

El efecto embrioprotector de la glicina en un modelo de embriopatía diabética es mediado por mejoría en el estrés oxidativo

Embryoprotective effect of glycine in a rat model of diabetic embryopathy is due to amelioration of oxidative stress

Rivas-Ramírez, A.L.¹, Chirino-Galindo, G.¹ , Rivas-Farias, A.², Palomar-Morales, M.^{1*} 

¹ Laboratorio de metabolismo de la diabetes mellitus, Unidad de Morfofisiología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Avenida de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla de Baz, 54090, Estado de México, México.

² Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Edificio de Inmunología, segundo piso, Unidad Profesional "Lázaro Cárdenas", Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio esquina Plan de Ayala s/n, Santo Tomás, Miguel Hidalgo, 11340, Ciudad de México, México.



Please cite this article as/Como citar este artículo:

Rivas-Ramírez A.L., Chirino-Galindo G., Rivas-Farias A., Palomar-Morales M. (2025). Embryoprotective effect of glycine in a rat model of diabetic embryopathy is due to amelioration of oxidative stress. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1730. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1730>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 10th 2024.

Accepted/Aceptado: December 20th 2024.

Available on line/Publicado: January 07th 2025.

RESUMEN

La coexistencia de gestación y la diabetes mellitus resulta en malformaciones mayores incompatibles con la vida, retraso de desarrollo, pérdida de gestación, o muerte materno-fetal. El tratamiento con glicina revierte los efectos nocivos de la glucosa, en pacientes y en modelos animales; así como los cambios metabólicos y bioquímicos causados por la diabetes mellitus/hiperglucemia. Sin embargo, no se ha investigado el efecto sobre el embarazo diabético, por lo que se realizó este trabajo. Se tuvieron ratas preñadas que se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos: control, glicina, diabéticos, diabéticos más glicina. Los sujetos se eutanzaron el día 19 de gestación, se obtuvieron los fetos, así como hígado, riñón y suero sanguíneo materno. Los fetos se evaluaron para detectar malformaciones, tanto gruesas como internas; secciones de hígado, riñón y cerebro fetal se analizaron histológicamente. El suero materno se procesó para determinar glucosa, colesterol y triglicéridos; en el hígado fetal se determinaron las actividades de las enzimas depuradoras de radicales libres y la lipoperoxidación. La administración de glicina mejora el desarrollo fetal, y los parámetros bioquímico-clínicos, y en ratas sanas, no afecta éstos parámetros ni el desarrollo fetal. La glucosa en exceso puede causar estrés oxidativo, que es revertido parcialmente por la glicina, lo que mejora el desarrollo fetal alterado por la hiperglucemia, sin embargo, la glicina administrada a ratas sanas produce un bajo porcentaje de malformaciones, resultado que no es fácil de explicar.

PALABRAS CLAVE: Glicina, embriopatía diabética, embrioprotección, estrés oxidativo, teratogénesis.

***Corresponding Author:**

Martín Palomar Morales, Laboratorio de metabolismo de la diabetes mellitus, Unidad de Morfofisiología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Avenida de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla de Baz, 54090, Estado de México, México.

ABSTRACT

The coexistence of pregnancy and diabetes mellitus results in major malformations incompatible with life, developmental delay, pregnancy loss, or maternal-fetal death. Treatment with glycine reverses the harmful effects of glucose, in patients and animal models; as well as the metabolic and biochemical changes caused by diabetes mellitus/hyperglycemia. However, the effect on diabetic pregnancy has not been investigated, so this study was designed. Pregnant rats were randomly assigned to four groups: control, glycine, diabetic, diabetic plus glycine. The subjects were euthanized on day 19 of gestation; fetuses were obtained, as well as liver, kidney, and maternal blood serum. The fetuses were evaluated for malformations, both gross and internal; sections of the fetal liver, kidney, and brain were subjected to histological analysis. Maternal serum was processed to determine glucose, cholesterol, and triglycerides; In the fetal liver, the activities of scavenging enzymes and lipoperoxidation were determined. The administration of glycine improves fetal development and biochemical-clinical parameters, but in healthy rats, it does not affect these parameters or fetal development. Excess glucose can cause oxidative stress, which is partially reversed by glycine, which enhances fetal development impaired by hyperglycemia; however, glycine administration to healthy rats produces a low percentage of malformations, a result hard to explain.

KEY WORDS: Glycine, diabetic embryopathy, embryoprotection, oxidative stress, teratogenesis.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un padecimiento crónico, causado por la producción reducida o ausente de la insulina, o resistencia de los órganos periféricos a esta hormona. Esta enfermedad es de etiología variada, lo que la convierte un problema de salud público, y en las últimas décadas, el número de casos y la prevalencia se han incrementado drásticamente. La principal manifestación de la DM es la hiperglucemia sostenida, aunque algunos otros parámetros clínicos y metabólicos se encuentran también afectados en la DM. Las complicaciones a largo plazo incluyen cardiopatía, nefropatía, neuropatía, retinopatía y vasculopatía diabéticas. El daño que la DM pregestacional o franca causa al embrión fue definido por Baker & Piddington (1993) como “embriopatía diabética”, y es diferente de los daños que causa la diabetes gestacional (GDM).

A nivel mundial, aproximadamente 60 millones de mujeres en edad reproductiva tienen DM, y para el año 2030, este número podría subir al doble (Centers for Disease Control and Prevention, 2008). La DM es de los padecimientos más comunes, tanto en el primer mundo, como en países en vías de desarrollo. La frecuencia global de neonatos de madres diabéticas se ha incrementado de 3.1 por mil neonatos vivos en 1998 a 4.7 en 2004. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, cerca de 6 % de los neonatos (8 millones) anualmente, muestran defectos congénitos al nacer. Se ha demostrado una relación entre la diabetes pregestacional y los defectos congénitos. La Secretaría de Salud de México ha publicado la Guía de Práctica Clínica (2009), en la que reconoce que la DM pregestacional es un factor en la aparición de malformaciones neonatales, y se propone reducirla como parte de sus metas.

Se ha descrito que el principal teratógeno de la DM es la glucosa a niveles no fisiológicos, y el mecanismo molecular parece ser el incremento del estrés oxidativo. Este es un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes fisiológicos (enzimas depuradoras, vitaminas, cofactores, etc.). Las especies reactivas de oxígeno en exceso pueden dañar las biomoléculas, incluyendo proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos. Estas moléculas reactivas pueden ser producidas por varios mecanismos moleculares, siendo el radical hidroxilo la molécula con la mayor capacidad de producir daño celular (Eriksson & Wenzel, 2015).

En apoyo a la idea que la embriopatía diabética está mediada por estrés oxidativo, se ha demostrado que los antioxidantes como las vitaminas C y E solas o en combinación (Cederberg *et al.*, 2001), el ácido lipoico (Al-Ghaffli *et al.*, 2004), el resveratrol (Singh *et al.*, 2011), la N-acetil cisteína (Wenzel *et al.*, 2003), y las poliaminas (Méndez & Palomar-Morales, 1999) pueden mejorar, prevenir o proteger al embrión en desarrollo de los efectos nocivos de la DM/hiperglucemia. Por el otro lado, los estudios pioneros del grupo de Carvajal-Sandoval demostraron que el tratamiento con glicina mejora el pronóstico de pacientes diabéticos, y de ratas macho con diabetes inducida químicamente (Carvajal-Sandoval *et al.*, 1995; 1999 a,b; 2007; Alvarado-Vazquez *et al.*, 2003, 2006). También se ha demostrado que la glicina reduce la teratogenicidad del ácido *all-trans* retinoico en un modelo de rata in vivo (Martínez-Angoa *et al.*, 2006), y la glicina previene las malformaciones inducidas por glucosa en embrión de ratón in vitro (Martínez-Galero *et al.*, 2008). Por estas razones, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la glicina en un modelo de rata de embriopatía diabética, y la posible participación de la mejoría del estrés oxidativo en el efecto embrioprotector.

Material y Métodos

Tratamientos

Se tuvieron 25 ratas *Wistar* hembra sanas, de 10-12 semanas de edad, con peso de 220-250 g, proporcionadas por el bioterio de la FES, donde fueron mantenidas, en condiciones controladas de ciclo luz:oscuridad, temperatura y humedad, con acceso ad libitum a alimento (pellets Enviro S2018) y agua purificada. Los procedimientos realizados siguieron la NOM-062-ZOO-1999, con aval del Comité de Bioterio. Las hembras fueron apareadas con machos sanos,

fértiles, de la misma cepa, por el método de trío, toda la noche, y la mañana siguiente se tomó un frotis vaginal para visualizarlo en un microscopio de luz Leica DM500. Se asignó el día cero cuando los espermatozoides fueron observados. Las ratas preñadas se asignaron al azar a cuatro grupos de cinco a siete individuos (control, diabéticas, glicina, diabéticas más glicina). Los sujetos de los grupos “diabéticas” y “diabéticas más glicina” fueron inyectados intraperitonealmente en la mañana del día 4 de gestación con estreptozotocina (STZ) (Sigma Aldrich Chemical Co.) a dosis de 50 mg/Kg de peso, disuelta en un pequeño volumen de amortiguador de citratos 100 mM pH 3.5; mientras que los grupos “control” y “glicina” se inyectaron con un volumen similar del mismo amortiguador. Los grupos control y diabéticas permanecieron con acceso libre al agua potable, pero los dos grupos tratados con glicina fueron administrados con este aminoácido grado alimenticio al 2 % en agua potable (Martínez-Angoa *et al.*, 2006; Paniagua-Castro *et al.*, 2006), los días 4 a 18 de gestación. La solución de glicina se reemplazó cada dos días para evitar contaminación.

Este esquema de inducción diabética se escogió ya que la administración de STZ antes del apareamiento evita éste en las ratas de la colonia en nuestra institución (Chirino-Galindo *et al.*, 2021), un hallazgo previamente reportado también por otro grupo independiente (Al-Ghaffli *et al.*, 2004). Por esta razón, se estableció un modelo de DM inducida por STZ en etapa pre-implantacional, ya que se sabe que la STZ causa hiperglucemia, glucosuria y fetos pequeños (Golob *et al.*, 1970; Sybulsky & Maughan, 1971). Adicionalmente, la vida media del agente es muy corta (Rodrigues *et al.*, 1999), por lo que las alteraciones del desarrollo y reabsorciones pueden ser atribuidas principalmente a la DM y no a la toxicidad de la STZ.

Obtención de muestras

En la mañana del día 19 de gestación, las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular de pentobarbital sódico, a dosis de 60 mg/Kg de peso, y la sangre se obtuvo por punción cardíaca con una jeringa hipodérmica. Las ratas fueron entonces eutanizadas por dislocación cervical, y se obtuvo el útero por laparotomía. Los riñones y una fracción del hígado se colectaron y fijaron en formalina. Cerca de la tercera parte del hígado se homogenizó en solución salina y se congeló hasta el momento de uso.

Análisis de suero

La sangre obtenida se centrifugó a 3000 rpm por 5 a 7 min, y se recuperó el suero, que se colectó en viales tipo Eppendorf de 2.0 mL, para almacenarse a -20 °C hasta su uso. La glucosa, el colesterol y los triglicéridos se midieron con ayuda de estuches comerciales (Spinreact REF14101, EliTech CHSL-5505 y EliTech TGML-5414, respectivamente), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se intentó también evaluar la concentración de hemoglobina glicosilada en sangre materna, con el estuche BioSystems 11044. Los cambios de color fueron monitoreados en un espectrofotómetro ultravioleta/visible Jenway 6305 para glucosa o hemoglobina glicosilada, o en un lector de microplacas Sunrise Tecan, para colesterol y triglicéridos.

Análisis fetal

Los úteros se cortaron de manera longitudinal con tijeras de cirugía, se obtuvieron los fetos y contaron. Todo el procedimiento fue llevado a cabo en frío. Los fetos se midieron con una regleta Vernier, se pesaron en una balanza semi analítica digital, y se fijaron en fluido de Bouin, durante 48 horas. Al finalizar este tiempo, se removió el fluido, se enjuagaron con agua corriente los fetos, y se sumergieron en alcohol al 70 %, para ser analizados por la técnica de Wilson modificada por Barrow & Taylor (1969). Las secciones morfológicas se visualizaron en un microscopio estereoscópico Leica MZ6, y posteriormente, de las secciones morfológicas, se obtuvieron el hígado, cerebro y riñón materno, y se sometieron a análisis histológico. En algunos casos, se obtuvo una pequeña parte del hígado antes de la fijación en Bouin, y se homogenizó en solución salina.

Actividad de enzimas depuradoras

Los extractos crudos de hígado materno o fetal se centrifugaron a baja velocidad para eliminar los residuos celulares. En el sobrenadante se midieron la actividad de las enzimas antioxidantes y la lipoperoxidación. La actividad de catalasa se determinó por el decremento de absorbancia a 240 nm, debido a la conversión de peróxido de hidrógeno en agua (Aebi, 1984). La glutatión peroxidasa (GPx) se monitoreó siguiendo el incremento en absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADPH (Paglia & Valentine, 1967). La actividad de glutatión S-transferasa (GST) se mide por aparición del conjugado glutatión-DNCP, que causa incremento en absorbancia a 340 nm (Tsuchida, 1999). La superóxido dismutasa fue estimada en base a la inhibición de la transferencia de electrones desde el NBT a la xantina, catalizada por la xantina oxidasa, y medida a 560 nm (Beauchamp & Fridovich, 1971). La lipoperoxidación fue determinada por la reacción de los lipoperoxidos con ácido tiobarbitúrico, y el uso de malondialdehído como estándar (Ohkawa *et al.*, 1979). La actividad enzimática fue normalizada por contenido de proteínas, que se midieron por el método de Lowry *et al.* (1951). En todos los casos, el cambio en absorbancia se determinó en un espectrofotómetro ultravioleta/visible Jenway 6305.

Análisis histológico

Las muestras fijadas de tejidos maternos y fetales se removieron del fijador (formalina o fluido de Bouin), y se enjuagaron en agua corriente, se deshidrataron en soluciones de alcohol en orden creciente, se aclararon en alcohol amílico, se embebieron en parafina grado histológico y se incluyeron. Los bloques fueron cortados a 5 μ m en un microtomo Leica RM2125RTS. Las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, y se tiñeron por la técnica de rutina de H y E. Las secciones de cerebro fetal se tiñeron con la técnica de ácido periódico-Schiff (PAS). Las secciones teñidas se visualizaron al microscopio óptico, se tomaron microfotografías con una cámara Leica EC3, y se analizaron con el software Leica LAS EZ.

Análisis estadístico

Los niveles séricos de glucosa, colesterol y triglicéridos, así como el tamaño de camada, peso y longitud fetal, se interpretaron por ANOVA bifactorial, a nivel de confianza de 0.05, en el programa Statistica V10 Enterprise®. El porcentaje de malformaciones o reabsorciones se calculó en base a la camada, y se analizó por chi-cuadrada. Para la elaboración de figuras y en la tabla, se utiliza el error estándar de la media (SEM).

Resultados y Discusión

Los valores de glucosa, colesterol y triglicéridos observados en ratas normales gestantes, sanas, fueron similares a los valores reportados para la especie, un hallazgo que indica que el tratamiento con amortiguador no afecta el metabolismo. Por el otro lado, para las ratas tratadas con STZ, los valores fueron altos, consistentes con los efectos del diabético. El tratamiento con glicina en ratas preñadas sanas no afecta los parámetros bioquímico-clínicos: la concentración de glucosa en suero fue mayor en esos sujetos que en las ratas control, pero la diferencia no es significativa. Es notable que el tratamiento con glicina a las ratas con diabetes inducida se acompañó por decremento en los parámetros séricos, pero el nivel de glucosa no alcanza los normales (Figura 1). Los resultados son consistentes con lo reportado por Alvarado-Vásquez *et al.* (2003). La hemoglobina glicosilada mostró niveles muy bajos en todos los casos, y no se detectaron diferencias significativas entre grupos, por lo que no se reporta este resultado.

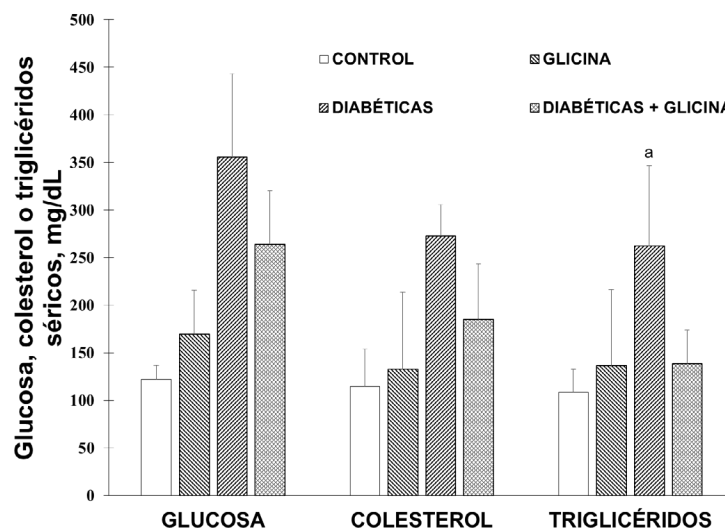


Figura 1. Parámetros séricos en ratas diabéticas tratadas con glicina.

La glucosa, el colesterol y los triglicéridos fueron determinados en suero de ratas diabéticas o sanas, con o sin tratamiento con glicina. Promedio \pm SEM de 5-7 determinaciones independientes. ^a $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

La administración de glicina a ratas normales no afecta la fertilidad o el tamaño de camada, ya que el tamaño de camada es similar entre los dos grupos de ratas sanas. La inducción a diabetes se ve acompañada por el decremento, no significativo, del tamaño de camada, con respecto al grupo control. Adicionalmente, el tratamiento de las ratas preñadas con glicina reduce el porcentaje de reabsorciones, sin alcanzar los valores normales. De manera sorprendente, la glicina, administrada a ratas sanas, produce un pequeño porcentaje de malformaciones (Tabla 1).

Buchanan & Kitzmiller (1994) han reportado que, en humanos y animales experimentales, la diabetes o hiperglucemia pregestacional causan retraso de desarrollo y bajo peso al nacer. En la especie humana, y en modelos experimentales, también hay pérdida de la gestación por causa de diabetes mellitus pregestacional (Freinkel, 1980; 1985); lo que puede explicar la elevada frecuencia de reabsorciones embrionarias en este trabajo. En las ratas del grupo control, la frecuencia de malformaciones es muy baja, como ha sido reportado para esta especie (Beaudoin, 1980). El peso y tamaño de los fetos del grupo diabéticas + glicina es muy cercano al control, lo que indica que probablemente la glicina restaura el efecto de la diabetes sobre el retraso de desarrollo. En un estudio previo, el tratamiento con glicina reduce el efecto nocivo del cadmio sobre el tamaño y peso fetal, así como el porcentaje de reabsorciones en ratona (Paniagua-Castro *et al.*, 2006). Sin embargo, la frecuencia de malformaciones, aunque más baja que en las ratas diabéticas, fue mayor que en las del grupo control.

Tabla 1. Parametros reproductivos y fetales en ratas diabéticas tratadas con glicina

	Control	Glicina	Diabéticas	Diabéticas mas glicina
Tamaño de camada (n)	12.00 ± 1.22 (5)	11.60 ± 0.60 (5)	9.83 ± 0.70 (6)	11.57 ± 1.90 (7)
Porcentaje de reabsorciones (camadas afectadas)	1.19 ± 0.53 (1)	9.08 ± 2.16 ^{ab} (3)	27.80 ± 5.39 ^a (3)	14.02 ± 4.35 ^{ab} (3)
Tamaño fetal	2.96 ± 0.04	2.86 ± 0.02 ^a	2.63 ± 0.05 ^a	2.86 ± 0.03 ^{ab}
Peso fetal	2.80 ± 0.11	2.74 ± 0.03	2.10 ± 0.07 ^a	2.52 ± 0.05 ^{ab}
Porcentaje de malformaciones (camadas afectadas)	0.0 (0)	3.54 ± 2.20 ^{ab} (2)	9.79 ± 5.7 ^a (3)	4.08 ± 1.83 ^{ab} (3)

Los valores son el promedio ± error estándar de la media (n = 5 a 7 camadas), y el porcentaje de reabsorciones y malformaciones de todos los fetos obtenidos (58-80), y el tamaño (cm) o peso (g) fetal. El porcentaje de reabsorciones y malformaciones se calcularon en base al tamaño de camada. ^ap < 0.05 con respecto al grupo control; ^bp < 0.05 con respecto al grupo diabético.

Los fetos de las ratas del grupo control no presentan malformaciones; en contraste, la inducción con STZ produce un elevado porcentaje de malformaciones, como ha sido reportado

por nuestro grupo y otros (Cederberg *et al.*, 2001; Al-Ghafli *et al.*, 2004; Wentzel & Eriksson, 2005; Wentzel *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011). Las malformaciones encontradas en ratas con diabetes inducida químicamente fueron principalmente exencefalia, hidramnios y lengua con protrusión. Las dos primeras se detectaron visualmente en fetos enteros, pero otras malformaciones, aunque generalizadas, solo se detectaron cuando se realizaron cortes morfológicos de los fetos, con la técnica de Wilson modificada. Por otra parte, el tratamiento con glicina a ratas con DM inducida químicamente revierte parcialmente tanto la frecuencia como la severidad de las malformaciones; las malformaciones encontradas en fetos de estas hembras fueron anasarca, edema local e hidramnios (estos datos no se muestran). Sorpresivamente, como se indicó antes, el tratamiento con glicina en las ratas normales, sanas, se acompañó de un pequeño porcentaje de malformaciones (anasarca y lengua protruida), mayor que lo reportado para esta especie. En la Figura 2, se muestran dos fetos con exencefalia. No hay una explicación sencilla del porqué en ratas normales, sanas, el tratamiento con glicina se ve acompañado por un pequeño porcentaje de malformaciones, en posteriores estudios se tratará de verificar si esta asociación es casual, o si existe alguna explicación biológica. Una posible explicación es que la glicina, como muchas otras moléculas, pueda tener propiedades antioxidantes y prooxidantes, dependiendo del momento metabólico y del esquema de administración; sin embargo, no se encontró evidencia en la literatura que sustente esta propuesta.

Adicionalmente a las malformaciones encontradas en algunos fetos intactos, es notable que el hígado fetal de ratas diabéticas es afectado por esteatosis, y se observan zonas hemorrágicas, al someter los fetos a la técnica de Wilson modificada. Los daños no son encontrados en fetos de madres del grupo control o glicina (Figura 3). La frecuencia y severidad de las malformaciones encontradas en fetos de ratas diabéticas son consistentes con la literatura; y la reducción de las mismas por administración de glicina es apoyada por los resultados obtenidos por Paniagua-Castro *et al.* (2006), quienes reportaron que la administración de glicina revierte la exencefalia provocada por cadmio en fetos de ratón.

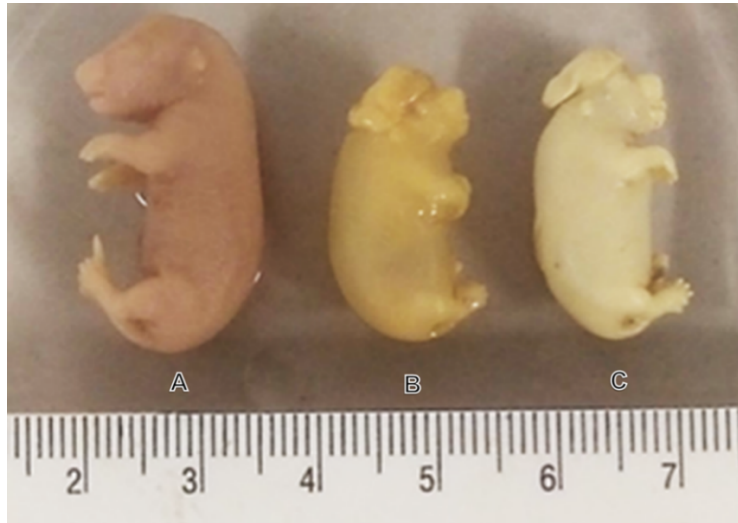


Figura 2. Fetos exencefálicos (B, C) de ratas diabéticas, comparados con fetos de una rata control. Se muestra una regla métrica bajo los fetos, para comparación.

Los efectos benéficos de la glicina han sido revisados y compilados recientemente por Pérez-Torres *et al.* (2017) y Razak *et al.* (2017). Particularmente, la administración con glicina restaura los principales signos y síntomas alterados por la DM en humanos y sujetos experimentales, tales como glicemia, glicación de proteínas, triglicéridos plasmáticos, etc. (Carvajal-Sandoval *et al.*, 1995, 2007; Alvarado-Vásquez *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta donde sabemos no se ha investigado el papel embrioprotector o antiteratógeno de este aminoácido sobre la diabetes experimental, pero los resultados reportados concuerdan con la reversión del daño teratógeno causado por el cadmio (Paniagua-Castro *et al.*, 2006) o ácido all-*trans*-retinoico (Martínez-Angoa *et al.*, 2006), por la glicina.

La administración de glicina a ratas preñadas sanas, normales, no afecta la capacidad reproductiva, ya que el tamaño de camada no es diferente entre los grupos control y glicina. La condición diabética reduce ligeramente el tamaño de camada, aunque este resultado no es diferente estadísticamente con respecto al grupo control (Tabla 1). Adicionalmente, el tratamiento de las hembras diabéticas preñadas con glicina reduce el porcentaje de reabsorciones sin alcanzar el valor control. Sorprendentemente, la glicina produce un pequeño porcentaje de reabsorciones en las ratas sanas normales (Tabla 1).

Los fetos de las ratas sanas, normales, no presentan malformaciones. La diabetes inducida con STZ produce un elevado porcentaje de malformaciones, más severas que las encontradas en las ratas tratadas con glicina. Las malformaciones encontradas en fetos de ratas inducidas a diabetes con STZ fueron exencefalia, lengua protruyente e hidramnios. La exencefalia y el hidramnios se detectan visualmente en los fetos enteros, pero otras malformaciones, aunque

generalizadas, se observan internamente solamente después de emplear la técnica de Wilson modificada. Por otra parte, el tratamiento de ratas inducidas a diabetes con glicina reduce tanto la severidad como la frecuencia de malformaciones; y el tipo de malformaciones encontradas en esas hembras fueron anasarca, edema localizado e hidramnios. Sorprendentemente, el tratamiento con glicina en ratas sanas normales se acompaña por un ligero porcentaje de malformaciones (anasarca y lengua protruyente). En la figura 2, se muestran dos fetos exencefálicos.

En secciones de hígado materno, las ratas preñadas del grupo control muestran la estructura normal de la especie: las venas centrolobulillares y los cordones hepáticos son visibles. La inducción diabética se acompaña de una ligera alteración del tejido, mientras que el tratamiento de las ratas diabéticas con glicina parece restaurar la estructura. Aunque en algunas secciones se pueden ver espacios vacíos, puede observarse una mejoría de la estructura hepática. El tratamiento de glicina en ratas normales, sanas, no produce ningún efecto sobre la estructura del hígado (Figura 4). Resultados similares se encontraron en ratones macho, en los que la administración de STZ, además de causar hiperglucemia y alterar el metabolismo lipídico, causó hepatoesteatosis, tumefacción celular y necrosis focal (Flores *et al.*, 2006).

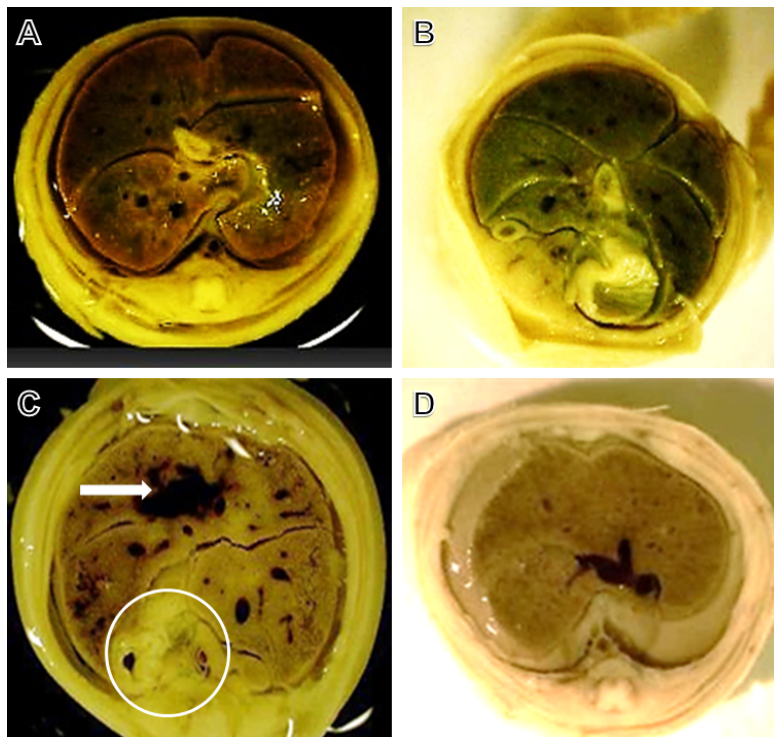


Figura 3. Efecto del tratamiento de ratas diabéticas con glicina sobre el hígado fetal.

A, corte de Wilson de un feto representativo de una rata control, que muestra la apariencia normal del hígado fetal; B: hígado de un feto de una rata sana tratada con glicina; C: hígado de un feto de una rata diabética; D: hígado del feto de una rata diabética tratada con glicina. La flecha muestra un área hemorrágica, y el círculo un depósito grasoso.

Por otra parte, en los riñones maternos del grupo control, los corpúsculos, así como los túbulos distales y proximales, el asa de Henle, y los ductos colectores parecen tener la estructura normal. Al igual que en el hígado, el tratamiento con glicina a las ratas preñadas control no produce ningún cambio visible. La inducción a diabetes con STZ altera profundamente la ultraestructura, ya que se pueden ver los espacios vacíos en cortes de riñón de ratas preñadas tratadas con STZ (Figura 5). Estos hallazgos respaldan lo hallado por Alvarado-Vásquez *et al.* (2003), quienes reportaron daño renal por efecto de la diabetes experimental, y restauración de la estructura normal por efecto de la glicina, en ratas.

Con respecto al corazón, los fetos de los grupos control y glicina muestran la estructura normal del tejido: los núcleos, las fibras musculares, los desmosomas, etc., son de apariencia normal. En los corazones de los fetos del grupo tratado con glicina, se puede observar disminución de las fibras cardíacas en los espacios intersticiales. Del mismo modo que en tejido materno, el tratamiento con glicina en ratas sanas no afecta la estructura, pero el tratamiento a ratas con diabetes mejora notoriamente la condición anormal (Figura 6). Un resultado similar se observa en el cerebro: los cerebros de fetos del grupo control muestran la estructura normal: las células piramidales, las células gliales, los oligodendrocitos en las secciones histológicas son de apariencia normal, y la inducción a diabetes no afecta la infraestructura normal. Igualmente, los fetos de los grupos tratados con glicina, ya sea de madres sanas o diabéticas, semejan lo observado en el cerebro de fetos controles (Figura 7).

Por último, en hígado fetal control, la estructura parece ser normal, al igual que la de hígado de los fetos de los grupos tratados con glicina, de ratas sanas o diabéticas; en contraste, el hígado de los fetos de madres diabéticas muestra desorganización celular y tisular (Figura 8).

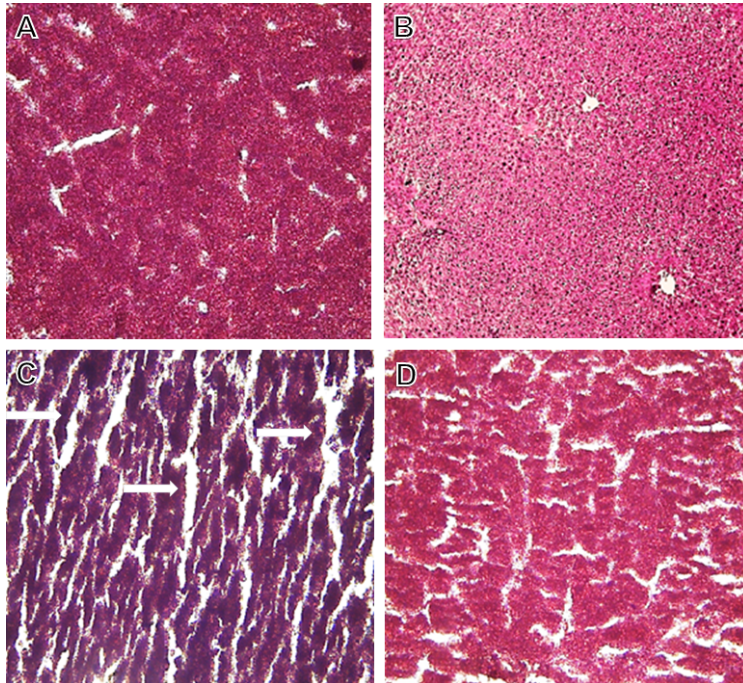


Figura 4. Efecto de la diabetes y la glicina sobre la histología del hígado materno.

A: sección histológica de un hígado de una rata preñada del grupo control; B: sección histológica de un hígado de una rata diabética preñada; C: Sección histológica de un hígado de una rata sana tratada con glicina; D: sección histológica de un hígado de una rata diabética preñada tratada con glicina. Las flechas muestran espacios vacíos.

Además de investigar el efecto de la glicina sobre la estructura histológica de los principales órganos de las ratas preñadas y sus fetos, se quiso investigar si la glicina podía mejorar el estrés oxidativo característico del estado diabético, como se ha reportado (Chen *et al.*, 2018). Las actividades de las enzimas antioxidantes, determinadas en extractos crudos de hígado materno o fetal, tienen respuestas diferentes por la administración de glicina o la inducción diabética. La catalasa no se altera por la administración de glicina, tanto en hígado materno como fetal, pero de manera sorprendente, es indetectable en hígado materno o fetal de los sujetos inducidos a diabetes. Sin embargo, niveles más elevados, aunque no distintos significativamente de los grupos control, se muestran en el grupo diabético tratado con glicina. Sin embargo, altos valores, pero no diferentes estadísticamente del grupo control, se observan en el grupo tratado con glicina (Figura 9A).

La actividad de GPx es más variable: la administración de glicina o STZ causa incremento en los valores obtenidos en hígado materno, con respecto al control, pero en ratas diabéticas el incremento es más acentuado. En hígado fetal de sujetos control, la actividad es muy baja, y la inducción diabética o el tratamiento con glicina produce un aumento significativo, mientras que la

administración del aminoácido a ratas diabéticas causa disminución de la actividad con respecto al grupo diabético, sin llegar a los valores del grupo control (Figura 9B).

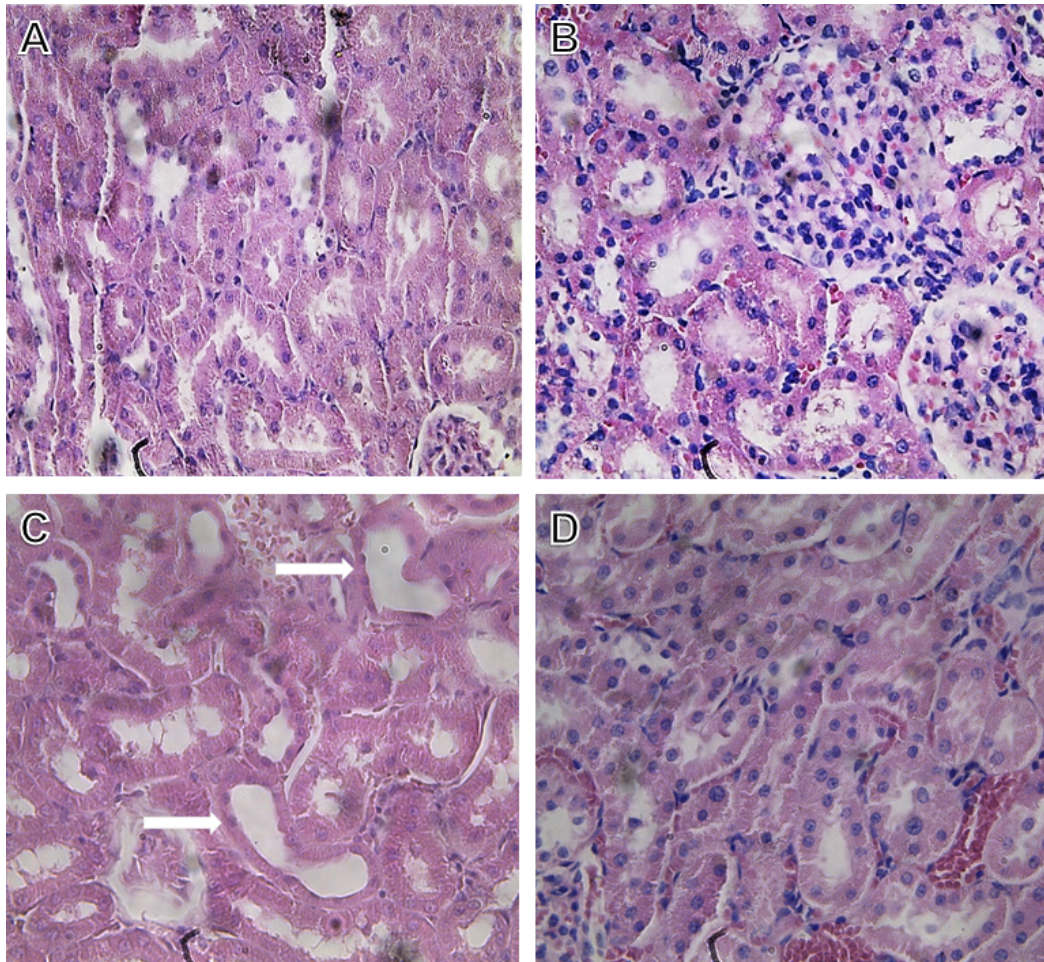


Figura 5. Efecto de la diabetes y la glicina sobre la histología del riñón materno.

A: sección histológica del riñón de una rata preñada del grupo control; B: sección histológica de un riñón de una rata diabética preñada; C: Sección histológica de un riñón de una rata sana tratada con glicina; D: sección histológica del riñón de una rata diabética tratada con glicina. Las flechas muestran espacios vacíos debido a pérdida de nefronas.

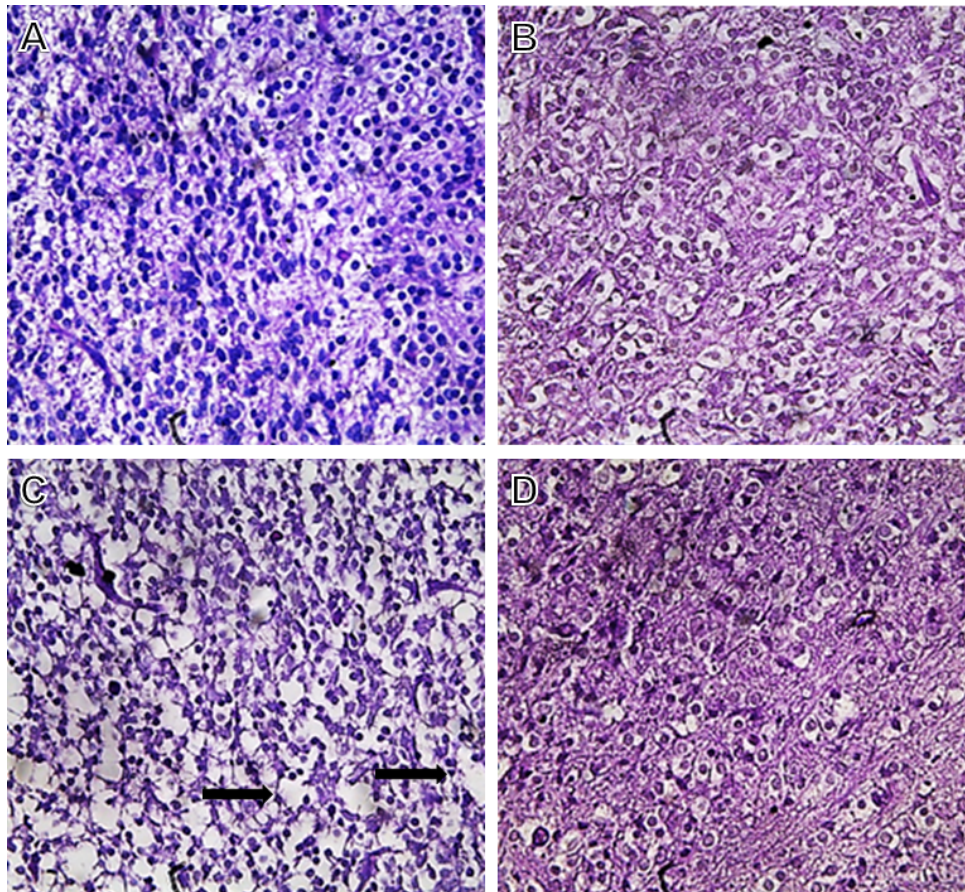


Figura 6. Estructura de corazón fetal por efecto del tratamiento con glicina en ratas diabéticas preñadas.

A: corazón de feto sano; B: corazón fetal del grupo con diabetes; C: corazón de feto de rata preñada sana tratada con glicina; D: corazón de feto de rata diabética preñada tratada con glicina.

Con respecto a la actividad de la GST, ésta es casi indetectable, y la única diferencia encontrada fue entre el grupo diabético y el control, tanto en hígado materno como fetal (Figura 9C).

Igualmente, la actividad de SOD fue muy baja tanto en hígado materno como fetal del grupo control, pero la inducción diabética no altera la actividad; sin embargo, el tratamiento con glicina aumenta de manera significativa la actividad; un resultado similar se observó en las hembras inducidas a diabetes y tratadas con glicina y sus fetos (Figura 9D).

Por último, la lipoperoxidación aumentó en el hígado de ratas diabéticas y sus fetos con respecto al control; similarmente, las ratas sanas tratadas con glicina y sus fetos muestran aumento de lipoperoxidación; la administración de glicina a ratas preñadas diabéticas restaura

la actividad en hígado de las hembras, pero no en los fetos (Figura 10). La glicina revierte el estrés oxidativo y la hepatotoxicidad causada por plomo en ratas (Alcaraz-Contreras, 2011), por lo que es lógico que en este trabajo el tratamiento con glicina revierte la lipoperoxidación causada por la inducción diabética. Los resultados obtenidos, tomados en conjunto, muestran que la DM produce un desequilibrio en las actividades de las enzimas depuradoras de especies reactivas, tanto en hígado materno como en fetal (El-Bassiouni *et al.*, 2005), así como un incremento en la lipoperoxidación (Cederberg *et al.*, 2000, 2001; El-Bassiouni *et al.*, 2005; Kamimoto *et al.*, 2010). El estrés oxidativo puede ser determinado de manera indirecta en plasma materno (Guney *et al.*, 2011), así como en tejidos fetales como corazón (Ejdesjó *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012).

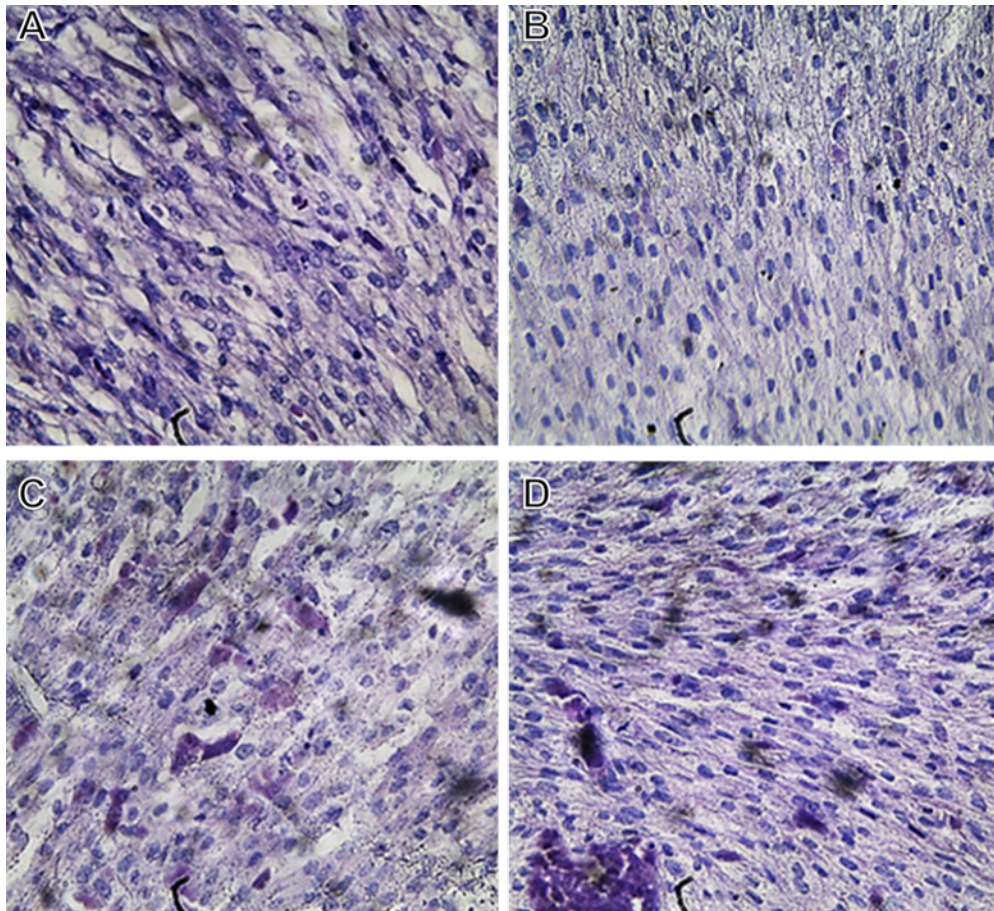


Figura 7. Estructura de cerebro fetal por efecto del tratamiento con glicina en ratas diabéticas preñadas.

A: cerebro de feto sano; B: corazón fetal del grupo con diabetes; C: cerebro de feto de rata preñada sana tratada con glicina; D: cerebro de feto de rata diabética preñada tratada con glicina.

Por otra parte, en los embriones malformados de ratas diabéticas las actividades de las enzimas se alteran (Ornoy *et al.*, 1999; Cederberg *et al.*, 2000; Zaken *et al.*, 2001), mientras que la incubación de embriones postimplantacionales de ratón en medio hiperglucémico produce aumento de la lipoperoxidación y cambio en la actividad de las enzimas antioxidantes (Zaken *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2007). Mediante enfoque de biología molecular, se ha demostrado que la expresión de los genes que codifican catalasa, SOD (y sus isoenzimas) y GPX se alteran en la embriopatía diabética (Cederberg *et al.*, 2000; Zabihi *et al.*, 2007; Wentzel *et al.*, 2008; Ejdesjő *et al.* 2011). La suplementación de la dieta o el medio de cultivo con vitaminas C y E (Cederberg *et al.*, 2000, 2001), resveratrol (Singh *et al.*, 2011), ácido fólico (Zabihi *et al.*, 2007); quercetina (Cao *et al.*, 2016); y curcumina (Wu *et al.*, 2015) previene el estrés oxidativo y la dismorfogénesis. Nuestro grupo de investigación ha reportado que *in vitro*, el ácido alfa-linolénico y el extracto de *Buddleja cordata*, rico en verbascósido, reducen la lipoperoxidación y la dismorfogénesis (Chirino-Galindo *et al.*, 2017, 2021). En este trabajo, se determinaron las actividades de las enzimas antioxidantes se evaluaron directamente en extractos de hígado materno y fetal, ya que Paniagua-Castro *et al.* (2006) previamente reportaron que el tratamiento con glicina, a la misma dosis empleada en este trabajo, previene la lipoperoxidación producida por cadmio en ratonas preñadas; además, la glicina, a dosis de 100 mg/Kg de peso, previene la lipoperoxidación hepática en rata macho tratada con plomo (El-Hafidi *et al.*, 2018).

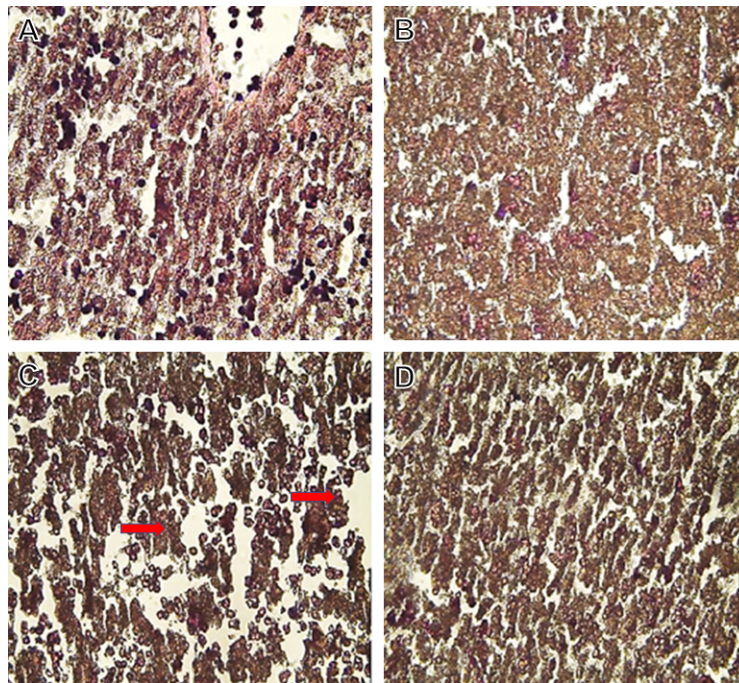


Figura 8. Estructura de hígado fetal por efecto del tratamiento con glicina en ratas diabéticas preñadas.

A: hígado de feto sano; B: hígado fetal del grupo con diabetes; C: hígado de feto de rata preñada sana tratada con glicina; D: hígado de feto de rata diabética preñada tratada con glicina.

Sorpresivamente, la glicina per se induce incremento en la lipoperoxidación hepática materna o fetal; tal vez este aminoácido, al igual que muchos otros antioxidantes, pudiera tener un efecto prooxidante cuando se administra sólo, o pudiera tener un efecto bifásico, como se ha reportado para otras moléculas (Chirino-Galindo *et al.*, 2017).

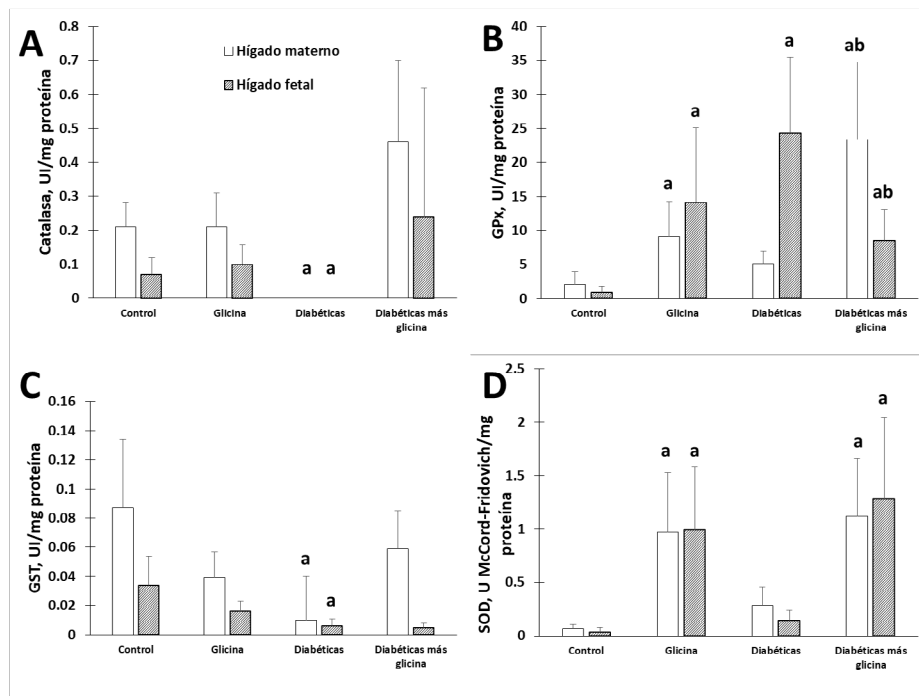


Figura 9. Actividad de enzimas depuradoras en hígado de ratas diabéticas tratadas con glicina y sus fetos.

Promedio \pm EEM de 5–7 determinaciones para hígado materno, o 30–35 en hígado fetal. ^a $p < 0.01$ con respecto al grupo control; ^b $p < 0.01$ con respecto al grupo diabético (ANOVA bifactorial).

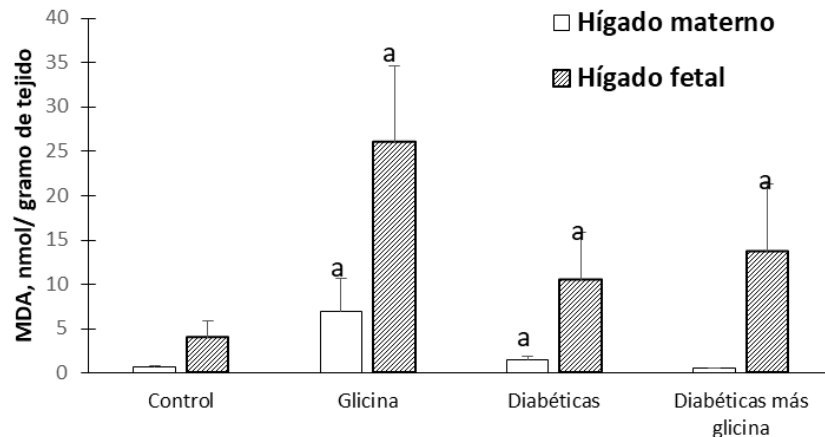


Figura 10. Lipoperoxidación en hígado de ratas diabéticas tratadas con glicina.

Promedio \pm EEM de 30–35 determinaciones. ^b $p < 0.01$ con respecto a su grupo control (ANOVA bifactorial).

Conclusiones

El tratamiento con glicina a ratas diabéticas preñadas evita las alteraciones del desarrollo causadas por la patología, probablemente por restaurar el estado oxidativo normal; aunque por sí solo produce un ligero estrés oxidativo, y un pequeño porcentaje de malformaciones y reabsorciones. Estudios posteriores pudieran determinar si este efecto puede ser evitado si se manejan dosis más bajas, y si la glicina afecta la expresión de genes de enzimas antioxidantes, o moléculas involucradas en la regulación del estrés oxidativo, la apoptosis, el ciclo celular o la embriogénesis. Una de las limitantes del presente estudio es que no se determinaron la expresión, por inmunohistoquímica o PCR, de las enzimas antioxidantes o de los genes involucrados en la apoptosis y el ciclo celular, así como si la inflamación tiene lugar durante la dismorfogénesis. Posteriores estudios se enfocarán a tratar de investigar estos aspectos.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, ARF, MPM; desarrollo de la metodología, ALRR, GCG; manejo de software, ALRR, GCG, ARF; validación experimental, ARF, MPM; análisis de resultados, ALRR, MPM; Manejo de datos, ALRR, GCG, MPM; escritura y preparación del manuscrito, ARF, MPM; redacción, revisión y edición, MPM.; administrador de proyectos, MPM; adquisición de fondos, MPM. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación no recibió financiamiento externo.

Declaraciones éticas

Los procedimientos en sujetos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, el estudio fue avalado por el Comité de Bioterio de la FES Iztacala.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al personal del bioterio de la FES Iztacala, MVZ Olga Leticia Flores Sánchez, Biól. Tomás Ernesto Villamar Duque y M. en C. Fernando Moreno Barrón, la ayuda y facilidades brindadas para el proyecto. El Biól. Leonardo Elías Cabrera Nájera apoyo técnicamente en la determinación de enzimas antioxidantes.

Referencias

- Aebi, H.E. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Al-Ghafli, M.H., Padmanabhan, R., Kataya, H.H., & Berg, B. (2004). Effects of α -lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 26, 123-135. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000028747.92084.42>
- Alcaraz-Contreras, Y., Garza-Ocañas, L., Carcaño-Díaz, K., & Ramírez-Gómez, X.S. (2011). Effect of glycine on lead mobilization, lead-induced oxidative stress, and hepatic toxicity in rats. *Journal of Toxicology*, 2011, 430539. <https://doi.org/10.1155/2011/430539>
- Alvarado-Vásquez, N., Lascurain, R., Cerón, E., Vanda, B., Carvajal-Sandoval, G., Tapia, A., Guevara, J., Montaña, L.F., & Zenteno, E. (2006). Oral glycine administration attenuates diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 79(3), 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.055>
- Alvarado-Vásquez, N., Zamudio, P., Cerón, E., Vanda, B., Zenteno, E., & Carvajal-Sandoval G. (2003). Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*, 134(4), 521-527. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(03\)00046-2](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(03)00046-2)

- Baker, L., & Piddington, R. (1993). Diabetic embryopathy: a selective review of diabetic trends. *Journal of Diabetes and their Complications*, 7(3), 204-212. [https://doi.org/10.1016/1056-8727\(93\)90046-2](https://doi.org/10.1016/1056-8727(93)90046-2)
- Barrow, M.V., & Taylor J. (1969). A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *Journal of Morphology*, 127(3), 291-306. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051270303>
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Beaudoin, A.R. (1980). Embryology and teratology. In: Baker HJ, & Lindsey JR. *The laboratory rat*. New York: Academic Press, Vol. I. p. 75-101.
- Buchanan, T.A., & Kitzmiller, J.L. (1994). Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annual Review of Medicine*, 45, 245-260. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.45.1.245>
- Cao, I., Tan, C., Meng, F., Liu, P., Reece, A., & Zhao, Z. (2016). Amelioration of intracellular stress and reduction of neural tube defects in embryos of diabetic mice by phytochemical quercetin. *Science Reports*, 6, 21491. <https://doi.org/10.1038/srep21491>
- Carvajal-Sandoval, G., Juárez, C.E., Ramos-Martínez, G., & Carvajal-Juárez, M.E. (1995). Inhibición de la glicosilación no enzimática de la hemoglobina en la diabetes mellitus. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 8(3), 185-188. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-162073>
- Carvajal-Sandoval, G., Juárez, E., Ramos-Martínez, G., Carvajal-Juárez, M.E., & Medina-Santillán, R. (1999a). Inhibition of hemoglobin glycation with glycine in induced diabetes mellitus in rats. *Proceedings of the Western Pharmacological Society*, 42, 35-36. PMID: 10697682
- Carvajal-Sandoval, G., Medina-Santillán, R., Juárez, E., Ramos-Martínez, G., & Carvajal-Juárez, E. (1999b) Effect of glycine on hemoglobin glycation in diabetic patients. *Proceedings of the Western Pharmacological Society*, 42, 31-32. PMID: 10697680
- Carvajal-Sandoval, G., Zamudio-Cortés, P., Carvajal-Juárez, M.E., & Juárez-de Carvajal, E. (2007). Prevención de los daños producidos por la diabetes mellitus y la senescencia. *Gaceta Médica de México*, 143, 53-61. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2007/gm071k.pdf>
- Cederberg, J., Galli, J., Luthman, H., & Eriksson, U.J. (2000). Increased mRNA levels of Mn-SOD and catalase in embryos of diabetic rats from a malformation-resistant strain. *Diabetes*, 49(1), 101-107. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.1.101>
- Cederberg, J., Simán, C.M., & Eriksson, U. (2001). Combined treatment with vitamin E and Vitamin C, decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatric Research*, 49: 755-762. <https://doi.org/10.1203/00006450-200106000-00007>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2008). Update on overall prevalence of major birth defects - Atlanta, Georgia, 1978-2005. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 57, 1-5. PMID: 18185492
- Chen, I., Zhand, J., Li, C., Wang, Z., Li, J., Zhao, D., Wang, S., Zhang, H., Huang, Y., & Guo, X. (2018). Glycine Transporter-1 and glycine receptor mediate the antioxidant effect of glycine in diabetic rat islets and INS-1 cells. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 123, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.007>

- Chirino-Galindo, G., Barrera-Argüelles, J.I., Trejo-González, N.L., Mejía-Zepeda, R., & Palomar-Morales, M. (2017). Biphasic effect of alpha-linolenic acid on glucose-induced dysmorphogenesis and lipoperoxidation in whole rat embryo in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(4), 878-883. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.011>
- Chirino-Galindo, G., López-Quintero, I.V., Ramírez-Domínguez, L.B., Cabrera-Nájera, L.E., Estrella-Parra, E.A., García-Bores, A.M., & Palomar-Morales, M. (2021). Verbascoside-enriched fraction from *Buddleja cordata* Kunth ameliorates the effects of diabetic embryopathy in an animal model. *Birth Defects Research*, 113(12), 981–994. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1894>
- El-Bassiouni, E.A., Helmy, M.H., Rawash, N.A., El-Zoghby, S.M., Kamel, M.A.E., & Rayah, A.N.A. (2005). Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of PGE2 level, gene expression of cyclooxygenases and apoptosis. *British Journal of Biomedical Science*, 62(4), 161-165. <https://doi.org/10.1080/09674845.2005.11732704>
- El-Hafidi, M., Franco, M., Ruiz, R.M., Santamaría, S.J., Pineda, F.J.A., López, A.O., Chávez, S.M., & Cardoso-Saldaña, G. (2018) Glycine increases insulin sensitivity and glutathione biosynthesis and protects against oxidative stress in a model of sucrose-induced insulin resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2101562. <https://doi.org/10.1155/2018/2101562>
- Eriksson, U.J., & Wentzel, P. (2015). The status of diabetic embryopathy. *Upsala Journal of Medical Science*, 121(2), 96-112. <https://doi.org/10.3109/03009734.2016.1165317>
- Ejdesjő, A., Wentzel, P., & Eriksson, U.J. (2011). Genetic and environmental influence on diabetic rat embryopathy. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 300(3), E454-E467. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00543.2010>
- Flores, C., Márquez, Y., Lopez-Ortega, Mendoza, C., Colmenarez, V., & Salas, Y. (2006). Caracterización de la diabetes mellitus experimental inducida con estreptozotocina en ratones nmri. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 12(1), 13-18. <http://www.ucla.edu.ve/dveterin/departamentos/CienciasBasicas/gcv/2530int2530er2530no/articulos/documasp/~8dlf9vt2.pdf>
- Freinkel, N., Dooley, S.L., & Metzger, B.E. (1985). Care of the pregnant woman with insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 313(29), 96-101. <https://doi.org/10.1056/NEJM198507113130206>
- Freinkel, N. (1980). Banting lecture 1980: of pregnancy and progeny. *Diabetes*, 29(12), 1023-1035. <https://doi.org/10.2337/diab.29.12.1023>
- Golob, E.K., Rishi, S., Becker, K.L., & Moore, C. (1970). Streptozotocin diabetes in pregnant and nonpregnant rats. *Metabolism*, 19(12), 1014-1970. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(70\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0026-0495(70)90024-7)
- Guía de Práctica Clínica. (2009). Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes en el Embarazo. Secretaría de Salud, México. <https://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.htm>
- Guney, M., Erdemoglu, E., Mungan, T. (2011). Selenium–Vitamin E combination and melatonin modulates diabetes-induced blood oxidative damage and fetal outcomes in pregnant rats. *Biological Trace Elements Research*, 143, 1091-1102. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8951-3>
- Kamimoto, Y., Sugiyama, T., Kihira, T., Zhang, L., Murabayashi, N., Umekawa, T., Nagao, K.,

- Ma, N., Toyoda, N., Yodoi, J., & Sagawa, N. (2010). Transgenic mice overproducing human thioredoxin-1, an antioxidative and anti-apoptotic protein, prevents diabetic embryopathy. *Diabetologia*, 53, 2046-2055. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1784-y>
- Kumar, S.D., Vijaya, M., Samy, R.P., Dhen, S.T., Ren, M., Watt, F., Kang, Y.J., Bay, B.H., & Tay, S.S.W. (2012). Zinc supplementation prevents cardiomyocyte apoptosis and congenital heart defects in embryos of diabetic mice. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 53(8), 1595-1606. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.008>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Martínez-Angoa, A., Parra-Hernández, E., Madrigal-Bujaidar, E., Chamorro-Cevallos, G., Carvajal-Sandoval, G., & Zamudio-Cortes, P. (2006). Reduction of all-trans-retinoic acid-induced teratogenesis in the rat by glycine administration. *Birth Defects Research A: Clinical and Molecular Teratology*, 76(10), 731-738. <https://doi.org/10.1002/bdra.20309>
- Martínez-Galero, E., Paniagua-Castro, N., Pérez-Pastén, R., Madrigal-Bujaidar, E., & Chamorro-Cevallos, G. (2008). Glycine decreases developmental damage induced by hyperglycaemia in mouse embryos. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 895-900. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.7.001>
- Méndez, J.D., & Palomar-Morales, M. (1999). Prevention by L-arginine and polyamines of delayed development and embryotoxicity caused by chemically-induced diabetes in rats. *Reproductive Toxicology*, 13(6), 501-509. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(99\)00039-8](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(99)00039-8)
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid in animal tissues for thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Ornoy, A., Zaken, V., & Kohen, R. (1999). Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology*, 60(6), 376-386. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9926\(199912\)60:6<376::AID-TERA10>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9926(199912)60:6<376::AID-TERA10>3.0.CO;2-Q)
- Paglia, E.D., & Valentine, N.W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158-168. PMID: 6066618.
- Paniagua-Castro, N., Escalona-Cardoso, G., & Chamorro-Cevallos, G. (2006). Glycine reduces cadmium-induced teratogenic damage in mice. *Reproductive Toxicology*, 23(1), 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.08.011>
- Pérez-Torres, I., Zúñiga-Monroy, A.M., & Guarnier-Lans, V. (2017). Beneficial effects of the amino acid glycine. *Mini Reviews in Medicine and Chemistry*, 17, 15-32. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160609081602>
- Razak, M.A., Begum, P.S., Viswanath, B., & Rajagopal, S. (2017). Multifarious beneficial effect of nonessential amino acid, glycine: a review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(1), 1716701. <https://doi.org/10.1155/2017/1716701>
- Rodrigues, B., Poucheret, P., Battell, M.L., & McNeill, J.H. (1999). Streptozotocin-induced diabetes: induction, mechanism(s) and dose dependency, In: McNeill JH. Experimental models of diabetes (pp. 3-17). Ed. CRC Press.

- Ryu, S., Kohen, R., Samuni, A., & Ornoy, A. (2007). Nitroxide radicals protect cultured rat embryos and yolk sacs from diabetic-induced damage. *Birth Defects Research A: Clinical and Molecular Teratology*, 79(8), 604-611. <https://doi.org/10.1002/bdra.20383>
- Singh, C.K., Kumar, A., Hitchcock, D.B., Goodwin, R., LaWoie, H.A., Nagarkatti, P., & Singh, U.S. (2011). Resveratrol prevents embryonic oxidative stress and apoptosis associated with diabetic embryopathy and improves glucose and lipid profile of diabetic dam. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(8), 1186-1196. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000457>
- Sybulski, S., & Maughan, G.B. (1971). Use of streptozotocin as diabetic agent in pregnant rats. *Endocrinology*, 89(6), 1537-1540. <https://doi.org/10.1210/endo-89-6-1537>
- Tsuchida, S. (1999). Glutathione transferase. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J.M.C. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species (pp. 83-85). Ed. Oxford University Press.
- Wentzel, P., Ejdesjő, A., & Eriksson, U.J. (2003). Maternal diabetes in vivo and high glucose in vitro diminish GADPH activity in rat embryos. *Diabetes*, 52(5), 1222-1228. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.5.1222>
- Wentzel, P. & Eriksson, U.J. (2005). A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E2 in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Defects Research, (Part A)* 73, 506–511
- Wentzel, P., Gäreskog, M., & Eriksson, U.J. (2008). Decreased cardiac glutathione peroxidase levels and enhanced mandibular apoptosis in malformed embryos of diabetic rats. *Diabetes*, 57(12), 3344-3352. <https://doi.org/10.2337/db08-0830>
- Wu, Y., Wang, F., Reece, E.A., & Yang, P. (2015). Curcumin ameliorates high glucose-induced neural tube defects by suppressing cellular stress and apoptosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212(6), 802.e1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.01.017>
- Zabihi, S., Eriksson, U.J., & Wentzel, P. (2007). Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes, enhances Vegf-A, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats. *Reproductive Toxicology*, 23(4), 486-498. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.03.007>
- Zaken, V., Kohen, R., & Ornoy, A. (2001). Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology*, 64(1), 33-44. <https://doi.org/10.1002/tera.1045>