



Posgrado en
Biología Experimental



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**Análisis del efecto de la hiperglucemia embrionaria
en el desarrollo del miocardio ventricular y expresión
de moléculas marcadoras de daño al miocardio**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

PRESENTA:

Biol. Ricardo Jaime Cruz

Tutor Interno: Dr. Mario García Lorenzana

Tutor Externo: Dra. Concepción Sánchez Gómez

Asesor: M. en B.E. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo con número de registro 458436 de la beca otorgada por CONACYT

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Análisis del efecto de la hiperglucemia embrionaria en el desarrollo del miocardio ventricular y expresión de moléculas marcadoras de daño al miocardio" que presentó:

Biol. Ricardo Jaime Cruz

El día 9 de enero del año 2019

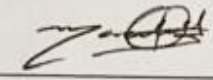
Presidente

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I



Secretario

Dra. Marcela Salazar García
Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental
Hospital Infantil de México, Federico Gómez.



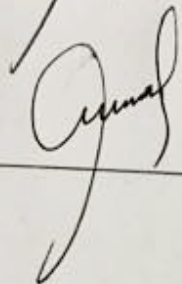
Vocal

Dr. Francisco Arenas Huertero
Laboratorio de Patología Experimental
Hospital Infantil de México, Federico Gómez.



Vocal

Dr. Guillermo Aquino Jarquín
Laboratorio de Investigación en Genómica, Genética y Bioinformática
Hospital Infantil de México, Federico Gómez.



Miembros del comité tutorial de la tesis “Análisis del efecto de la hiperglucemia embrionaria en el desarrollo del miocardio ventricular y expresión de moléculas marcadoras de daño al miocardio “

Tutor Interno: Dr. Mario García Lorenzana

Profesor Investigador Titular C, Tiempo Completo
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Tutor Externo: Dra. Concepción Sánchez Gómez

Investigador en Ciencias Médicas “C”
Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental
Hospital Infantil de México, Federico Gómez

Asesor: M. en B. E. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga

Técnico Académico Titular E, Tiempo Completo
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

DEDICATORIAS

A la memoria y al recuerdo de mi papá y mi abuelo, por hacer de mí el hombre soy ahora.

A mi “amá” por ser mi principal mi apoyo, que con su ejemplo siempre estuvo impulsándome a seguir adelante, y en especial por tenerme tanta paciencia.

A mis tías Angelica, Silvia, Gladiz, Cheli, así como mi tío Luis por siempre motivarme con sus palabras y a mi abue Carmelita por siempre creer en mí.

A mis primos Fany, Deshy, Jess, Pame, Coto, Kike, Isra, Lulu, Oscar, Sandy, Itzi y Dona que siempre se interesaron en mí y siempre estuvieron apoyándome, al parcerero Andrés por siempre alentarme aunque no entendieras del todo el tema.

A la Dra. Concepción por toda la confianza y el infinito apoyo que siempre me ha brindado.

A mi “profe” Roberto Lazzarini, por siempre ser mentor y amigo, apoyándome incondicionalmente.

Al Dr. Mario García por todo su valioso asesoramiento.

A mi segunda casa el HIMFG, en especial a la Dra. Marce y la Maestra Laura por siempre apoyarme, orientarme y por toda su confianza brindada en mí.

Al Dr. Arenas por abrirme las puertas de su laboratorio de Patología Experimental y asesorarme en todos los PCR.

Al Dr. Aquino por toda su eterna disposición y todo el apoyo brindado en la extracción de ARN y el manejo de lentivirus.

Al Dr. Alarcón por abrirme y darme un panorama diferente en torno a la diabetes.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del HIMFG, Arturo, Jorge, Tania, Janeth.

A cada uno de mis profesores durante el posgrado por ser nuestros vectores de conocimiento, y en especial a mi universidad por darme todo el apoyo necesario en todo momento.

RESUMEN

La hiperglucemia durante la gestación (HGG) se asocia con efectos adversos durante el desarrollo embrionario y fetal, que a corto plazo conducen a la aparición de cardiopatías congénitas y a largo plazo significan un riesgo de defectos morfológicos y funcionales cardíacos como hipertrofia. Las causas de estos trastornos en la progenie de madres con HGG aún no está clara. Existen moléculas que se ha sugerido su uso como indicadores de daño al miocardio. En investigaciones clínicas en personas adultas diabéticas con problemas funcionales del corazón y trabajos experimentales que usaron ratones transgénicos, se determinó que la sobreexpresión del miR-223, se asocia a un incremento en la expresión TNNI3K (cinasa específica del corazón que se une a la troponina cardíaca I (cTnI) implicada en procesos de remodelaciones anómalas cardíacas, desencadenando hipertrofia ventricular e insuficiencia cardíaca. Sin embargo, no se ha estudiado el efecto de la hiperglucemia embrionaria en un modelo no transgénico. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el desarrollo embrionario del corazón bajo condiciones de hiperglucemia y su relación con en el desarrollo del miocardio ventricular, cambios la expresión de las proteínas sarcoméricas (troponina I cTnI, desmina y TNNI3K) y los cambios en la expresión del miRNA-223. Empleamos huevos fértiles de Gallus gallus domesticus se incubaron 3.5 días para obtener embriones en estadio 22HH. Posteriormente se indujo hiperglucemia embrionaria mediante solución de glucosa (30 mmol/l) cada 24 horas, hasta el final del experimento (10 días de incubación, estadio 36HH), grupo HG. A otro grupo de embriones fueron tratados con solución salina (Grupo NT). Se obtuvieron mediciones de glucosa en sangre periódicamente. Se registró peso y talla del embrión y el corazón. El corazón se empleó para análisis histopatológico, expresión del miR-223 por RT-qPCR y detección de expresión con microscopia confocal y western blot de TNNI3K cTnI y desmina. Resultados. Los embriones hiperglucémicos mostraron un retraso en la maduración de diversos órganos incluyendo el corazón, similar a lo reportado en un modelo de diabetes inducida en rata. El análisis histopatológico evidencio disminución del grosor de la pared ventricular izquierda (39%) y derecha (35%) en embriones hg respecto a los controles. RT-qPCR mostró aumento del 41% del miR-223 en embriones HG respecto a normoglucemicos. TNNI3K y cTnI presentaron respectivamente 37% y 39% mayor fluorescencia, en el caso de la desmina hubo una disminución del 23%, se corroboró por western blot en los embriones HG respecto a los controles NT. Conclusiones. El ambiente hiperglucémico durante el desarrollo embrionario, disminuyó la maduración fetal. El corazón mostró menor tamaño y grosor de las paredes ventriculares. El aumento del miR-223 desencadenó la elevación de TNNI3K y cTnI que puede inducir procesos de remodelación anómala cardíaca. Nuestros hallazgos correlacionan con la hipertrofia descrita en fetos y niños recién nacidos de mujeres con HGG.

ABSTRACT

Hyperglycemia during pregnancy (HGG) is associated with adverse effects on embryonic and fetal development that in the short-term lead to the appearance of congenital heart defects and in the long term mean a risk of cardiac morphological and functional defects such as hypertrophy. The exact cause of these disorders in the progeny is not yet clear. There are molecules that, thanks to various investigations, have been suggested as indicators of myocardial damage. In clinical studies in diabetic adults with myocardial functional problems and experimental work in transgenic mice, it was determined that overexpression of miR-223 is associated with an increase in TNNI3K expression (specific kinase of the heart that binds to cardiac troponin I (cTnI) involved in anomalous cardiac remodeling processes leading to the development of ventricular hypertrophy and heart failure, however, the effect of embryonic hyperglycemia in a non-transgenic model has not been studied, therefore, our objective was to evaluate cardiac embryonic development under conditions of hyperglycemia and its relation to the development of the ventricular myocardium, changes the expression of sarcomeric proteins (troponin I cTnI, desmin and TNNI3K) and the possible dysregulation of miRNA-223 We used fertile eggs of *Gallus gallus domesticus* were incubated 3.5 days to obtain embryos in stage 22HH. stage 22HH hyperglycemia was induced by administering glucose solution (30 mmol/l) in the air chamber every 24 hours, until the end of the experiment (10 days of incubation, stage 36HH), group HG. The control embryos were treated with saline solution (NT Group). Blood glucose was recorded periodically. Weight and size of embryo and heart were recorded. The heart was used for histopathological analysis, miR-223 expression by RT-qPCR and expression detection with confocal and western blot microscopy of TNNI3K cTnI and desmin. Results Hyperglycemic embryos showed a delay in the maturation of various organs, including the heart, like that described in a model of diabetes induced in rats. The histopathological analysis evidenced decrease in the thickness of the left ventricular wall (39%) and right (35%) in hg embryos with respect to the controls. RT-qPCR showed a 41% increase in miR-223 in HG embryos compared to normoglycemic. TNNI3K and cTnI presented respectively 37% and 39% greater florescence, in the case of desmin there was a decrease of 23%, it was corroborated by western blot in HG embryos with respect to NT controls. Conclusions The hyperglycemic environment during embryonic development, decreased fetal maturation. The heart showed smaller size and thickness of the ventricular walls. The increase of miR-223 triggered the elevation of TNNI3K and cTnI that can induce anomalous cardiac remodeling processes. Our findings correlate with the hypertrophy described in fetuses and newborns of women with HGG.

ABREVIATURAS

DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM 2	Diabetes mellitus tipo 2
HGG	Hiperglucemia durante la gestación
ADA	American Diabetes Association
IDF	International Diabetes Federation
OMS	Organización Mundial de la Salud
GNE	Glucosilación no enzimática
PVD	Pared ventricular derecha
PVI	Pared ventricular izquierda
TIV	Tabique interventricular
TNNI3K	Cinasa interactuante con troponina I
cTnI	Troponina I
miRNAs	MicroRNAs
HG	Embriones tratados con glucosa (hiperglucémicos)
NT	Embriones no tratados con glucosa (normoglucémicos)
PBS	Buffer de fosfatos

INDICE

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ABREVIATURAS.....	VII
I. INTRODUCCION.....	12
1. Diabetes Mellitus	12
1.1 Clasificación de la DM	13
1.2 Diabetes Durante la Gestación	15
1.3 Efectos de la Hiperglucemia durante la Gestación.....	16
2. El Corazón.....	16
2.1 Características anatómicas e histológicas del corazón.....	16
2.2 Desarrollo y Diferenciación del Miocardio.	19
2.3 Miocardiopatías.....	21
3. Proteínas marcadoras de daño al miocardio.	22
3.1 Cinasa interactuante con troponina I (TNNI3K)	22
3.2 Troponina I (cTnl)	23
3.3 Desmina	23
4. MicroRNAs y el corazón.	24
II. ANTECEDENTES.....	28
5.1 Antecedentes clínicos	28
5.2 Antecedentes Experimentales	30
6.1 Ventajas del modelo de <i>Gallus gallus</i>	33
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. HIPÓTESIS.....	36

V. OBJETIVO GENERAL.....	37
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	37
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
7.1 Inducción de hiperglucemia embrionaria.....	38
7.2 Análisis anatómico e histológico.	39
7.2.1 Peso y desarrollo corporal.....	39
7.3 Análisis estructural de microscopia electrónica de barrido.	40
7.4 Procedimiento Histológico.	40
7.5 Evaluación de expresión de miR-223 por qRT-PCR.	41
7.6 Inmunodetección por microscopia confocal.	41
7.7 Análisis de la expresión de proteínas por Western Blot.	42
7.8 Análisis Estadístico.....	42
VIII. RESULTADOS	43
8.1 Inducción de Hiperglicemia.....	43
8.2 Peso y desarrollo corporal.....	45
8.3 Análisis morfométrico e histológico.	47
8.4 Evaluación de expresión de miR-223 por qRT-PCR.....	51
8.5 Inmunodetección de proteínas indicadoras de daño al miocardio....	52
8.5.1 TNNI3K.....	52
8.5.2 cTnl.....	53
8.5.3 Desmina.....	54
IX. DISCUSIÓN.....	56
9.1 Importancia de hiperglucemia en embrión de pollo.....	57
9.2 El ambiente hiperglucémico y la morfohistología cardiaca.....	58
9.3 Expresión del miR 223 en modelo embrionario de hiperglucemia...59	
9.4 Patrón de expresión de las proteínas sarcoméricas marcadoras de hipertrofia.	60

X. CONCLUSIONES.....	63
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	64
XII. ANEXOS.....	73
XIII. EVENTOS ACADÉMICOS DURANTE LA MAESTRÍA.....	74

Análisis del efecto de la hiperglucemia embrionaria en el desarrollo del miocardio ventricular y expresión de moléculas marcadoras de daño al miocardio

I. INTRODUCCION

1. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una afección crónica que se caracteriza por valores de glucemia plasmática en ayuno mayores a 126 mg/dl una glucemia plasmática casual 200 mg/dl o más (NOM015-SSA2, 2010; OMS, 2016). Dicha enfermedad es de primera importancia de salud pública en todo el mundo por ser cada vez más frecuente y por la severidad y diversidad de sus complicaciones crónicas (Zhao & Reece, 2013). Se ha informado que alrededor de 425 millones de los adultos de 20 a 79 años la padecen. En México, en 2017 se informó que se presentaron alrededor de 12 millones de casos, ocupando así el 6to. lugar mundial en número de individuos con diabetes. Se espera que para el 2045 en nuestro país un aumento aproximado de 21.8 millones en la incidencia. (IDF, 2017).

La glucosa es la molécula energética necesaria para que la célula cumpla sus funciones metabólicas y la insulina sintetizada y secretada por el páncreas, es una hormona esencial, necesaria para el transporte de glucosa desde la circulación sanguínea hacia las células (ADA, 2017). La DM aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no la utiliza eficazmente. La falta de insulina o la incapacidad de las células de responder a su estímulo provocan hiperglucemia. (OMS, 2016).

Clasificación de la DM

De acuerdo NORMA Oficial Mexicana Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus (2010), esta enfermedad puede ser clasificada en las siguientes categorías:

- ❖ **Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)**, debida a la destrucción de las células β del páncreas que y generalmente conduce a la deficiencia de insulina.
- ❖ **Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)**, debida a una pérdida progresiva de función de las células β del páncreas y secreción de insulina disminuida que con frecuencia conduce a la resistencia a la insulina.
- ❖ **Otros tipos específicos de diabetes** debido a otras causas, como la diabetes monogénica (diabetes mellitus neonatal y la diabetes del adulto en jóvenes (MODY, por sus siglas en inglés) enfermedades del páncreas exocrino (cistifibrosis y pancreatitis), diabetes inducida por medicamentos o productos químicos (glucocorticoides, tratamiento del VIH/SIDA o después del trasplante de órganos).
- ❖ **Diabetes Mellitus Gestacional**, se diagnostica en las embarazadas entre las semanas 24 y 28 de gestación, (las mujeres con mayor riesgo pueden ser estudiadas desde antes). El estudio consiste en la toma de una muestra de sangre para evaluar el nivel glucosa una hora después de una carga de 50 g de glucosa por vía oral, si se encuentra una glucemia plasmática >140 mg/dl, se podrá diagnosticar o realizar estudios más específicos como la prueba de

tolerancia a la glucosa en una curva de tres horas, administrando 100 g de glucosa y se mide la glucemia antes, a la hora, a las dos y a las tres horas de la administración: si se tienen dos o más valores iguales o superiores a 95, 180, 155 y 140 mg/dl (a las 0, 1, 2 y 3 horas), se diagnostica de diabetes gestacional.

La sintomatología y progresión de la DM1 y la DM2 pueden variar considerablemente. En la DM1 existe destrucción total de las células beta, productoras de insulina, que se encuentran en los islotes pancreáticos. Este tipo de pacientes necesitan la administración diaria de insulina, a fin de mantener el nivel de glucosa dentro del intervalo adecuado. Sin esta hormona no serían capaces de sobrevivir. En la DM2 predomina la pérdida progresiva de la secreción de insulina y la incapacidad del organismo de responder plenamente a dicha hormona, efecto que se define como resistencia a la insulina. La DM2 es la forma más frecuente de diabetes, y representa alrededor del 90% del total de casos. En cambio, la incidencia de DM1 se encuentra en aumento en todo el mundo, pero hay una gran variación en lo reportado en cada país, con algunas regiones del mundo que presentan una incidencia más alta que otros. (IDF, 2017).

La hiperglucemia es uno de los factores de riesgo reconocidos para la aparición y progresión de las complicaciones de la DM. La elevación mantenida en las concentraciones de glucosa provoca cambios en las proteínas plasmáticas y tisulares con efectos indeseables sobre la salud del paciente diabético, de no controlarse, puede provocar daños a largo plazo en varios órganos del cuerpo, que conllevan al desarrollo de complicaciones sanitarias incapacitantes y peligrosas para la supervivencia como:

ceguera, insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, amputación de miembros inferiores, problemas cardiovasculares, etc. (IDF, 2017).

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

- ❖ Estrés oxidante. En ambientes hiperglucémicos suele promover complicaciones en el desarrollo pre y posnatal. Estudios experimentales y clínicos informan que el estrés oxidante derivado de la hiperglucemia promueve la producción de radicales libres; deteriora el sistema de defensa antioxidante endógeno de las células en el que intervienen las vitaminas A, C y E, y las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Matough y cols. 2012). Incluso, el estrés oxidativo en mujeres gestantes con hiperglucemia puede afectar desfavorablemente el desarrollo embrio-fetal (Wender y cols. 2004).
- ❖ Glicación. La glucosa en exceso puede formar uniones covalentes con proteínas del plasma sanguíneo a través de un proceso conocido como glicación es un proceso no enzimático que provocan modificaciones bioquímicas, fisicoquímicas y funcionales. Lo mismo puede ocurrir con otras biomoléculas de la superficie celular y endógenos como lípidos y ácidos nucleicos. La glicación ocurre en condiciones fisiológicas, pero en ambientes hiperglucémicos está patológicamente acelerada, sobre todo en períodos de descompensación metabólica natural como sucede durante la gestación. El

grado de glicación depende de la concentración de glucosa en el medio extracelular y del tiempo de vida media de las biomoléculas. Estudios recientes sugieren que los productos finales de la glicación proteínica avanzadas interactúan con receptores de membrana y modifican la señalización intracelular, la expresión génica, la liberación de moléculas proinflamatorias y/o radicales libres. Alternativamente se activan las vías de señalización intracelular para la generación de citocinas proinflamatorias y procleróticas que conducen al desarrollo y progresión de complicaciones cardiovasculares diabéticas (Singh y col. 2014).

1.2 Diabetes durante la gestación

El periodo de la gestación provoca grandes cambios fisiológicos, que trascurren desde el inicio hasta el momento del parto, caracterizados entre otros por la presencia de niveles altos de glucosa en el último trimestre. La prevalencia de hiperglucemia durante la gestación según la Asociación Americana de Diabetes se presenta en un 9.2% de la población norteamericana (DeSisto y col. 2014). Cuando los niveles de glucosa sobrepasan 95mg/dl en ayuno entre las semanas 24-28 se puede hablar de la presencia de hiperglucemia gestacional, para confirmar diabetes mellitus gestacional (DMG), se realiza una prueba, donde se toma una muestra de sangre en ayuno, después, la mujer toma una cantidad específica de glucosa disuelta en agua y se continúa tomando muestras de sangre cada hora hasta completar 3 horas. Se diagnostica diabetes si dos o más de los niveles de glucosa se encuentran por arriba

de los siguientes valores: En ayuno 95 mg/dl, 1 hora 180 mg/dl, a las 2 horas 155 mg/dl y a las 3 horas 140 mg/dl (NOM015-SSA2, 2010).

En el resto de las mujeres gestantes diabéticas, la hiperglucemia se diagnostica durante el primer trimestre, pero en la mayoría de estos casos, es probable que la DM tipo 1 o 2, con un valor mayor o igual a 126mg/dL ya estuviese presente antes de la concepción (ADA 2018). A este tipo de diabetes en mujeres gestantes se le conoce como diabetes mellitus pregestacional (OMS, 2016). La Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), estimó que el 16.2% de las mujeres que dieron a luz niños vivos en 2017 sufrieron alguna forma de hiperglucemia durante el embarazo. Se estima que el 86,4% de estos casos se debieron a DMG, el 6,2% a diabetes detectada antes del embarazo y el 7,4% a otros tipos de diabetes detectadas por primera vez en el embarazo (IDF, 2017).

1.3 Efectos de la Hiperglucemia durante la Gestación

En general el embarazo diabético cursa con niveles altos de glucosa y se caracteriza por resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y/o alteración en las hormonas placentarias. Estos factores a menudo provocan retrasos en el desarrollo embrionario que contribuyen de manera significativa en la morbilidad y mortalidad de la descendencia de madres diabéticas (Tkáč, 2013; Wentzel, y col. 2005). Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la hiperglucemia en mujeres, junto con malos hábitos alimenticios durante la gestación afectan el desarrollo pre y posnatal de la progenie y se relaciona con el desarrollo en la progenie de DM, obesidad y

enfermedades cardiovasculares, las cuales pueden manifestarse desde edades tempranas o en la vida adulta (Zhao & Reece, 2013; Wentzel y col. 2005). A pesar de la relevancia de estos estudios, los mecanismos celulares y moleculares que conducen al desarrollo de todas estas enfermedades no han sido completamente dilucidados.

2 El Corazón

2.1 Características anatómicas e histológicas del corazón

El corazón es el órgano central y más importante del sistema circulatorio en todos los vertebrados. El corazón se encuentra alojado en el tórax, ocupando la porción inferior del mediastino, entre los pulmones, por delante de la columna vertebral y descansando sobre el diafragma, consta de cuatro cavidades contralaterales, dos atrios y dos ventrículos. Los atrios conforman el segmento atrial, el atrio derecho recoge sangre de la circulación sistémica y el atrio izquierdo de la circulación pulmonar. El ventrículo derecho impulsa la sangre venosa a la circulación arterial pulmonar para su oxigenación y el ventrículo izquierdo impulsa la sangre arterial a la circulación sistémica (Anderson & Becker, 1980).

Las cavidades derechas e izquierdas están separadas por un tabique cardiaco que evita que se mezcle la sangre venosa y la arterial. Este tabique consta de tres regiones bien definidas: 1. Tabique Interatrial, que separa ambos atrios. 2. Tabique Atrioventricular, que separa el atrio derecho del ventrículo izquierdo y viceversa. 3. Tabique Interventricular, que separa al VD del VI (Baño, et al. 1986).

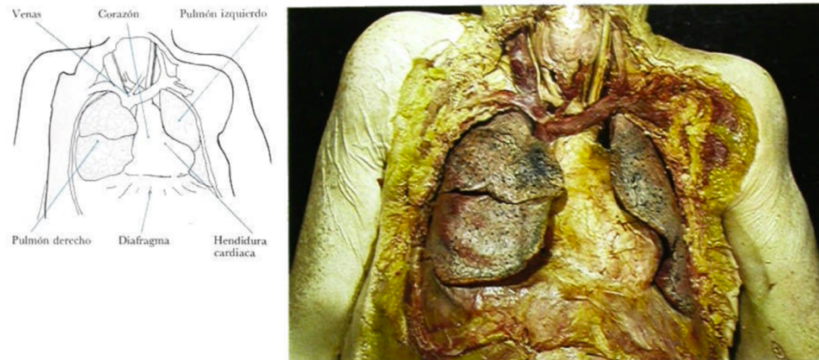


Imagen 1. Localización espacial del corazón (Anderson & Becker, 1981)

El segmento ventricular gracias a su función contráctil aporta la fuerza del bombeo que impulsa la sangre. Ambos ventrículos son diferentes en morfología, ciclo de presiones y resistencias. Anatómicamente el ventrículo derecho presenta una capa muscular moderadamente gruesa, compuesta por fibras de diámetro intermedio. En contraste el ventrículo izquierdo que comúnmente se describe como la cavidad más grande y fuerte del corazón, tiene una pared es más gruesa y sus fibras musculares son de mayor diámetro, dándole la fuerza suficiente para impeler la sangre a través de la válvula aórtica hacia el resto del cuerpo (Hall, 2011). De todo esto queda claro que la labor de bombeo que ejerce el miocardio ventricular es trascendental para la función cardiaca. (Ham, 1967).

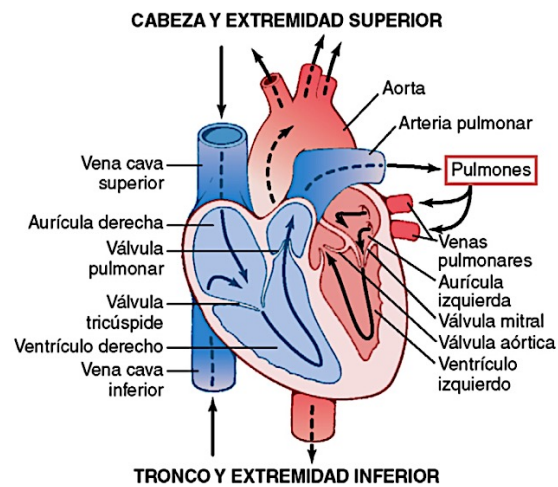


Imagen 2. Estructura del corazón y trayecto del flujo sanguíneo a través de las cavidades y válvulas cardíacas (Guyton, 2011).

Histológicamente el corazón está formado por tres capas celulares. I. Endocardio, epitelio simple que cubre las cavidades e impide el contacto directo de la sangre con la superficie interna de las cavidades cardíacas. II. Miocardio, es la capa que ocupa casi toda la masa de la pared del corazón, se compone de fibras musculares cardíacas inmersas en tejido conectivo, especializados principalmente en el control de la contracción rítmica del corazón. III. Epicardio, capa de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas y en menor cantidad adipocitos, asociadas a vasos coronarios (Harrison, 2006).

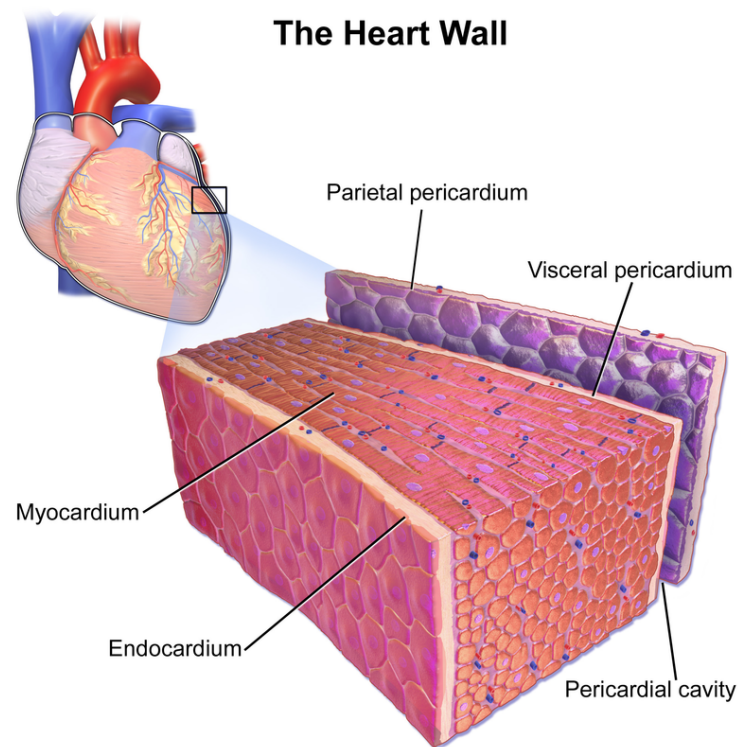


Imagen 3. Organización histológica del corazón (Blausen, 2014).

2.2 Desarrollo y Diferenciación del Miocardio.

El desarrollo embrionario normal del corazón depende de eventos moleculares previos como la especificación del mesodermo temprano, en mesodermo esplácnico, después en el mesodermo cardiogénico y posteriormente, la morfogénesis de las cámaras cardíacas embrionarias que al remodelarse forman un corazón maduro de cuatro cavidades (Salazar, y col. 2006). En varias especies se ha reportado que el endodermo que recubre al mesodermo esplácnico, induce la diferenciación del mesodermo precardiaco a células cardíacas con capacidad contráctil, esto mediante la secreción de diversas proteínas como la proteína morfogenética ósea (BMP) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). (Katherine & Kirby, 2002). Los factores de

transcripción Nkx 2.5 y Gata 4, y la proteína nuclear Mef-2c son claves para la especificación del mesodermo cardiogénico promoviendo la expresión de proteínas del citoesqueleto contráctil, como actina, miosina, titina, troponina, etc.

El desarrollo embrionario cardíaco es un proceso de gran complejidad y perfectamente ordenado y genéticamente orquestado que involucra la integración paulatina de poblaciones celulares de diverso origen (Brand, 2003). Lo anterior se acompaña de cambios paulatinos en el patrón de expresión de genes, grado de especificación y diferenciación de las células, organización tisular, formación de primordios e incremento de tamaño y remodelación hasta manifestarse anatómicamente en un corazón de 4 cavidades. Además, el crecimiento y desarrollo del miocardio ventricular en mamíferos durante el periodo fetal y neonatal es dependiente en gran medida de cambios que ocurren en la población de cardiomiocitos (Engelmann & Boehm, 1992). En modelos animales como pollo y rata, la proliferación miocárdica, se detiene poco después del nacimiento, sin embargo, se reporta un incremento del tamaño celular (Sedmera & Thompson, 2011).

Fallas durante la cardiogénesis de algún proceso morfogenéticos o en la expresión de genes responsables del desarrollo y/o función cardíaca pueden conducir a diversos defectos morfológicos y funcionales del órgano.

2.3 Miocardiopatías

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos de los vasos sanguíneos y del corazón. Dentro de las afecciones cardiovasculares con mayor incidencia a causa de la hiperglucemia destacan las miocardiopatías (Elliott, y cols. 2008). Estas enfermedades son un grupo de afecciones anatómicas y funcionales, específicas del miocardio de uno o ambos ventrículos asociadas con la disfunción mecánica y/o eléctrica (Pons, 1986). A nivel histológico se presentan desarreglo del miocardio y anomalías en la organización miofibrilar que conducen a la dilatación ventricular.

Las miocardiopatías pueden ser genéticas o adquiridas y a menudo conducen a insuficiencia cardíaca progresiva e inclusive a muerte súbita (Kraker, Viswanathan, Knöll, & Sadayappan, 2016). Los tres tipos principales de miocardiopatías que afectan al ventrículo izquierdo son la miocardiopatía dilatada, la miocardiopatía restrictiva y la miocardiopatía hipertrófica (Elliott, y col. 2008). La miocardiopatía hipertrófica se caracteriza por miocitos anormalmente grandes y desalineados, localizados en el tabique interventricular y fibrosis aumentada, el ventrículo engrosado y rígido lo cual reduce el cumplimiento de la labor del músculo cardíaco, y contribuye a la insuficiencia cardíaca (Kraker y col. 2016).

Actualmente no se conocen a fondo los procesos morfogenéticos que participan en el desarrollo normal de las estructuras anatómicas maduras del corazón. Las redes

moleculares que regulan los procesos morfogénéticos cardiacos y los factores que afectan estos procesos que pueden conducir al desencadenamiento de las miocardiopatías siguen sin ser del todo claras.

3. Proteínas marcadoras de daño al miocardio.

Los miocardiocitos son las células con actividad contráctil que componen el corazón. Cada miocardiocito contiene miofibrillas ordenadas en sarcómeros compuestos por diversas proteínas entre las que destacan además de la actina y la miosina, la troponina I (cTnI), la desmina y la cinasa interactuante con troponina I (TNNI3K). Los sarcómeros son considerados las unidades morfológicas y funcionales del miocardiocitos. Además, se ha señalado que cuando está modificada la expresión o función de las proteínas sarcoméricas se manifiesta daño al miocardio e hipertrofia cardíaca.

3.1 Cinasa interactuante con troponina I (TNNI3K)

La cinasa interactuante con troponina I es una proteína específica del corazón, codificada por el gen TNNI3K. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas quinasas MAP cinasa cinasa (MAPKKK) que desempeña un papel importante en la fisiología cardíaca y adicionalmente promueve la diferenciación de células madre embrionarias. Es activada por mitógenos MAPK y en modelos de ratas se ha observado que su sobreexpresión acelera la hipertrofia de miocardiocitos provocando insuficiencia cardíaca (Tang, et al. 2013). Es un mediador de la fosforilación de Troponina I (cTnI) en la Ser 22 y Ser 23 que estimula un cambio conformacional de la

Troponina I, contribuyendo en la regulación de la función de contracción del miocardio. Se ha constatado en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, que la sobreexpresión de TNNI3K acelera en gran medida la disfunción cardíaca en modelos de cardiomiopatía en ratones, lo que indica un papel importante de TNNI3K en la modulación de la progresión de la enfermedad cardíaca (Wang y cols. 2011; Wang, y cols. 2013).

3.2 Troponina I (cTnI)

La troponina I es una proteína del músculo esquelético y cardíaco. En el caso del corazón, se presenta mediante una única isoforma de peso molecular de 23,9 kDa. Consta de 209 residuos de aminoácidos. Es una proteína globular de gran tamaño. Consta de tres subunidades polipeptídicas: troponina C (fijadora de calcio), troponina I (inhibidora) y troponina T (fijadora de tropomiosina). Sirve como acopladora para la miosina y la actina, además de regular al Ca^{2+} para lograr una adecuada contracción. Tiene gran importancia en la regulación de la contracción del músculo cardíaco. Durante el infarto al miocardio, suele perderse la integridad de la membrana del cardiomiocito y la troponina I es liberada al torrente sanguíneo. Esta situación permite que la troponina I plasmática sea considerada un marcador de daño al miocardio (Díaz & Burgos, 2002).

3.3 Desmina

Es una proteína de 52 kD que conforma un tipo de filamento intermedio y es propia del citoesqueleto de las células musculares estriadas. Los filamentos de desmina se

localizan a lo largo de todo el sarcómero y suele anclarse a los discos intercalares, organelos membranosos y membrana nuclear. Refuerza la organización de los discos intercalares y ejerce una función de interconexión y de andamio para que se mantenga la integridad estructural y la arquitectura del cardiomiocito (Goldfarb & Dalakas, 2009).

La desmina, es altamente expresada en el músculo cardíaco, además, es un componente esencial en las células del sistema de conducción miocárdica, especializado en regular la contracción rítmica y coordinada de las cavidades cardíacas (Bazoukis y col. 2018). La desmina disminuye paulatinamente su expresión y se desorganiza en los procesos de adelgazamiento de las paredes ventriculares e insuficiencia cardíaca, que suelen conducir a una disminución del bombeo y fuerza mecánica ventricular. Estas características determinan que la desmina sea considerada un buen marcador de posibles daños al miocardio (Goldfarb & Dalakas, 2009).

4. MicroRNAs y el corazón.

Los microRNAs (miRNAs) son secuencias cortas (20-24 nucleótidos) de ARN no codificantes que se han identificado en un gran número de organismos. La secuencia de la mayoría de los miRNAs está altamente conservada en todas las especies (Lakshmipathy y col. 2007). Su estudio ha aumentado debido a que se sabe que actúan como moduladores de la expresión génica (sub o sobreexpresión), al inhibir la traducción de RNAm blanco específicos, logrando además regular la progresión de

enfermedades como el cáncer y procesos relacionados con diferentes aspectos de la morfofisiología cardíaca pre y posnatal (Vidigal & Ventura, 2015).

Investigaciones recientes hablan de la importancia de diversos miRNAs, debido a que su expresión se encuentra incrementada o disminuida (desregulada) durante la progresión de hipertrofia, fibrosis e insuficiencia cardíacas, remodelaciones anómalas del miocardio, hipoxia e isquemia miocárdica, y también promueven la apoptosis (Ottaviani & Da Costa, 2017). El interés en el estudio de miRNAs como posibles herramientas en la lucha contra diferentes enfermedades cardíacas ha incrementado de manera exponencial, sin embargo, el estudio de los miRNAs en el corazón embrionario es más bien escaso.

II. ANTECEDENTES

5.1 Antecedentes clínicos

Las cardiopatías congénitas y la miocardiopatía hipertrófica son padecimientos comunes en la diabetes pregestacional, con una incidencia mayor al 4% (Dervisoglu, et al. 2018). En cambio, en la DG los cambios estructurales son menos comunes, aunque es más común observar problemas de función cardíaca (Pauliks, et al 2015). Evidencias clínicas y experimentales señalan que la hiperglucemia en mujeres gestantes y el estilo de vida durante el embarazo afectan el desarrollo pre y posnatal de la progenie. El ambiente hiperglucémico puede provocar modificaciones moleculares y morfológicas en las estructuras embrio-fetales debidas a cambios sutiles en la economía energética materna y predisponer un mayor riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares desde la infancia en individuos sin defectos aparentes. La HGG es considerada un agente teratogénico que interfiere en el desarrollo embrio-fetal. Por esta razón diversos autores han desarrollado estudios con la finalidad de conocer los procesos moleculares y mecanismos celulares que afecta. En un estudio publicado por Russell y colaboradores en el 2008 reclutaron veintiséis mujeres con DM pregestacional y se les practicó un ecocardiograma fetal en las semanas 13, 20 y 36 de gestación para evaluar la estructura y función cardíacas. En fetos de embarazo con diabetes pregestacional encontraron cambios estructurales y funcionales del corazón, comparados con fetos controles de mujeres sanas en cada edad gestacional. Estos hallazgos sugieren que la disfunción cardíaca puede estar precedida por los cambios estructurales cardíacos en fetos de embarazo diabético.

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

Además, investigaciones clínicas muestran como varios miRNAs se encuentran desregulados en la diabetes, un ejemplo típico es miR-223 que se ha propuesto como un biomarcador tisular de diabetes (Zhu & Leung, 2015). Adicionalmente, varios estudios genéticos humanos en diversas poblaciones han sugerido un papel importante de TNNI3K en la regulación y el desarrollo de la obesidad y problemas cardiovasculares. Zhao y cols. en 2011 en un estudio realizado en estadounidenses europeos, con edades entre 2 y 18 años, encontraron una asociación entre la obesidad infantil y el aumento de TNNI3K a nivel sanguíneo. Cornelis y cols. en 2013 analizaron la correlación del tipo de alimentación en la población estadounidense y la

concentración de TNNI3K, plantearon que dicha proteína se asocia positivamente con una alimentación incontrolada, la obesidad, y la presencia de problemas cardiovasculares.

5.2 Antecedentes Experimentales

La investigación de los miRNAs en el corazón embrionario normal y patológico es escasa en comparación con los reportes de miRNAs en el corazón posnatal. Varios estudios miden la expresión de miRNAs, pero sin relacionarla con los procesos morfogénéticos que sufre el corazón. Xua y colaboradores en 2006 evaluaron la expresión diferencial de 25 microRNAs en corazón embrionario de *Gallus gallus domesticus* (E18HH) y en etapas post natales, sin embargo, no investigaron quién promueve su expresión, ni algún gen blanco. Tampoco se determinaron los procesos morfogénéticos que se relacionen con su expresión, o bien la dinámica de expresión a lo largo de la embriogénesis. Por su parte, Legendijk y Goumans, en 2011 analizaron el efecto de la pérdida de expresión de los microRNAs y el impacto en procesos de organogénesis y sus repercusiones en el desarrollo. Sin embargo, no se ha investigado el cambio en la expresión de microRNAs con potencialidad cardíaca en un ambiente hiperglucémico ni su impacto en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

En trabajos recientes se determinó el patrón de expresión temporal de miRNAs cardíacos en ratones transgénicos y se evidenció que el exceso del miR-223 se asocia con el desarrollo de hipertrofia ventricular e insuficiencia cardíaca (Wang y col. 2013).

Inclusive existen trabajos donde se señala que la expresión disminuida o ausente de miR-223 funciona como un regulador contrarrestando la hipertrofia e insuficiencia cardíacas (Zhang, y cols. 2016). Asimismo, en el tejido cardíaco se ha demostrado un papel importante del miR-223 en la regulación de la expresión del receptor Glut4, (Lu, et al. 2010).

Por su parte, TNNI3K es una MAP cinasa específica de corazón que se une y fosforila a la troponina cardíaca I (cTnI) y juega un papel clave en la regulación de la contracción del miocardio ventricular (Wang, y col, 2013). En 2015 Wang y colaboradores señalan una relación positiva en la expresión del miR-223 y la proteína TNNI3K en corazones con hipertrofia. Adicionalmente, se ha identificado que la expresión excesiva de TNNI3K es sumamente importante en la progresión de las miocardiopatías (Tang, et al, 2013).

Wheeler y colaboradores en 2009 en ratones transgénicos de cardiomiopatía de y en un modelo de insuficiencia cardíaca por sobrecarga de presión, en ambos modelos se reportó la sobre expresión de TNNI3K y encontraron mayor disfunción cardíaca, lo que indica un papel importante de TNNI3K en la modulación de la progresión de diferentes formas de enfermedad cardíaca.

Posteriormente Vagnozzi y colaboradores en 2013, apoyados de ratones transgénicos en los que se sobreexpresó TNNI3K, además de confirmar un papel importante de TNNI3K en la modulación de la progresión de la cardiomiopatía, los ratones transgénicos de TNNI3K tenían niveles plasmáticos elevados de cTnI y mayor número

de infartos. Los autores concluyeron que la excesiva actividad cinasa de TNNI3K fue la responsable de los eventos de infartos que se presentaron, en los ratones.

En un trabajo alterno, Tang y cols en (2013), investigaron la actividad de la cinasa TNNI3K en in vitro y realizaron un análisis proteómico. Descubrieron que TNNI3K tiene una doble función cinasa Tyr y Ser / Thr. Adicionalmente reportaron que la expresión incrementada de TNNI3K promueve cambios celulares y moleculares como la reducción de la longitud del sarcómero y cambios en la composición de titina, todos ellos indicativos de remodelación cardíaca. Encontraron que TNNI3K, se ubica en los discos intercalares del sarcómero. Finalmente concluyeron que TNNI3K podría mediar vías de señalización intracelular en respuesta a situaciones de estrés en el corazón.

Todos estos antecedentes generan el interés de investigar más a fondo el papel del miR-223 y la proteína TNNI3K en las enfermedades del corazón durante su desarrollo bajo ambientes hiperglucémicos. Por razones bioéticas resulta complicado realizar labores de investigación en desarrollo embrionario y bajo ambientes hiperglucémicos. Por lo que, es necesario un modelo experimental adecuado, donde se puedan aislar las variables maternas y evaluar el desarrollo embrionario cardíaco bajo condiciones de hiperglucemia y su relación con en el desarrollo del miocardio ventricular.

6.1 Ventajas del modelo de *Gallus gallus*

Diversas investigaciones mediante marcaje selectivo *in ovo* del corazón embrionario de *Gallus gallus domesticus* describen el desarrollo de elementos embriológicos y su destino en estructuras del corazón maduro (Wittig & Münsterberg, 2016), lo que ha permitido especular el origen de los defectos congénitos del corazón y la etapa embrionaria en que ocurren las anomalías, esto debido a que el desarrollo cardíaco humano es comparable al del pollo. En contraste, la mayoría de los trabajos experimentales que abordan el efecto de la hiperglucemia materna durante el desarrollo cardíaco, se han llevado a cabo en modelos murinos utilizando comúnmente la estreptozotocina como inductor de Diabetes (Salazar, y cols, 2015). En cambio, el modelo de *Gallus gallus domesticus* permite analizar el efecto exclusivo de la hiperglucemia materna sin la interferencia de otros factores maternos, permitiendo además visualizar detalladamente el desarrollo del embrión a lo largo de la gestación (Davey & Tickle, 2007).

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

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

III. JUSTIFICACIÓN

Estadísticas de la Organización Mundial de la Salud indican que los niveles crecientes de obesidad conducirán un aumento desmesurado en la prevalencia de todos los tipos de diabetes a nivel mundial (DeSisto, et al. 2014). Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la hiperglucemia que ocurre en mujeres gestantes puede tener efectos a corto, mediano y largo plazo en la progenie. A corto plazo puede provocar muerte embrionaria o fetal y el desarrollo de enfermedades congénitas de diversos órganos. A mediano y largo plazo, la prevalencia de hiperglucemia se considera un factor de riesgo para el desarrollo en la progenie de obesidad, enfermedades metabólicas y cardiovasculares entre las que destaca las miocardiopatías. Cabe señalar, que las redes moleculares que regulan los procesos morfogenéticos cardiacos y los factores que afectan estos procesos que pueden conducir al desencadenamiento de las miocardiopatías en algún momento de la vida siguen sin ser del todo claras.

Aunque se conoce el papel de algunos miRNAs desarrollo embrionario cardíaco y su impacto en el desarrollo de las miocardiopatías, la función del miR-223 en este aspecto ha sido poco explorado (Takaya & Ono, 2009). En este contexto, trabajos experimentales recientes en ratones transgénicos asocian el exceso del miR-223 con la hipertrofia ventricular e insuficiencia cardíaca y una relación positiva de la expresión del miR-223 y TNNI3K en corazones con hipertrofia y la expresión excesiva de TNNI3K que promueve cambios celulares como la reducción de la longitud del sarcómero y cambios en la composición de titina que conducen a la progresión de las miocardiopatías (Wang y col. 2013). Incluso, se ha reportado que la carencia o

expresión disminuida de miR-223 contrarresta la hipertrofia e insuficiencia cardíacas (Zhang, y cols. 2016). Adicionalmente, se ha demostrado un papel importante de este miRNA en la regulación de la expresión del receptor Glut4 (Lu, et al. 2010). Sin embargo, estos resultados no han sido validados en el desarrollo embrionario cardíaco en un modelo *in vivo* no transgénico de hiperglucemia aislada como lo permite el embrión de pollo.

Por la homología anatómica y embrionaria del modelo de pollo con el modelo murino y los humanos, pensamos que la información obtenida podría resultar de utilidad en la validación del miR-223 y la proteína TNNI3K como potenciales biomarcadores que ayude a un diagnóstico diferencial temprano de hipertrofia cardíaca fetal e infantil, con la finalidad de que en el futuro después de haber sido caracterizado el papel de estas moléculas en el desarrollo, homeostasis y función cardíacas puedan ser empleadas como tratamiento potencial en algún protocolo de terapia génica.

IV. HIPÓTESIS

El ambiente hiperglucémico durante el desarrollo embrionario afectará la morfología e histología de las paredes ventriculares y modificará el patrón de expresión de proteínas sarcoméricas y el miR-223 asociados a remodelaciones anómalas cardíacas.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desarrollo embrionario cardiaco bajo condiciones de hiperglucemia y su relación con en el desarrollo del miocardio ventricular, cambios la expresión de las proteínas sarcoméricas (troponina I cTnI, desmina y TNNI3K) y la posible desregulación del miRNA-223.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Estandarizar un modelo de hiperglucemia en embriones de *Gallus gallus domesticus* cultivados *in ovo*.
- ❖ Determinar el efecto del ambiente hiperglucémico en el peso y desarrollo corporal y cardiaco
- ❖ Analizar comparativamente la morfometría e histopatología de corazones de embriones desarrollados en un ambiente normo o hiperglucémico.
- ❖ Cuantificar la expresión relativa de miR-223 en los corazones maduros de embriones desarrollados en condiciones de normo e hiperglucemia.
- ❖ Estudiar por inmunofluorescencia el patrón de expresión y distribución de cTnI, desmina y TNNI3K, consideradas marcadoras de daño al miocardio, en los corazones embrionarios desarrollados en condiciones de normo o hiperglucemia.
- ❖ Determinar por WB la expresión de las proteínas sarcoméricas cTnI, desmina y TNNI3K en los corazones de ambos grupos de estudio.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Inducción de hiperglucemia embrionaria

Se emplearon huevos fértiles de gallina (*Gallus gallus domesticus*), libres de patógenos específicos, adquiridos en la granja ALPES S.A. (Tehuacán, Puebla). Los huevos se separaron en dos grupos de estudio GI. Grupo hiperglucémico (HG). GII. Grupo normoglucémico sin tratamiento (NT). Los huevos de ambos grupos se incubaron a 37°C y 60% de humedad por 3 - 3.5 días de incubación hasta alcanzar el estadio 22HH con base en la clasificación de Hamburger y Hamilton (1952) que relaciona la morfología embrionaria y cardíaca con el tiempo de incubación. Pasado ese tiempo, se abrió una ventana de aproximadamente 1 cm² en el lado romo del cascarón. GI. Para inducir hiperglucemia, los embriones se manipularon siguiendo la metodología modificada de Zhang (2016). A través de la ventana del cascarón y con la ayuda de una jeringa de 1 ml, para el GI. se administraron diariamente 450 µL de solución de glucosa al 30 mmol/L, diluida en solución salina (NaCl 0.9%) desde el estadio 22HH, hasta un máximo de 10 días de incubación (estadio 36HH). GII. Los embriones control (NT) fueron tratados con una dosis diaria de 450 µL de solución salina. Para verificar la inducción de hiperglucemia, a partir del día 4 de incubación se obtuvieron embriones GI y GII cada 24 horas (n = 30 de cada grupo en 36HH). Se separaron del vitelo, se decapitaron y se tomó una pequeña muestra de sangre para registrar el nivel de glucemia, empleando tiras reactivas y un glucómetro. Los datos se registraron en una tabla y se elaboró una gráfica.

7.2 Análisis anatómico e histológico.

7.2.1 Peso y desarrollo corporal

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

7.3 Análisis estructural de microscopia electrónica de barrido.

Los corazones de estadio 36HH, se fijaron en una solución de glutaraldehído (0.1%) en PBS (0.1M) pH 7.4 y se deshidrataron en alcoholes graduales, para ser llevados a punto crítico, posteriormente fueron montados en platinas de cobre. Las muestras se observarán en el microscopio electrónico de barrido, (JEOL, Japón) se obtuvieron imágenes digitales para comparar cambios en el proceso de trabeculación y delaminación en los corazones de ambos grupos.

7.4 Procedimiento Histológico.

Los corazones fijados en paraformaldehído (6-12 hrs) se emplearon para evaluar el desarrollo del miocardio. Después de la evaluación anatómica, se eliminó el exceso del fijador y se deshidrataron en alcohol etílico a concentraciones graduales ascendentes (30-100%), se transparentaron en Xilol y se incluyeron en parafina. Se elaboraron cortes seriados de 6 µm en el plano transversal a la altura de los músculos papilares y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina y Eosina (anexo I) Los cortes

histológicos se emplearon para medir el d, así como el conteo de miocitos en 3 áreas diferentes de cada pared ventricular con la ayuda de un Scanner Digital Aperio (Leica, EU) y con el software ImageScope. Para determinar las propiedades histológicas de las propiedades del miocardio ventricular, las preparaciones se fotografiaron en un microscopio óptico Olympus.

7.5 Evaluación de expresión de miR-223 por qRT-PCR.

Se empleó un lote de corazones que alcanzó el estadio 36 HH (10 días de incubación). En ambos grupos (HG y NT) se obtuvo solamente el tejido ventricular y se almacenó en congelación a -80°C hasta su uso en una PCR a tiempo real. Para medir la expresión de microRNA-223, se realizaron pruebas de PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando como control endógeno el miRNA U6. Primero se extrajo el ARN total del tejido previamente congelado por el método de extracción fenólica con TRIzol (Reagent Invitrogen Life Technologies). La concentración de ARN total se determinó en un espectrofotómetro. El cDNA se sintetizó a partir de 50ng de RNA total, usando primers específicos para cada miRNA. La RT-PCR a tiempo real para medir la expresión de miRNAs se llevó a cabo con sondas marcadas TaqMan y utilizando "Universal Master Mix II Protocol". Cada reacción de PCR se llevó a cabo por triplicado. La expresión de los miRNAs se analizó por el procedimiento de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ (Silberman, 2006).

7.6 Inmunodetección por microscopia confocal.

Para poder determinar la expresión de las proteínas sarcoméricas TNNI3K, troponina I y desmina se emplearon cortes histológicos del corazón (6 μ m) que fueron montados en portaobjetos cubiertos con poli-L lisina al 1%. Las laminillas se rehidrataron y se hizo recuperación de antígenos con búfer de citratos (BioGenex, USA) en autoclave a 15 lb de presión por 5 min y, finalmente, se adicionó anticuerpos anti-TNNI3K (ABCam, UK), anti-cTnI (Santacruz, EU) y anti-Desmina (Santacruz, EU) en concentración 1/200, las muestras se incubaron toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación. las muestras se trataron con anticuerpo secundario anti-rabbit (Life Technology, USA) por 4 horas a temperatura ambiente, los núcleos celulares se tiñeron con ioduro de RedDot (Biotium, USA) diluidos 1/150. Por último, las muestras se montaron y se observaron en un microscopio confocal (Carl Zeiss, Alemania). Se obtuvieron microfotografías en las 3 zonas de interés con aumento de 10X, 40X y 60X (software, ZEN 2010).

7.2 Análisis de la expresión de proteínas por Western Blot.

El tejido ventricular de los corazones en estadio 36 HH HG y NT fue colocado en tubos eppendorf en solución de lisis Tris-HCl con inhibidor de proteasas para homogenizar, centrifugar y cuantificar proteínas a 280nm, con un nanodrop (Fisher Scientific, USA). Se separaron las proteínas utilizando una cámara de electroforesis (Fisher Scientific, USA). Y el Precision Plus Protein se usó como marcador de peso molecular. Después de la transferencia de proteínas a la membrana en el Trans-Blot, (Fisher Scientific, USA), se emplearon anticuerpos primarios para la proteína TNNI3K, cTnI y desmina

seguido de una cuantificación por quimioluminiscencia, empleando alfa-actina como control. Los promedios de las densidades ópticas obtenidas para la expresión de cada proteína se reportaron como porcentaje del control que fue el 100% de la expresión \pm la desviación estándar.

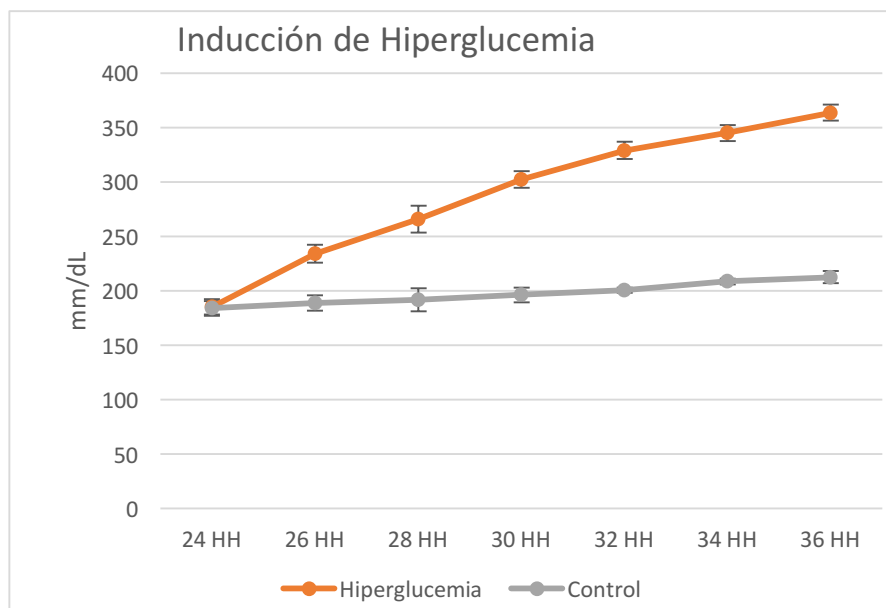
7.4 Análisis Estadístico

Para el análisis de los resultados, los datos obtenidos como peso, talla y glucemia se procesaron para obtener promedios, desviación estándar y se les aplicó un test de normalidad Shapiro Wilk. En caso de los análisis morfométricos del corazón, se obtuvieron promedios, desviación estándar y se realizó un análisis de normalidad Shapiro Wilk y se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes. La expresión de los miRNAs se analizó por el procedimiento de $2^{-\Delta Ct}$. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando una ANOVA de una vía. Las diferencias entre los grupos de estudio fueron consideradas como significativas con valores de $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1 Inducción de Hiperglicemia

En ambos grupos, experimental y controles, se continuo el desarrollo embrionario hasta alcanzar ± 10 días de incubación totales. Para el caso de los embriones hiperglucémicos (HG) los niveles de glucosa en la sangre aumentaron continuamente tras cada dosis diaria de glucosa, llegando a superar los 350 mm/dL, en comparación con el grupo de embriones normoglucémicos (NT) en donde no se presentaron cambios significativos en los niveles de glucosa. El registro promedio glucosa en sangre del GII fue 198 mm/dL, como se muestra en la gráfica 1.



Grafica 1. Rastreo de los niveles de glucosa en sangre, durante el desarrollo embrionario de *Gallus gallus* n=86.

8.2 Peso y desarrollo corporal

En esta investigación, aunque ambos grupos hiperglucémico y control fueron incubados juntos por 10 días, no solo se detectó microsomía, demostrada por embriones de menor peso y talla; también se observó un retraso general en la maduración de los embriones HG respecto a los NT. El grupo de embriones NT, alcanzaron el estadio 36 HH, en contraparte los embriones del grupo HG solo llegaron al estadio ± 33 HH tras 10 días de incubación. Además, en los embriones del grupo HG se detectó retraso en la maduración de extremidades como lo indica la cabeza de flecha y en los párpados (como lo señala la flecha), así como defectos en las falanges de las patas, como lo indicado por la estrella en la figura 1.

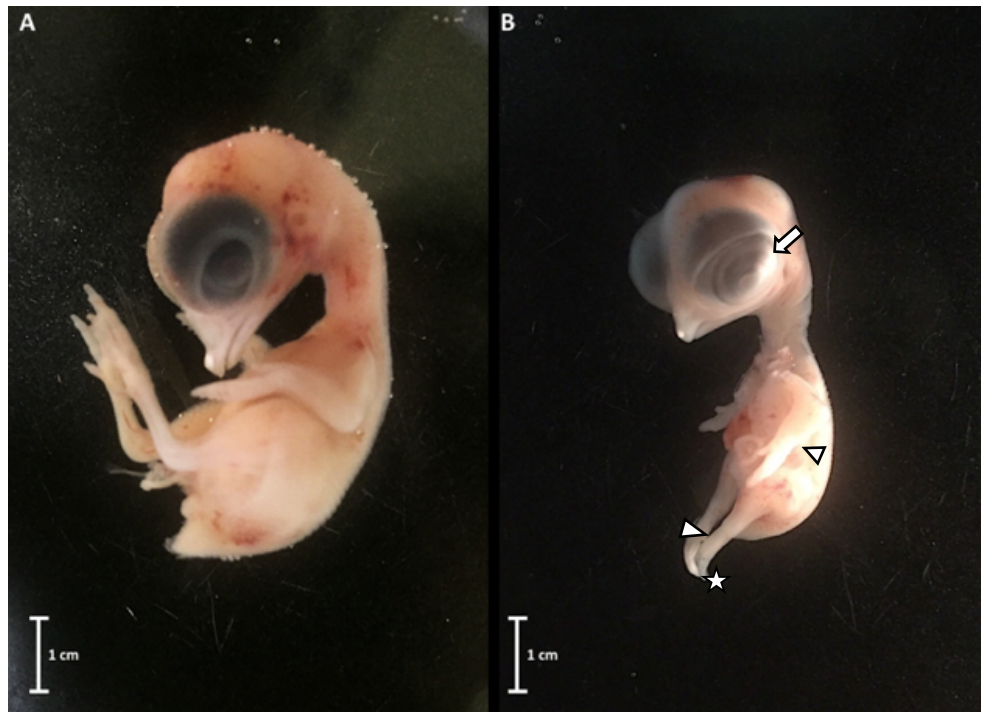
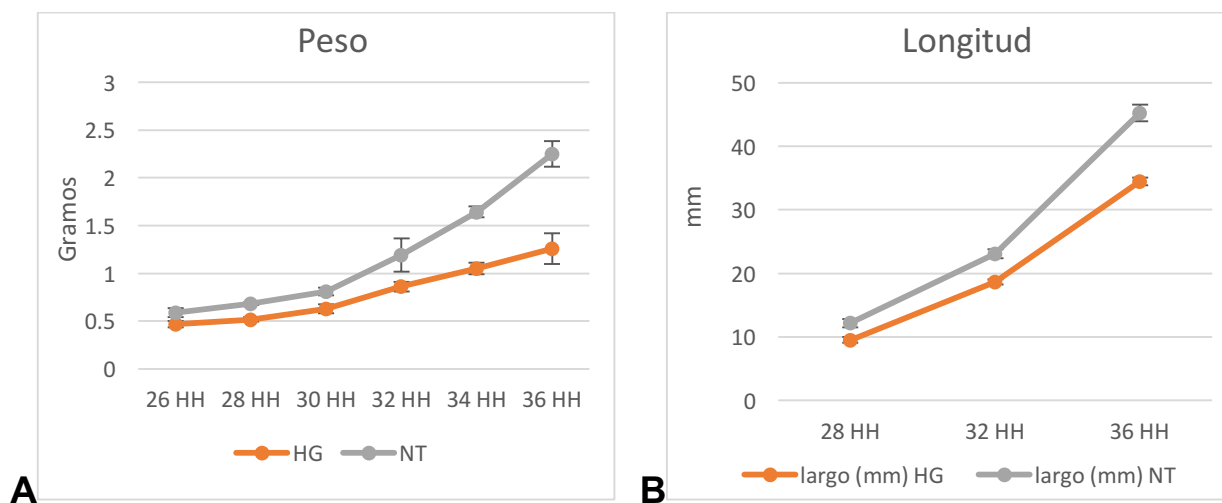


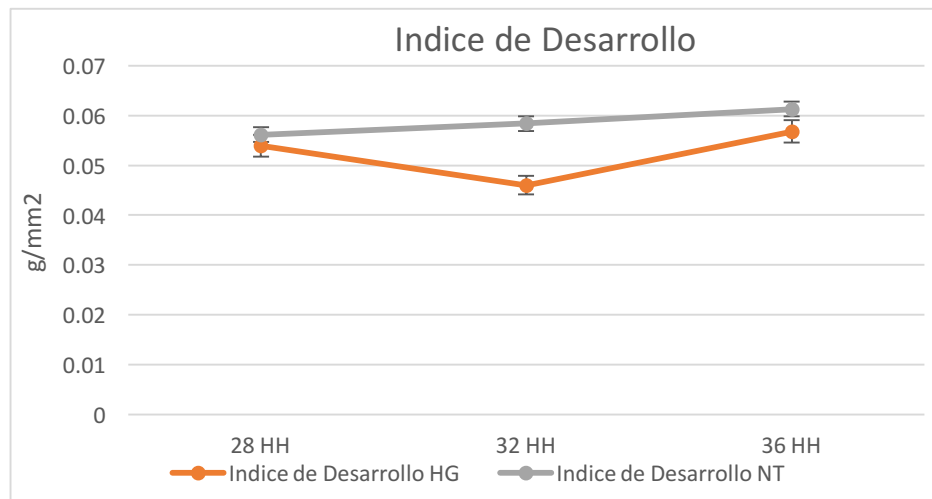
Figura 1. A) Embrión de *Gallus gallus* incubado por 10 días, en estadio 36 HH normoglucémico. B) Embrión de *Gallus gallus* incubado por 10 días hiperglucémico

Los embriones de ambos grupos, mostraron un aumento exponencial del peso y largo durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, los embriones del grupo HG mostraron una reducción del 34% ($p=0.0032$) en el aumento de peso corporal, comparados con el grupo de embriones NT. Para el caso de la longitud hubo una reducción del 14% en los embriones del grupo HG respecto a los NT ($p=0.0031$), como lo indican las gráficas 2A y 2B.



Grafica 2A. Análisis morfométrico de embriones NT y HG. **Grafica 2A.** Peso corporal de los embriones NT 34% mayores respecto a los HG. **Grafica 2B.** Longitud de los embriones de los embriones NT 14 % mayores respecto a los HG.

Aunque los embriones de ambos grupos de estudio se obtuvieron después del mismo tiempo de incubación (10 días), el retraso en el desarrollo del grupo experimental de embriones HG, fue muy evidente, y se constató por el mayor índice de desarrollo embrionario (peso/largo²) del grupo normoglucémico (NT), respecto al grupo HG ($p=0.0401$) como se aprecia en la gráfica 3.



Gráfica 3. Índice de desarrollo del crecimiento del grupo de embriones NT (línea gris) respecto a los HG (línea naranja).

Respecto a la morfometría cardíaca, se fotografiaron los corazones de embriones HG y de los embriones NT, se midió el largo y ancho del corazón completo, encontrando un menor tamaño de los corazones de embriones HG, como lo ilustra la figura 2.

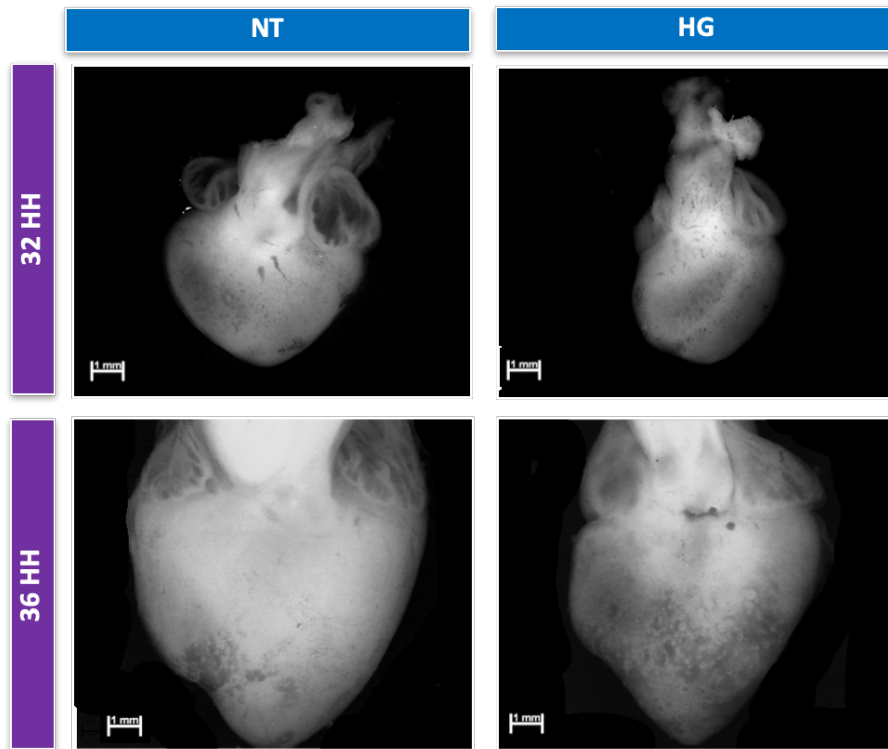


Figura 2. Corazones de embriones de *Gallus gallus* observados a 25x. A) Corazón en estadio 32 HH de embrión NT. B) Corazón en estadio 32 HH de embrión HG. C) Corazón en estadio 36 HH de embrión NT. D) Corazón en estadio 36 HH de embrión HG (la barra de escala representa 1 mm en todas las fotografías).

8.3 Análisis morfométrico e histológico.

Para corroborar el retraso en el desarrollo embrionario por el ambiente hiperglucémico, se procedió a analizar la morfohistología de los corazones, en estadio 32 HH y 36 HH, mediante cortes histológicos seriados transversales donde se midió el diámetro ventricular y el tamaño de la circunferencia cardiaca a la altura media de los ventrículos, tomando como referencia la inserción de los músculos apilares. En los embriones del grupo HG, encontramos una disminución de casi el 20% del diámetro ventricular ($p=0.0301$), respecto a la circunferencia cardiaca, los embriones del grupo HG presentaron una reducción del 25% ($p=0.0281$) con respecto a los embriones del grupo NT, como se ve en las gráficas de la figura 3.

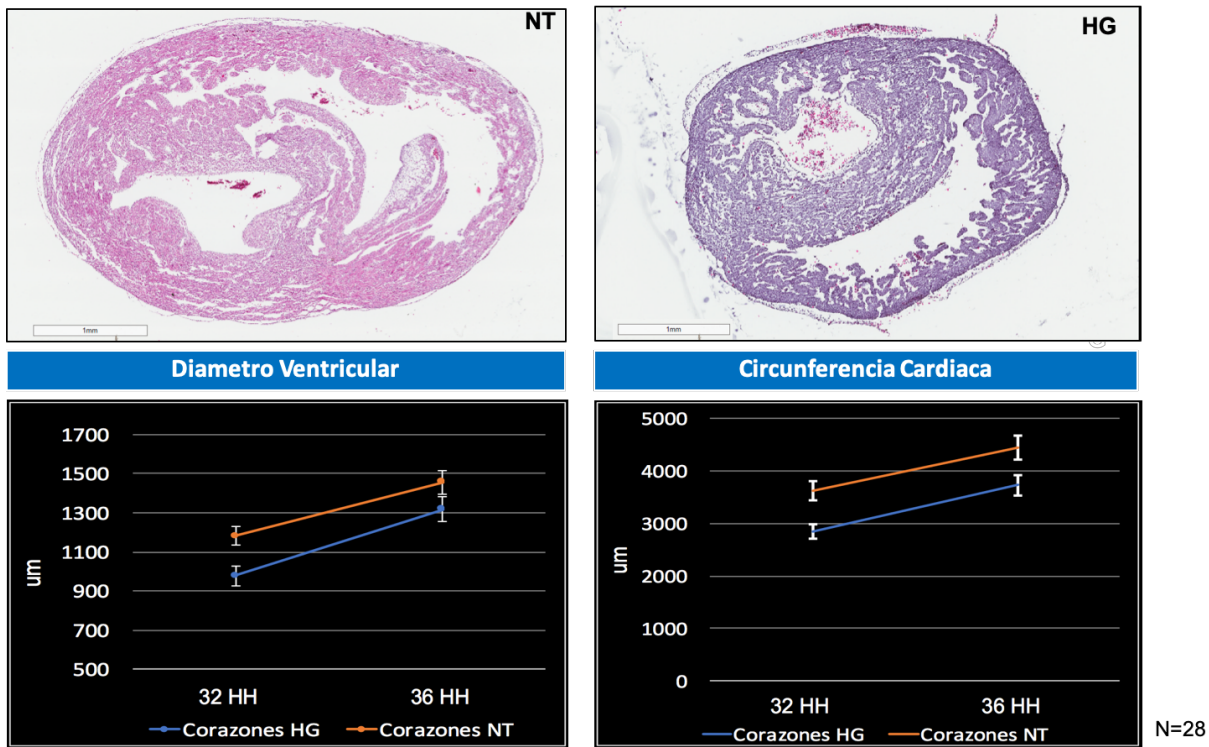


Figura 3. Imágenes representativas de cortes histológicos de corazones, teñidos con tinción de hematoxilina-eosina de observados a 4x. A) Corte transversal de corazón de embrión NT en estadio 32 HH. B) Corte transversal de corazón de embrión HG en estadio 32 HH. C) Grafica del promedio del diámetro de los corazones de embriones HG respecto a los embriones NT. D) Grafica del promedio de la circunferencia cardíaca de embriones HG respecto a los embriones NT (la barra de escala representa 1 mm en todas las fotografías).

Para corroborar lo anterior se procedió a analizar a mayor aumento la morfohistología de la pared libre del ventriculo derecho (PVD), de la pared libre del ventriculo izquierdo (PVI) y del tabique interventricular (TIV) de corazones en estadio 32 HH y 36 HH, esto mediante cortes histológicos seriados, encontrando una disminución en el grosor en ambas paredes ventriculares y en el tabique interventricular, de los embriones del grupo HG, con respecto a los embriones del grupo NT, como se ve en la figura 4.

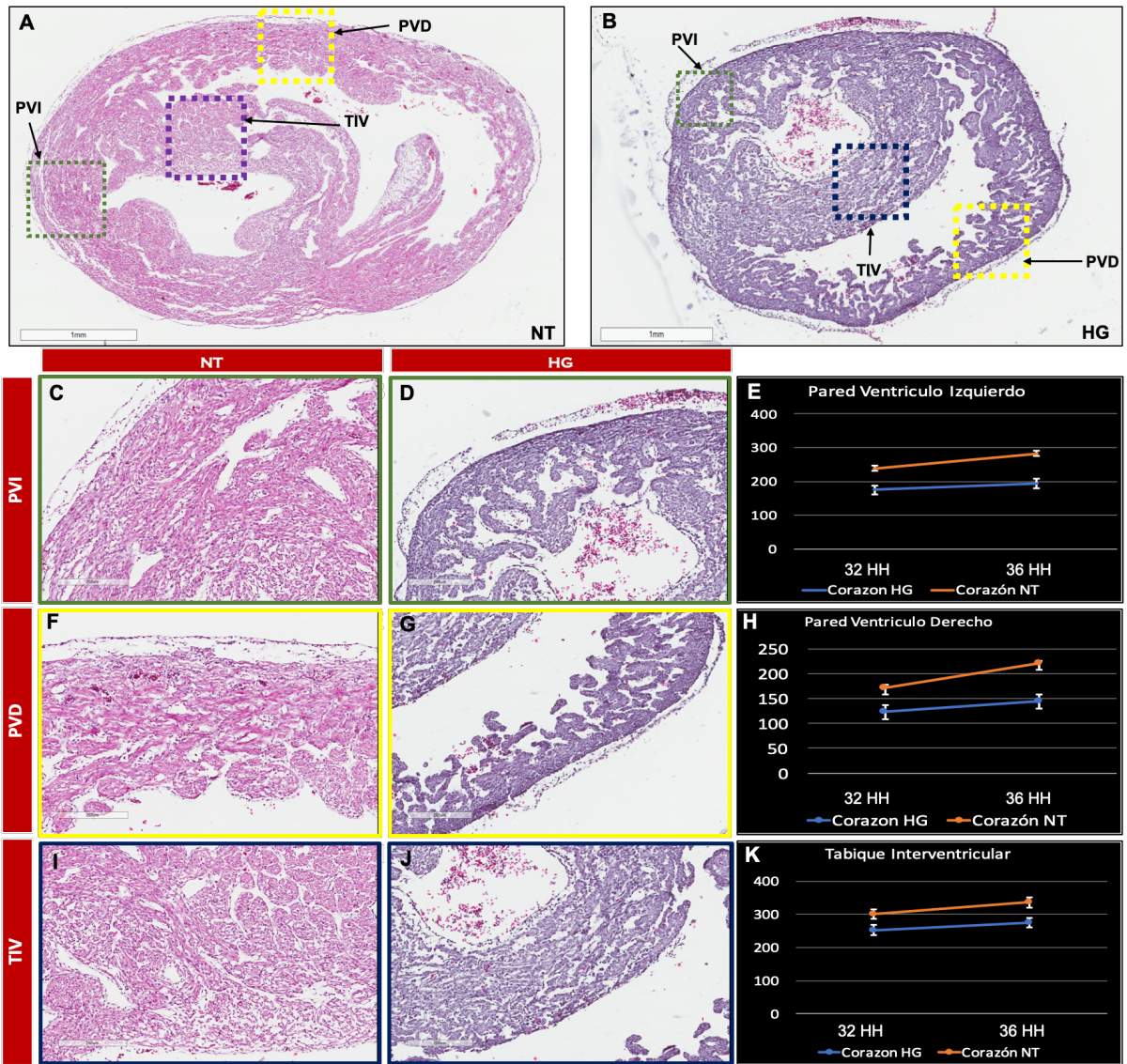
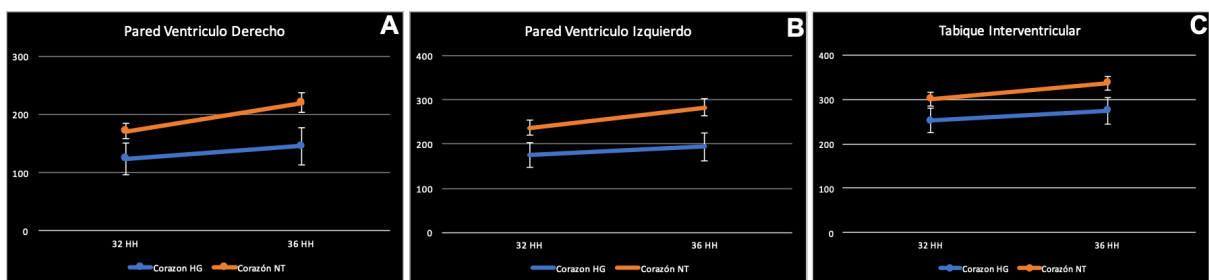


Figura 4. Imágenes representativas de cortes histológicos transversales de corazones 36HH, teñidos con tinción de hematoxilina-eosina. A) Corte a la altura de los músculos papilares indicando las 3 zonas de interés de un corazón del grupo HG observados a 6x. B) Corte a la altura de los músculos papilares indicando las 3 zonas de interés de un corazón del grupo NT observados a 6x. C) Pared Ventricular izquierda de embrión NT observados a 40x. D) Pared Ventricular izquierda de embrión HG observados a 40x. E) Grafica del promedio del grosor de las paredes ventriculares derechas de embriones HG respecto a los embriones NT. F) Pared Ventricular Derecha de embrión NT observados a 40x. G) F) Pared Ventricular Derecha de embrión HG observados a 40x. H) Grafica del promedio del grosor de las paredes ventriculares derechas de embriones HG respecto a los embriones NT. I) Tabique Interventricular de embrión NT observado a 40x. J). Tabique Interventricular de embrión HG observado a 40x. K) Grafica del promedio del grosor del tabique interventricular de embriones HG respecto a los embriones NT (la barra de escala representa 200 um en todas las fotografías).

En el Grupo HG se presentaron resultados similares en ambos estadios (32 HH y 36 HH). En la PVI en estadio 36HH se presentó una pérdida del grosor de 40%. ($p=0.0025$). En la PVD hubo una pérdida del grosor de 35% ($p=0.0021$). Para el caso del TIV se observó una disminución del 38% ($p=0.00202$) en el grosor respecto al grupo de embriones NT.

Posteriormente se realizó un conteo de miocitos por campo, usando como referencia las tres áreas anteriores (pared ventricular derecha e izquierda, y el tabique interventricular de ambos grupos en 32 HH y 36 HH). En el grupo HG se observó una disminución del 30% ($p=0.00286$) en el número de células por campo en la pared ventricular derecha, en la pared ventricular izquierda se redujo un 34% ($p=0.00237$) el número de células y en el tabique interventricular el número de células por campo disminuyó un 19% ($p=0.00493$) respecto a los embriones NT (figura 5).



Gráfica 4. Resultados del promedio de conteo celular por campo, vistos a 40x. A) Pared Ventricular Derecha de embriones NT respecto a los embriones HG. B) Pared Ventricular Izquierda de embriones NT respecto a los embriones HG. C) Tabique interventricular de embriones NT respecto a los embriones HG.

En el análisis mediante microscopia electrónica de barrido de la organización de las trabéculas carnosas de los ventrículos del grupo HG se encontró un retraso en la

delaminación y en la compactación de las trabéculas respecto a los NT (figura 6), la flecha señala la pared ventricular con un mayor nivel de compactación en embriones NT, respecto a la pared ventricular de los embriones HG como lo indica la cabeza de flecha.

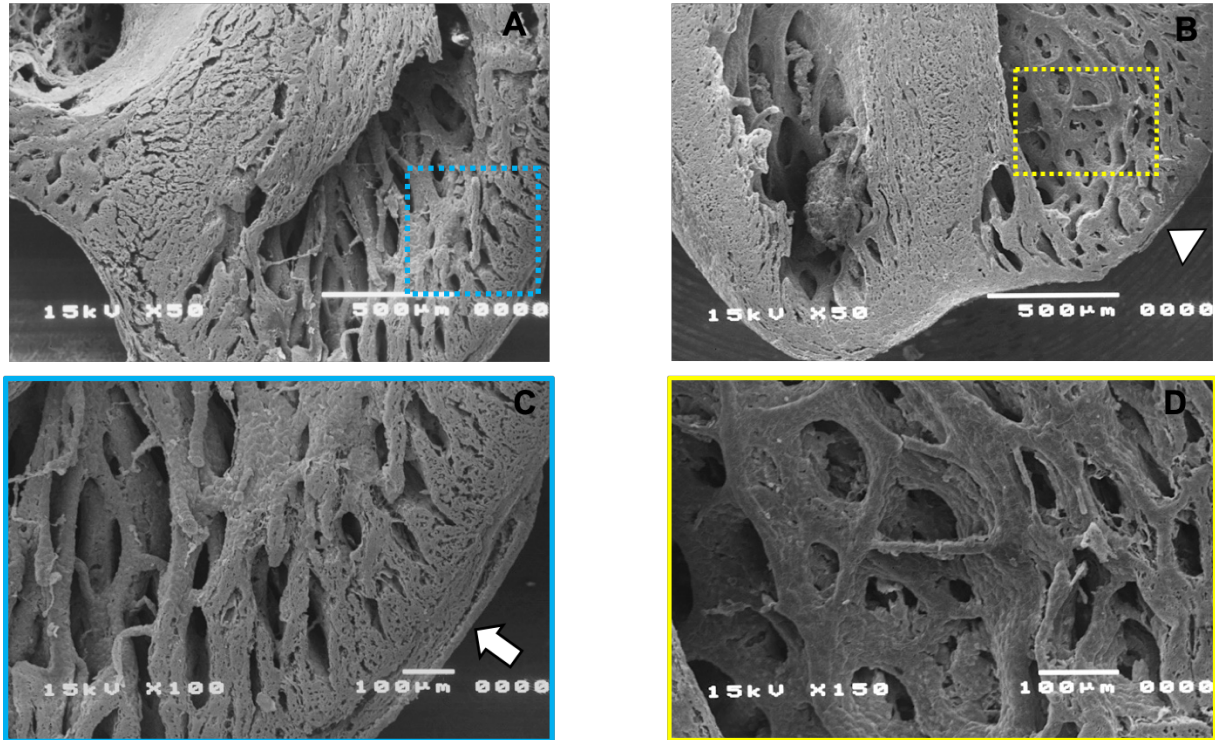
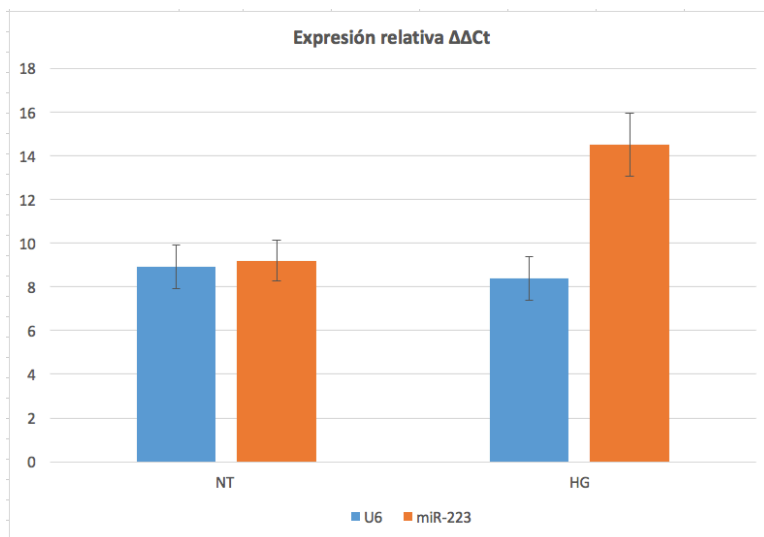


Figura 5. Micrografías de corazones embrionarios de *Gallus gallus* en estadio 32 HH. A y C) Corazón NT. D y B) Corazón HG.

8.4 Evaluación de expresión de miR-223 por qRT-PCR

Para validar el posible aumento de la expresión del miR-223 en un ambiente hipoglucémico se realizaron pruebas de qRT-PCR en el tejido cardiaco de estadio 36HH y utilizando como control endógeno el miRNA U6, y mediante la técnica de expresión relativa $\Delta\Delta C_t$ se constató un aumento del 41% ($p=0.00256$) en la expresión del miR-223 en los embriones HG respecto a los NT, como lo muestra la figura 7.



Gráfica 5. Expresión del miR-223 por qRT-qPCR.

8.5 Inmunodetección de proteínas indicadoras de daño al miocardio.

8.5.1 TNNI3K

Se ha reportado en la literatura que existen proteínas sarcoméricas que se ven afectas al aumentar la expresión del miR-223, por lo que evaluamos la expresión de TNNI3K, usando anticuerpos específicos, se buscó comparar la expresión de esta proteína mediante inmunofluorescencias, cuantificando la densidad óptica de fluorescencia. Se encontró un aumento en la expresión de TNNI3K en los corazones de embriones HG, en comparativa con los embriones NT como se muestra en la figura 8. En la PVD del grupo HG se presentó un aumento del 30% ($p=0.00361$) más de expresión de la TNNI3K, en las PVI un aumentó en 37% ($p=0.00233$). Un resultado similar se encontró en el TIV, donde hubo un incremento del 34% ($p=0.00261$) en la expresión de TNNI3K, cabe recalcar que su expresión, no se detectó en la forma típica de fibrilar, por el contrario, dispersa en el citoplasma.

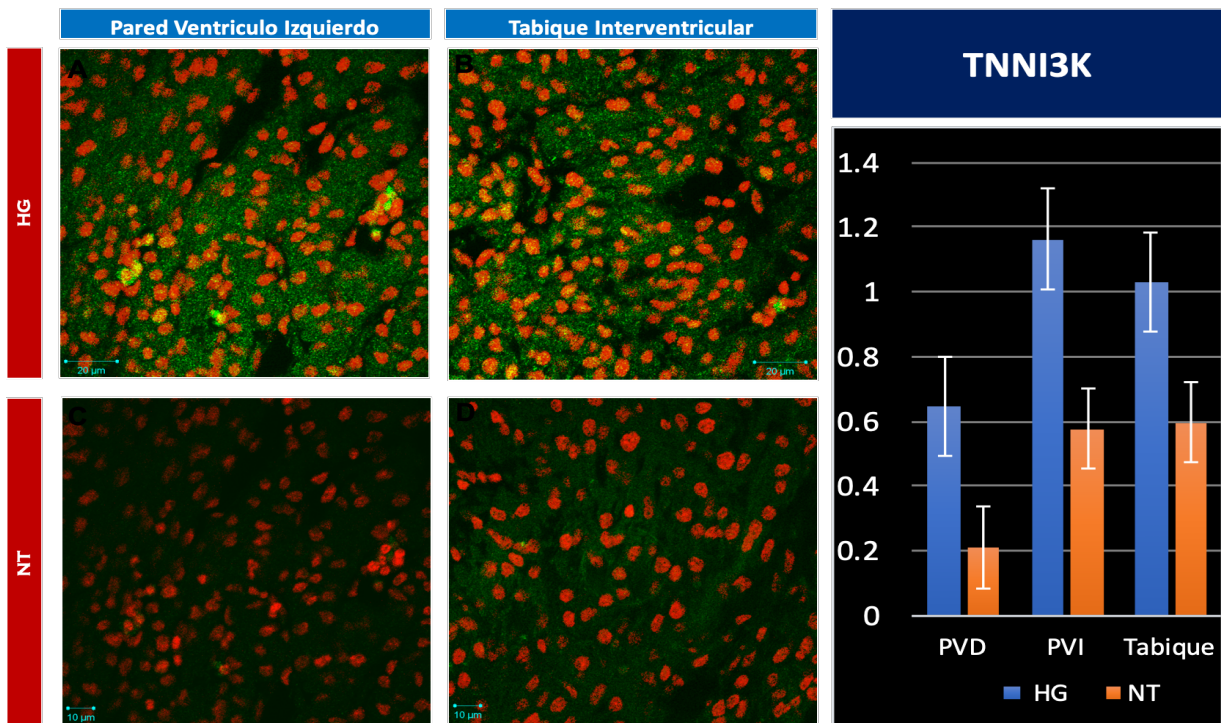


Figura 6. Imágenes representativas de inmudetecciones de TNNI3K en cortes histológicos transversales de corazones 36HH. A) Pared Ventricular Izquierda de embriones HG observado a 60x. B) Imagen del tabique interventricular de embriones HG visto a 60x. C) Pared Ventricular Izquierda de embrión NT visto a 60x. D) Imagen del tabique interventricular de embriones NT visto a 60x.

8.5.2 cTnl

Dando seguimiento al aumento en la expresión de TNNI3K, al ser una cinasa interactuante con cTnl, se procedió a medir en las paredes libres ventriculares derecha e izquierda, así como el tabique interventricular por medio de inmunofluorescencia específica contra cTnl. Se encontró un aumento en su expresión de 39% ($p=0.0284$) en la PVI, en la PVD se presentó un aumento del 24% ($p=0.0297$) (Figura 7). Un resultado similar fue lo ocurrido en el TIV donde hubo un aumento del 41% ($p=0.00225$) de la expresión de cTnl en los embriones HG respecto a los embriones NT como se muestra en la figura 9 esta proteína, no se detectó el patrón fibrilar linear clásico, la fluorescencia tenía un aspecto más bien grumoso en el grupo HG.

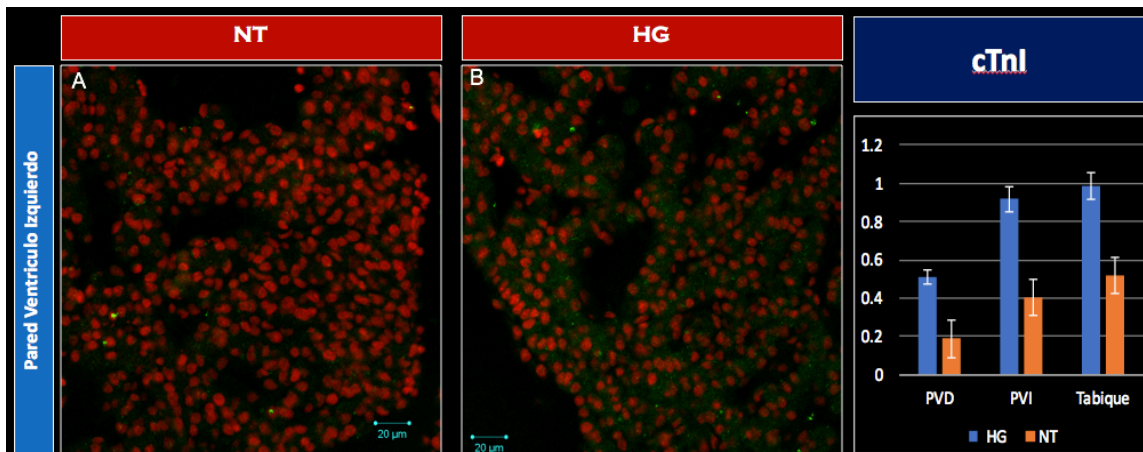


Figura 7. Imágenes representativas de inmunodetecciones de cTnI en cortes histológicos transversales de corazones 36HH. A) Pared Ventricular Izquierda de embrión HG observado a 60x. B) Imagen del tabique interventricular de embriones HG visto a 60x.

8.5.3 Desmina

Continuando con los marcadores de daño al miocardio, se procedió a medir la desmina por medio de inmunofluorescencia en las paredes ventriculares libres derecha e izquierda, así como el tabique interventricular. En la figura 10 se muestran imágenes representativas de la PII, donde se presentó una disminución del 23% ($p=0.00374$) de la expresión de desmina en los embriones HG respecto a los embriones NT.

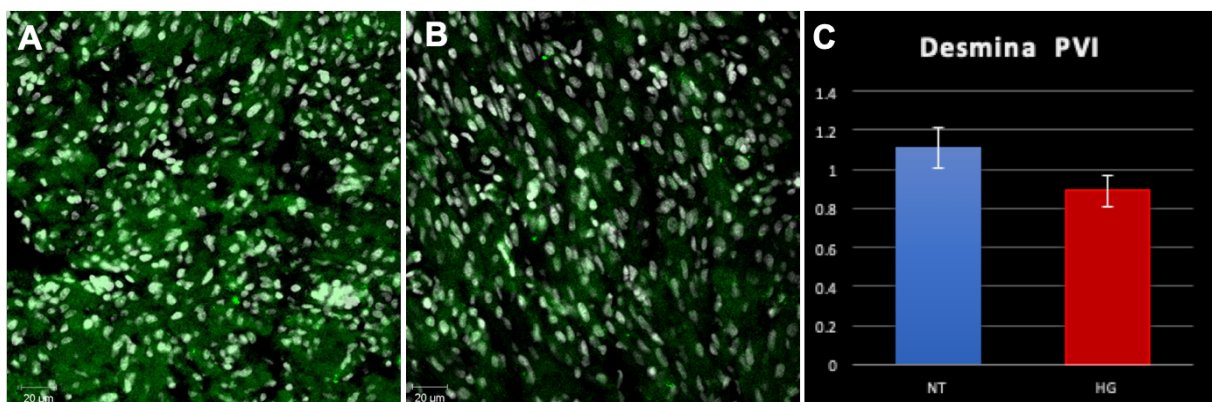


Figura 8. Imágenes representativas de inmunodetecciones de desmina en cortes histológicos transversales de corazones 36HH. A) Pared Ventricular Izquierda de embrión NT observado a 60x. B) Imagen de la Pared Ventricular Izquierda de embriones HG visto a 60x.

El análisis por Western Blot de la expresión de las proteínas sarcoméricas mostró resultados similares a lo observado en la inmunofluorescencia. En las densitometrías obtenidas del tejido del grupo HG hubo un aumento del 62% ($p=0.00321$) en la expresión de TNNI3K, un aumento del 54% ($p=0.00402$) en cTnI, en contraste, en el caso de la desmina hubo una disminución del 23% ($p=0.00341$). Se utilizó actina como control como lo indica la figura 11.

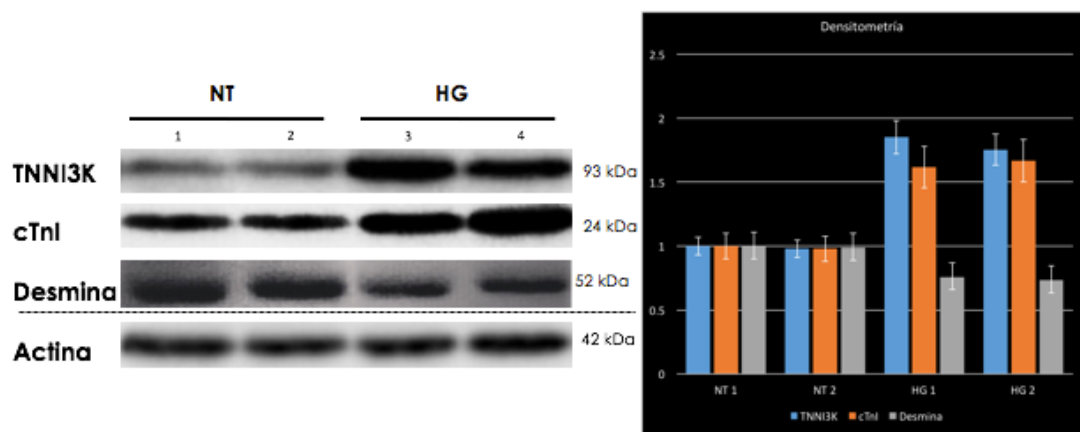


Figura 9. A) Western Blot de TNNI3K, cTnI, desmina y Actina. B) Densitometría de las proteínas medidas en el Western Blot.

IX. DISCUSIÓN

Actualmente se reporta un incremento acelerado a nivel mundial de casos de mujeres diabéticas en edad reproductiva que correlaciona con el incremento de casos de fetos y niños que manifiestan deficiencias en la función miocárdica que a menudo conduce a la muerte perinatal. En concordancia con estos hechos, evidencias clínicas y experimentales sugieren que los niveles elevados de glucosa durante la gestación a menudo causan la muerte embrionaria o fetal, así como las enfermedades congénitas de diversos órganos, que comúnmente son causas de muerte prenatal (Herrera y col. 1985).

Existen una gran variedad de fuentes en la literatura que muestran información acerca de estudios realizados en mujeres con diabetes durante la gestación que establecen una posible relación de esta enfermedad materna con las alteraciones en la homeostasis y función cardíacas observadas en la progenie desde el periodo neonatal y/o en la vida adulta que puede desarrollar hipertrofia cardíaca y daño al miocardio. Los efectos llegan a presentarse como consecuencia directa del ambiente intrauterino hiperglucémico observado en casos de DM tipos 1 y 2 (Dervisoglu, 2018).

Diversos trabajos en ratones transgénicos asocian el exceso del miR-223 con la hipertrofia ventricular e insuficiencia cardíaca y con la expresión exacerbada de TNNI3K, reducción de la longitud del sarcómero que conducen a la progresión de las miocardiopatías. Con el propósito de validar estos resultados en un modelo desarrollo

embrionario cardíaco *in vivo* no transgénico, evaluamos el desarrollo del miocardio ventricular, la expresión de las proteínas sarcoméricas cTnI, desmina y TNNI3K, así como el miRNA-223 en embriones de pollo en un medio hiperglucémico. A pesar de la importancia que tiene la hiperglucemia en mujeres gestantes en los problemas de función del corazón de la progenie, poco se sabe sobre los cambios celulares y mecanismos de regulación que promueven estos daños.

9.1 Importancia de hiperglucemia en embrión de pollo

Por razones bioéticas, no se pueden realizar investigaciones experimentales en humanos en etapas embrio-fetales y los modelos mamíferos murinos no permiten analizar de manera aislada la hiperglucemia. Por esta razón el embrión de pollo resultó un modelo de estudio adecuado que nos permitió aislar como única variable experimental el ambiente hiperglucémico para hacer estudios en etapas distintas del desarrollo embrionario y así analizar los efectos del ambiente hiperglucémico sobre la morfohistología cardíaca.

Los resultados de menor peso y talla de los embriones del grupo HG, replican algunos los resultados materno-fetales de mujeres que presentaban diabetes no controlada durante la gestación. Lessi, y cols. (2010) mencionan que en casos menos extremos, la hiperglucemia en mujeres gestantes altera el crecimiento y el desarrollo prenatal, lo que puede generar microsomía. En nuestra investigación no solo se vio la presencia de microsomía, al obtener embriones más pequeños también se observó el retraso general en el desarrollo de los embriones HG respecto a los NT, ambos grupos fueron

incubados juntos por 10 días (Figura 1, grafica 2 y 3). En este periodo, el grupo de embriones NT alcanzó el estadio 36 HH, en contraparte los embriones del grupo HG tras 10 días de incubación solo llegaron al estadio ± 33 HH. Además, en los embriones del grupo HG se detectó retraso en la maduración de extremidades y ojos, así como defectos en las falanges de las patas. Estos resultados son concordantes con lo reportado por Salazar-García y cols. (2015) en un modelo de rata con hiperglucemia inducida mediante la administración de estreptozotocina el día 5 de la gestación y con Reller & Kaplan, (1998) en un estudio de hijos de mujeres diabéticas, quienes inclusive mencionan que el ambiente hiperglucémico puede llegar a afectar la función sistólica y diastólica, llegando a causar insuficiencia cardíaca.

9.2 El ambiente hiperglucémico y la morfohistología cardíaca

El retraso en la maduración morfológica y funcional de órganos como el corazón y estructuras derivadas, pueden significar repercusiones importantes en la función cardíaca, lo cual puede conducir a procesos de remodelación cardíaca e inclusive a hipertrofia de los cardiomiocitos (Tang, 2013). Las trabéculas carnosas son estructuras musculares irregulares que se fijan a la pared ventricular, que dan resistencia para aumentar la contracción del corazón, el retraso o la falla en la delaminación y compactación de las trabéculas está asociado a problemas en la contracción cardíaca y en la presencia de arritmias cardíacas (Icardo & Fernandez, 1987). Encontramos en el grupo HG menor tamaño del corazón (figura 2) y observamos retraso en la delaminación de las trabéculas, así como menor grado de compactación del miocardio (Figura 5). Por tanto, podemos suponer que los efectos del ambiente hiperglucémico

en la morfología del corazón pueden tener repercusiones posteriores a nivel molecular y funcional.

Se sabe que la organización de las miofibrillas tiene un papel importante en la contracción del miocardio, en este contexto, en experimentos realizados en el año 2014 por Dowling y sus colaboradores encontraron diferencias en las características histológicas del corazón de fetos de 18 días obtenidos de ratones hembra diabéticas, respecto a los de madres control. Nosotros al igual que estos autores encontramos que diferencias significativas entre el grupo HG y el control fue el número de núcleos en el miocardio de las paredes ventriculares como lo muestra la figura 5. Por tanto, con base en nuestros resultados de menor diámetro, circunferencia y grosor de las paredes ventriculares (figuras 3 y 4) y menor número de núcleos en el miocardio (Gráfica 4) podemos concluir que el ambiente hiperglucémico embrionario altera el desarrollo de miocardio de la progenie.

9.3 Expresión del miR 223 en modelo embrionario de hiperglucemia.

Los miRNAs, son pequeñas secuencias de RNA no codificantes, su estudio ha crecido debido a que participan en varios procesos fisiológicos y patológicos. La evidencia acumulada indica que la desregulación de algunos de estos miRNAs y los procesos en los que participan estos miRNAs juegan un papel crucial en remodelaciones anómalas cardíaca.

El miR-223 se ha implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, pero prácticamente todos coinciden que está asociado con enfermedades del miocardio. Lu et al. (2010) informaron que el miR-223 estaba aumentado en las biopsias del ventrículo izquierdo de pacientes con diabetes tipo 2 y que la sobreexpresión de miR-223 aumentaba la captación de glucosa al aumentar la expresión de la proteína Glut4. Wang y col. en 2015, en un modelo de ratón con hipertrofia cardíaca *in vivo e in vitro*, informaron que la expresión elevada del miR-223 acelera la hipertrofia cardíaca. En concordancia con estos reportes, nuestro modelo de hiperglucemia embrionaria encontramos una mayor expresión de miR-223 (gráfica 5) que probablemente esté relacionada con los cambios morfohistológicos de corazón antes mencionados y con la expresión de otras proteínas sarcoméricas. Para confirmar esta idea analizamos el patrón de expresión de TNNI3K, y proteínas sarcoméricas marcadoras de defectos funcionales del miocardio, cTnI y desmina mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal (figuras 6-8) y western blot (figura 9).

9.4 Patrón de expresión de las proteínas sarcoméricas marcadoras de hipertrofia.

Los cardiomiocitos contienen conjuntos de sarcómeros alineados en serie paralelos al eje longitudinal de la célula. El mecanismo de la hipertrofia cardíaca está relacionado con los cambios en la organización de la estructura sarcomérica inducida por la alteración de la fosforilación de proteínas (Landstrom & Ackerman, 2012). Existe evidencia de que las remodelaciones anómalas en el corazón posnatal son provocadas por la activación de cascadas de proteína cinasa que, a su vez, activan MAPK. Estas

quinasas fosforilan varios sustratos celulares importantes para el crecimiento celular y los procesos de diferenciación relacionados con la hipertrofia cardíaca (Katta y cols. 2013). Se sabe que la expresión exagerada de TNNI3K acelera la disfunción cardíaca en modelos de miocardiopatías en ratones, lo que indica un papel importante en la modulación de la progresión de la enfermedad. Adicionalmente se ha informado que el aumento de la actividad TNNI3K induce la remodelación cardíaca provocando una serie de cambios celulares y moleculares, que incluyen una reducción de la longitud del sarcómero y cambios en la composición de la isoforma de la titina (Tang y col. 2013). La cTnI es una proteína que colabora en el acoplamiento actina-miosina durante la contracción cardíaca. Se ha descrito una mayor sensibilidad para la cTnI en la detección de una mínima lesión miocárdica, y en el diagnóstico del infarto (García, et al. 1998).

TNNI3K y cTnI, se localizan en el sarcómero de células cardíacas y son efectores en el acoplamiento de la miosina y la actina, durante la contracción del músculo cardíaco (Tang y col. 2013). La sobre expresión de estas proteínas se considera indicador de daño al miocardio y predictor preinfarto (Díaz & Burgos, 2002). Así mismo, se ha reportado alta expresión de cTnI en humanos adultos fallecidos que habían padecido diabetes y alguna deficiencia en la función cardíaca. Adicionalmente, en un modelo experimental de cardiomiopatías en ratas, la cTnI se asoció con remodelaciones anómalas cardíacas (Johnston, et al. 2017). Con base a estos antecedentes, suponemos que los altos valores de expresión tanto de TNNI3K (figura 8) como de cTnI encontrados en el grupo HG (figura 9) son indicativos de un posible daño

miocárdico, esto debido a que el corazón no tendría la fuerza necesaria para realizar el bombeo óptimo de la sangre.

En concordancia con esta idea, el análisis del patrón espacio temporal de expresión de TNNI3K y cTnI por microscopia confocal permitió definir que en el miocardio del grupo HG ninguna de estas proteínas tiene un patrón fibrilar lineal, la fluorescencia más bien tenía un aspecto grumoso, la DOF y la expresión relativa de las proteínas detectada por WB fue mayor. En contraste en el grupo NT el patrón de expresión de TNNI3K cTnI era fibrilar, mientras que la DOF y la expresión relativa de las proteínas fue menor (figuras 8, 9).

En cuanto a la desmina, es un componente integral de los cardiomiocitos particularmente de los filamentos intermedios, su baja expresión se ha relacionado a defectos mecánicos y estructurales del citoesqueleto celular, conllevando a un mal funcionamiento en la contracción del músculo cardíaco ya que se vincula al aparato contráctil, los discos intercalares, el núcleo y otros orgánulos celulares (Goldfarb & Dalakas, 2009). Pudiendo también provocar deficiencia en la propagación correcta de la actividad de la contracción y conducción de señales eléctricas entre las células del músculo cardíaco (Panagopoulou y col. 2008). Nosotros encontramos que la expresión de la desmina en el grupo HG mostraba un patrón difuso (figura 10), en algunos especímenes del grupo NT fueron distinguibles incipientes discos intercalares por inmunofluorescencia, nunca se observaron en especímenes del grupo HG. Respecto

a la DOF y expresión relativa de la desmina en el grupo HG se encontró disminuida respecto al grupo NT.

X. CONCLUSIONES

El desarrollo embrionario bajo un ambiente hiperglucémico afectó la morfología y la histología de las paredes ventriculares del corazón, además en el grupo hiperglucémico se vio afectado al alza el patrón de expresión del miRNA-223 y de las proteínas sarcoméricas TNNI3K y cTnl; y a la baja la expresión de desmina, lo cual podría tener repercusiones en la función cardíaca a mediano o largo plazo.

Una vez concluida la investigación podemos decir que los efectos a los que conlleva la hiperglucemia durante el desarrollo embrionario, pueden abrir más puertas a nuevos estudios de investigación del efecto del ambiente hiperglucémico en la progenie, tanto a corto, como largo plazo. Esto contribuye a la sociedad debido a que existen muchos factores en un ambiente intrauterino hiperglucémico que aumentan los riesgos de contraer enfermedades cardiovasculares a cualquier etapa de la vida. Tomando en cuenta que la población actual con diabetes es tan grande y entre ellos, madres diabéticas, estamos aportando nueva información que podría ayudar concientizar de todos los riesgos que conlleva el desarrollo embrionario bajo un ambiente hiperglucémico y propensión a desarrollar enfermedades cardiovasculares.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- ADA. (2017). Standards of Medical Care in Diabetes. American Diabetes Association. USA: Journal of diabetes.
- Anderson, R., & Becker, A. (1980). Cardiac Anatomy. An Integrated. Text and Colour Atlas. Cardio. Edit. Doyma, Barcelona, 10.1-10.30. 8.
- Baño, R. M., Quero, J. M., & Antúnez, J. M. (1986). Anatomía cardiaca. *Cardiología Pediátrica*, 4, 32-56.
- Bazoukis, G., Letsas, K. P., Xia, Y., Tse, G., & Li, K. (2018). A novel desmin mutation causing severe left ventricular arrhythmogenic cardiomyopathy/dysplasia. *Journal of thoracic disease*, 10(26), S3100-S3110.
- Blausen, S. (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". *W. Journal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436.
- Brand, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental Biology*, 258, 1-19.
- Cornelis, M. C., Rimm, E. B., Curhan, G. C., Kraft, P., Hunter, D. J., Hu, F. B., & van Dam, R. M. (2013). Obesity susceptibility loci and uncontrolled eating, emotional eating and cognitive restraint behaviors in men and women. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 22(5), E135-41.
- Davey, M., & Tickle, C. (2007). The chicken as a model for embryonic development. *Cytogenet Genome Res*, 117, 231-239.

- DeSisto, C., Kim, S., & Sharma, A. (2014). Prevalence Estimates of Gestational Diabetes Mellitus in the United States, Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (PRAMS), 2007–2010. *Prev Chronic Dis*, 11(13).
- Díaz, H., & Burgos, H. (2002). Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular. *Rev. IATREIA*, 15(3), 180-187.
- Dervisoglu, P. Kosecik, M & Kumbasar, S. (2018) Effects of gestational and pregestational diabetes mellitus on the foetal heart: a cross-sectional study, *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 38:3, 408-412, DOI: 10.1080/01443615.2017.1410536
- Dowling D, Corrigan N, Horgan S, Watson CJ, Baugh J, Downey P y McAuliffe FM. Cardiomyopathy in offspring of pregestational diabetic mouse pregnancy. *Diabetes J research* 2014, 2004:624939.
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., & Charron, P. (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.*, 29, 270–276.
- Engelmann, L., & Boehm, D. (1992). Transforming growth factor-beta in heart development. *Mechanisms of development*,(38), 85-98.
- García, B., Díaz-Buschmann, I., Jurado, J., García, R., Parra, J., Medina, A. S., & Escribano, J. (1998). Valor de la troponina I cardíaca como prueba diagnóstica en el estudio del dolor torácico. *Rev Esp Cardiol.*, 51(2), 122-128.

- Goldfarb, L., & Dalakas, M. (2009). Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(7), 18067-1813.
- Guyton, J. y Hall, E. (2011). Tratado de fisiología médica. En J. E. Hall, *Tratado de fisiología médica* (pág. 1112). Elsevier Health Sciences.
- Ham, A. (1967). *Tratado de Histología*. México: Interamericana.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.*, 195, 231-272.
- Harrison. (2006). *Harrison Principios de Medicina Interna* ((16 ed.). ed.). McGraw-Hill.
- Hatsugai, N., & Hara-Nishimura, I. (2010). Two vacuole-mediated defense strategies in plants. *Plant signaling & behavior*, 5(12), 1568-1570.
- Herrera, E., Palacin, M., Martín, A., & Lasuncion, M. (1985). Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes*, 34(2), 42-46.
- Johnston JR, Chase PB y Pinto JR. Troponin through the looking-glass: emerging roles beyond regulation of striated muscle contraction. *Oncotarget* 2018; 9(1) 1461- 1482.
- Icardo, J., & Fernandez-Terán, A. (1987). Morphologic Study of Ventricular Trabeculation in the Embryonic Chick Heart. *Acta Anatomica* , 130 , 264–274.
- IDF, Ogurtsova, K. d., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N., & Makaroff, L. (2017). *Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015*

and 2040. International Diabetes Federation. Diabetes research and clinical practice.

- Iessi, I., Bueno, A., Sinzato, Y., Taylor, K., Rudge, M., & Damasceno, D. (2010). Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetology and Metabolic Syndrome.*, 2(21), 37-46.
- Itani, N., Skeffington, K. L., Beck, C., & Giussani, D. (12 de 2016). Sildenafil therapy for fetal cardiovascular dysfunction during hypoxic development: studies in the chick embryo. *Journal Physiology*, 12, 1-11.
- Katherine, E. Y., & Kirby, L. M. (2002). Wherefore Heart Thou? Embryonic Origins of Cardiogenic Mesoderm. *Developmental Dynamics*, 223, 307–320.
- Katta, A., Thulluri, S., Manne, N. D., Addagarla, H. S., Arvapalli, R., Nalabotu, S. K., ... & Blough, E. R. (2013). Overload induced heat shock proteins (HSPs), MAPK and miRNA (miR-1 and miR133a) response in insulin-resistant skeletal muscle. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31(2-3), 219-229.
- Kraker, J., Viswanathan, S. K., Knöll, R., & Sadayappan, O. (2016). Recent Advances in the Molecular Genetics of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Frontiers in Physiology*, 7, 499-511.
- Lagendijk, A., & Goumans, M. (2011). MicroRNA-23 Restricts Cardiac Valve Formation by Inhibiting Has2 and Extracellular Hyaluronic Acid Production. *Circ Res*, 109(649), 657.
- Lakshmiathy, U., Love, B., Goff, L. A., Jörnsten, R., Graichen, R., Hart, R. P., & Chesnut, J. D. (2007). MicroRNA expression pattern of undifferentiated and

differentiated human embryonic stem cells. *Stem cells and development*, 16(6), 1003-16.

- Landstrom, A. P., & Ackerman, M. J. (2012). Beyond the cardiac myofilament: hypertrophic cardiomyopathy- associated mutations in genes that encode calcium-handling proteins. *Current molecular medicine*, 12(5), 507-18.
- Lazzarini, R., Alcántar, O., Jaime, R., García, E., Gutiérrez, M. C., & Gómez, L. E. (2015). Las nanopartículas de oro de 20 nm inhiben la proliferación e invasión de células de carcinoma mamario humano MCF7, in vivo. *Mundo Nano*, 8(15), 96-107.
- Lu, H., Buchan, R., & Cook, S. (2010). MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovascular Research*, 410-420.
- Matough, F., Budin, S., Hamid, Z., Alwahaibi, N., & Mohamed, J. (2012). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 12(1), 5-18.
- NOM, N. O. M. (2010). 015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. *Diario Oficial de la Federación*, 23.
- OMS. (2016). Informe mundial sobre la diabetes. Resumen de Orientación. OMS, World Health Organization.
- Panagopoulou, P., Davos, C. H., Milner, D. J., Varela, E., Cameron, J., Mann, D. L., & Capetanaki, Y. (2008). Desmin mediates TNF-alpha-induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure. *The Journal of cell biology*, 181(5), 761-75.

- Pons, G. (1986). Enfermedades del miocardio. En J. Soler, & A. Bayes, *Cardiología* (pág. 487). Barcelona, España: Doyma.
- Reller, M., & Kaplan, S. (1998). Hypertrophic Cardiomyopathy in Infants of Diabetic Mothers: An Update. *American Journal of Perinatology*, 1.
- Salazar-García, M., Reyes, E., Revilla, M., Villavicencio-Guzmán, L., Reyes, A., & Sánchez-Gómez, C. (2015). Importance of Maternal Diabetes on the Chronological Deregulation of the Intrauterine Development: An Experimental Study in Rat. *Journal of Diabetes Research*, 10, 1-10.
- Salazar, M., Sánchez-Gómez, C., Contreras, A., Carrillo, B., & Revilla, C. (octubre de 2006). Los segmentos cardiacos primitivos su implicacion en la cardiogenesis normal aplicada a la cardiologia pediatria. *Archivos Mexicanos de Cardiología*, 76(5), 46-51.
- Sedmera, D., & Thompson, R. (2011). Myocyte Proliferation in the Developing Heart. *Developmental Dynamics* (240), 1322-1334.
- Silberman, R. P. S. (2006) *Métodos físico-químicos en Biotecnología*, 2 edición, IBT-UNAM pp 23-35.
- Singh, P., Bali, A., Singh, N., & Singh, A. (2014). Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* , 18(1), 1-14.
- Takaya, T., & Ono, K. (2009). MicroRNA-1 and microRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circulation Journal*, 73, 1492–1497.

- Tkáč, I. (2013). Cardiovascular importance of hyperglycemia and hypoglycemia. *Diabetes care*, 36 (Supplement 2), S267-S271.
- Tang, H., Xiao, K., Mao, L., Rockman, H., & Marchuk, D. (2013). Overexpression of TNNI3K, a cardiac specific MAPKKK, promotes cardiac dysfunction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52, 101-111.
- Vagnozzi RJ, Gatto GJ, Jr, Kallander LS, Hoffman NE, Mallilankaraman K, Ballard VL, et al. Inhibition of the cardiomyocyte-specific kinase tnni3k limits oxidative stress, injury, and adverse remodeling in the ischemic heart. *Sci Transl Med.* (2013), 5:207 141.
- Vidigal, J., & Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lesson from in vivo studies. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 137-147.
- Wang, H., Wang, L., Song, L., Zhang, Y. J., Xu, R., & Meng, X. (2013). TNNI3K is a novel mediator of myofilament function and phosphorylates cardiac troponin I. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(2), 128-137.
- Wang, L., Wang, H., Ye, J., Xu, R., Song, L., Shi, N. Meng, X. (2011). Adenovirus-mediated overexpression of cardiac troponin I-interacting kinase promotes cardiomyocyte hypertrophy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 38, 278-284.
- Wang, X., Wang, J., Su, M., Wang, C., & Chen, J. (2013). TNNI3K, a Cardiac-Specific Kinase, Promotes Physiological Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice. *PLOS ONE* 8(3): e58570, 8(3), e58570.

- Wang, Y. S., Zhou, J., Hong, K., Cheng, X., & Li, Y. (March de 2015). MicroRNA-223 Displays a Protective Role Against Cardiomyocyte Hypertrophy by Targeting Cardiac Troponin I-Interacting Kinase. *Cell Physiol Biochem*, 35(4), 1546-1556.
- Wheeler FC, Tang H, Marks OA, Hadnott TN, Chu PL, Mao L, et al. Tnni3k modifies disease progression in murine models of cardiomyopathy. *PLoS Genet*. 2009;5: e1000647.
- Wender, E., Koslik, J., Biczysko, R., & Ozegowsky, S. (2004). Changes of oxidative stress parameters in diabetic pregnancy. *Free Radic Res.*, 38(8), 795-803.
- Wentzel, P., Gäreskog, M., & Eriksson, U. (2005). Folic acid supplementation diminishes diabetes- and glucose-induced dysmorphogenesis in rat embryos in vivo and in vitro. *Diabetes*, 54, 546-553.
- Wittig, J., & Münsterberg, A. (2016). The Early Stages of Heart Development: Insights. *Journal of cardiovascular Develoapment Disease*, 3(12), 1-15.
- Xua, H., Wang, X., Du, Z., & Li, N. (2006). Identification of microRNAs from different tissues of chicken embryo and adult chicken. *FEBS Letters*, 580(15), 3610–3616.
- Zhang, G., Gurtu, V., & Kain, S. (Oct de 1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 227(3), 707-711.
- Zhao, Z., & Reece, A. (2013). New concepts in diabetic embryopathy. *Lab Med. Clin*, 33(2), 207-223.

- Zhao, J., Bradfield, J. P., Zhang, H., Sleiman, P. M., Kim, C. E., Glessner, J. T., & Chiavacci, R. M. (2011). Role of BMI-associated loci identified in GWAS meta-analyses in the context of common childhood obesity in European Americans. *Obesity*, 19(12), 2436-2439.
- Zhu, H., & Leung, S. W. (2015). Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis of controlled profiling studies. *Diabetology*. 58 (5), 900-911.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Tinción Hematoxilina-Eosina

- a) Des-parafinado. Los tejidos se colocaron en estufa para histología antes descrita a 60°C por 3 horas, a fin de eliminar el exceso de paraplasto. Una vez transcurrido el tiempo, los tejidos fueron sumergidos en 3 cambios de Xilol por 5 minutos c/u.
- b) Hidratación. Los tejidos fueron sumergidos en series graduales de alcohol por 5 minutos desde 100 hasta 30% y finalmente en agua bidestilada.
- c) Tinción Hematoxilina. Los tejidos fueron bañados por 3 minutos con Hematoxilina de Harris, el exceso de colorante fue lavado con agua destilada por 3 minutos. Se pasaron en un cambio rápido en solución de alcohol al 70% con 5 gotas de HCL, después con agua:amoniac (1:1000) por 3 minutos.
- d) Tinción Eosina. A fin de contrastar el núcleo celular los tejidos fueron sumergidos por 1 minuto en Eosina. Posteriormente los cortes fueron deshidratados rápidamente con alcohol al 96% y dos más de alcohol 100%.
- e) Montaje. Los tejidos se pasan por Xilol e inmediatamente fueron montados en resina Entellan New®.

XIII. EVENTOS ACADÉMICOS DURANTE LA MAESTRÍA

- (2018) Teorico-Práctico Single-Cell RNA. Del Simposio de EpigenOMiCa: El establecimiento de Single- Cell RNA-seq en México. Hospital Infantil de México Federico Gómez.
- (2017) Teorico-Práctico. “Curso avanzado de tecnología de microarreglo de tejidos y patología digital para la búsqueda de biomarcadores en cáncer: Aplicación en investigación y asistencia.” Hospital Infantil de México, Federico Gómez – Facultad de Medicina, UNAM.

CONGRESOS DURANTE LA MAESTRÍA

- (2018) Noviembre IV Congreso Nacional de La Asociación Mexicana de Investigadores de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, AMIINSAHE. “La importancia del miR-223 en el desarrollo del miocardio ventricular en condiciones de hiperglucemia” Modalidad Oral (Primer Autor)
- (2018) Septiembre V Congreso Iberoamericano de Histología, XXXIX Congreso Nacional de Histología. Universidad Autónoma Metropolitana, “Importancia del miRNA-223 en el desarrollo del miocardio ventricular del corazón en condiciones de hiperglucemia” Modalidad Oral (Primer Autor).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00201

Matrícula: 2162802044

Análisis del efecto de la hiperglucemia embrionaria en el desarrollo del miocardio ventricular y expresión de moléculas marcadoras de daño al miocardio.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 9 del mes de enero del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR
DR. FRANCISCO JESUS ARENAS HUERTERO
DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN
DRA. MARCELA SALAZAR GARCIA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaría la Última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: RICARDO JAIME CRUZ

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

APROBAR

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



RICARDO JAIME CRUZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DR. FRANCISCO JESUS ARENAS HUERTERO

VOCAL

DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN

SECRETARIA

DRA. MARCELA SALAZAR GARCIA