

ESTUDIO MORFOMÉTRICO EN LA DESCENDENCIA DE RATAS DIABÉTICAS

Yelina Gorrita Pérez¹, Nínive Núñez López², Sonia Clapés Hernández³, Tammy Fernández Romero⁴

¹ Facultad de Ciencias Médicas Mayabeque. Cuba

² Facultad de Ciencias Médicas "Victoria de Girón". Cuba

³ Facultad de Ciencias Médicas "Victoria de Girón". Cuba

⁴ Facultad de Ciencias Médicas "Victoria de Girón". Cuba

Correo electrónico: yelinagorrita@infomed.cld.cu

RESUMEN

Se realizó una investigación experimental en ratas hembras de la cepa Wistar criolla, mediante un modelo de diabetes mellitus de hiperglucemia aguda, con el objetivo de identificar las modificaciones en las medidas del peso, talla, diámetros craneanos y morfometría facial de los fetos de ratas diabéticas, tratadas o no con vitamina E, con respecto a un grupo control. Los fetos se extrajeron el día antes de llegar al término de la gestación y sometidos a un estudio morfométrico. Se estudiaron 198 fetos procedentes de madres diabéticas y 53 del grupo control para un total de 251. Se utilizaron variables como peso, talla, diámetros craneanos y las variables de morfometría facial. La información se procesó estadísticamente y se aplicaron medidas para análisis de variables cuantitativas como la media, desviaciones estándar y promedio. Para la comparación de las medias se utilizó el test Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney y se consideró un nivel de significación con valores de probabilidad menores de 0,05. Los resultados mostraron una disminución del peso y talla en los fetos procedentes de las ratas diabéticas independientemente del tratamiento y un aumento de los diámetros antero posterior y biparietal en los fetos diabéticos con respecto a los controles. Se identificó un incremento de la distancia entre los globos oculares y disminución en la longitud transversal y cráneo-caudal de la cara en los fetos de ratas diabéticas con respecto a los controles.

INTRODUCCIÓN

La DM es una enfermedad crónica de elevada incidencia y prevalencia a nivel mundial. En Cuba el número de enfermos ha crecido notablemente manteniéndose

entre las primeras diez causas de muerte por enfermedades no transmisibles desde 1970 ⁽¹⁾. Actualmente muestra una tasa de defunciones de 19,6 por cada 100 000 habitantes (reportes del Anuario estadístico del MINSAP 2012) ⁽²⁾.

La DM es la condición patológica que con mayor frecuencia complica el embarazo, con influencia en el futuro de la mujer y de su hijo. El 0,3 % de las mujeres en edad fértil son diabéticas. Entre el 0,2 y el 0,3 % de todos los embarazos se conoce que la mujer ha tenido diabetes previa a la gestación, y la diabetes mellitus gestacional (DMG) complica entre el 1 y 14 % de los embarazos. En Cuba esto adquiere gran importancia, pues la tasa de prevalencia de DM por 1000 habitantes en mujeres en edad fértil es elevada, 4,7 entre 15 y 19 años, 13,5 entre 20 y 24, 46,1 entre 25 y 59 años ^(2,3,4).

En la DM preconcepcional (DMP) la falla en la producción de insulina hace que el "ambiente diabético" comience a actuar desde el período embrionario. Esto produce efectos nefastos sobre el producto de la concepción, por lo que el embarazo en estas condiciones es considerado de mayor riesgo ⁽⁵⁾.

Al igual que en humanos, la diabetes materna afecta el desarrollo de los fetos en ratas de experimentación, lo cual se traduce en aumento del número de reabsorciones, disminución del número de crías por camada, disminución del peso de las crías y retraso en el crecimiento ^(5,6).

El desarrollo fetal se caracteriza por patrones secuenciales de crecimiento, maduración orgánica y tisular determinado por el medio materno, la función útero-placentaria y el potencial de crecimiento genético inherente al feto. Cuando las circunstancias son óptimas ninguno de estos factores tienen un efecto limitante sobre la velocidad del crecimiento y desarrollo fetal. De esta manera el feto sano debe alcanzar la maduración funcional y el crecimiento somático completo. Desde el punto de vista obstétrico el crecimiento intrauterino es el signo más evidente e importante de bienestar fetal, un fallo en alguno de sus determinantes provoca el nacimiento de un niño bajo peso ⁽⁷⁾.

En la DMP existe una mayor incidencia de abortos espontáneos y mortalidad perinatal y en los casos más severos se presenta crecimiento intrauterino restringido (CIUR) o niños microsómicos. El porcentaje de CIUR se eleva hasta un 20% y puede estar causado por malformaciones congénitas (MFC) o engrosamiento de vasos en la región pélvica materna que debilita los flujos sanguíneos uterino y placentario ⁽⁵⁾.

En la *diabetes* se producen cambios en indicadores bioquímicos que evidencian una situación de estrés oxidativo (EOx). Existe una menor capacidad antioxidante total del plasma, se incrementa la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación y se daña el material genético ^(6,8,9).

La *gestación* es un estado caracterizado por un incremento, estrictamente regulado, de los procesos oxidativos en la madre y en el producto de la concepción, determinado por un aumento en el consumo de O₂, y por la utilización de algunas especies reactivas en varios procesos celulares importantes para el desarrollo materno-fetal ⁽¹⁰⁾. En el tercer trimestre se produce un incremento de los lípidos circulantes, más significativo en las embarazadas diabéticas, por lo que hay mayor aporte de sustratos para las reacciones de peroxidación lipídica. La disminución en las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes que pueden ocurrir a lo largo de la gestación, podría favorecer la formación de productos derivados de reacciones de peroxidación lipídica y tener importantes consecuencias, no sólo para las estructuras maternas, como el endotelio y la placenta, sino también para el feto ^(6,9,11).

Es importante considerar que tanto la diabetes como la gestación pueden producir EOX. La unión de estas situaciones de adaptación metabólicas pudieran estar relacionadas con algunas de las complicaciones que aparecen durante la gestación en las mujeres con DMP, que pudiera evitarse con tratamientos antioxidantes en períodos tempranos de la gestación ^(12,13,14).

La administración materna de vitaminas E es capaz de llegar al feto en cantidades importantes y restaurar el daño producido por la peroxidación lipídica inducida por la DM, incidiendo positivamente en el desarrollo fetal ^(9,10).

Las complicaciones en la gestación diabética es un problema al que el sistema de salud en Cuba presta atención por sus consecuencias sobre la salud fetal y de la madre. Teniendo en cuenta lo antes expuesto acerca de la DM pregestacional y su repercusión sobre el desarrollo y crecimiento fetal y las ventajas que tienen los modelos experimentales en roedores, al permitir un estudio minucioso de esta entidad, ^(5,6,13,14) los autores se propusieron realizar un estudio morfométrico para identificar las modificaciones del peso, talla, diámetros craneanos y morfometría facial en fetos de ratas diabéticas, tratadas o no con vitamina E, con respecto a un grupo control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrolló un modelo de DM con niveles de hiperglucemia aguda en 21 ratas Wistar hembras fértiles y vírgenes, con peso de 180 a 200g, por inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) 40 mg/kg en 200uL de buffer citrato 0.1M pH 4,5. A los 5 días, se diagnosticó la diabetes por niveles de glicemia superiores a 200mg/dL mediante glucómetro Bayer y en sangre extraída de la cola. Las ratas fueron apareadas con machos sanos de la misma cepa y se diagnosticó la gestación por la presencia de espermatozoides en el lavado vaginal. Se formaron

aleatoriamente dos grupos: Uno que recibió Vitamina E (acetato de á-tocoferol) 150mg/kg/día en 1ml de NaCl 0,9%, y otro que recibió diariamente el vehículo (1ml de NaCl 0,9%). Los preparados se administraron por sonda esofágica y se determinó la glicemia los días 0,7, 14 y 20 de la gestación. Las 5 ratas restantes a las que no se les administró tratamiento alguno constituyeron el grupo control.

Los animales se mantuvieron con ciclos constantes de 12 horas luz/oscuridad, temperatura de 21-23°C, ventilación continua, libre acceso a agua corriente y alimentación con pienso granulado a libre demanda. El día 20 de la gestación se practicó eutanasia por desangrado bajo anestesia (tiopental sódico 50-60mg/kg y punción de la vena cava inferior) ⁽¹⁵⁾.

Todos los fetos extraídos de los tres grupos de ratas, exceptuando los fallecidos, fueron sometidos a estudios morfométricos. Para las variables de morfometría facial se eligieron aleatoriamente los fetos según correspondía.

Las variables morfométricas analizadas en todos los fetos fueron las siguientes:

Peso: Fue tomado en una balanza digital marca YAMATO con sensibilidad de 0,01gramos (g), unidad en que se expresan los resultados.

Talla total: Se midió colocando al animal extendido sobre un papel milimetrado, los puntos de referencia para la medición fueron el hocico y el extremo distal de la cola. Los resultados se expresaron en milímetros (mm)

Diámetro craneano anteroposterior (DAP): Se midió colocando el pie de Rey desde la cresta supranasal hasta el borde superior del agujero occipital, se expresó en mm.

Diámetro craneano biparietal (DBP): Se determinó colocando el pie de Rey sobre un plano imaginario y paralelo al borde superior de las orejas. Los resultados se expresaron en mm.

Variables de morfometría facial:

Vista frontal: DGO (Distancia entre los globos oculares). Se determinó colocando el pie de Rey desde el ángulo externo del ojo izquierdo al ángulo externo del ojo derecho, los resultados se expresaron en mm. Se realizó en todos los fetos estudiados.

Vista lateral: DPP (Distancia poro nasal – pabellón auricular). Se midió colocando el pie de Rey desde el poro nasal hasta el borde superior de las orejas, los resultados se expresaron en mm. Fue realizada en todos los fetos estudiados.

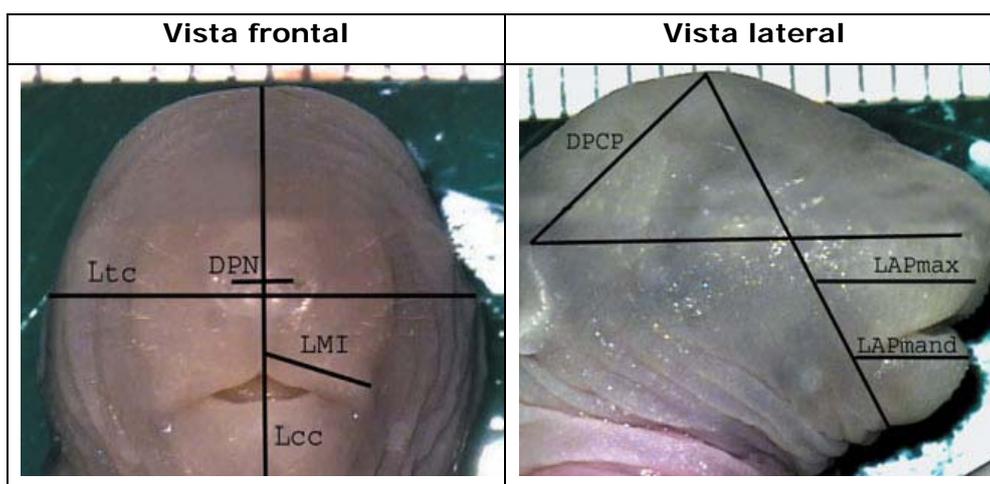
Para el análisis de las siguientes variables de la morfometría facial se eligieron aleatoriamente 2 fetos normales y 2 malformados por camada.

-Vista frontal: DPN (Distancia entre los poros nasales), **LMI** (Longitud del maxilar izquierdo), **LMD** (Longitud del maxilar derecho), **Ltc** (Longitud transversal de la cara) y **Lcc** (Longitud cráneo-caudal de la cara).

-Vista lateral: **DPCP:** Distancia entre el punto cefálico superior - pabellón auricular (derecho e izquierdo), **LAP max** (Longitud antero-posterior del maxilar), **LAP mand** (Longitud antero-posterior de la mandíbula).

Para el estudio de estas variables se tomaron fotos de las vistas frontales y laterales de la cara de los fetos. Las medidas fueron realizadas con el programa Imagen J, empleando la herramienta «medición» que permite calcular en píxeles la distancia entre 2 puntos cualesquiera de una imagen. La figura 1 muestra las variables cuantitativas consideradas en la vista frontal y lateral de los fetos.

Figura 1: Vistas frontal y lateral derecha de un feto control.



El procesamiento estadístico se realizó con el programa Statistica versión 8 y el Microstat. Para el análisis de las variables en escalas de intervalo o superior, se calcularon medias y desviaciones estándares. La comparación de las medias entre los grupos se realizó empleando el test Kruskal-Wallis (para tres grupos) y la prueba U de Mann-Withney (para dos grupos). Se consideró un nivel de significación cuando los valores de probabilidad (p) fueron menores a 0,05.

RESULTADOS

Se estudiaron en total 26 ratas de las que se obtuvieron 269 fetos (Tabla 1). Las camadas de fetos nacidos vivos de ratas diabéticas contenían como promedio 9.42 fetos, valor inferior al del grupo control.

Cuando se analizó el promedio de crías vivas en ambos grupos de ratas diabéticas se encontró que el promedio de fetos de las ratas diabéticas tratadas con vitamina E se acerca a los valores del grupo control y fue superior al del grupo de fetos no tratados, aunque estos valores no tuvieron significación estadística.

Tabla 1: Distribución por grupo de las ratas y fetos estudiados.

Grupos	Diabéticas con Vitamina E	Diabéticas con Vehículo	Control	Total
# RATAS	13	8	5	26
Total de fetos por grupos	136	77	56	269

Promedio de fetos por ratas	10,46	9,63	11,2	
Total de fetos vivos por grupos	129	69	53	251
Promedio de fetos vivos por ratas	9.92 *	8.63	10.6	
	9.42			

* Prueba U Mann-Whitney para muestras independientes no hay diferencias significativas al comparar los grupos diabéticos ($U = 47.0, p = 0.750101$).

En la Tabla 2 se muestran las variables morfométricas de los fetos estudiados en cada grupo.

Tabla 2: Análisis de variables morfométricas en los diferentes grupos de fetos.

VARIABLES MORFOMÉTRICAS	Diabéticas con Vitamina E (n = 129)	Diabéticas con Vehículo (n = 69)	Control (n = 53)
Peso	3,267 ^a ± 0,550	3,347 ^a ± 0,662	3,679 ± 0,653
Talla	49.00 ^a ± 3.715	49.058 ± 4.081	51.179 ± 4.489
Diámetro antero posterior del cráneo	12,801 ^a ± 1,377	12,783 ^a ± 0,945	11,670 ± 1,695
Diámetro biparietal del cráneo	9,004 ± 0,911	9,246 ^a ± 0,662	8,757 ± 1,012

Se presentan los valores como la media ± desviación estándar. El peso en gramos y demás medidas en milímetros.

Todas las variables resultaron significativas $p < 0.05$ (test no paramétrico Kruskal-Wallis)

^a Diferencia significativa $p < 0.05$ al comparar con el control (test no paramétrico U Mann-Whitney)

Las medias aritméticas de estas variables mostraron diferencias estadísticamente significativas con el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Al evaluar las variables mediante la Prueba de U Mann – Whitney se muestra una relación significativa desde el punto de vista estadístico en el peso, talla y diámetro antero posterior entre los grupos diabéticos con vitamina E y control. En los grupos diabéticos con vehículo con respecto al control las diferencias significativas se encontraron en peso, diámetro antero posterior y diámetro biparietal.

Al realizar este mismo análisis estadístico entre los grupos diabéticos con vitamina E y no tratados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En las tablas 3 y 4 se muestra un resumen del análisis morfométrico facial de las variables cuantitativas.

Tabla 3: Análisis morfométrico de la vista frontal de la cara de los fetos según grupos.

VISTA FRONTAL	Diabéticas con vitamina E (n)	Diabéticas con vehículo (n)	control (n)

Distancia entre los globos oculares	7,702 ^b ± 0,913 (129)	8,072^b ± 0,571 (69)	7,236 ± 1,090 (53)
Distancia entre los poros nasales	1,500 ± 0,271 (29)	1,594 ± 0,361 (14)	1,752 ± 0,333 (6)
Longitud maxilar izq	3,475 ± 0,313 (29)	3,560 ± 0,678 (14)	3,490 ± 0,441 (6)
Longitud maxilar derecho	3,382 ± 0,378 (29)	3,580 ± 0,673 (14)	3,390 ± 0,466 (6)
Longitud transversal de la cara	9,643 ± 0,687 (29)	9,452 ^b ± 0,690 (14)	10,056 ± 0,377 (6)
Longitud cráneo-caudal de la cara	10,128 ^b ± 0,914 (29)	10,196 ^b ± 0,905 (14)	11,362^a ± 0,556 (6)

Se presentan los valores como la media ± desviación estándar y las medidas en milímetros.

^a Diferencia significativa p menor 0.05 (test no paramétrico Kurskal-Wallis)

^b Diferencia significativa p < 0.05 al comparar con el control (test no paramétrico U Mann-Whitney)

Tabla 4: Análisis morfométrico de vista lateral de la cara de los fetos según grupos.

VISTA LATERAL	Diabéticas con Vitamina E (n)	Diabéticas con Vehículo (n)	control (n)
Distancia poro nasal – pabellon auricular Derecho	12,401 ± 1,078 (129)	12,449 ± 0,832 (69)	12,075 ± 1,313 (53)
Distancia poro nasal – pabellon auricular Izq.	12,401 ± 1,078 (129)	12,449 ± 0,832 (69)	12,075 ± 1,313 (53)
Distancia entre el punto cefálico sup- pabellón auricular.	5,528 ± 0,676 (29)	5,709 ± 0,798 (14)	5,867 ± 0,691 (6)
Longitud antero-posterior del maxilar.	4,352 ± 0,558 (29)	4,542 ± 0,741 (14)	4,397 ± 0,331 (6)
Longitud antero-posterior mandibular.	2,464 ± 0,558 (29)	2,819 ± 0,401 (14)	2,750 ± 0,346 (6)

Se presentan los valores como la media ± desviación estándar y las medidas en milímetros. Ninguna magnitud resultó estadísticamente significativa al comparar entre grupos.

Al realizar el estudio morfométrico, se observó que las medias aritméticas de la vista frontal (Tabla 3) en las variables distancia entre los poros nasales, longitud transversal de la cara y longitud cráneo-caudal de la cara estuvieron aumentadas en el grupo control. La distancia entre los globos oculares y longitud de los procesos maxilares, tanto izquierdo como derecho fueron mayores en los fetos

diabéticos con vehículo. Sin embargo sólo se encontraron diferencias significativas (test de Kruskal-Wallis) en la longitud cráneo-caudal de la cara entre los grupos, que fue mayor en los fetos controles con respecto a los diabéticos tratados con vitamina E y los no tratados.

Al evaluar las variables de la morfometría facial con el test U Mann-Whitney (Tabla 3), se muestra una diferencia significativa desde el punto de vista estadístico en las variables distancia entre los globos oculares, longitud transversal y longitud cráneo-caudal de la cara entre los fetos diabéticos con vehículo y el grupo control. También se observan diferencias en la distancia entre los globos oculares y longitud cráneo-caudal de la cara entre los fetos diabéticos con Vitamina E con respecto al control. Al comparar los grupos diabéticos con vitamina E y no tratados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Este análisis reveló un incremento de la distancia entre los globos oculares ($p < 0,05$) en los fetos diabéticos tratados con vitamina E y no tratados con respecto a los controles.

Los resultados obtenidos muestran que los fetos diabéticos, tuvieron una disminución significativa en la longitud transversal y cráneo-caudal de la cara con respecto a los fetos controles.

En la vista lateral (Tabla 4) se identificó aumento de las medias aritméticas en las variables distancia poro nasal-pabellón auricular derecho e izquierdo, longitud antero-posterior del maxilar y longitud antero-posterior mandibular en el grupo diabético con vehículo, con respecto a los otros grupos. Lo mismo ocurrió con la distancia entre el punto cefálico sup-pabellón auricular en el grupo control. Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa (test Kruskal-Wallis y U Mann-Whitney).

DISCUSION

Los resultados muestran un valor inferior de fetos vivos procedentes de ratas diabéticas con respecto al del grupo control. Resultados similares se han obtenido en otros estudios de embriopatía diabética inducida en ratas con STZ, como los de A Kiss y colaboradores, que hallaron un número más bajo de fetos vivos y mayor proporción de pérdidas embrio-fetales, lo que puede ser explicable por el entorno intrauterino de hiperglicemia severa. Otros investigadores como S Clapés y AC Polanco y colaboradores también han señalado el negativo efecto de la diabetes en fetos humanos y de ratas ^(5,6, 16).

Diferentes investigadores han relacionado el efecto antioxidante y protector de la vitamina E durante el embarazo en ratas diabéticas, lo que pudiera estar relacionado con el mayor número de fetos que se obtuvieron en las ratas que

recibieron este antioxidante, aunque en este estudio no se pueden establecerse conclusiones por lo reducido de la muestra ^(13,14).

Los resultados obtenidos en el estudio de las variables morfométricas muestran que los fetos diabéticos independientemente de su tratamiento, tuvieron un menor peso y talla que los fetos del grupo control, lo que corrobora el retardo del crecimiento como una característica de la descendencia de ratas diabéticas, según ha sido expuesto y comprobado por diferentes autores. ^(2, 6,16). En el estudio de A Kiss y colaboradores, referido anteriormente, se encontró un 87% de fetos con restricción del crecimiento intrauterino en las ratas madres diabéticas con respecto al 24% en los fetos de madres no diabéticas ⁽¹⁶⁾.

Aunque en diferentes estudios con la administración de suplementos vitamínicos C y E, se ha mostrado un aumento del peso fetal, en este estudio las variables morfométricas estudiadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos diabéticos con Vitamina E y no tratados. ⁽¹⁰⁾

Con respecto al aumento significativo de los diámetros antero posterior y biparietal en los fetos diabéticos con respecto a los controles, no se hallaron antecedentes de estudios similares en fetos de madres diabéticas.

No encontrar diferencias significativas en el promedio de fetos vivos y en las variables morfométricas estudiadas en los fetos provenientes de ratas diabéticas tratadas con vitamina E, podría tener diferentes explicaciones como son: el pequeño tamaño muestral, y la utilización de un linaje de ratas Wistar criollas; a diferencia de otros investigadores que utilizando linajes de ratas Wistar inglesas para inducir la embriopatía diabética obtuvieron resultados favorables con el uso de la vitamina E ^(13,14, 17).

Se ha comprobado que en dependencia del linaje empleado, así de severa puede ser la diabetes en su descendencia, notándose diferencias entre los diferentes linajes de ratas. Eriksson en el 2010, demostró que los linajes de ratas cruzadas entre las líneas Wistar y Sprague-Dawley, al enfermar de diabetes presentaron menor crecimiento y mayores patrones de dismorfismo genético con respecto a los linajes puros. ⁽¹⁸⁾Esto confirma la repercusión del genoma materno en el crecimiento y desarrollo fetal.

Se reconoce el efecto de las elevadas concentraciones de glucosa en ratas diabéticas como inductor de malformaciones craneofaciales en animales de laboratorio, ya que actúa como agente teratógeno que alteran la migración y distribución de las células de las crestas neurales en los primordios craneofaciales, lo que podría repercutir en la morfometría facial. ^(12, 19,20). Aunque no se han encontrado referencias en la literatura al respecto, esto explicaría las diferencias estadísticamente significativas encontradas en la distancia entre los globos

oculares, longitud transversal y cráneo-caudal de la cara entre los grupos de fetos de madres diabéticas y del grupo control.

Las variables morfométricas faciales estudiadas no mostraron modificaciones significativas en el grupo tratado con vitamina E, a pesar del efecto beneficioso reportado en diferentes investigaciones con respecto a otras variables morfométricas fetales. ^(5, 6, 16).

CONCLUSIONES

Se concluye que en los fetos de ratas diabéticas independientemente del tratamiento se produjo una disminución del crecimiento, que se tradujo en una disminución de los valores de la talla y peso. Se encontró un aumento de los diámetros antero posterior y biparietal en los fetos diabéticos con respecto a los controles. Se identificaron diferencias en las variables de morfometría facial con respecto a los fetos controles que se expresa por un incremento de la distancia entre los globos oculares y disminución en la longitud transversal y cráneo-caudal de la cara.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz Arce D. Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. Rev cubana invest bioméd [internet]. 2006 jul-sep; 25(3).
2. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadística, Ministerio de Salud Pública. Anuario estadístico de salud pública. [internet] 2012
3. García García C. Diabetes mellitus gestacional. Med int mex [internet]. 2008; 24(2):148-56.
4. Malpica E, Pérez M, García Kalí. Diabetes Mellitus y embarazo. Revisión Bibliográfica. Revista Médica Electrónica [internet]. 2008; 30(6).
5. Pedroso Filiberto E, Alonso Rodríguez D, Moreno Tellez E. Estrés oxidativo en las cardiopatías congénitas. Archivo Médico de Camagüey [Internet]. 2007; 11(3).
6. Clapés Hernández S. Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo. Rev cubana invest biomed [Internet]. 2000;19(3):191-5.
7. Tomé López Orlando, Cruz Álvarez Yainet, Alfonso Zerquera Cristina, Selva Silva Selma, Cruz García María A.. Estudio somatométrico de crías de rata con crecimiento intrauterino retardado desde el nacimiento hasta el destete. Rev Cubana Invest Bioméd [Internet]. 2006 Dic; 25(4).
8. Morgan SC, Relaix F, Sandell LL, Loeken MR. Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract

- defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* [Internet]. 2008 Jun; 82(6):453-63.
9. García G Damarys, García D Ricardo. Avances en la patogénesis de la embriopatía diabética. *Rev. méd. Chile* [Internet]. 2009 Dic ; 137(12):1627-1635.
 10. Corría Osorio Jesús, Cruz Manzano Elio. Balance entre las especies reactivas y los sistemas antioxidantes en la gestación normal. *Rev Cubana Obstet Ginecol* [Internet]. 2009 Jun; 35(2).
 11. Reece EA. Diabetes-induced Embryopathy —Is Prevention Feasible. *Maternal-Fetal Medicine* [Internet]. 2008; 41-44.
 12. Loeken MR. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc Gynecol Investig* [Internet]. 2006 Jan; 13(1):2-10.
 13. Viana M, Herrera E, Bonet B. Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention with vitamin E. *Diabetologia*. 1996; 39:1041-46
 14. Viana M, Auroma OI, Herrera E, Bonet B. Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos. *Free radic biol med* [Internet]. 2000 Dic; 29(11):1115-21.
 15. Canadian Council on Animal Care. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* Ottawa Ontario. 1998; (1).
 16. Kiss.A, Lima.P, Sinzato Y, et al. Damasceno. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetology & Metabolic Syndrome* [internet]. 2009; 1:21.
 17. Gäreskog M, Eriksson UJ, Wentzel P. Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats. *Birth Defects Res A Clin Mol* [Internet]. 2006 Jun; 76(6):483-90.
 18. Ejdesjö A, Wentzel P, Eriksson UJ. Genetic and environmental influence on diabetic rat embryopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2011 Mar; 300(3):E454-67.
 19. Snider P, Olaopa M, Firulli AB, Conway SJ. Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage. *Scientific World Journal* [Internet]. 2007 Jul 3; 7:1090-113.
 20. Degenhardt KR, Milewski RC, Padmanabhan A, et al. Distinct enhancers at the Pax3 locus can function redundantly to regulate neural tube and neural crest expressions. *Dev Biol* [Internet]. 2010 Mar 15; 339(2):519-27.