, 1984).

Se ha reportado que las poliaminas son depuradores endógenos de ERO's, por lo cual pueden proteger el DNA, las proteínas y los lípidos del daño oxidativo; y son esenciales para la proliferación, la diferenciación y la función celular (Ha et al., 1998; Kwon et al., 2003).

Por otra parte, los mecanismos de defensa antioxidante incluyen una variedad de enzimas, entre las que se encuentran la Glutatión Peróxidasa (GPx), la Superóxido Dismutasa (SOD) y la Catalasa (Cat), las cuales son las principales enzimas depuradoras de ERO. Las tres difieren en la distribución subcelular y el tipo de reacción catalizada (Cederberg et al., 2000; Ornoy et al., 1999).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa no se afectan por incubación de embriones postimplantacionales en presencia de elevada glucosa, y que la adición de

poliaminas no tiene tampoco ningún efecto; aunque la lipoperoxidación, indicador indirecto del estrés oxidativo, se incrementa por efecto de la glucosa, pero la adición de poliaminas la restaura a niveles casi normales (Chirino-Galindo et al., 2012). En ese trabajo, no se pudo detectar actividad de catalasa, pero otros grupos de investigación han detectado actividad tipo catalasa en embriones de día 11 *in vivo* (Sivan et al., 1997), así como efecto de la diabetes en esta actividad (Cederberg and Eriksson, 1997); la actividad se ha detectado en embriones de 10.5 días de edad gestacional incubados por 28 h, y se ha reportado disminución de la actividad en medio hiperglucémico-hipercetonémico, así como restauración de la actividad por suplementación de vitaminas C y E en el medio de cultivo (Ornoy et al., 1999; Zaken et al., 2001).

El propósito de éste trabajo es tratar de detectar si la incubación de embriones en medio con elevada glucosa afecta la inmun expresión de enzimas antioxidantes (catalasa, SOD-1 y 2) de embriones de rata, así como el efecto que la suplementación con espermidina o espermina sobre dicha inmun expresión.

Metodología

Reactivos

Se utilizaron reactivos grado analítico, de las marcas Sigma Chemical Co, Merck o J.T: Baker, excepto donde se indica.

Material biológico

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar, vírgenes, de 2 ½ a 3 meses de edad, con peso de 250 a 300 g, con ciclos estrales definidos, las cuales se mantuvieron en condiciones de luz, humedad y temperatura controladas (12 h luz por 12 h oscuridad; 22 °C, 60% de humedad ambiental) con agua y alimentación *ad libitum* (Rodent Diet 2018S, Harlan, México). Para el apareamiento de las hembras, se colocaron toda la noche dos ratas en presencia de un macho de la misma cepa, sanas, de fertilidad comprobada y se tomó al día siguiente el lavado vaginal, que se observó al microscopio, y se asignó como tiempo cero la media noche anterior al día en que se detectaron espermatozoides en dicho lavado.

Preparación del medio de cultivo

Se obtuvo suero de ratas hembras o macho pies de crías, retirados, y se centrifugó inmediatamente de acuerdo a New (1978). El suero se congeló a -70 °C hasta el momento de la preparación del medio de cultivo, antes de lo cual se inactivó por calentamiento a 56 °C durante 30 min. El medio de cultivo control o normal consta de

suero inmediatamente centrifugado e inactivado al 80% en solución salina fisiológica (NaCl 154 mM) suplementado con antibióticos (penicilina 1000 UI/mL y estreptomycin 100 µg/mL), y se filtra a través de una membrana Millipore de 0.22 µm de malla. El medio puede volver a congelarse antes de utilizarlo.

Adicionalmente se prepararon medio “hiperglucémico” o con elevada glucosa (500 mg/dL; GLC), medio con elevada glucosa y espermidina 25 µM (SPD), y medio con elevada glucosa y espermina 25 µM (SPM). Los medios se filtraron de la misma manera.

Cultivo de embriones

El día 10 de gestación, cerca del mediodía, las ratas preñadas fueron anestesiadas, y antes de la muerte cardiaca, se hizo una incisión ventral (laparotomía) para obtener el útero, el cual se colocó en solución salina estéril, en una caja Petri a 37 °C. En condiciones estériles, y con ayuda de pinzas de relojero y de tijeras curvas de oftalmología se limpió el útero de sangre y tejido graso.

Posteriormente, con ayuda de dos pinzas de relojero, se separó la decidua del útero; la cual contenía el embrión; inmediatamente después, con ayuda de un microscopio estereoscópico Leica MZ6, se separó el embrión de la decidua y se retiró la membrana de Reichert con ayuda de “agujas de chaquiras”. Los embriones se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 2.0 mL de capacidad, estériles, con 1.0 mL de medio de cultivo pregasificado 3-5 minutos con una mezcla de gases (O₂/CO₂/N₂ 5/5/90), y se mantuvieron a 37 °C, rotando a 30 rpm en un aparato diseñado para este fin en el Taller de Equipo para Laboratorio de Enseñanza de la FES Iztacala, llamado Rotocell®, durante 24 hrs. Se incubaron por lo menos doce embriones en cada una de las condiciones.

Al término de la incubación, los embriones se obtuvieron, y enjuagaron en solución salina (NaCl 0.9%), para ser observados al microscopio estereoscópico acoplado a una cámara fotográfica Moticam 5, y con ayuda de una reglilla y un ocular micrométricos se evaluaron los cambios morfológicos, y se tomaron fotografías para su registro y almacén.

Técnica Inmunohistoquímica

Una vez observados al microscopio, los embriones post-cultivados se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS por 24 h; se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones para posteriormente aclarar los tejidos con xilol; seguido por imbibición e inclusión en paraplast plus (Histowax, Leica Microsystems); y finalmente se cortaron en el micrótomato de rotación Leica 2125RTS a 5-

6 μm . Las secciones se extendieron sobre portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina, para adherir el tejido al vidrio.

Se realizó la técnica inmunohistoquímica de la siguiente manera: las laminillas se desparafinaron con xilol, se trataron con metanol suplementado con H_2O_2 0.3% durante 30 min, y se rehidrataron con alcohol etílico a diferentes concentraciones. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C, seguido por incubación con el anticuerpo secundario, conjugado con biotina, y posteriormente se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 1 h; y se usó 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Para catalasa, el anticuerpo primario utilizado fue anticatalasa anti-humano monoclonal de ratón (Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri), y el secundario, el IgG anti-ratón de cabra biotinilado (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California). Para SOD-1, el anticuerpo primario era de oveja dirigido contra la Cu/Zn-SOD humana (Vector Laboratories, Burlingame CA) y el anticuerpo secundario era de conejo anti-IgG de oveja, biotinilado. Para la SOD-2, el anticuerpo primario usado fue de conejo anti-SOD II de oveja (Santa Cruz Biotechnology), y el secundario de cabra anti-IgG de conejo, biotinilado (Santa Cruz Biotechnology).

Con el fin de comprobar que la reacción observada se debía a la enzima buscada y no a las peroxidases endógenas inespecíficas, se realizaron dos controles negativos, en uno se agregó DAB a las muestras después de tratarlas con metanol adicionado con H_2O_2 0.3%; y en el segundo se omitió el anticuerpo primario. Por último las laminillas se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron de nuevo con alcoholes a diferentes concentraciones, se transfirieron a xilol y se montaron con medio de montaje para inmunohistoquímica (Palomar-Morales et al., 2010).

Cuantificación de la reacción

Se observaron las laminillas al microscopio óptico Leica DM500 equipado con una cámara fotográfica Leica ES3, y se tomaron fotos, para posteriormente cuantificar la cantidad de gránulos inmunorreactivos por área de medición y la diferencia de color en las imágenes obtenidas (Palomar-Morales et al., 2010) con el programa Image Pro Plus 6.0, con el fin de convertir la intensidad del color café a un valor numérico entre 0 (blanco) y 255 (negro). Se analizaron los campos visuales con tejido cefálico o cardíaco. De cada embrión se obtuvo un solo valor, promedio de estas determinaciones. A su vez estos promedios fueron colectados.

Análisis Estadístico

Los resultados numéricos obtenidos se evaluaron mediante ANOVA simple seguido por prueba de Tukey cuando fue necesario, los resultados no paramétricos se evaluaron por la prueba de Kruskal-Wallis. Se usó el paquete estadístico SAS® 9.0.

Resultados y discusión

Crecimiento de los embriones

La morfología de los embriones de rata de diez días de edad gestacional cultivados por 24 h fue diferente en los cuatro grupos estudiados (Figura 1). Los embriones cultivados en el medio control presentan la morfología normal de la especie, si bien son un poco menores (Chirino, 2007). Por otro lado los embriones cultivados en una concentración elevada de glucosa presentan una alteración del desarrollo al grado que la morfología es anormal; mientras que los embriones cultivados en una elevada concentración de glucosa y suplementados con espermidina o espermina presentan una reversión de la alteración en el desarrollo y su morfología es similar a la mostrada por los embriones cultivados en medio control. El análisis morfométrico demostró que hay un retraso del crecimiento y un efecto profundo sobre el desarrollo (Figura 1). Tanto la longitud cefalocaudal, el número de somitas, el diámetro del saco vitelino, y la longitud de la cabeza, indicadores de crecimiento, son menores estadísticamente en embriones cultivados en medio con glucosa a una concentración de 500 mg/dL (Tabla 1); la adición de espermidina o espermina restaura los valores morfométricos a los normales.

Se cultivaron por lo menos 20 embriones bajo cada una de las cuatro condiciones establecidas en la metodología; sin embargo, durante el proceso de deshidratación algunos se perdieron, y durante el proceso de corte, de otros no se obtuvieron secciones adecuadas para poder realizar la técnica inmunohistoquímica, por lo cual en algunos casos sólo se realizó la técnica inmunohistoquímica para dos enzimas en lugar de para las tres; por lo que en éste trabajo se describen los resultados obtenidos en ésta para 10-12 determinaciones para cada caso.

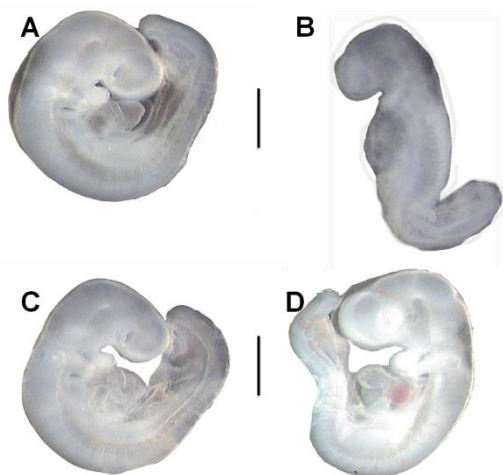


Figura 1. Embriones de 10.5 días de edad gestacional incubados por 24 h en distintas condiciones: A: medio control; B: medio con glucosa 500 mg/dL; C: medio con elevada glucosa y espermidina 25 μ M; D: medio con elevada glucosa y espermina 25 μ M.

Tabla 1. Efecto de la glucosa y las poliaminas sobre el crecimiento de los embriones de rata de diez días de edad gestacional, cultivados por 24 horas.

	Longitud cefalo-caudal (mm)	Número de somitas	Diámetro de saco vitelino (mm)	Longitud de la cabeza (mm)
CTR	3.58 \pm 0.09	25.80 \pm 0.89	4.55 \pm 0.09	1.83 \pm 0.05
GLC	2.23 \pm 0.07 ^a	18.57 \pm 0.51 ^a	3.15 \pm 0.051 ^a	1.14 \pm 0.05 ^a
GLC+SPD	3.71 \pm 0.07	28.00 \pm 0.65	4.70 \pm 0.07	1.94 \pm 0.05
GLC+SPM	3.77 \pm 0.05	28.71 \pm 0.46	4.77 \pm 0.05	1.97 \pm 0.05

Promedio \pm SD de 18-20 determinaciones; ^aP < 0.05 con respecto al control.

El cultivo de embriones aporta evidencia sustancial acerca de los mecanismos mediante los cuales los factores teratogénicos ejercen sus efectos nocivos sobre la progenie; pero también es un acercamiento muy utilizado para poder estudiar el posible efecto protector de sustancias o moléculas antiteratogénicas sobre la DM (hiperglucemia) o sobre otros factores teratogénicos (Chirino, 2007; Ellington, 1997).

La morfología anormal presentada por los embriones cultivados en medio suplementado con glucosa, está

sustentada con la evidencia que señala que la DM tipo 1 mal controlada, la hiperglucemia experimental, o la incubación de embriones en medio con elevada glucosa, produce en la progenie alteración del crecimiento (productos con bajo peso al nacer o fetos menos desarrollados) y del desarrollo (malformaciones en neonatos o en fetos; dismorfogénesis en cultivo) (Eriksson et al., 2003; Forsberg et al., 1996; Ornoy et al., 1999). Es importante hacer notar que la adición de espermidina o espermina revierte la dismorfogénesis, ya que los embriones muestran la forma característica de la especie para esta edad gestacional; pero además los valores de los parámetros morfométricos se acercan a los encontrados para el grupo control, lo que ya había sido reportado previamente por Chirino-Galindo et al. (2009, 2012).

Inmunohistoquímica para catalasa

En los cortes histológicos de los embriones (Figura 2) se puede observar la manifestación del color café, el cual es determinado por la presencia de la catalasa. Independientemente de la incubación a la que se someten los embriones, la catalasa se localiza en el tubo neural, tejido cardíaco, y en los tejidos extraembrionarios principalmente.

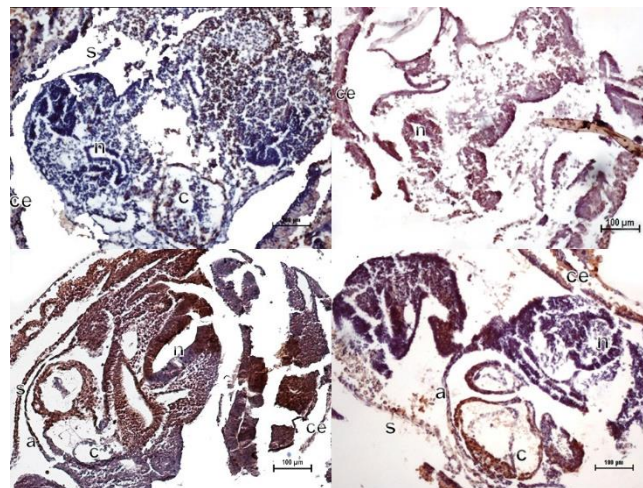


Figura 2. Reacción inmunohistoquímica para catalasa en embriones cultivados en medio normal (arriba, izquierda); glucosa (arriba, derecha), espermidina (abajo, izquierda), y espermina (abajo, derecho).

Tanto la intensidad del color café, (Figura 3) como la cantidad de gránulos inmunorreactivos por área de medición (Figura 4), determinados con el programa Image Pro Plus 6.0 están relacionados de manera directa con la cantidad de catalasa; sin embargo, no hay diferencia en la intensidad del color, entre los cuatro grupos, mientras que con respecto a la cantidad de

gránulos inmunorreactivos por área de medición, se ven más gránulos en los embriones cultivados en presencia de glucosa, aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas.

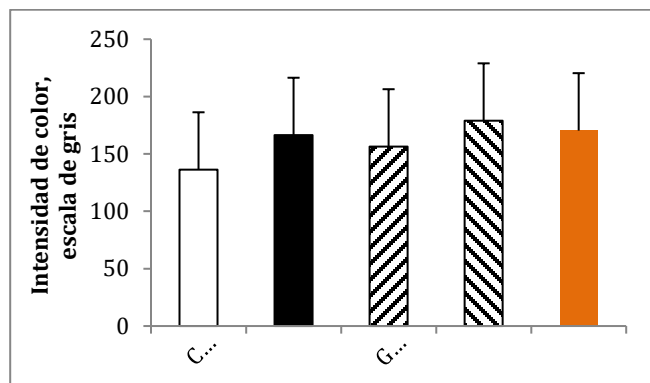


Figura 3. Intensidad de reacción inmunohistoquímica para catalasa, en unidades arbitrarias, en cortes histológicos de embriones cultivados en presencia de glucosa, suplementada con poliaminas. Promedio \pm SD de 10-12 determinaciones. No hay diferencias significativas.

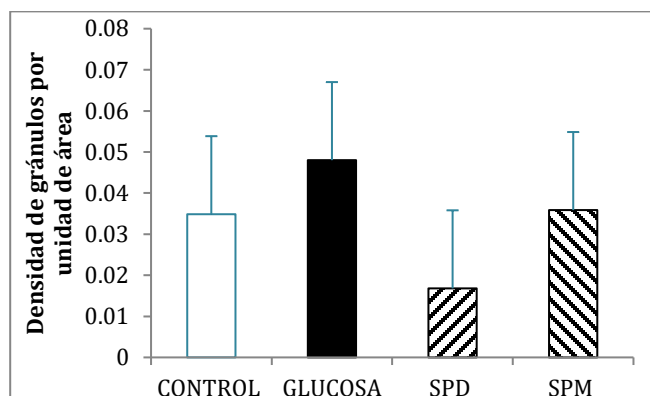


Figura 4. Densidad de gránulos inmunorreactivos para catalasa, por unidad de área, en cortes histológicos de embriones cultivados en presencia de glucosa, suplementada con poliaminas. Promedio \pm SD de 10-12 determinaciones. No hay diferencias significativas.

Es importante hacer resaltar que, en un estudio previo, no se encontró actividad de Cat en embriones de 10.5 días de edad cultivados bajo las condiciones usadas en este estudio (Chirino-Galindo et al., 2012), pero otros autores han encontrado inmunoreactividad a esta proteína, únicamente en la región cefálica *in vivo* en embriones de 10.5 días de edad gestacional, mientras que no se demuestra en otros tejidos en desarrollo (Nardacci et al., 2004), por lo cual se buscó Cat en embriones de rata *in vitro* por métodos inmunohistoquímicos; encontrando una tendencia a disminuir la cantidad de catalasa en embriones cultivados en medio glucosado, sin embargo no hubo diferencia significativa entre estos y los

cultivados en medio control. Esto puede deberse a que cuando un órgano se encuentra bajo estrés oxidativo, la actividad de las enzimas antioxidantes aumenta. Sin embargo, al continuar el estrés oxidativo, se va reduciendo la actividad enzimática (Ornoy, 2007).

Inmunohistoquímica para SOD-1

En embriones cultivados en medio control se puede observar que esta proteína se expresa en todo el tejido de manera uniforme; las zonas en donde se observa un color morado más oscuro es donde la proteína se encuentra expresada (citoplasma); en el centro de cada célula se puede observar el núcleo en color negro; también se observa que no hay degeneración o muerte celular (Figura 5).

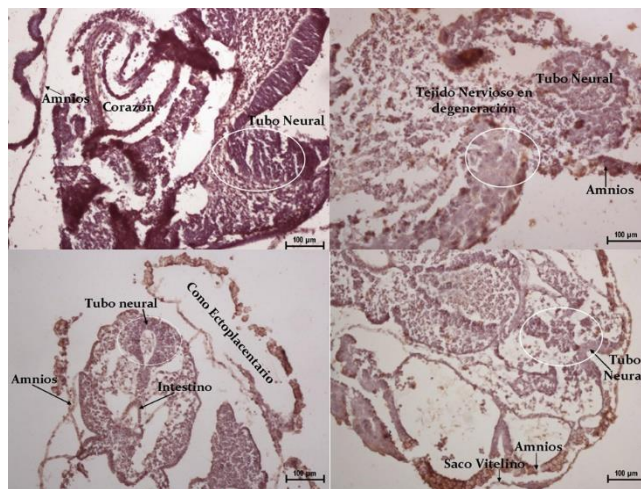


Figura 5. Reacción inmunohistoquímica para SOD-1 en embriones cultivados en medio normal (arriba, izquierda); glucosa (arriba, derecha), espermidina (abajo, izquierda), y espermina (abajo, derecha).

En los embriones cultivados en medio con elevada glucosa, la expresión de la SOD-1 no es igual en todos los tejidos, y donde se encuentra es muy débil su expresión ya que la glucosa incrementa la aparición de las especies reactivas de oxígeno, por lo cual inhibe la expresión de la proteína por lo tanto causa más daño a los tejidos. Las poliaminas al parecer protegen algunas estructuras, ya que la expresión de la proteína al parecer está dada en todos los tejidos; pero el efecto de la espermidina parece ser un poco mayor que el de la espermina (Figura 5).

La cuantificación de la reacción inmunohistoquímica para SOD-1, tanto para la intensidad de la reacción (Figura 6), como para la cantidad de gránulos por unidad de área (Figura 7), no mostró cambio por efecto de alguna adición, ya sea de la glucosa, o de las poliaminas, cuando se realizó el análisis estadístico.

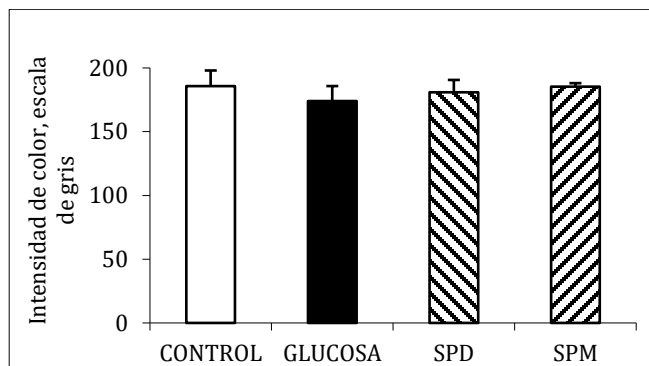


Figura 6. Intensidad de reacción para SOD-1, en unidades arbitrarias, en cortes histológicos de embriones cultivados en presencia de glucosa, suplementada con poliaminas. Promedio \pm SD de 10-12 determinaciones. No hay diferencias significativas.

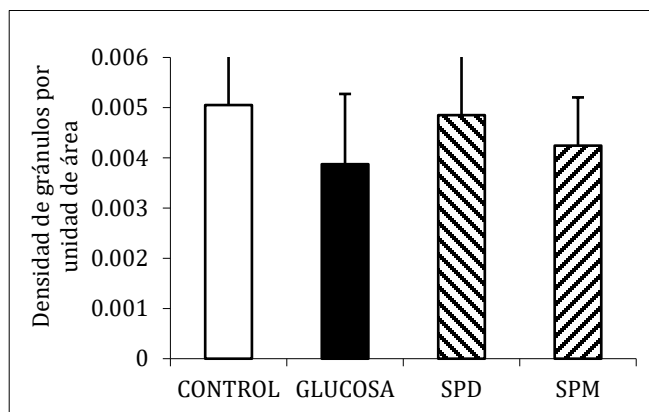


Figura 7. Densidad de gránulos inmunorreactivos por SOD-1, por unidad de área, en cortes histológicos de embriones cultivados en presencia de glucosa, suplementada con poliaminas. Promedio \pm SD de 10-12 determinaciones. No hay diferencias significativas.

Otros grupos de trabajo demostraron que la actividad de la SOD-1 era mayor en los embriones de rata cultivados en un medio con altas concentraciones de glucosa (Zabihi y Loeken, 2010), lo que proporciona la evidencia de que en un medio hiperglucémico hay una mayor producción de EROs. Eriksson y Borg (1991) observaron un ligero incremento general en la actividad de esta enzima en los embriones cultivados en altas concentraciones de glucosa *in vitro*, sin embargo, los métodos bioquímicos no distinguen entre la actividad debida a la isoenzima citosólica (SOD-1 ó Cu/Zn-SOD) o la mitocondrial (SOD-2 ó Mn-SOD). Estudios *in vivo* demuestran que los niveles en la actividad de SOD disminuyen en los embriones de madres diabéticas y no diabéticas con desarrollo anormal. Hagay et al. (1995) encontraron que el incremento en la actividad de SOD en ratones

transgénicos actuó como protectora contra la embriopatía diabética.

Por último, toda esta evidencia apoya los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la expresión de la enzima en los diferentes tratamientos, ya que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de SOD-1 entre los embriones normales y los embriones malformados, por lo que se piensa que la sobreproducción de EROs no afecta la actividad de esta enzima depuradora de radicales libres, pero protege junto con otros antioxidantes (Vitaminas C y E y ácido fólico) a los embriones de los efectos nocivos que causan las altas concentraciones de glucosa.

Inmunohistoquímica para SOD-2

Se puede observar en las laminillas la manifestación del color café, el cual es determinado por la presencia de la SOD-2 (Figura 8). La inmunoexpresión no se afecta por la incubación con glucosa o la suplementación con poliaminas (Figura 9); pero en cambio la distribución, evaluada como gránulos por unidad de área, disminuye por efecto de la glucosa, y se restaura parcialmente por adición de espermidina o espermina al medio de cultivo (Figura 10).

En embriones de roedores, muchos estudios han demostrado que los ERO's son producidos por la diabetes materna o el cultivo en presencia de elevadas concentraciones de glucosa en el medio, y que la administración de antioxidantes, o con experimentos en animales transgénicos que sobreexpresan la SOD revierten la frecuencia de malformaciones (Bachrach et al., 2001; Chirino Galindo, 2007; Hagay et al., 1995).

Este trabajo aporta evidencia necesaria que demuestra que las ERO se incrementan en los tejidos expuestos a la hiperglucemia, y que el estrés oxidativo juega un importante papel en la etiología de las malformaciones producidas por la diabetes pudiendo prevenir el estrés oxidativo y revertir los defectos en el desarrollo embrionario con la utilización de espermina y espermidina.

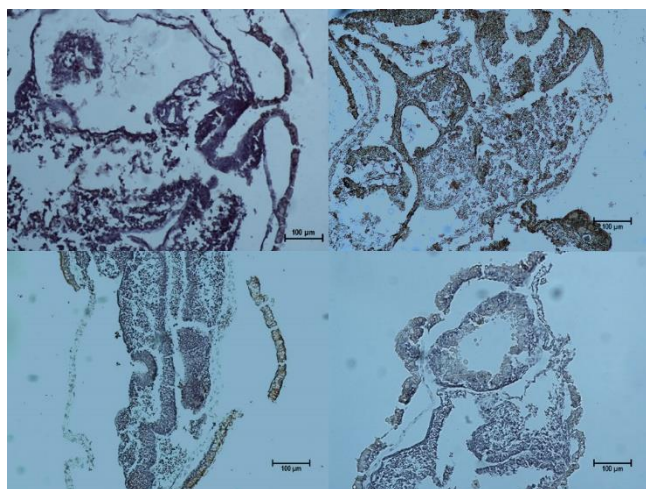


Figura 8. Reacción inmunohistoquímica para SOD-2 en embriones cultivados en medio normal (arriba, izquierda); glucosa (arriba, derecha), espermidina (abajo, izquierda), y espermina (abajo, derecho).

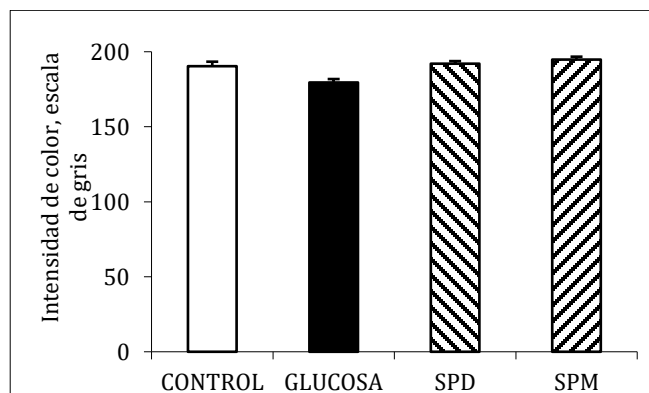


Figura 9. Intensidad de reacción para SOD-2, en unidades arbitrarias, en cortes histológicos de embriones cultivados en presencia de glucosa, suplementada con poliaminas. Promedio \pm SD de 10-12 determinaciones. No hay diferencias significativas.

Conclusiones

La inmunorreactividad de las enzimas antioxidantes Cat, SOD-1 y SOD-2 en embriones de rata de 10.5 de edad gestacional cultivadas por 24 h no se afecta por adición de glucosa o poliaminas.

La distribución y abundancia de gránulos inmunorreactivos por unidad de área para SOD-2 parece afectarse por efecto de glucosa y de poliaminas, mientras que la de Cat y SOD-1 no parece afectarse.

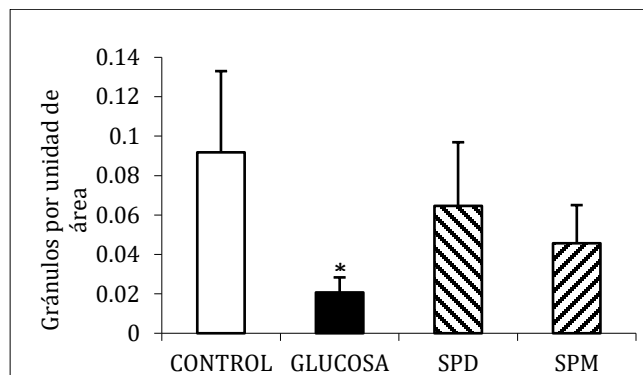


Figura 10. Densidad de gránulos inmunorreactivos por SOD-2, por unidad de área, en cortes histológicos de embriones cultivados en presencia de glucosa, suplementada con poliaminas. Promedio \pm SD de 10-12 determinaciones. * $P < 0.05$ comparado con el grupo control.

Es posible que cambios en el estado oxidativo de los embriones pueda afectar la expresión de genes apoptóticos y antiapoptóticos. Se está realizando investigación en este sentido.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado parcialmente por la División de Investigación y Posgrado de la FES Iztacala a través de la Unidad de Morfología y Función, y por el PAPIIT, proyecto IN215414.

Los autores desean agradecer al M. en C. Fernando Barrón Moreno, del bioterio de la FESI su apoyo en el cuidado de los sujetos experimentales a lo largo del presente proyecto.

Nuestro agradecimiento especial para el Biol. José Martínez Aguilar (R.I.P.) del TELE, por el diseño y construcción del Rotocell®, así como su reparación cuando fue necesario.

Dulce Raquel Flores Olmedo ayudó al diseño de las figuras 2, 5 y 8 a partir de las microfotografías.



Referencias

- Bachrach U., Wang Y. C., Tabib, A. (2001). Polyamines: New cues in cellular signal transduction. *News Physiol. Sci.* 16: 106-109.
- Buchanan T. A., Kitzmiller J. L. (1994). Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annu. Rev. Med.* 45: 245-260.
- Cederberg J., Eriksson J. U. (1997). Decreased catalase activity in malformation-prone embryos of diabetic rats. *Teratology* 56: 350-357.
- Cederberg J., Galli J., Holger L., Eriksson U. (2000). Increased mRNA levels of Mn-SOD and catalase in embryos of diabetic rats from a malformation-resistant strain. *Diabetes* 49: 101-107.
- Chirino G. G. (2007). Efecto de las poliaminas sobre el crecimiento de embriones de rata cultivados in vitro, en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. Tesis de Licenciatura en biología. FES Iztacala, UNAM.
- Chirino-Galindo G., Baiza-Gutman L. A., Barrera-Escorcía E., Palomar-Morales M. (2009). Polyamines protect rat embryo in vitro from high glucose-induced developmental delay and dysmorphogenesis. *Birth Def. Res. (Part B)* 86: 58-64.
- Chirino-Galindo G., Mejía-Zepeda R., Palomar-Morales M. 2012. Change in lipoperoxidation but not in scavenging enzymes activity during polyamine embryoprotection in rat embryo cultured in hyperglycemic media. *In Vitro Cell. Devel. Biol. Anim.* 48: 570-576.
- Danglot-Banck C., Gómez-Gómez M. (2004). Los hijos de madres diabéticas. *Rev. Mex. Ped.* 71: 248-257.
- Ellington S. K. L. (1997). Effects of excess glucose on mammalian post-implantation embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 299-306.
- Eriksson U. J. (1991). Diabetes in pregnancy: effects on post implantation embryos. *Isr. J. Med. Sci.* 27: 478-486.
- Eriksson U. J., Borg L.A.H. 1991. Protection by free oxygen radical enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia*, 34: 325-331.
- Ferris A. M., Reece E. A. (1994). Nutritional consequences of chronic maternal conditions during pregnancy and lactation: lupus and diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 59 (Suppl): 465S-473S.
- Forsberg H., Borg L. A., Eriksson U. J. (1996). Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. *Free Radic. Res.* 24: 451-459.
- Freinkel N. (1980). The Banting lecture: of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29: 1023-1035.
- Freinkel N., Cockroft D. L., Lewis N. J., Gorman L., Akazawa S., Phillips L. S., Shambaugh G. E. III. (1986). The 1986 McCollum award lecture. Fuel-mediated teratogenesis during early organogenesis: The effects of increased concentrations of glucose, ketones, or somatomedin inhibitor during rat embryo culture. *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 986-995.
- Gabbe S. G. (1985). Management of diabetes mellitus in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 153: 824-828.
- Ha H., Sirisoma N., Kuppusamy P., Zweier J., Woster P., Casero Jr. R. A. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11140-11145.
- Hagay Z. J., Weiss Y., Zusman I., Peled-Kamar M., Reece E. A., Eriksson U. J., Grouer Y. (1995). Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger cooper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. *Am. J. Obstet Gynecol* 173: 1036-1041.
- Igarashi K., Kashiwagi K. (2000). Polyamines: Mysterious of modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559-564.
- Kwon H., Wu G., Bazer F. W., Spencer T. E. (2003). Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biol. Reprod.* 69: 1626-1634.
- Lesser K. B., Carpenter M. W. (1994). Metabolic changes associated with normal pregnancy and pregnancy complicated by diabetes mellitus. *Semin. Perinatol.* 18: 399-406.
- Metzger B. E. (1991). Biphasic effects of maternal metabolism on fetal growth. Quintessential expression of fuel-mediated teratogenesis. *Diabetes* 40 (Suppl 2): 99-105.
- Nardacci R., Falciatori I., Moreno S., Stefanini S. (2004). Immunohistochemical localization of peroxisomal enzymes during rat embryonic development. *J. Histochem. Cytochem.* 52: 423-436.
- New D. A. T. (1978). Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.* 53: 81-122.
- Ochoa R., Leal G., Méndez J. (2002). Papel de las poliaminas en inmunosupresión. *Rev. Med. IMSS* 40: 77-83.



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

Ornoy A. (2007). Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod. Toxicol.* 24: 31-41.

Palomar-Morales M., Morimoto S., Mendoza-Rodriguez C., Cerbon M. (2010). The protective effect of testosterone on streptozotocin-induced apoptosis in β cells is sex specific. *Pancreas* 39: 193-200.

Reece E. A., Homko C., Wiznitzer A. (1994). Metabolic changes in diabetic and nondiabetic subjects during pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* 49: 64-71.

Sadler T. W. (1980). Effects of maternal diabetes on early embryogenesis: I. The teratogenic potential of diabetic serum. *Teratology* 21: 339-347.

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

Zabihi S., Wentzel P., Eriksson U. J. (2008). Maternal blood glucose levels determine the severity of diabetic embryopathy in mice with different expression of Copper-Zinc Superoxide Dismutase (CuZnSOD). *Toxicol. Sci.* 105: 166-172.

Zaken V., Kohen R., Ornoy, A. (2001). Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 64: 33-44.