

Tesis de Licenciatura

Modulación de la síntesis de prostaglandina E en embriones de rata diabética

Sinner, Débora Inés

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sinner, Débora Inés. (). Modulación de la síntesis de prostaglandina E en embriones de rata diabética. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000659_Sinner

Cita tipo Chicago:

Sinner, Débora Inés. "Modulación de la síntesis de prostaglandina E en embriones de rata diabética". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000659_Sinner

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

Seminario de Licenciatura

*Modulación de la Síntesis de
Prostaglandina E en Embriones
de Rata Diabética*

Autora: Débora Inés Sinner
Directora: Elida T. González
Codirectora: Alicia S. Jawerbaum

Centro de Estudios Farmacológicos
y Botánicos (CEFyBO)
Serrano 669 Buenos Aires

Diciembre de 1998

№ 065 9 1

AGRADECIMIENTOS

A Elida por todo lo transmitido, por su cariño y comprensión.

A Alicia por su paciencia, su buena predisposición para explicarme y enseñarme las “tareas” diarias y su afecto.

A Virginia, Silvina y Carolina por su compañía y buena disposición para extenderme una mano de ayuda en los momentos necesarios.

A Marita por toda su ayuda y su cariño.

A Mamá y Papá por todo su amor.

A David, por su cariño.

A Alejandro por su amor, comprensión y paciencia.

RESUMEN

En el presente trabajo se evalúa el desarrollo embrionario, la síntesis de prostaglandina E (PGE) y la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS) durante la organogénesis temprana en un modelo experimental de rata diabética no insulino dependiente (DNID) obtenida por administración intraperitoneal de estreptozotocina. Los resultados mostraron que un 5% de los embriones DNID presentaban anomalías congénitas severas no compatibles con la vida, mientras que en el 95% restante no se hallaron malformaciones, pero sí un retraso en el crecimiento. Los embriones DNID de 11 días de gestación secretan más PGE al medio de incubación que los embriones controles. El tratamiento *in vitro* con SIN-1, dador de óxido nítrico (NO) incrementa la síntesis de PGE tanto en embriones controles como en DNID; por el contrario el agregado al medio de cultivo de L-NMMA, inhibidor de la NOS, reduce la liberación de PGE en ambos grupos, sugiriendo esto una modulación por parte del NO en la síntesis de PGE. Por otra parte la actividad de la NOS y los valores de contenido de nitritos se hallan incrementados en los embriones DNID. El tratamiento *in vivo* con L-NAME, inhibidor de la NOS, durante los días 7 a 11 de gestación, mostró una reducción en la síntesis de PGE, un aumento en la reabsorción de embriones y la aparición de fallas en el tubo neural. El cultivo de embriones explantados en dia 10 de gestación durante 24 horas en presencia de suero normal o diabético, no mostró diferencias significativas en cuanto al desarrollo embrionario ni modificó el contenido de PGE lo cual indicaría la ausencia de factores séricos maternos responsables del incremento en la síntesis de PGE en embriones de rata DNID. Sobre la base de estos resultados podría decirse que NO modularía la síntesis de PGE en embriones durante la organogénesis temprana. La alta producción de NO en embriones DNID estimularía un incremento en la síntesis de PGE, lo cual resultaría beneficioso para el embrión en la prevención ante malformaciones.

INTRODUCCION

Desarrollo embrionario

Segmentación y gastrulación

Una vez que el oocito es liberado del ovario, es captado por las fimbrias y situado dentro del oviducto. La primera división meiótica ya se ha completado, el primer cuerpo polar está presente y el huso formado para proseguir con la segunda división meiótica. La fertilización ocurre dentro de la ampula del oviducto, región cercana al ovario. En este momento se completa la meiosis formándose el segundo cuerpo polar. Luego el embrión será transportado a través del oviducto hacia el útero, durante este evento ocurren las primeras divisiones.

La segmentación es del tipo rotacional (26) ya que el primer clivaje ocurre en el plano meridional, sin embargo el segundo clivaje ocurre en uno de los blastómeros en sentido meridional y otro en sentido ecuatorial. Por otra parte es característico de mamíferos la asincronía en las divisiones, no todos los blastómeros se dividen al mismo tiempo.

Otra característica es la compactación de los blastómeros ocurrida en el estadio de 8 células en especies tales como el ratón. Estas células se dividen para dar un estadio de 16 células llamado mórula consistente en un grupo de células internas rodeadas por células externas (2). Los descendientes de las células externas darán células trofoblásticas, las cuales no formarán parte del embrión en sí pero darán origen al tejido extraembrionario del corion, la porción embrionaria de la placenta que será responsable de permitir al embrión obtener oxígeno y nutrientes de la madre.

El embrión será derivado de los descendientes de las células internas que formarán la masa celular interna (52). Estas células no solo originarán el embrión, sino también a membranas asociadas al mismo: saco vitelino, amnios y alantoides.

Posteriormente mediante un proceso denominado cavitación las células del trofoblasto secretan un fluido dentro de la mórula creando el blastocito. La masa celular interna es posicionada en un lado del anillo formado por las células trofoblásticas. Esta estructura es denominada blastocito.

El blastocito está rodeado por la zona pelúcida de la cual escapará en el momento de llegar al útero con ayuda de una proteasa que lisa la matriz de la zona (53), luego el blastocito podrá hacer contacto directo con el útero a través de las células trofoblásticas.

Posteriormente la masa celular interna se segregará dando el hipoblasto que a su vez formará el endodermo del saco vitelino y el epiblasto que generará el ectodermo del amnios y todos los tejidos del embrión. En este momento comienza la gastrulación; el endodermo y el mesodermo presuntivo migran a través del surco primitivo, las células que migren a través del nodo de Hensen darán origen a la notocorda. Los precursores ectodérmicos son localizados anteriormente al surco primitivo.

Neurulación

Luego de la gastrulación el embrión queda conformado por tres capas: la endodermal interna, la mesodérmica intermedia y el ectodermo externo.

Durante la neurulación primaria el ectodermo es dividido en tres grupos de células: a) las del tubo neural posicionadas internamente serán las que originarán el cerebro y la médula espinal, b) posicionadas externamente las que darán la epidermis, c) las células de cresta neural que migrarán y darán origen a distintas estructuras.

En general la neurulación consta de los siguientes estadios: formación de la placa neural, formación del piso de la placa neural, cambio de forma en la placa neural, “curvación” de la placa para dar el surco neural, cierre del surco para dar el tubo neural.

La formación del tubo neural comienza con la inducción por el mesodermo de las células ectodérmicas ubicadas por encima de él, diferenciándolas de las destinadas a originar la epidermis.

La placa neural sufre extensión convergente por intercalación de células. Como resultado la placa se estira y estrecha (30). Luego se produce el plegamiento de la placa neural por cambio de forma en las células centrales que decrecen su altura y adoptan una forma de cuña, las células laterales no sufren dicho cambio. A su vez las células ubicadas cerca del ectodermo no neural sufren un cambio de forma similar a

las células del piso del tubo neural en formación. El tubo neural se cierra cuando los pliegues se acercan uno a otro por la línea dorsal media.

En los extremos el tubo neural permanece aun abierto. Estas aberturas son denominadas *neuroporo anterior* y *neuroporo posterior*.

En mamíferos el cierre del tubo neural se produce en varios lugares a la vez (21) a lo largo del eje antero posterior. Distintos defectos en el tubo neural ocurren cuando este no se cierra en algún punto. Es de mencionar en humanos las condiciones de espina bífida y anencefalia.

Diferenciación del tubo neural

La porción anterior del tubo neural sufre cambios drásticos, allí se forman tres vesículas primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo, que posteriormente formarán distintas regiones del cerebro.

Somitas

A cada lado de la notocorda se encuentran bandas de células mesodérmicas, constituidas por mesodermo paraxial el cual se separa en bloques llamados somitas. Estas somitas darán origen a las células que formarán las vértebras, costillas, dermis dorsal, músculos esqueléticos de la espalda y músculos esqueléticos de la pared del cuerpo y miembros.

Corazón

El corazón se origina de dos regiones del mesodermo esplácnico que interactúan con el tejido adyacente para diferenciarse en dicho órgano. En aves y mamíferos las células presuntivas del corazón forman dos tubos con una doble pared formada por el endocardio y el epimiocardio. Como primera medida se fusiona el epimiocardio y posteriormente el endocardio que forma una cámara simple pulsátil.

Esta cámara se divide primero en un atrio y un ventrículo luego el tubo se contorsiona en forma de “S”, los septos separan a cada cámara en lado derecho e izquierdo y las válvulas se desarrollan.

Cultivo de embriones postimplantatorios: utilidades del modelo

A finales de los años 70' fueron puestas a punto técnicas para el cultivo de embriones postimplantatorios de roedores, donde puede reproducirse el desarrollo embrionario durante la organogénesis temprana, durante los días 9.5 hasta 12.5 de gestación (51), el cual es aproximadamente igual al alcanzado por embriones *in vivo*.

Esta técnica es importante para estudios de tipo teratogénicos, ya que se eliminan las influencias del ambiente materno.

Con el objeto de facilitar los estudios de ontogenia se han definido distintos ~~estadios~~ de desarrollo embrionario los cuales permiten realizar una evaluación adecuada del desarrollo alcanzado por el embrión ante distintas situaciones (6).

Pueden utilizarse distintos parámetros para evaluar el crecimiento del embrión, tales como el diámetro del saco vitelino longitud de la cabeza, contenido de proteínas, contenido de ADN (8). Entre ellos los parámetros que mejor cuantifican el crecimiento embrionario son el contenido de proteínas y ADN, los cuales presenta una relación logarítmica con la edad embrionaria (6).

Alteraciones de la organogénesis en embriones de ratas diabéticas

En humanos es alta la incidencia de malformaciones en los hijos de madres diabéticas (41), las cuales están relacionadas con la mortalidad de los mismos. Las lesiones específicas para la patología de la diabetes materna son: síndrome de regresión caudal (63), espina bífida, anencefalia, hidrocefalia y otros defectos en el sistema nervioso central (12). Otro sistema que resulta ser afectado es el cardiovascular (63).

Tanto la predisposición genética como la nutrición materno-embrial serían factores implicados en la embriopatía de las ratas diabéticas (9).

Es amplia la literatura que cita que el crecimiento y la organogénesis de embriones postimplantatorios de roedores en cultivo pueden ser afectados por la adición de glucosa al medio de cultivo (55,22); la aparición de malformaciones sería dosis dependiente de la concentración de glucosa agregada al medio de cultivo (17). Embryos de ratones y ratas cultivados en condiciones de hiperglucemia presentan defectos en la fusión del tubo neural, retraso en el crecimiento (16), hipertrofia de corazón o aún reabsorción del embrión en los casos donde las malformaciones son severas no compatibles con la vida (17).

Diabetes Mellitus: Patología

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica muy común que afecta entre el 1 y 2 % de la población. Existen dos tipos principales: tipo I o insulino dependiente (DID) y tipo II o no insulino dependiente (DNID), siendo la primera la más severa. Respecto de la diabetes I se sabe que se hereda la predisposición a padecer la enfermedad (67), el gen responsable de la susceptibilidad mapea en el brazo corto del cromosoma 6, en el complejo mayor de histocompatibilidad. El proceso que genera la diabetes se inicia durante la niñez tras una infección viral común que alteraría las células β pancreáticas de forma tal que son reconocidas como extrañas por el sistema inmune (10). El ataque autoinmune se iniciaría con el reconocimiento de las células alteradas por macrófagos que a través de distintos acontecimientos llevaría a que las células disminuyan la secreción de insulina. Con el tiempo las modificaciones celulares aumentan y se produce una invasión linfocitaria que provoca la lisis casi total de las células beta pancreáticas (50).

Las consecuencias son una deficiencia total en la producción de insulina acompañada por una sobreproducción de glucagon (15). En estos pacientes habrá entonces un impedimento en la utilización de glucosa por parte de los tejidos, sobreproducción de glucosa hepática, mayor síntesis y utilización de reservas lipídicas y la consecuente elevación de cuerpos cetónicos plasmáticos.

En la Diabetes tipo II existiría una predisposición genética para padecer la enfermedad pero se requieren de factores ambientales para desarrollarla. Entre estos

factores serían de importancia la excesiva ingesta de calorías y la ganancia en peso y la instalación de la obesidad (50). La enfermedad tendría su origen a partir de un estado conocido como prediabetes caracterizado por una deficiencia relativa en la secreción de insulina y una mayor demanda periférica de la misma; este defecto secretorio ocurre específicamente ante el estímulo de glucosa. Con el tiempo se desarrolla la enfermedad en sí, afectando principalmente a individuos mayores de 35 años aunque pueden encontrarse casos juveniles de la enfermedad (15).

Desarrollada la patología, además de deficiencia en la secreción de insulina, hay resistencia periférica a la insulina y defecto en la supresión de producción de glucosa hepática inducida por hiperglucemia, entre otras alteraciones. Los niveles de glucagon son elevados, y los cambios metabólicos existentes son característicos de un estado catabólico con lo cual se encuentran alterados la mayoría de los metabolitos (50).

En períodos iniciales la enfermedad se detecta por medio de curvas de tolerancia a la glucosa ya que las glucemias basales pueden no estar elevadas (46).

Modelos experimentales

En la rata los modelos más conocidos para el estudio de la patología diabética son la pancreatectomía subtotal y la administración de estreptozotocina, droga que provoca la destrucción de las células beta pancreáticas.

El modelo experimental más utilizado es el que se obtiene por inyección intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de peso), disuelta en buffer citrato.

La estreptozotocina es un antibiótico obtenido de *Streptomices Acharamogenes*, cuya acción descripta histológicamente (40) es una degranulación y necrosis específica de las células beta pancreáticas, 7 a 10 horas después de su administración. Con lo cual las ratas tratadas con estreptozotocina exhiben muchas de las características de los pacientes con diabetes tipo I no controlada (34).

Con respecto a la diabetes tipo II, se ha desarrollado un modelo que se obtiene por inyección neonatal de estreptozotocina (27). Las células beta pancreáticas se destruyen al día 2 de nacimiento y luego se regeneran en forma parcial

espontáneamente dando en el animal adulto un modelo de diabetes no insulino dependiente caracterizado por glucemias ligeramente elevadas, curvas de tolerancia a la glucosa alteradas y bajas concentraciones de insulina circulante (37). Si bien el modelo no presenta algunas características del síndrome (obesidad, marcada resistencia a la insulina) es ampliamente utilizado, puesto que resulta de interés para el estudio de las primeras etapas de la patología, así como para el estudio de los efectos de la disminución de la secreción de insulina en forma independiente de la resistencia a la misma.

Prostaglandinas

Generalidades

Las prostaglandinas son ácidos grasos de veinte carbonos que contienen un anillo de cinco carbonos. Fueron descubiertas por primera vez en las secreciones prostáticas por Goldblatt (20) y Von Euler (64), describiéndose un efecto vasodepresor y estimulante del músculo liso.

Las prostaglandinas son sintetizadas a partir de ácidos grasos poliinsaturados, estos son el ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico, que dan origen a tres series diferentes de prostaglandinas (respectivamente serie 1, serie 2, serie 3) según la cantidad de dobles enlaces presentes en las cadenas laterales. Otra forma de clasificación de las prostaglandinas puede realizarse a partir de la composición estructural del anillo pentano y define los grupos A, B, C, D, E, F, G, H e I. De estos los que tienen mayor importancia biológica son los grupos E, F, e I. El ácido araquidónico es el precursor de todas las prostaglandinas de la serie 2, las cuales son de gran importancia biológica. Este ácido puede obtenerse en forma directa a través de la dieta o por desaturación y elongación del ácido linoleico. Forma parte de los componentes fosfolipídicos de la membrana celular y otras estructuras celulares. Para el inicio de la síntesis de prostaglandinas el araquidónico debe ser liberado de la membrana celular, función que es cumplida por enzimas tales como la fosfolipasa A₂ o fosfolipasa C, ambas estimuladas por Ca²⁺ (11).

Una vez liberado de la membrana el araquidónico puede ser metabolizado por dos tipos de enzimas (Esquema 1). Una de ellas, la lipooxigenasa, cataliza la formación de hidroperóxidos inestables que a través de sucesivos pasos se transforman en compuestos tales como los leucotrienos. La otra enzima es la ciclooxigenasa, presente en todas las células de mamíferos excepto en glóbulos rojos, que en presencia de O_2 forma con el ácido araquidónico el intermediario PGG₂, el cual pasa a otro intermediario PGH₂ que luego es convertido enzimáticamente a otros compuestos estables: PGE₂, PGD₂ vía isomerasas, o PGF_{2 α} vía reductasa. La PGE₂ puede ser convertida a PGF_{2 α} por medio de la enzima 9-ceto reductasa.

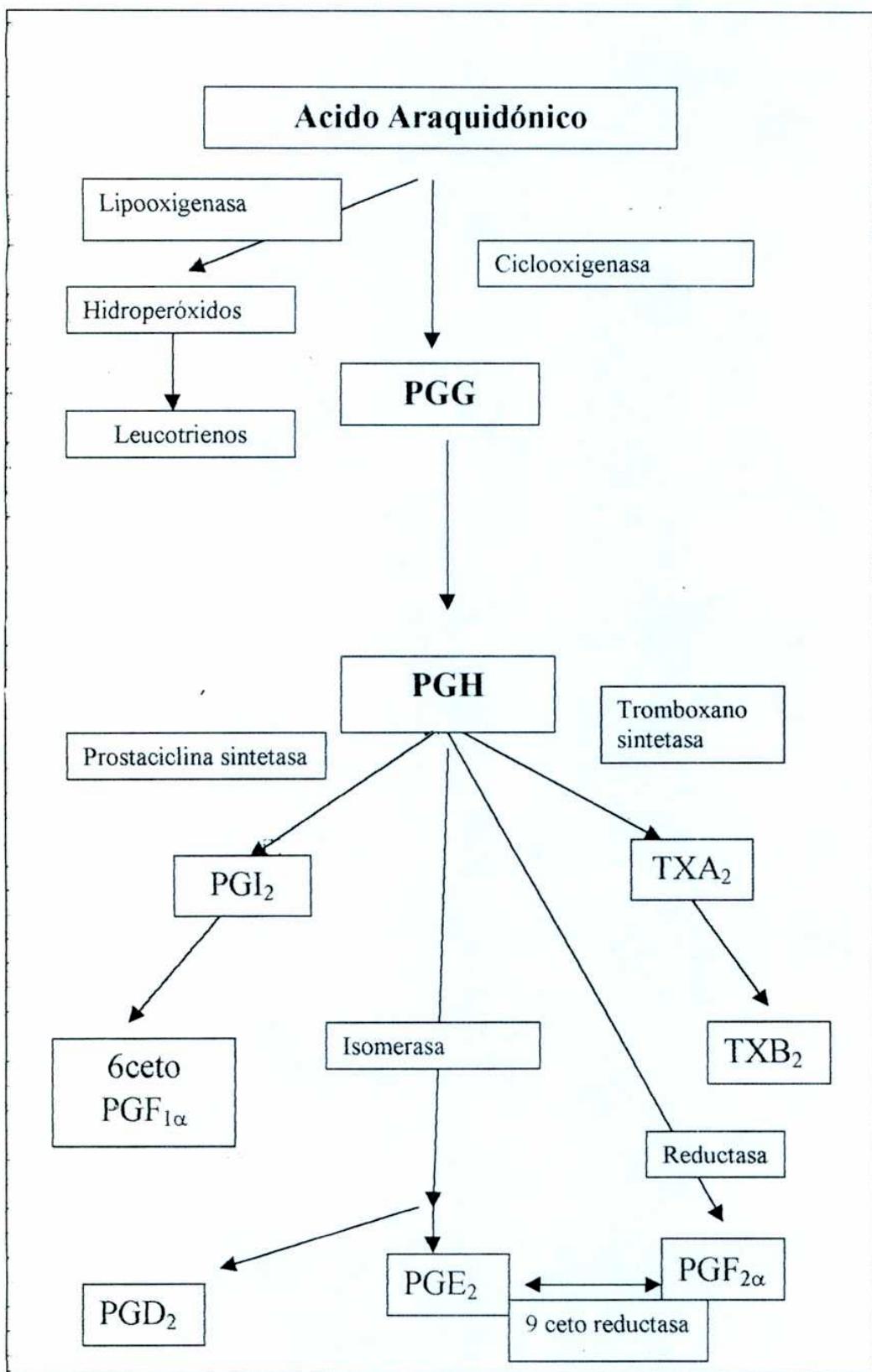
Las prostaglandinas presentan una variedad de funciones, puesto que actúan sobre la presión arterial, agregación plaquetaria, provocan contracción o relajación del músculo liso, quimiotaxis y quimiocinecias de células sanguíneas (3); participan en diferentes eventos reproductivos tales como ovulación, luteólisis (8), y desencadenamiento del trabajo de parto.

En exceso son responsables de desórdenes diversos tales como los procesos inflamatorios, alérgicos, alteraciones del ciclo sexual, abortos (36); su deficiencia puede conducir a trastornos como la infertilidad, hipertensión arterial y úlceras gástricas.

Niveles de prostaglandinas en la Diabetes mellitus

Se ha reportado que los niveles de síntesis de prostaglandinas se encuentran incrementados en diversos tejidos en pacientes diabéticos así como en distintos modelos de diabetes (58). Por otra parte los valores se hallan disminuidos en embriones de ratas provenientes de madres diabéticas insulino dependientes vía inyección de estreptozotocina en el día 6 de gestación (54). Trabajos previos en nuestro laboratorio dan cuenta de un incremento en la síntesis de PGE₂ y PGF_{2 α} en conceptos de ratas diabéticas no insulino dependientes (DNID) (33).

Esquema 1: Cascada del ácido araquidónico



Prostaglandinas: efectos biológicos durante la morfogénesis temprana del embrión

La administración de inhibidores de la ciclooxygenasa durante la gestación afecta al desarrollo del embrión (65).

Durante los eventos de formación del tubo neural se ha hallado un patrón en la síntesis de PGE acompañando estos cambios. Durante la expansión de los pliegues craneales neurales, el nivel de PGE es alto, luego cuando los pliegues convergen para cerrar el tubo los valores de PGE comienzan a declinar y finalmente son bajos cuando la neurulación se ha completado (54). PGE estaría entonces involucrada en algún mecanismo celular durante la neurulación temprana. También la vía araquidónico-prostaglandina sería importante en los eventos de cierre del tubo neural.

El principal efecto teratogénico durante la diabetes tipo I experimental, es la malformación del tubo neural, presentando fallas en el cierre del mismo. Esto se observa en condiciones de hiperglucemia tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, pudiéndose evitar la aparición de estas malformaciones con el agregado de PGE al medio de cultivo. *In vivo* dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados o ácido araquidónico, precursor de la síntesis de prostaglandinas, evitan la aparición de malformaciones en ratas diabéticas tipo I (55).

Oxido nítrico

Características generales

El radical libre óxido nítrico (NO) es generado por la enzima Oxido Nítrico Sintasa (NOS), que convierte la L-arginina en L-citrulina y NO en cantidades equimolares en presencia de O₂ y NADPH. Luego el NO es rápidamente metabolizado por oxidación para dar nitritos y nitratos.

El óxido nítrico es un importante mediador biológico cuya vida media es de 7 segundos y puede generar junto con radicales libres derivados del oxígeno peroxinitritos, de alta toxicidad para la célula por su capacidad de nitrosilar proteínas (47).

La enzima NOS es un homodímero con un grupo hemo, perteneciente a la familia de los citocromos-P450. Son sus cofactores la tetrahidrobioptерina, la flavina adenina mononucleótido (FAD) y la flavina mononucleótido (FMM).

Se han aislado varias isoformas de NOS: el tipo I aislado en cerebro (cNOS), el tipo II aislado en macrófagos (iNOS) y el tipo III aislado en el endotelio vascular (eNOS). Tanto el tipo I como el tipo III son constitutivas y calcio/calmodulina dependientes. El tipo II (forma inducible) es expresado en músculo liso vascular en respuesta a citoquinas o endotoxinas y su actividad es calcio/calmodulina independiente. Por lo general las enzimas constitutivas se asocian con la síntesis basal de NO mientras que la inducible estaría asociada a niveles mayores de síntesis de NO en procesos infecciosos o inflamatorios (36).

Inhibidores de la síntesis de NO

Existen numerosos análogos de L-arginina tales como N^G -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), y N^G monometil-L-arginina (L-NMMA), los cuales inhiben tanto a las isoformas constitutivas como a las inducibles (38). Por otra parte la aminoguanidina predominantemente inhibe a la isoforma inducible.

Los glucocorticoides como la dexametasona inhiben la expresión génica de la isoforma inducible, pero sin afectar la actividad de la isoforma constitutiva de la NOS (39).

Efectos biológicos del NO

Puede hablarse de tres categorías de roles fisiológicos del NO: control cardiovascular, neurotransmisión (62) y función inmune. El NO generado en el endotelio vascular regula el tono muscular (49); media la actividad bactericida y tumoricida de los macrófagos(28). Es también mediador de la apoptosis o muerte celular programada.

Se ha sugerido que el NO actuaría durante el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso (35).

EL exceso de NO resulta ser tóxico y dañino para los tejidos, asociados con la inflamación producida en estos (48).

Durante la preñez es responsable del mantenimiento de la circulación útero placentaria generando un estado de vasodilatación que asegure la adecuada liberación de oxígeno y nutrientes al embrión en crecimiento y remueva los desechos metabólicos. Además sería el responsable del mantenimiento quiescente y relajado del músculo liso uterino, efecto que decae al comienzo del parto. En tejido placentario a término, parece relacionarse con el desencadenamiento del trabajo de parto (23).

NO y organogénesis temprana

La NOS se encuentra presente en el embrión durante la organogénesis (66). Aunque su caracterización aún no es demasiado clara se ha detectado actividad de la NOS en tejidos embrionarios. Mediante técnicas de inmunocitoquímica, histoquímica o hibridización *in situ* fue detectada en áreas discretas del cerebrotal como el procencéfalo del embrión de rata de 10 días de gestación (4). También fue detectada por inmunocitoquímica en embriones de ratón de 12 días de gestación, en médula espinal en neuronas simpáticas preganglionares, neuronas de los núcleos espinales y en células que rodean la parte ventral del neuroepitelio (7).

Se asigna un rol específico al NO durante la organogénesis temprana, ya que experiencias realizadas con dadores de NO (SNP) o inhibidores de la NOS (L-NMMA) inyectados en el fluido amniótico de embriones en cultivo han mostrado que: en exceso el NO genera citotoxicidad en tejidos cefálicos específicos provocando zonas discretas con células muertas siendo las zonas más afectadas por este el mesencéfalo y el romboencéfalo; por otra parte la falta de NO genera fallas en el desarrollo del segundo arco branquial y copa óptica. De esto se especula que durante el desarrollo la expresión de la NOS debe ser regulada, y el NO sintetizado ejerce influencias en el desarrollo mediado posiblemente por procesos apoptóticos (42).

NO y síntesis de Prostaglandinas

Trabajos previos en nuestro laboratorio han descripto que el NO activa la enzima ciclooxygenasa presente en hipotálamo, tejido uterino, complejo ovocito-cúmulus, placenta y pancreas, provocando esto un aumento en la síntesis de prostaglandinas (58,59,60,23,24). No se conoce si un mecanismo similar ocurre en embriones en organogénesis temprana, vía NO modulando la síntesis de PGE.

HIPOTESIS

De acuerdo a los antecedentes mencionados anteriormente las hipótesis de este trabajo son:

- La síntesis de PGE embrionaria está modulada por niveles de óxido nítrico.
- En los embriones de rata diabética los niveles de óxido nítrico modulan las anomalías en la síntesis de PGE y la aparición de malformaciones.

OBJETIVOS:

- Evaluar morfológicamente al embrión de rata DNID en organogénesis temprana.
- Evaluar el efecto de dadores e inhibidores de la síntesis de NO sobre la producción de PGE en embriones de rata sana y diabética.
- Determinar las concentraciones de nitratos/nitritos y la actividad enzimática de la NOS en embriones controles y DNID en día 11 de gestación.
- Evaluar si el tratamiento *in vivo* con L-NAME, inhibidor de la NOS, durante la organogénesis temprana modifica en el embrión su morfología y la síntesis de PGE.
- Evaluar morfológicamente el desarrollo *in vitro* de embriones de rata sana durante la organogénesis temprana cultivados en presencia de suero de rata sana y DNID.
- Evaluar si el cultivo *in vitro* de embriones de rata sana en presencia de suero DNID modifica los niveles de PGE.

MATERIALES

Estreptozotocina

Buffer citrato

N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA)

N^G -monometil-D-arginina (D-NMMA)

3-morfolin-sydnomina-hidrocloridro (SIN-1)

N^G -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME)

Anticuerpos de conejo para cuantificar PGE

HEPES

NADPH

Penicilina

Streptomicina

Todos obtenidos de SIGMA, St. Louis, MO, USA.

Dowex AG50W-X8 obtenido de BIO RAD, Richmon, USA.

[3 H]-Prostaglandina E de AMERSHAM, Buckinghamshire, England

[14 C]-arginina obtenidas de AMERSHAM, Buckinghamshire, England.

Medios de incubación

Solución Krebs Ringer bicarbonato

Na^+ 145 mM

K^+ 5.9 mM

Ca^+ 2.2 mM

Mg^{2+} 1.2 mM

Cl^- 127 mM

HCO_3^- 25 mM

SO_4^{2-} 1.2 mM

PO_4^{3-} 1.2 mM

Tyrodes

Se indican las concentraciones en paréntesis dadas en g/l, salvo expresa aclaración.

NaCl (8 g/l)

| | |
|---|-------------|
| KCl | (0.2 g/l) |
| MgCl ₂ 6 H ₂ O | (0.1 g/l) |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | (0.056 g/l) |
| CaCl 2H ₂ O | (0.051 g/l) |
| Glucosa | (1 g/l) |
| NaHCO ₃ | (1 g/l) |
| Rojo Fenol | (10 mg/l) |
| Estreptomicina | (100 ug/l) |
| Penicilina | (64 ug/l) |

METODOS

Animales

Se utilizan ratas variedad Wistar, alimentadas con purina y agua ad libitum, mantenidas en un ritmo de 14: 10 horas de luz oscuridad respectivamente a temperatura de 22 ± 2 °C y humedad constante.

Las ratas DNID se obtienen por administración neonatal de estreptozotocina en una dosis de 100 mg/kg. El estado diabético se verifica en los animales adultos a través de curvas de tolerancia a la glucosa, utilizándose solo aquellos animales cuyos valores de glucemia se encuentren entre 180-250 mg/dl, 120 minutos después de la administración de glucosa 1.5 g/kg i.p. (en ratas controles dicho valor es menor a 110 mg/dl).

Hembras controles y diabéticas de peso entre 200 y 300 g. son apareadas durante la noche con machos controles. El apareo se confirma a la mañana siguiente por la presencia de espermatozoides en los extendidos vaginales, considerándose este como el día 1 de gestación. En el día 10 o día 11 de gestación las madres son sacrificadas mediante dislocación cervical. Se remueve rápidamente el útero y se lo coloca en caja de Petri conteniendo solución Krebs o Tyrodes según corresponda.

Luego bajo lupa se remueve del útero el tejido decidual, liberándose el concepto, con ayuda de pinzas especiales. En caso de tratarse del día 11 de gestación, el embrión se separa de sus membranas (amnios, saco vitelino) para la evaluación de viabilidad (mediante la presencia de latido cardíaco), rotación axial, número de somitas, y presencia de malformaciones congénitas. Se dosa el contenido proteico según Lowry (43), como índice de crecimiento fetal, para lo cual el embrión es homogeneizado e hidrolizado con 1 ml de NaOH 0.5 M y utilizándose como estándar seroalbúmina bovina.

Un grupo de ratas controles y diabéticas son tratadas desde el día 7 al día 11 de gestación con L-NAME (inhibidor de la NOS, 5mg/kg) o con solución salina en forma intraperitoneal. Al día 11 las madres son sacrificadas, se obtienen los embriones y se los evalúa en la forma mencionada anteriormente.

Cultivo de embriones

Se utiliza el método de New y col (51). En el día 10 de gestación se obtienen los conceptos (embrión con sus anexos embrionarios) según se explicó anteriormente y utilizándose Tyrodes como medio de explante. El concepto intacto (Fotografía 1) es cultivado en tubos Falcon conteniendo medio Tyrodes (0.5ml) adicionado con suero control o suero DNID (1.5 ml) pregaseado con una mezcla de gas de O₂: CO₂:N₂, 5:5:90 durante 5 minutos; al momento de agregar los conceptos al tubo este se vuelve a gasear durante 3 minutos con la misma mezcla de gases.

El suero es obtenido de aorta abdominal bajo anestesia, tanto de animales controles o animales NIDD. Al momento del uso este suero es inactivado a 56 °C durante 50 minutos con 3 interrupciones de gaseado durante 1 minuto con carbógeno. Luego se le adiciona Penicilina o Streptomicina en concentración de 64 ug/ml y 100 ug/ml respectivamente.

Los conceptos son cultivados durante 24 horas en estufa a temperatura de 37°C y con equipo rotador. A las 16 horas de cultivo los tubos son nuevamente gaseados con una nueva mezcla de gases 5:15:80 O₂: CO₂:N₂. Cumplidas las 24 horas se levanta el

Fotografía 1: Embrión con sus membranas explantado el día 10 de gestación (arriba).

Fotografía 2: Embrión cultivado *in vitro* durante 24 horas, explantado en el día 10 de gestación, en presencia de suero control (abajo).

cultivo y el embrión (Fotografía 2) es separado de sus membranas (saco vitelino, amnios, alantoides) para evaluación de parámetros tales como viabilidad, número de somitas y malformaciones en tubo neural. Se dosa también proteínas para lo cual el embrión es hidrolizado con NaOH 0.5 M o bien los embriones son almacenados a -70°C para la posterior determinación de contenido de nitratos/nitritos o actividad NOS. Por otra parte algunos son sonicados para la posterior extracción del contenido de PGE.

Determinación de PGE

Liberación de PGE

Una vez obtenidos los embriones controles o DNID en el día 11 de gestación, son incubados en tubos conteniendo 2 ml de Krebs durante una hora en baño térmico a 37°C con agitación constante y bajo atmósfera de 5% de CO₂ en 95 % de O₂. Previo a la incubación se agrega en el medio SIN-1 (dador de NO) (300uM), L-NMMA (inhibidor de la NOS) (300uM) o D-NMMA (300uM) según corresponda, se realizan también controles sin el agregado de ninguna droga completándose el volumen con medio de incubación.

Las prostaglandinas son extraídas una vez cumplido el período de incubación para lo cual el embrión es separado y homogeneizado para la posterior determinación de proteínas. Por otra parte el medio de incubación es llevado a pH 3.15 por agregado de CIH, luego se agrega acetato de etilo en un volumen similar y se procede a la extracción de la fase orgánica tres veces. Posteriormente lo extraído es secado bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente y almacenado a -70°C hasta la determinación de PGE mediante RIA.

Contenido de PGE

Se determina también el contenido de PGE en los embriones provenientes de cultivo o embriones obtenidos de la madre en día 11 de gestación. Los embriones son sonicados con 250 λ de PBS en tres series de 10 segundos. Luego se agrega 1 ml de alcohol etílico y se centrifuga durante 10 minutos a 2000 r.p.m. El sobrenadante es

evaporado bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, el pellet se utiliza para determinación de proteínas para lo cual se le agrega 1 ml de NaOH 0.5M. Las muestras secas se reconstituyen con PBS se acidifican a pH 3.15 y se extrae la fase orgánica con acetato de etilo, esta fase luego es secada en estufa de vacío y almacenada a -70° C para la posterior determinación de PGE por RIA.

Determinación de PGE por RIA

El ensayo de RIA es realizado según descripción previa (18), por desplazamiento de unión de la PG tisular con ^{14}C -PG exógena, reconocida mediante anti PGE-BSA como agente inmunogénico en una dilución final de 1:70. Los residuos tisulares y los reactivos fueron reconstituídos en PBS 0.01 M (pH 7.4) que contiene 0.15 de NaCl, 0.1% de BSA y 0.1% de azida sódica.

La reactividad cruzada de PGE_2 fue de 100 % con PGE_1 y menos del 0.1% con otras prostaglandinas. Los coeficientes de variación intra e inter ensayos fueron 8.2 % y 6% respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg por tubo. Los resultados son expresados como pg/ ug de proteína.

Ensayo de la actividad de la NOS

La actividad de la NOS es cuantificada en embriones controles o embriones NIDD por el ensayo de conversión de ^{14}C -arginina a ^{14}C -citrulina descripta por Bredt y Snyder (5) y modificada por Salter et al (60). Cinco embriones aislados son homogeneizados por pipeteo repetido con una pipeta de vidrio en 300 μl de buffer pH 7.4 (conteniendo HEPES 20 mM y 0.45 mM de Ca^{2+}). El homogenato es incubado luego a 37° C en presencia de ^{14}C -arginina (0.1uCi) y 0.5 mM de NADPH. Se agrega L-valina con el objeto de inhibir la actividad arginásica que implica un consumo de L-arginina derivado hacia el ciclo de la urea, inhibiéndose también la síntesis inespecífica de NO. Transcurridos 15 minutos de incubación las muestras se centrifugan por 10 minutos a 10000 g y el sobrenadante se pasa por una columna de 1 ml de Dowex AG50W-W8 de forma Na^+ equilibrada con 20mM de HEPES pH 7.4, eluyendo la ^{14}C -citrulina con 3 ml de agua. La radiactividad es medida con contador líquido de centelleo. Dado que la formación de L-citrulina a partir de L-

arginina es estequiométrica con la formación de NO se puede asumir que fue producida una cantidad equivalente de NO. La actividad enzimática se expresa en pmol/ minuto.mg de proteína.

Dosaje de nitratos- nitritos

Las concentraciones de nitratos- nitritos se dosan mediante la reacción de Griess (25), previa reducción de los nitritos a nitratos utilizando nitrato reductasa. Los nitritos obtenidos se convierten en un azo-compuesto coloreado el cual absorbe a 595 nm.

Las muestras se ubican en una ‘ placa de 96 hoyos ‘ con reactivo de Griess. El producto cromogénico es cuantificado con un lector de placas modelo BioRad.

Estadística

Todos los valores presentados en este trabajo representan la media \pm el desvío estándar (SEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante test de “t” de Student y análisis de la variancia de una vía combinado con el test de Tukey o test de Fisher cuando fue apropiado. Las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Evaluación del desarrollo embrionario de rata DNID durante la organogénesis temprana

En el día 11 de gestación se evalúa en primer término la viabilidad de los embriones (determinada por presencia de latido cardíaco) de rata DNID respecto de los controles. Estos últimos no presentan malformaciones, pero en el grupo DNID se encuentra un 5 % de casos de embriones con anormalidades severas (Fotografía 3) no compatibles con la vida (embriones en proceso de reabsorción, sin desarrollo de órganos), el resto de estos embriones son viables, morfológicamente normales, con número de somitas y porcentaje de rotación axial similares al control (tabla 1). Respecto del contenido proteico, índice de crecimiento embrionario, está disminuido en los embriones viables DNID respecto de los controles ($p < 0.01$) (Figura 1), dato que indicaría un retraso en el crecimiento de los embriones DNID.

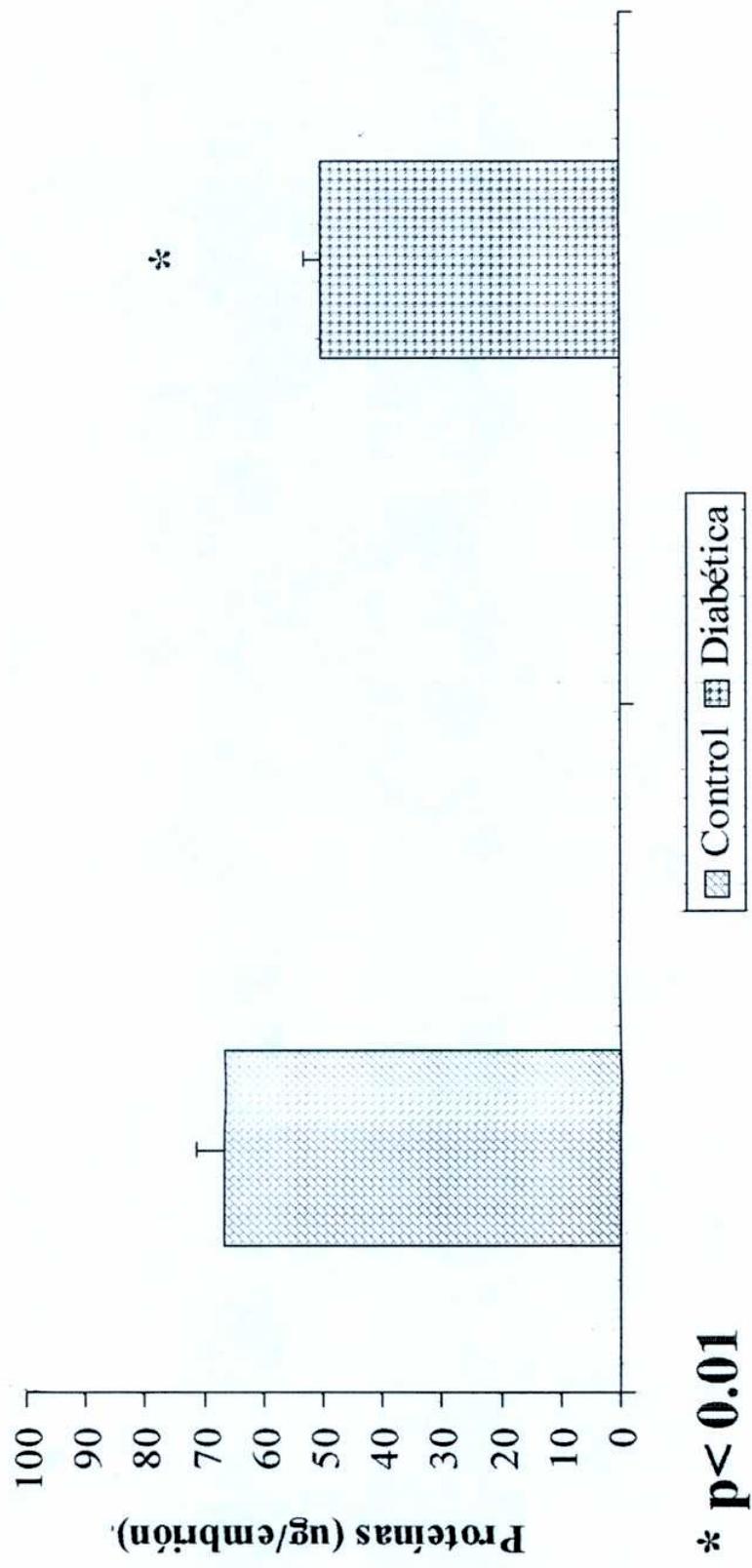
TABLA 1: Desarrollo de embriones NIDD y controles en día 11 de gestación. La rotación axial (RA) es discriminada en tres categorías (rotados, en rotación, no rotados) sobre el total de embriones viables de cada grupo.

| | Embriones control | Embriones NIDD |
|------------------------------------|-------------------------------|---|
| Número de somitas | 9.8 ± 0.7 (108 embriones) | 9.9 ± 0.7 (90 embriones) |
| RA: no rotados | 74% (80/108) | 72 % (65/90) |
| RA: en rotación | 16 % (17/108) | 18 % (16/90) |
| RA: rotados | 10 % (11/108) | 10 % (9/90) |
| Contenido proteico (ug/embrión) | 66.7 ± 4.2 (20 embriones) | 50.4 ± 2.8 * (20 embriones) * $P < 0.01$ vs. control |

Fotografía 3: Embrión viable (izquierda), embrión no viable en proceso de reabsorción (derecha).



Figura 1: Contenido de proteínas en embriones de rata control y DNID de 11 días de gestación



*Síntesis de PGE en embriones controles y DNID durante el día 11 de gestación.
Modulación por dadores de NO e inhibidores de la enzima NOS.*

Se evalúa la síntesis de PGE en embriones de rata control y DNID de 11 días de gestación liberadas al medio de incubación, siguiendo los procedimientos explicados en la sección correspondiente. La figura 2 muestra que se encuentra incrementada la síntesis de PGE en el grupo DNID ($p < 0.05$ vs Control).

En presencia de SIN-1 (donor de NO) en el medio de incubación, la síntesis de PGE se halla incrementada en ambos grupos: Control ($p < 0.01$ vs. Control sin agregados) y DNID ($p < 0.001$ vs D sin agregados) (Figura 2). Por el contrario, la presencia de L-NMMA (inhibidor de la NOS), produce un descenso en la síntesis de PGE en ambos grupos ($P < 0.05$) (Figura 3). Este efecto resulta ser específico dado que el agregado en el medio de incubación de D-NMMA en concentración similar al L-NMMA no produce efecto alguno. Estos resultados estarían indicando una probable modulación de la síntesis de PGE embrionaria mediada por el NO.

Actividad enzimática de la NOS en embriones control y DNID

Se evalúa la actividad de la NOS en embriones control y DNID durante el día 11 de gestación (Figura 4) y se encuentra que dicha actividad está incrementada en el grupo diabético ($p < 0.05$) en forma paralela al aumento de la producción de PGE determinada en este grupo.

Concentración de nitratos/nitritos en embriones de rata control y diabéticos en día 11 de gestación.

Se determinan las concentraciones de nitritos en los embriones control y DNID de 11 días de gestación (Figura 5), hallándose incrementados los valores de nitritos en el grupo diabético ($P < 0.05$ vs. Control) en forma paralela al aumento en la actividad de la NOS antes mostrado.

Figura 2: producción de PGE en embriones controles y DNID incubados durante 60 minutos en Krebs con o sin agregado de SIN-1 (300 uM).

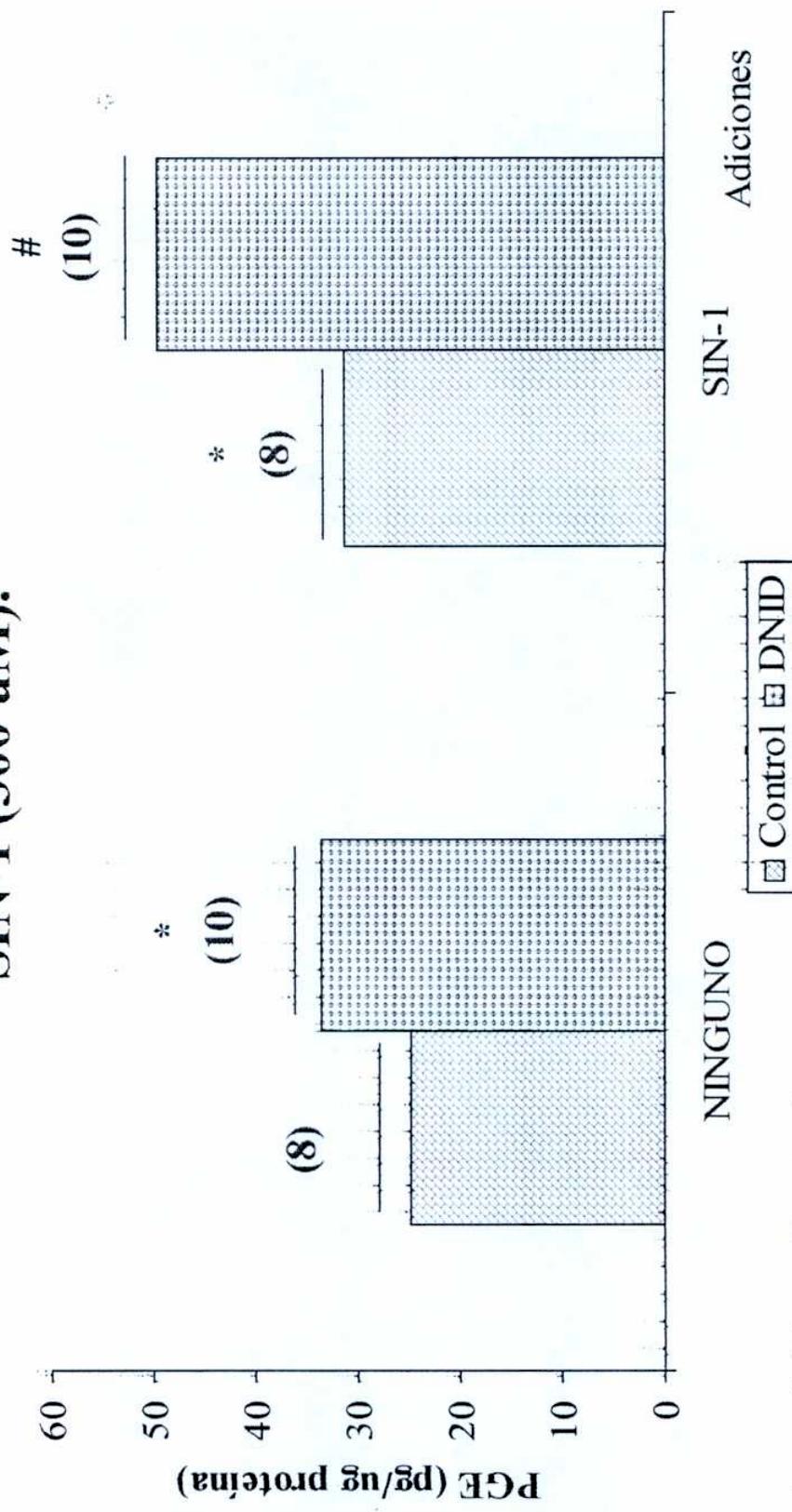


Figura 3: Producción de PGE en embriones controles y DNID incubados durante 60 minutos en kreb's con o sin agregado de L-NMMA (300 μ M) o D-NMMA (300 μ M)

* $p < 0.05$ vs control

$p < 0.05$ vs diabética

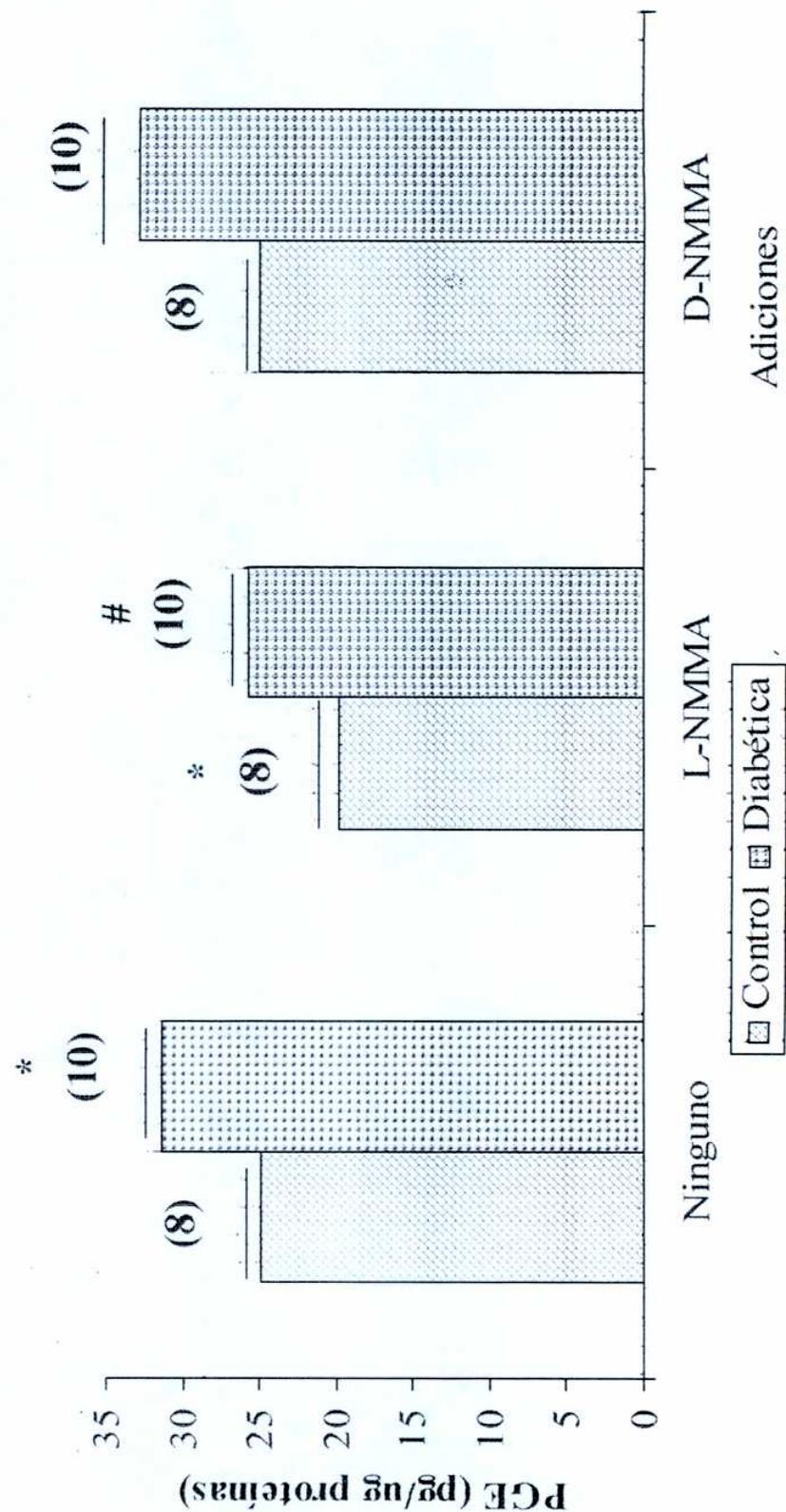


Figura 4: Actividad enzimática de la NOS en embriones de rata control y DNID de 11 días de gestación

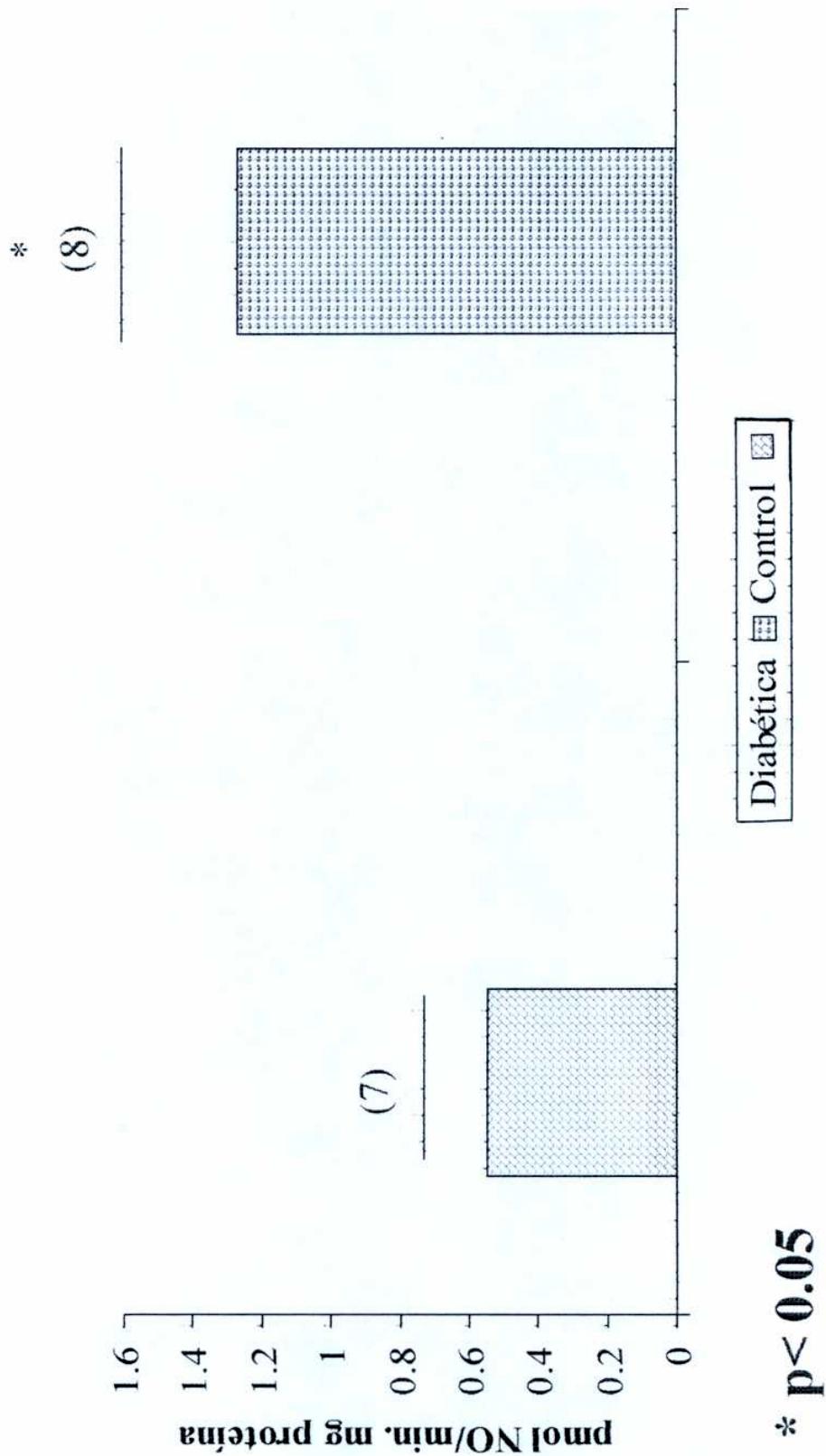
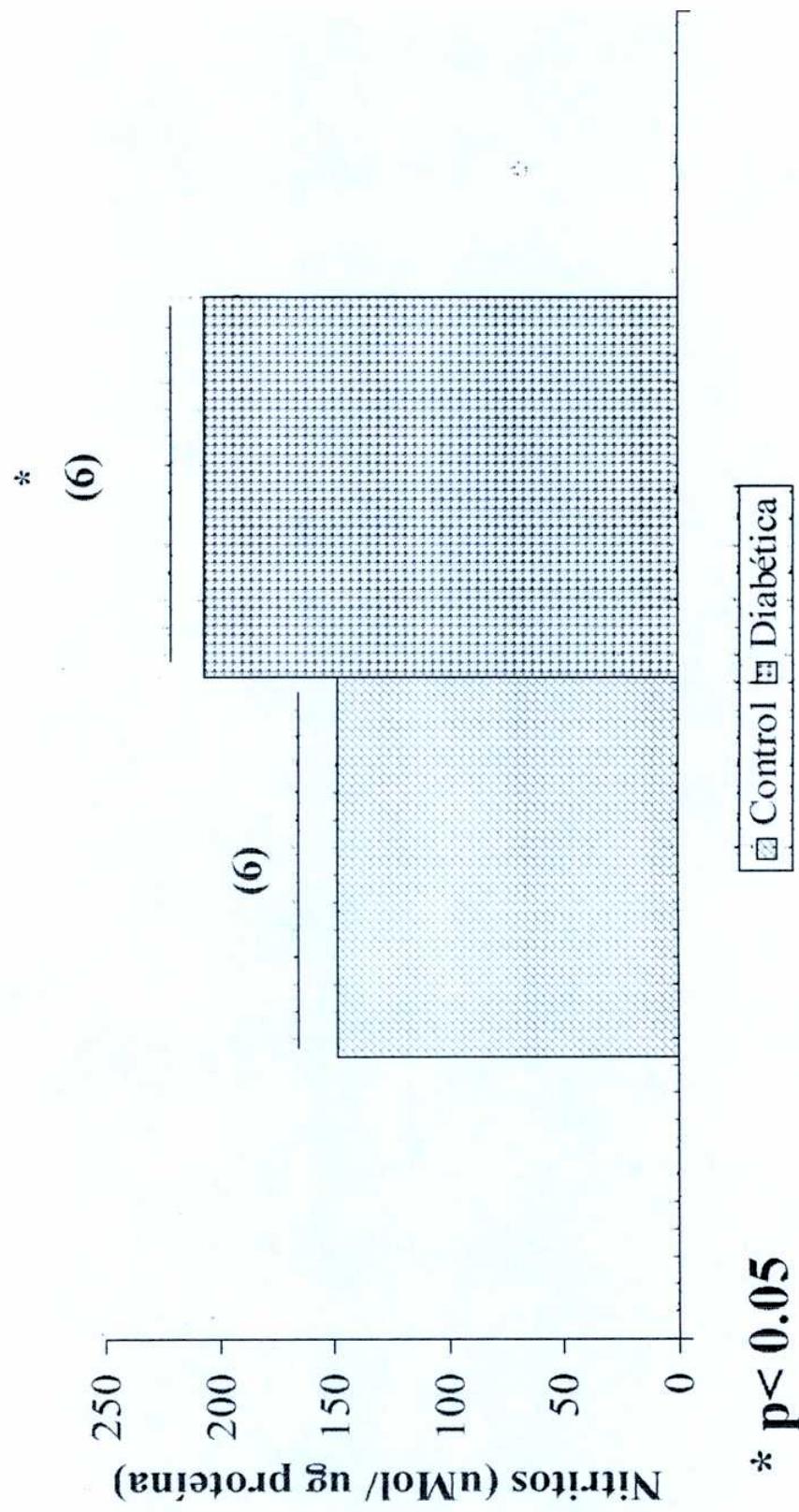


Figura 5: concentración de nitratos/nitritos en embriones control y DNID de 11 días de gestación



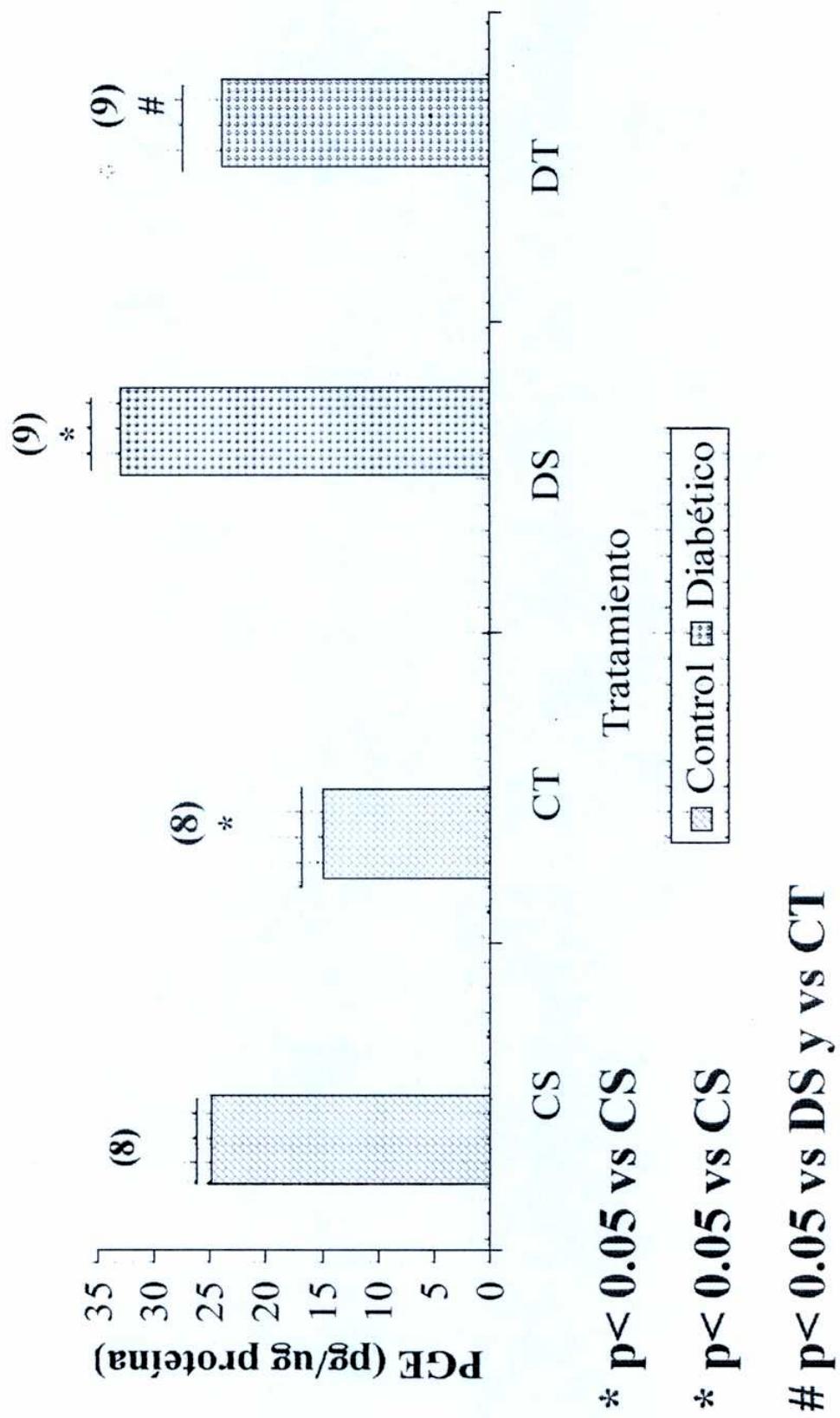
Tratamiento in vivo con L-NAME, síntesis de PGE y morfología embrionaria.

En embriones de ratas controles y NIDD tratadas intraperitonealmente con L-NAME (inhibidor de la NOS) en forma diaria desde el día 7 al 11 de gestación, se evalúa la síntesis de PGE liberada al medio de incubación, resultando estar disminuida en los grupos tratados con L-NAME respecto de su control ($p < 0.05$ vs CS, $p < 0.05$ vs DS) (Figura 6). Una vez más se verifica el aumento en la síntesis de PGE en el grupo NIDD (DS) respecto del control (CS) ($p < 0.05$).

Con respecto a la morfología embrionaria (Tabla 2) se observa un mayor porcentaje de reabsorciones en los grupos control y DNID tratados con L-NAME ($p < 0.01$ vs CS, $p < 0.05$ vs DS respectivamente); respecto el número de somitas no se observan diferencias significativas, no puede decirse lo mismo acerca de las incidencias en malformaciones en el tubo neural, donde los grupos control y DNID tratados con L-NAME presentan un alto porcentaje de defectos del tubo neural respecto del control correspondiente ($p < 0.001$ vs CS, $p < 0.01$ vs DS respectivamente) (Fotografía 4). Es de destacar que el grupo más afectado por estas anomalías resulta ser el control tratado, significativamente mayor respecto del diabético tratado ($p < 0.05$). Este aumento en la incidencia de malformaciones se produce en forma paralela al descenso en la síntesis de PGE, con lo cual podría establecerse una relación entre niveles de PGE, NO e incidencias de malformaciones, resultando que a menores concentraciones de NO y PGE los defectos en el desarrollo embrionario son mayores.

Tabla 2: Desarrollo embrionario (día 11 de gestación) en ratas controles y DNID tratadas entre el día 7 y 11 con L-NAME. Controles tratados con solución salina (CS), Controles tratados con L-NAME (CT), Diabéticos tratados con solución salina (DS), Diabéticos tratados con L-NAME (DT). * $p < 0.01$ vs CS, # $p < 0.05$ vs DS, ♦ $p < 0.001$ vs CS, • $p < 0.01$ vs DS, ♦♦ $p < 0.05$ vs CT.

Figura 6: Producción de PGE en embriones de ratas de 11 días de gestación. Control (CS), control tratado con L-NAME (CT), Diabéticos (DS), Diabéticos tratados con L-NAME (DT)





| | CS (Salina) N=8 | CT (L-NAME) N=8 | DS (Salina) N=9 | DT (L-NAME) N=9 |
|-----------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|--|
| % de reabsorciones | 0 | 11.58 * p< 0.01 vs CS | 3.2 | 10.81 # p< 0.05 vs DS |
| Número de somitas | 10.0 ± 0.8 | 11.8 ± 0.5 | 9.85 ± 0.5 | 10.4 ± 1.1 |
| Defectos en tubo neural (%) | 0 | 40 ♦ p< 0.05 vs CS | 1 | 17 • ♦ p< 0.01 vs DS y p< 0.05 vs CT |

Evaluación de la morfología de los embriones control cultivados en presencia de suero control o DNID

Se evalúa el desarrollo de los embriones control cultivados desde día 10 por 24 horas en presencia de suero normal o suero diabético (DNID), no hallándose diferencias significativas en cuanto al número de somitas o porcentaje de embriones anómalos (Tabla 3). Estos resultados mostrarian que la presencia del suero diabético durante estas 24 horas no afectaría el normal desarrollo de los embriones de rata control.

Tabla 3: Embriones de rata control cultivados con suero normal o suero diabético (DNID) desde el día durante 24 hs.

| | Suero control n=10 | Suero Diabético (DNID) n=10 |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| % de embriones anómalos | 11 | 9 |
| Contenidos de proteínas (ug/embrión) | 63 ± 4 | 51 ± 7 |
| Número de somitas | 12.8 ± 0.7 | 12.5 ± 1 |

Contenido de PGE en embriones de rata control y diabéticos de 11 días de gestación

Se dosa el contenido de PGE en los embriones de rata control y rata diabética de 11 días de gestación, hallándose incrementados los valores en el grupo DNID respecto de los controles ($p < 0.001$ vs Control) (Figura: 7), indicando esto no sólo un aumento en la PGE liberada al medio (Figuras 2,3), sino también un aumento en el contenido de prostaglandinas en el grupo DNID.

Síntesis de PGE en embriones control cultivados de día 10 de gestación durante 24 horas con suero control o DNID.

Embriones control son cultivados desde el día 10 de gestación por 24 horas en presencia de medio de cultivo adicionado con suero control o diabético, determinándose al finalizar el cultivo el contenido de PGE en los embriones de ambos grupos, no observándose diferencia significativa en los valores entre ambos grupos (Figura 8), sugiriendo la ausencia de factores séricos involucrados en la modulación de la síntesis de PGE durante este período.

Figura 7: Contenido de PGE en embriones de rata control y DNID de 11 días de gestación.

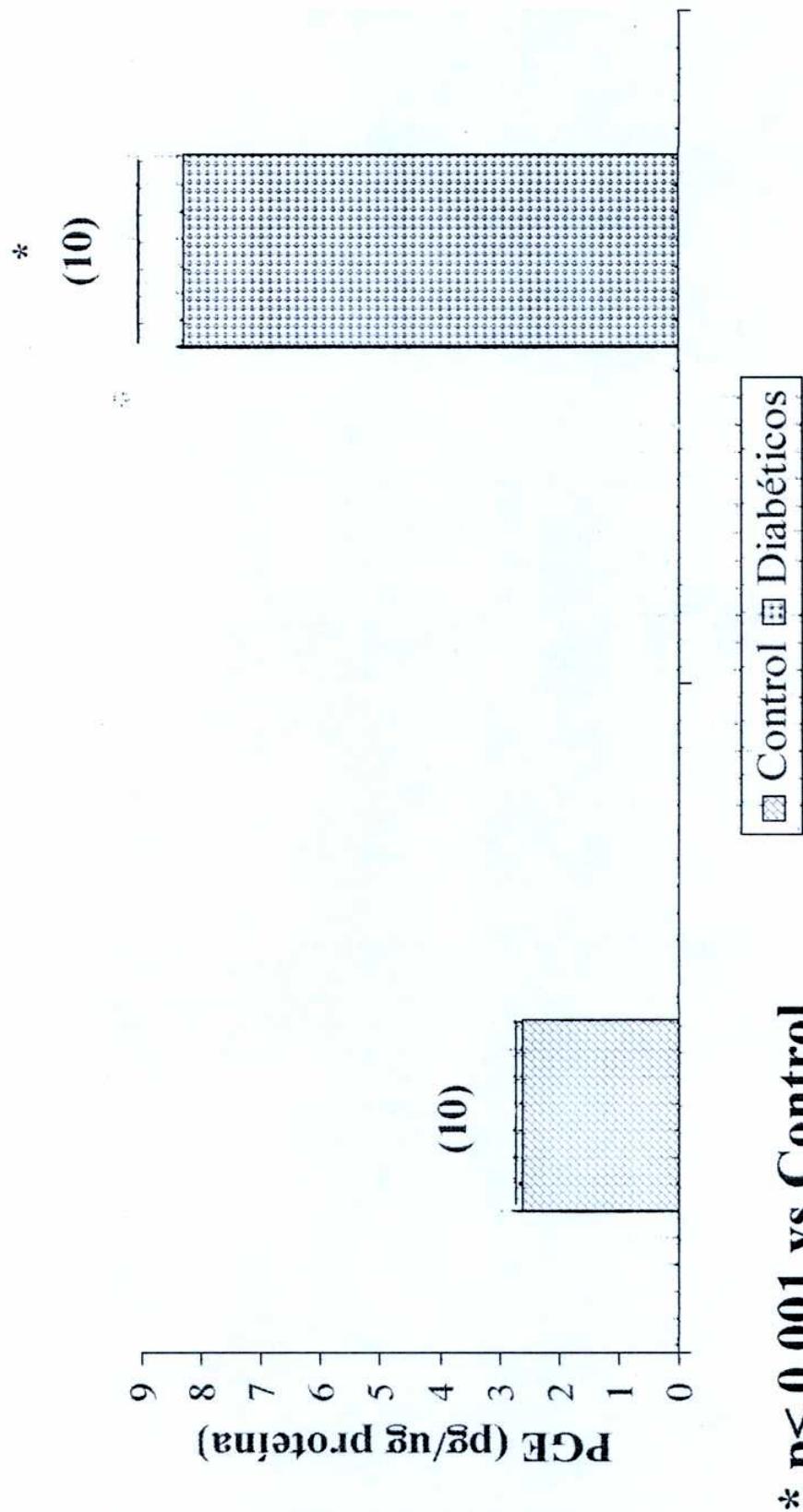
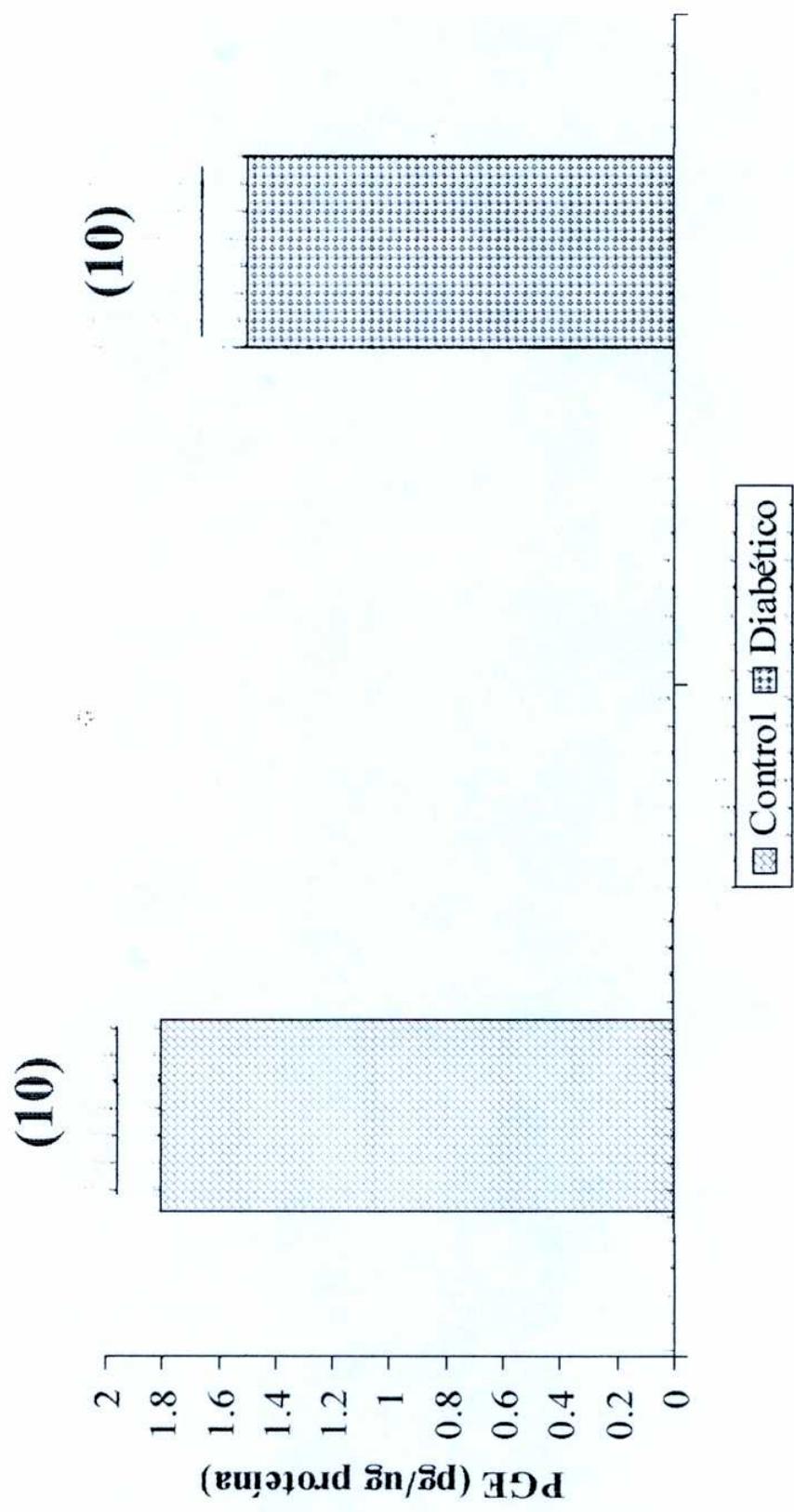


Figura 8: Contenido de PGE en embriones cultivados a partir del día 10 de gestación durante 24 horas



CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha evaluado en el modelo DNID la morfología embrionaria durante la organogénesis temprana. Se ha encontrado un porcentaje del 5% de embriones no viables probablemente por causa de malformaciones congénitas severas. El resto de los embriones resultaron ser viables, con ausencia de malformaciones, pero con retraso de crecimiento respecto de los embriones controles. En distintos modelos experimentales de diabetes insulino dependiente se observó retraso de crecimiento embrionario, al igual que en la etapa de preñez temprana en mujeres diabéticas con mal control glucémico (17).

La incidencia de malformaciones en conceptos de mujeres insulino dependientes se encuentra incrementada entre 3 y 5 veces (41). Puesto que la diabetes gestacional se desencadena en el segundo trimestre del embarazo, no se observan malformaciones, pero si la diabetes tipo II es preexistente se reportan casos de malformaciones (4).

Una gran cantidad de evidencia propone que la vía del ácido araquidónico se encuentra involucrada en la aparición de malformaciones. *In vivo*, la suplementación de ácido araquidónico disminuye la incidencia de malformaciones en embriones de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (55). *In vitro* la adición al medio de PGE previene la aparición de malformaciones en condiciones de hiperglucemia. Por otra parte en la diabetes severa los niveles de PGE embrionarios se encuentran disminuidos (54). Varios autores proponen que la suplementación de PGE en cultivo de embriones realizado en condiciones de hiperglucemia o con suero diabético protegen al embrión de malformaciones en el tubo neural (1). Según algunos estudios la deficiencia de PGE al momento de la fusión del tubo neural resulta ser crítica, estando involucrada en las fallas del cierre del mismo.

Por el contrario, en el modelo de diabetes no insulino dependiente analizado en este trabajo, los niveles de PGE se encuentran elevados en los conceptos obtenidos durante la organogénesis temprana. Se pudo verificar la ausencia de malformaciones, y probablemente el nivel elevado de PGE resulta ser protector de la dismorphogénesis ante el medio de desarrollo anómalo.

Se ha establecido previamente una relación entre NO y PGE (13), lo cual ha sido observado en varios tejidos entre ellos complejo ovocito-cumulus, placenta y útero.

También se ha visto que una sobreproducción de NO está relacionada con el aumento de prostaglandinas tanto en tejidos sanos como diabéticos (57,45,32).

Por otra parte trabajos previos han comprobado la presencia de la actividad NOS en embriones durante la organogénesis temprana (66) y se han determinado por inmunohistoquímica la isoforma nNOS en procencéfalo y médula espinal (4,7). Esta actividad debe ser regulada durante el desarrollo ya que el NO estaría implicado en procesos de morfogénesis tales como la cefálica, siendo su exceso o falta responsable de dismorfogénesis (42).

En el presente trabajo se ha hallado una relación entre PGE y NO en el embrión durante la etapa de organogénesis temprana. Se ha comprobado *in vitro* que la incubación de embriones controles y diabéticos con dadores de NO aumenta la síntesis de PGE y disminuye en presencia de inhibidores de la NOS.

A su vez la actividad de la NOS fue evaluada en embriones controles y diabéticos hallándose incrementada la misma en los embriones diabéticos, hecho que correlaciona con los valores de nitritos evaluados en ambos grupos y que resultaron ser mayores en el grupo diabético. En el mismo no sólo se halla incrementada la actividad de la NOS y los niveles de nitritos, sino también los niveles de PGE, pudiéndose establecer entonces una estrecha relación entre actividad de la NOS, los niveles de NO, y los niveles incrementados de PGE embrionarios.

El aumento en la producción de NO observado en el grupo diabético sería el responsable de la estimulación de la síntesis de PGE, lo cual resultaría beneficioso para los embriones.

Durante la preñez, estudios previos evaluaron los efectos de inhibidores de la NOS en períodos tempranos (65) resultando en la inhibición del crecimiento de los embriones o la aparición de malformaciones en extremidades.

En la experiencia realizada *in vivo* el tratamiento con L-NAME provocó un mayor índice de reabsorciones tanto en animales sanos como controles y un aumento en la incidencia de malformaciones en el tubo neural. Además resultó en una menor producción de PGE en todos los grupos tratados. En ratas diabéticas tratadas con L-NAME cuando los niveles de PGE descendieron a valores similares a los del grupo control no tratado, los defectos en tubo neural alcanzaron una gran incidencia, por lo

cual los altos valores de PGE hallados en ratas DNID sin tratar serían los responsables de la protección del embrión ante el entorno materno anómalo.

En el grupo control tratado, los valores de PGE descendieron significativamente respecto de los controles no tratados y la dismorfogénesis en tubo neural resultó ser marcada incluso mayor que en el caso de embriones diabéticos donde no son tan bajos los niveles de PGE obtenidos luego del tratamiento.

El desarrollo del embrión durante la etapa de organogénesis fue evaluado *in vitro* en presencia de suero control o suero DNID con el objeto de evaluar la existencia de factores séricos involucrados con la modulación de la síntesis de PGE. Los cultivos se realizan a partir del día 10 de gestación durante 24 horas.

La evaluación morfológica de los mismos no mostró diferencias significativas. En cuanto al contenido de proteínas no se vio modificado por efecto del suero DNID durante este lapso. Cuando se evalúa el contenido de PGE embrionario después del cultivo no se encontraron diferencias significativas con el control, lo cual parecería indicar que los incrementos en la síntesis de PGE que se observan en el embrión de rata DNID no estarían condicionados por el suero materno.

En este trabajo se ha hallado que los embriones provenientes de ratas DNID no presentan malformaciones, a diferencia de lo visto en modelos más severos de diabetes; si se observa retraso en la tasa de crecimiento durante la etapa de organogénesis temprana. Los valores incrementados de NO serían los responsables del aumento de la síntesis de PGE a través de una vía NO-prostaglandinas que modula la síntesis de PGE tanto en embriones controles como diabéticos y podría estar relacionada con la prevención de la aparición de anormalidades congénitas. Será importante entonces realizar estudios posteriores en modelos de diabetes más severos evaluando la vía óxido nítrico-prostaglandina, con el objeto de aclarar su participación en los mecanismos involucrados en la dismorfogénesis.



Débora I. SINNER



ERICA DOMA UZ



Alicia Jevetska

BIBLIOGRAFIA

1. Baker, R., Piddington R, Goldman A., Egler, J., and Mohering J. 1990 "Myo inositol and prostaglandins reverse the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos" *Diabetologia* 33: 593-596
2. Barlow, P., Owen, D.A.J. and Graham,C. 1972 "DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo" *J.Embryol. Exp. Morphol.* 27: 432-445
3. Behrman, H.R. and Romero, R.J. 1992 "Prostaglandins and prostaglandin-like products in reproduction: eicosanoids, peroxides, and oxygen radicals." 7: 238-272
4. Black SM., Bedolli MA, Martinez S, Bristow JD, Ferriero DM, Soifer SJ. 1995 "Expression of neuronal nitric oxide synthase corresponds to regions of selective vulnerability to hypoxia-ischaemia in the developing rat brain" *Neurobiol. Dis* 2:3 145-155
5. Bredt D.S., Snyder S.H. (1989) "Nitric oxide mediates Glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum" *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9030-9033
6. Brown, N., Fabro, S., 1981 "Quantitation of rat embryonic development in vitro: A morphological Scoring System" *Teratology* 24: 65-78
7. Bruning G., Mayer, B. 1996 "Prenatal development of nitric oxide synthase in the mouse spinal cord" *Neurosci Lett* 202 :3 189-192
8. Cartsen, M.e., Miller, J. 1990 Uterine function: Molecular and cellular aspects Edit Plenum Press New York and London.
9. Cockroft D.L. and Coppola P.T. 1977 "Teratogenic effects of excess glucose on head-fold rat embryos in culture" *Teratology* 16: 141-146
10. Craighead, J. 1975 "The role of viruses in the pathogenesis of pancreatic disease and diabetes mellitus" *Prog. Med. Virol.* 19:161
11. Chang, J., Musser, J.H. and McGregor, H. 1987 "Phospholipase A2: Function and pharmacological regulation" *Bioch. Pharmacol.* 36: 2429-2436
12. Chung, C.S. and Myriathopoulus N.C. 1975 "Birth defects" Original article series, ed Begsma D. Vol 11, pp 1-38
13. Di Rosa, M., Ialenti, A. Ianaro, A. And Sautebin L. 1990 Interaction between

- nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prost Leuk. & Fatty Acids* 54: 229-239
14. Ding, A.H., Nathan, C. F. and Stuehr, D.J. 1988 "Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages" *J. Immunol.* 141: 2407-2412
 15. Efendic, S., Luft, R., Wajingot, A. 1984 "Aspects of the pathogenesis of type 2 diabetes" *Endocrinol. Rev.* 5: 395
 16. Ericksson U.J. 1988 "Importance of genetic predisposition and maternal environment for the occurrence of congenital malformations in offspring of diabetic rats" *Teratology* 37: 365-394
 17. Eriksson, U.J., Styrud, J. and Eriksson R.S.M. 1985 "Diabetes in pregnancy: Genetic and temporal relationships of maldevelopment in the offspring of diabetic rat" En *Carbohydrate metabolism in pregnancy and the newborn Cap IV*
 18. Faletti A., Viggiano J.M., Gimeno M.A.F. (1995) "Beta-endorphin inhibits prostaglandin synthesis in rat ovaries and blocks induced ovulation" *Prostaglandins* 49:93-103

 19. Franchi A. M., Chaud M. Rettori, V., Suburo, A, McCann S. M., and Gimeno M.A.F. 1994 :Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen treated rat uteri" *Proc Natl. Acad Sci USA* 91: 539-543
 20. Goldblatt M.W. 1933 "A depressor substance in seminal fluid" *J. Soc. Chem. Ind. (London)* 52: 1056-1057
 21. Golde, J.A. and Chernoff, G.F. 1993 "Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice" *Teratology* 47: 73-80
 22. Goldman A.S., Baker L., Piddington, R., Marx, R, Herold, B., Egler R. 1985 "Hyperglycemia induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8227-8231
 23. Gonzalez E, Jawerbaum, A., Novaro V., Sinner, D., Gimeno MAF "Nitric oxide modulates placental prostanoid production from late pregnant non-insulin-dependent rat. *Prost Leuk & fatty acids* en prensa.
 24. Gonzalez E., Rosello-catafau J., Xaus, C., Jawerbaum, A., Novaro, V., Gomez, G, Gelpi, E., Gimeno, MAF. 1997 "Influence of nitric oxide synthase and kinin

- antagonist on metabolic parameters in chronic-streptozotocin-induced diabetes mellitus". *Prostaglandins* 53: 321-336
25. Green L.C., Wagner D.A., Glowoski J. (1982) "Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids" *Anal Biochem* 126:131-138
26. Gulyas, B. J. 1975 "A reexamination of the cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: Rotation of the blastomere pairs during second cleavage in the rabbit" *J. Exp. Zool.* 193: 235-248
27. Hebdon, R. "The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus in fluid and electrolyte handling in rats" 1986 *Clin Sci.* 70:111
28. Hibbs J. B., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Granger, D. L., Drapier, D. C., Amber, I.J., and Lancaster J.R. 1990 Synthesis of nitric oxide from a terminal guanido nitrogen atom of L-arginine: A molecular mechanism of regulating cellular proliferation that targets intracellular iron" In Nitric oxide from L-arginine a bioregulatory system" Moncada, S. and E A Higgs eds Elsevier, Amsterdam 189-223
29. Irving, W.J., MacCuish, A.C., Campbell, J., Duncan,L. 1976 "Autoimmunity and Diabetes Mellitus" *B.J.Clin.Pract* 30: 131-135
30. Jacobson, A.G. and Sater, A.K. 1988 "Features of embryonic induction" *Developmente* 104: 341-359
31. Jawerbaum A., Rosello Catafau J., Gonzalez E.T, Novaro, V., Gomez, G., Gelpi, E., Gimeno A.L. and Gimeno MAF 1997 " Eicosanoid production by placental and amnion tissues from control and non-insulin-dependent diabetic rats. Influence of oxytocin in the incubating medium" *Prost Leuk& Essential fatty acid* 56: 425- 429
32. Jawerbaum, A., Gonzalez E., Faletti, A., Novaro, V., and Gimeno, MAF 1997 "Nitric oxide mediates human chorionic gonadotrophin-induced prostaglandin E generation in rat oocyte-cumulus complexes" *Reprod. Fertil. Dev* 9: 931-934
33. Jawerbaum, A., Rosello Catafau, J., Gonzalez, E.T., Novaro,V., Gomez, G., Gelpi E., Gimeno, A.L. and Gimeno M.A.F. 1994 "Glucose metabolism triglyceride and glycogen levels, as well as eicosanoid production in islet uterine strips and in embryos in a rat model of non-insulin-dependent diabetes

- mellitus during pregnancy." *Prostaglandins* 47: 81-95
34. Junod, A., Lambert, A., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A., Renold, A. 1967 "Studies of the diabetogenic action of streptozotocin" *Proc Soc. Exper. Biol. Med.* 126: 201
35. Kandell E.R. and O'Dell T.T., 1992 Are adult learning mechanism also used for development?" *Science* 258: 243-246
36. Kenneth, K., Wu 1996 "Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase" *Advances in pharmacology*, volume 33 The University of Texas Health. Science Center at Houston, ed. (Houston Texas 77025 Department of Internal Medicine), pp. 179-206
37. Kergoat, M., Guerre-Milo, M., Lavau, M., Portha, B. 1991 "Increased insulin action in rats with mild insulin deficiency induced by neonatal streptozotocin" *Am.J. Physiol.* 260: E561
38. Knowles, R.G., and Moncada, S. 1994 "Nitric oxide synthases in mammals." *Biochemical Journal* 298: 249-258
39. Knowles, R.G., Salter, M., Brooks, S.L., and Moncada S. 1990 "Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 172: 1042-1048
40. Kobberling, J., Creutzfeld, W. 1970 "Comparison of different methods for the evaluation of the oral glucose tolerance test" *Diabetes* 19: 870
41. Kucera J. 1971 "Rate and type of congenital anomalies among offsprings of diabetic women" *J. Reprod. Med.* 7: 61-70
42. Lee Q. P. and Juchau M.R. 1994 "Dysmorphogenic effects of nitric oxide (NO) and NO synthase inhibition. Studies with intra amniotic injections of sodium nitroprusside and N- monomethyl-L-arginine" *Teratology* 49: 452-464
43. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent" *J Biol Chem* 193:265-275
44. Mallet, B, Vialettes, B., 1990 "Le diabetes gestationnel" *Diabète & Métabolism* (Paris) 16: 172-183
45. McDaniel M.L, Lwon, G., Hill J.R., Marshall, C and corbett J. A. 1996 "Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes" *Proc Soc Exp Biol Med.* 211:24-32

46. Metzger, B.E., Phelps, R.L., Freinkel, N. 1991 "Biphasic effects of maternal metabolism on fetal growth. Essential expression of fuel mediated teratogenesis" *Diabetes* 40 suppl 2 99-105
47. Miller, M.J.S., Sadowska Nowiscka, H., Chotinaruemol S., Kakkisj L., Clarck D.A. 1993 "Amelioration of chronic ileitis by NOS inhibition" *J. Pharmacol Exp Ther* 264: 11-16
48. Miller, M.J.S., Voelker, C.A., Ollster,S., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Rivera,D., Eloby-Childress, S., Lllu,X., Clark, D.A., and Pierce, M.R. 1996 " Fetal growth retardation in rats may result from apoptosis; role of peroxynitrite." *Free Radical Biology & Medicine* 21: 619-629
49. Moncada S, Palmer R. J., and Higg E. A. 1991 "Nitric oxide physiology pathophysiology and pharmacology" *Pharmacol Rev* 43: 109-142
50. National diabetes data group, Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucosa intolerance. *Diabetes* 28: 1979 1979
51. New D.A.T. 1978 "Whole embryo culture and the study with mammalian embryos during organogenesis" *Biol Rep* 53: 81-122
52. Pedersen, R.A., Wu, K. and Batakier, H. 1986 "Origen of the inner cell mass in mouse embryo. Cell lineage analysis by microinjection" *Dev. Biol.* 117: 581-595
53. Perona, R., and Wasserman P.M. 1986 "Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cell of mural trophectoderm" *Dev. Biol.* 114: 42-52
54. Piddington, R, Joyce J., Dhanasekaran, P., Baker, L. 1996 "Diabetes mellitus affects prostaglandin E₂ levels in mouse embryos during neurulation" *Diabetologia* 39: 915-920
55. Pinter E., Reece, A. Leranth, C., Garcia Segura M., Hobbins, J.C., Mahoney, J. and Naftolin F. 1986 "Arachidonic acid prevents hyperglycemia associated yolk sac damage and embryopathy" *Am. J. Obs Gynecol.* 155:4, 691-702
56. Pinter E., Reece, E.A., Leranth C. 1986 "Yolk sac failure in embryopathy due to hyperglycemia: ultrastructural analysis of yolk sac differentiation in rat conceptuses under hyperglycemic culture conditions" *Teratology* 33: 73-84
57. Rettori, V., Gimeno, MAF, Lyson K and McCann S.M., 1992 "Nitric oxide mediates norepinephrine induced prostaglandin E₂ release from the

- hypothalamus" Proc NATl Acad. Sci 89: 11543-11544
58. Rosen, P. And Hohl, C. 1984 "Prostaglandins and diabetes" Ann Clin.Res. 16: 300-313
59. Sadler T.W., 1980 "Effects of maternal diabetes on early embryogenesis II Hyperglycemia induces exencephaly" Teratology 21: 349-356
60. Salter M., Knowles R.G., Moncada S. (1991) "Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-Dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases" FEBS 291:145-149
61. Shade, D., Eaton, R., 1975 "Glucagon regulation of plasma ketone body concentration in human diabetes" J Clin Invest. 56: 1340
62. Snyder S.H., 1992 "Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters ?" Science 257: 494-496
63. Soler, N., Walsh, C and Malins, J. 1976 "Congenital malformations in infants of diabetic mothers" Q. J. Med. 45: 308-313
64. Von Euler, U. S. 1935 "Uber die spezifische blutdrucksenkende substanz des menschlichen prostata und semen blasensekretes. Klin. Wochenschr 14: 1182-1183
65. Wentzel P, Eriksson U.J. 1998 "Antioxidants diminish developmental damage induced by high glucose and cyclooxygenase inhibitors in rat embryos in vitro" Diabetes 47:4 677-684
66. Xue C., Reynolds P, and Johns R 1996 "Developmental expression of NOS isoforms in fetal rat lung: implications for transitional circulation and pulmonary angiogenesis" AM J. Physiol 270: 88-100
67. Zonana J., Rimoin, D.N. 1976 "Inheritance of diabetes mellitus" Engl. J. Med. 295: 603