

Tesis de Posgrado

Efecto de prostaglandinas, óxido nítrico y endotelina-1 sobre el metabolismo y desarrollo del embrión en oncogénesis durante la gesta diabética

Sinner, Débora Inés

2003

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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. (2003). Efecto de prostaglandinas, óxido nítrico y endotelina-1 sobre el metabolismo y desarrollo del embrión en oncogénesis durante la gesta diabética. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3561_Sinner.pdf

Cita tipo Chicago:

Sinner, Débora Inés. "Efecto de prostaglandinas, óxido nítrico y endotelina-1 sobre el metabolismo y desarrollo del embrión en oncogénesis durante la gesta diabética". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3561_Sinner.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**“Efecto de Prostaglandinas, Oxido Nítrico y Endotelina-1 sobre
el Metabolismo y Desarrollo del Embrión en Organogénesis
durante la Gesta Diabética”**

**Autora: Débora Inés Sinner
Directora: Elida T. González
Directora Asistente: Alicia S. Jawerbaum
Consejera de Estudios: Graciela Guerrero**

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Area: Ciencias Biológicas**

**Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CONICET)**

2003

358

“Efecto de Prostaglandinas, Oxido Nítrico y Endotelina -1 sobre el metabolismo y desarrollo del Embrión en organogénesis durante la Gesta Diabética”

“Effect of Prostaglandins, Nitric Oxide and Endothelin-1 on Metabolism and Development of organogenetic embryo during diabetic pregnancy”

AGRADECIMIENTOS:

Elida, por haber dirigido esta tesis, brindarme un lugar en su laboratorio y la oportunidad de iniciarme en la investigación científica.

Alicia, por brindarme sus conocimientos, guía y especialmente por darme la oportunidad de ingresar en el mundo maravilloso del desarrollo embrionario.

Ariel, por su guía en el estudio de los lípidos, sus consejos y sugerencias y una forma diferente de ver la Ciencia.

Mis profesores de la FCEyN-UBA, por brindarme todos sus conocimientos y haberme guiado a lo largo de toda la carrera con toda dedicación.

A mis compañeros en el CEFYBO:

Carolina, Verónica y Evangelina por todos los buenos momentos que compartimos a lo largo de este tiempo, las charlas, la ayuda que me brindaron en los experimentos y las tareas del laboratorio, y en la corrección de la tesis.

Marita, por su compañía, su ayuda, los mate cocidos con leche y todos sus consejos.

Elisa, por sus consejos y sugerencias. Paula, Claudia y Camila por su ayuda con los experimentos.

Karphuck, por ayudarme siempre cuando estaba en apuros técnicos. Noemí, por su buena disposición para ayudarme.

A mis compañeros en el INIBIOLP:

Matías, por toda su ayuda en la realización de experimentos, discusiones científicas, consejos y bibliografía.

Natalia, Carolina y Gisella, por el tiempo compartido, los intercambios teóricos, ayuda y amistad.

Betina por su buena predisposición, ayuda y consejos.

La Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Técnica y el programa PROGRESAR (ICMER, CHILE) que con sus aportes económicos permitieron la realización de este trabajo.

Patricia y Carlos, por su amistad y toda su ayuda, sin importar cuando, con la PC.

Mónica y Susana, por toda su paciencia y toda la ayuda que me brindaron a lo largo de tanto tiempo.

Mamá y Papá, por haberme inculcado la importancia de estudiar y por el esfuerzo que realizaron para que esto sea posible.

Mi hermano, por su ayuda con las imágenes.

Alejandro, por tanta paciencia, soporte moral, apoyo y amor a lo largo de todo este tiempo.

A todos ellos, muchas gracias de corazón.

*Tú fuiste quien formó todo mi cuerpo;
Tú me formaste en el vientre de mi madre.
Te alabo porque estoy maravillado
Porque es maravilloso lo que has hecho.
De ello estoy bien convencido.
No te fue oculto el desarrollo de mi cuerpo
Mientras era formado en lo más profundo de la tierra.
Tus ojos vieron mi cuerpo en formación;
Todo estaba escrito en tu libro.
Habías señalado los días de mi vida
Cuando aún no existía ninguno de ellos.*

ABREVIATURAS

15dPGJ₂	15 deoxy, delta ^{12,14} prostaglandina J₂
BADGE	Bisfenol A diglicidil éter
BSA	Seroalbúmina bovina
Ca ²⁺	Calcio ²⁺
Ci	Curie
COX	Ciclooxigenasa
ET	Endotelina
GMPc	Guanosin 3',5'-monofosfato cíclico
IP₃	Inositol trifosfato
i. p.	Intraperitoneal
L-NMMA	N-mono-metil-L-arginina
LPS	Lipopolisacárido
LTB₄	Leucotrieno
Min	Minutos
NO	Oxido Nítrico
NOS	Sintasa de Oxido Nítrico
PBS-T	Buffer fosfato salino adicionado con detergente Tween 20%
PG	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandina E₂
PGI₂	Prostaciclina
PPAR	Receptor nuclear activado por factores de proliferación peroxisomal
RIA	Radioinmunoensayo
SIN-1	3-morfolino-sidnomo-hidroclorido
SOD	Superóxido dismutasa
TBq	TeraBecquerel
TZD	Tiazolidinedionas

Índice

	Página
Resumen.....	I
Abstract.....	II
Introducción.....	1
⇒ El embrión durante la organogénesis temprana	1
⇒ Diabetes Mellitus	8
Modelos experimentales de diabetes	12
Preñez y diabetes	13
El embrión de madre diabética	15
⇒ Endotelinas	
Síntesis y funciones de las Endotelinas	17
Endotelinas durante el desarrollo embrionario	19
⇒ Óxido Nítrico	
Síntesis de óxido nítrico	21
Funciones biológicas	22
Óxido nítrico y organogénesis	24
⇒ Prostaglandinas	
Síntesis y Funciones de las Prostaglandinas	25
Funciones Biológicas de las Prostaglandinas	29
Prostaglandinas en la Diabetes Mellitus	30
Prostaglandinas en el desarrollo embrionario durante la organogénesis temprana	31
⇒ Lípidos	
Clasificación	34
Funciones Biológicas	36
Prostaglandinas y lípidos	37
Lípidos y Diabetes	37
Lípidos en el desarrollo embrionario	38
Factores de transcripción relacionados con el metabolismo de los lípidos	40
Objetivos e hipótesis de trabajo.....	44
Materiales y Métodos.....	46
<i>Materiales</i>	46
<i>Animales</i>	47
<i>Soluciones</i>	47
<i>Métodos</i>	
⇒ Modelos experimentales de diabetes	49
Diabetes tipo I	49
Diabetes tipo II	49
⇒ Determinaciones séricas	
Determinación de niveles de glucosa sanguínea	50
Obtención de sueros	50
Determinación de triacilglicéridos séricos	51
⇒ Determinaciones embrionarias	
Incubaciones embrionarias	51
Determinación de proteínas embrionarias	52
Determinación del contenido embrionario de ET-1	52
Determinaciones de PGE embrionaria	53
Evaluación del transporte de ³ H-PGE ₂	54
Determinación de nitratos/nitritos embrionarios	55
Análisis de masa y síntesis de lípidos	56

Indice

Determinación de niveles y producción embrionaria de 15dPGJ ₂	59
Cultivo de embriones	59
Expresión de PPAR γ , PPAR β/δ y las enzimas cicloxigenasa I y II	60
⇒ Estadística	63
Resultados	64
⇒ <i>Capítulo I: Características generales de los modelos de diabetes tipo I y tipo II</i>	64
Características morfológicas de los embriones provenientes de ratas sanas, diabéticas tipo I y tipo II	66
⇒ <i>Capítulo II: Endotelinas en la organogénesis temprana del embrión de rata sana y diabética</i>	71
Niveles de endotelinas en embriones de ratas sanas y de ratas diabéticas tipo II	71
Efecto de óxido nítrico sobre los niveles de ET-1	72
Influencia de ET-1 sobre la generación de óxido nítrico	76
Efecto de ET-1 sobre la síntesis de PGE ₂	78
Niveles de ET-1 y su modulación en el embrión proveniente de rata diabética tipo I	79
⇒ <i>Capítulo III: Prostaglandina E₂ durante la organogénesis de los embriones de ratas sanas y de ratas diabéticas: Niveles y mecanismos de modulación</i>	85
Sección IIIa: PGE₂: Síntesis y transporte en el embrión de rata diabética tipo I	85
Estudios <i>in vitro</i> durante la organogénesis temprana	85
Niveles de PGE ₂ en embriones de ratas diabéticas tipo I y embriones sanos en presencia de suero diabético	86
Síntesis, contenido y liberación de PGE ₂ en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I	87
Captación y liberación de ³ H-PGE ₂	89
Sección III b: Efecto de óxido nítrico sobre la síntesis de Prostaglandina E₂ embrionaria	92
Sección III c: Expresión de las isoformas constitutiva e inducible de la enzima COX en el embrión de rata sana y diabética durante la organogénesis	95
⇒ <i>Capítulo IV: "Metabolismo lipídico en embriones de ratas sanas y diabéticas durante la organogénesis temprana"</i>	98
Sección IV a: Niveles de lípidos en embriones de ratas sanas y diabéticas	98
Sección IV b: Síntesis de lípidos a partir de precursores radioactivos	
¹⁴ C-Acetato de sodio	104
¹⁴ C-Acido Oleico	109
⇒ <i>Capítulo V Influencia de la 15dPGJ₂ sobre el metabolismo de lípidos embrionario</i>	112
Efectos de 15dPGJ ₂ sobre la masa de lípidos embrionaria	112
Síntesis de lípidos a partir de ¹⁴ C-Acetato de sodio y efectos de 15dPGJ ₂	115
Niveles embrionarios de síntesis y liberación de 15dPGJ ₂	122
Efecto de agonistas de PPAR γ sobre la síntesis de lípidos	123
Expresión de los factores de transcripción PPAR γ y PPAR β/δ	127
Discusión	130
Conclusiones	148
Bibliografía	152

RESUMEN

El entorno diabético durante la preñez provoca alteraciones en el desarrollo del embrión, sin embargo los mecanismos subyacentes no han sido totalmente clarificados.

En este trabajo hemos analizado los efectos de algunos agentes vasoactivos, sobre el desarrollo y metabolismo del embrión de rata durante la organogénesis en dos modelos diferentes de diabetes inducida por estreptozotocina. Ambos modelos presentan anomalías morfológicas y retardo en el crecimiento embrionario, siendo más severo el cuadro en el modelo de diabetes tipo I. En el embrión de rata diabética tipo II, se hallaron niveles incrementados de Endotelina 1 (ET-1) y de Oxido Nítrico (NO), compuestos que se regulan negativamente entre sí. En forma diferente el embrión de rata diabética tipo I, presenta niveles disminuidos de ET-1 e incrementados de NO, y no existe modulación entre ambos compuestos. A su vez, estos embriones presentan anomalías en el contenido y la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) debido a alteraciones en el transporte de dicho prostanoide.

La síntesis de lípidos embrionarios es un mecanismo activo, proceso que se encuentra alterado en el embrión de rata diabética, siendo dicha anomalía más severa en el modelo tipo I, la cual es revertida por acción de PGE₂ y acentuada por 15 deoxi delta 12,14 prostaglandina J₂ (agonista del receptor nuclear PPAR γ), ambos moduladores del metabolismo lipídico.

Los resultados permiten afirmar que, en respuesta al grado de severidad del entorno materno diabético, se afecta la síntesis, producción y regulación de agentes vasoactivos que alteran en forma directa el desarrollo del embrión.

Palabras Claves: Embrión, Prostaglandina E₂ (PGE₂), 15 deoxi delta^{12,14} Prostaglandina J₂ (15dPGJ₂), Oxido Nítrico (NO), Endotelina-I (ET-1), Lípidos, Diabetes Mellitus

ABSTRACT

During pregnancy, diabetic milieu induces anomalies on embryonic development, although underlying mechanisms still remain unclear.

In this work we have analyzed the effects of vasoactive agents on embryonic development and metabolism during organogenesis in two different models of diabetes induced by streptozotocin. Both models show morphological anomalies and delayed embryonic growth, being this condition worse in diabetes type I. Increased levels of Endothelin-1 (ET-1) and Nitric Oxide (NO) were found in embryos from diabetic type II rats, where there is a negative modulation between both agents. Differently, embryos from diabetic type I rats show diminished levels of ET-1 and increased levels of NO and no modulation between both compounds. In addition, these embryos show anomalies in embryonic levels and production of Prostaglandin E_2 (PGE_2) because of the transport alterations of this prostanoid.

Embryonic lipid synthesis is an active mechanism, that is impaired in diabetic embryo, being more severe in type I model. This alteration is reverted by PGE_2 and accentuated by 15 deoxy delta^{12,14} prostaglandin J_2 . (an agonist of nuclear receptor $PPAR\gamma$), both modulators of lipid metabolism.

This results let us to state that, according to severity of maternal diabetic milieu, synthesis, production and regulation of vasoactive agents are affected, altering directly the normal embryonic development.

Key words: *Embryo, Prostaglandin E_2 (PGE_2), 15 deoxy delta^{12,14} Prostaglandin J_2 (15dPGJ₂), Nitric Oxide (NO), Endothelin-1 (ET-1), Lipids, Diabetes Mellitus*



Introducción

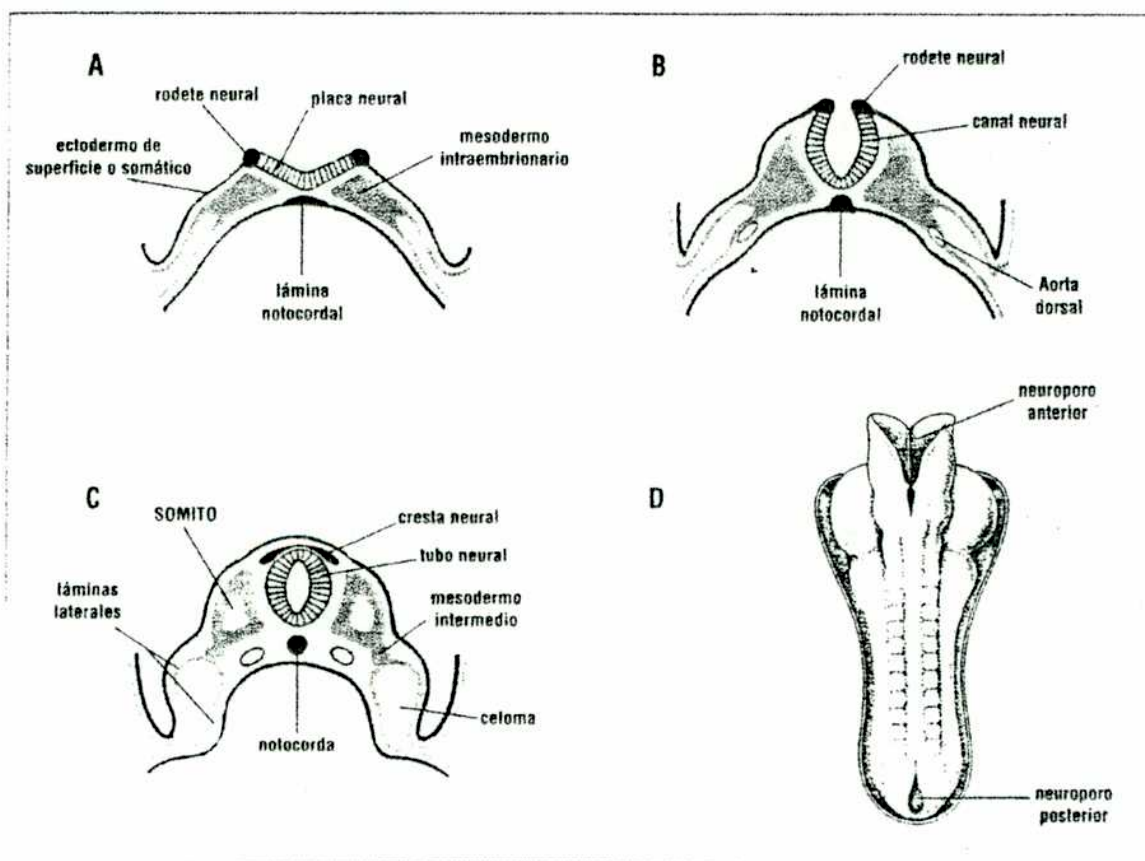
INTRODUCCION

❖ El embrión durante la organogénesis temprana

El período de organogénesis temprana es una etapa de grandes cambios en el embrión en desarrollo. Durante este período se inicia la formación de diferentes órganos y sistemas, al igual que se produce la segmentación del mesodermo, la formación de los arcos branquiales y la migración de las células de la cresta neural.

Esquema N° 1

"Fases del desarrollo del tubo neural"



Referencias: A fase de placa neural; B fase de canal neural; C fase de tubo neural; D embrión humano de 23 días antes del cierre de los neuroporos anterior y posterior.

Tomado de "La piel y el sistema nervioso" Lluís Puig Sanz (1998) Editorial Mra

Un evento importante es la formación del tubo neural, (esquema Nº 1) ya que éste constituye el rudimento del sistema nervioso central. Este proceso es conocido como neurulación. En roedores se postula que la misma se produce por un proceso combinado, entre neurulación primaria y secundaria, aunque esta última se limitaría solamente a la región caudal. La neurulación primaria comienza con la interacción del cordomesodermo y las células del ectodermo ubicadas por encima del mismo. Estas darán origen al tubo neural, el cual posteriormente se diferenciará en cerebro y médula espinal.

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) las posicionadas externamente, que darán origen a la epidermis; c) las células de cresta neural, ubicadas entre las que darán origen al tubo neural y las que darán origen a la epidermis, que migrarán y generarán diferentes tipos celulares.

Como resultado de las interacciones cordomesodermo-ectodermo se originará la placa neural. La misma sufre extensión convergente por intercalación de células. Como resultado la placa se estira y estrecha (Jacobson y Sater, 1988). 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, mientras que 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 abierto. Estas aberturas son denominadas neuroporo anterior y neuroporo posterior.

En mamíferos el cierre del tubo neural se produce en varios lugares simultáneamente (Golden y Chernoff, 1993) a lo largo del eje antero posterior. Distintos defectos en el tubo neural ocurren cuando este no se cierra en algún punto. La falla en el cierre del tubo neural en la región posterior da origen a la condición denominada espina bifida. La severidad de esta condición depende de la extensión de médula espinal que permanezca abierta. La falla en el cierre del tubo neural en la región anterior origina una condición letal: anencefalia. En este caso el prosencéfalo permanece en contacto con el líquido amniótico y posteriormente degenera. Estos tipos de anomalías son comunes en humanos y presentan una frecuencia

alta cercana a 1 por cada 500 nacimientos.

Como antes se mencionó, parte del proceso de formación del tubo neural en roedores es producto de la neurulación secundaria. Esta consiste en la formación de un cordón celular medular, el cual se ahueca por cavitación para formar el tubo neural (Schoenwolf, 1991). Se ha descrito que este proceso tiene lugar en la zona caudal del tubo en formación, a nivel de la somita 35 (Schoenwolf, 1984; Nievelstein y col, 1993).

En un paso posterior, el tubo neural comienza a diferenciarse. La porción anterior sufre cambios drásticos, allí se forman tres vesículas primarias (prosencefalo, mesencefalo y romboencefalo) que originarán distintas regiones del cerebro.

A medida que se produce el cierre del tubo neural las células de la cresta neural comienzan a migrar. En mamíferos las células de la región craneal, comienzan su migración antes de que se cierre el tubo neural, cuando los pliegues neurales están elevándose, mientras que las células de la región espinal no migran hasta que se complete el cierre del tubo neural en esa región. (Nichols y col, 1981; Erickson y col, 1983). Las células de cresta neural migran siguiendo diferentes patrones a través de todo el embrión originando diferentes tipos celulares. Las distintas regiones de la cresta neural según su ubicación a lo largo del eje neural, en sentido anteroposterior, son designadas como cefálica, vagal, troncal y lumbosacral. Como ejemplos de los derivados de las células de cresta neural se pueden mencionar a la mayoría de las neuronas y las células gliales de los ganglios sensoriales y autónomos del sistema nervioso periférico o el sistema nervioso entérico. Las células de la cresta neural cefálica, ubicadas a nivel del diencefalo, darán origen al “mesoectodermo”, que incluye la dermis facial y cefálica y su tejido conectivo, al músculo liso de la pared del tronco arterioso y de las largas arterias derivadas de los arcos aórticos, y al tejido conectivo del timo y las glándulas paratiroides (Le Douarin, 1982; Gilbert, 1997) (esquema N° 2).

Introducción

Esquema N°2

“Derivados de las células de cresta neural”

Derivado	Tipo celular o estructura derivada
Sistema nervioso periférico	Neuronas, incluyendo ganglios sensoriales, simpáticos y parasimpáticos. Células Neurogliales Células de Schwann
Derivados Endócrinos y Paraendócrinos	Médula Adrenal Células secretoras de Calcitonina Células tipo I del Cuerpo Carotideo
Células Pigmentadas	Células epidermales pigmentadas (Melanocitos)
Cartílago y Hueso Facial	Cartílago y huesos faciales y ventrales anteriores del cráneo
Tejido conectivo	Endotelio y estroma de la cornea Papila dental Dermis, músculo liso y tejido adiposo de la piel de la cabeza y el cuello Tejido conectivo de las glándulas salivares, lagrimales, timo, tiroides, y pituitaria. Tejido conectivo y músculo liso de grandes arterias derivadas de arcos aórticos

Tomado de “Developmental Biology” 5th Edition Scott F. Gilbert (1997) Editorial Sinauer

Otra característica de la organogénesis temprana es la formación de las somitas. Estas se originan a partir de bandas de células mesodérmicas, (que pertenecen al mesodermo paraxial) ubicadas a cada lado de la notocorda, que se compactan y se separan en bloques. Las somitas son estructuras transitorias que 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. Desde un punto de vista práctico el número de somitas, junto con otras características morfológicas, permite definir el estadio de desarrollo (Kaufman y Bard, 1999).

El primer órgano funcional que aparece durante el desarrollo embrionario y específicamente durante la organogénesis temprana es el corazón. Este órgano forma parte del sistema circulatorio, integrado además por las células sanguíneas, y una complicada red de vasos sanguíneos. La importancia en la aparición temprana de este sistema se fundamenta en el hecho de que el paulatino aumento en la masa del embrión hace que la simple difusión de los nutrientes se vuelva insuficiente para las necesidades del organismo en formación.

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 constituida por el endocardio y el epimiocardio. A medida que avanza el proceso de la neurulación, el intestino primitivo queda encerrado por el plegamiento del mesodermo esplácnico. Este movimiento favorece al acercamiento de los tubos que darán origen al corazón. Como primera medida se fusiona el epimiocardio y posteriormente el endocardio, formándose así una cámara simple pulsátil. La región posterior no fusionada del endocardio dará origen a la abertura de las venas vitelinas. Estas venas transportarán los nutrientes desde el saco vitelino hacia el seno venoso. La sangre luego pasará dentro de la región atrial a través de una válvula. Finalmente las contracciones del tronco arterioso empujarán la sangre hacia la aorta.

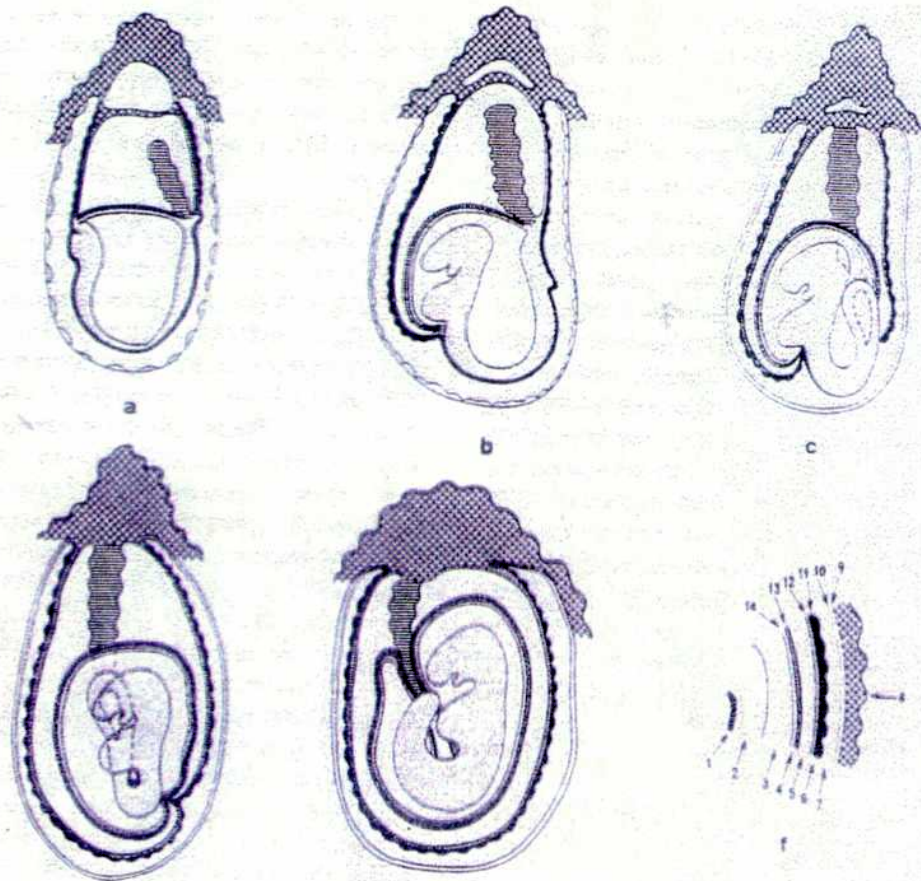
La actividad pulsátil del corazón comienza antes de que éste adquiera su conformación definitiva, durante el proceso de fusión de los dos tubos. El marcapaso de esta actividad es el nodo senoauricular del seno venoso.

El corazón tubular debe sufrir aún otros cambios para llegar a su forma definitiva. Esta cámara tubular se divide primero en un atrio y un ventrículo, luego el tubo se contorsiona en forma de “S”, y se forman los tabiques que separan a cada cámara en lado derecho e izquierdo. A su vez se desarrollan las válvulas, las cuales impedirán el flujo retrógrado de la sangre. Algunas de las anomalías congénitas relacionadas con un desarrollo cardíaco alterado incluyen defectos en la formación del tabique ventricular, hiperplasia cardíaca malformaciones de las válvulas y anomalías en el tracto de flujo de salida de la sangre. Esta última es una de las características del síndrome de DiGeorge, el cual es común en humanos con una frecuencia de 1: 4000 por cada nacimiento vivo (Epstein y Buck, 2000).

En roedores, otro evento que se produce durante este período es la rotación del embrión respecto de su eje axial. Como resultado de este proceso, se produce un cambio en la orientación del embrión y la configuración de las membranas extraembrionarias, puesto que éste gira dentro de sus membranas, quedando completamente rodeado por el amnios y periféricamente por el saco vitelino. La presencia de este evento es evaluada como una característica de esta etapa de desarrollo embrionario (Esquema N° 3).

Esquema N° 3

“Rotación del embrión respecto del eje axial”



Referencias 1 Endodermo embrionario, 2 Ectodermo embrionario + mesodermo, 3 Cavity Amniótica, 4 Amnios, 5 Cavity exocelómica, 6 saco vitelino, 7 Cavity del saco vitelino, 8 Cono ectoplacental y derivados del trofoectodermo, 9 Membrana de Reichert, 10 Endodermo parietal, 11 Endodermo visceral, 12 Componentes extraembrionarios mesodermales del saco vitelino, 13 Componente mesodermal del amnios, 14 Componente ectodermal del amnios.

Tomado de “The anatomical basis of mouse development” MH Kaufman y JBL Bard (1999) Academic Press Harcourt Brace & Company, Publishers.

La nutrición del embrión vertebrado se logra a través de diferentes estrategias. Todas las especies poseen saco vitelino, pero su función y morfología es variable. En algunos grupos como los reptiles y aves, este saco contiene el vitelo, el cual posee sustancias proteicas y lipídicas, que servirán al embrión como alimento y material estructural. En ciertos mamíferos, como los roedores, se habla de saco vitelino invertido, ya que si bien no contiene vitelo, su superficie absortiva se orienta hacia el tejido decidual materno, absorbiendo los nutrientes maternos durante las primeras etapas del desarrollo (Jollie, 1990). Esta función es llevada a cabo por la capa endodérmica visceral del saco vitelino, la cual es un epitelio con funciones de transporte. Estudios *in vitro* mostraron la importancia de este epitelio para el normal desarrollo de los embriones de roedores, mediando en forma selectiva la transferencia de macromoléculas al embrión en desarrollo (Payner y Deuchar, 1972; Freeman y col, 1981). Esta función nutritiva precede al establecimiento de la circulación embrionaria y a la placentación, que luego contribuirán a la nutrición y a la respiración.

En humanos, la situación respecto del saco vitelino es diferente, puesto que rápidamente se establece la placentación corioalantoidea, y el saco vitelino queda reducido a una pequeña membrana adherida a la placenta.

Durante la organogénesis de los vertebrados, la primera circulación existente es la vitelina, originada dentro del saco vitelino. En este período ocurre un cambio de gran importancia en la nutrición histotrófica del embrión, que pasa a ser hemotrófica (Moore, 1982).

Diversos estudios han demostrado diferentes funciones del saco vitelino en la nutrición de los embriones, tales como la síntesis y ensamblado de lipoproteínas, y el transporte de distintas sustancias hidrofóbicas como lípidos y vitaminas liposolubles hacia el embrión. Este transporte se realiza por liberación a la cavidad exocelómica en un principio, o a través de la circulación vitelina más adelante (Terasawa y col, 1999; Farese y col, 1996).

❖ Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica que afecta, según informes de la Sociedad Argentina de Diabetes y la American Diabetes Association (2002), al 7-9% de la

población. Existen dos tipos principales: tipo I o insulino dependiente y tipo II o no insulino dependiente, siendo la primera la más severa.

Diabetes tipo I: la causa primaria de la patología es la destrucción de las células β pancreáticas, que conduce a un déficit absoluto de insulina. En general, este daño es la consecuencia de un proceso autoinmune que puede ser detectado por la presencia de anticuerpos. En otros casos, donde no se identifican anticuerpos y la etiología no es conocida, se habla de Diabetes Idiopática (Gavin y col, 2002).

La predisposición a padecer diabetes tipo I mediada por procesos autoinmunes es hereditaria (Zonana y col, 1976); el gen responsable de la susceptibilidad se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en el complejo mayor de histocompatibilidad. El proceso que genera la diabetes se inicia generalmente durante la niñez o adolescencia, tras una infección viral común que alteraría las células β pancreáticas de forma tal que son reconocidas como extrañas por el sistema inmune (Craighead y col, 1975). El ataque autoinmune parece iniciarse con el desconocimiento de las células alteradas por parte de los macrófagos. Sucesivos eventos posteriores llevarán a una disminución en la secreción de insulina, invasión linfocitaria y lisis casi total de las células β pancreáticas (Nacional Diabetes Data group, USA, 1979)

Como consecuencia existirá una deficiencia total en la producción de insulina acompañada por una relación alterada de glucagon/insulina, puesto que no hay daño en las células α pancreáticas (productoras de glucagon) que a su vez incrementan su número, luego de la muerte de las células β (Efendic y col, 1984). Ante la falta de insulina, se verá impedida la utilización de glucosa por parte de los tejidos, y existirá una sobreproducción de glucosa hepática. El organismo se verá forzado a la utilización de sus reservas lipídicas como fuente alternativa de energía, camino metabólico que origina intermediarios tóxicos tales como cuerpos cetónicos, cuyos niveles se elevarán en plasma y se evidenciarán en orina.

El tratamiento del paciente diabético tipo I consiste en la administración de insulina. La dosis de insulina a utilizar dependerá de la respuesta glucémica propia de cada paciente a la ingesta de alimentos y al ejercicio. En general se requiere de al menos tres aplicaciones de insulina diarias para alcanzar niveles euglucémicos. Por otra parte, el tipo de insulina a

Introducción

aplicar puede ser de corta, mediana o larga acción, pero en general se utiliza una combinación de las mismas, determinada según las necesidades del paciente.

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, la ganancia en peso y la instalación de la obesidad (Nacional Diabetes Data group, USA, 1979). 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 (Efendic y col, 1984). En los últimos años la tendencia al descenso en la edad de los pacientes que padecen de este tipo de patología es creciente, a tal punto que hay niños de corta edad que padecen esta enfermedad (Marx, 2002).

En los inicios de la diabetes tipo II los niveles de glucosa en ayunas pueden no estar alterados, con lo cual la existencia de la patología debe comprobarse con curvas de tolerancia a la glucosa (Metzger y col, 1991).

Una vez establecida la patología, algunas de las alteraciones que se presentan son resistencia periférica a la insulina, deficiencia en la secreción de insulina, curvas alteradas de tolerancia a la glucosa, y defecto en la supresión de producción de glucosa hepática por hiperglucemia. Los niveles de glucagon son elevados, y los cambios metabólicos existentes son característicos de un estado catabólico con lo cual se encuentran alterados los niveles de la mayoría de los metabolitos, tales como glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y cuerpos cetónicos (Nacional Diabetes Data group USA, 1979).

Si bien en esta patología siempre se consideró la influencia genética y la ambiental, recientemente se establecieron algunas bases bioquímicas. Básicamente, se cree que el exceso de triacilglicéridos y ácidos grasos de cadena larga interferirían en el proceso de translocación de receptores de glucosa a la membrana celular (McGarry, 2002). De esta forma, se altera el mecanismo de acción de la insulina, sobre la captación de glucosa en tejidos periféricos.

Con el tiempo, muchos pacientes diabéticos tipo II se vuelven dependientes de insulina. Esto se debe al deterioro creciente en la función de las células β pancreáticas, que finalmente mueren. Un mecanismo por el cual se produciría la muerte de estas células, sería a través de ácidos grasos de cadena larga que estimularían la actividad de la enzima Oxido Nítrico Sintasa (NOS) y la síntesis de ceramidas, lo cual en forma conjunta o independiente provocaría la apoptosis de las células β (Unger y Orci, 2001).

El tratamiento de la diabetes tipo II puede ser dietario, con secretagogos que estimulan la secreción de insulina, o mejorando la resistencia periférica a la hormona y el perfil metabólico. En algunos casos, sería necesario el tratamiento con insulina, con dosis dependientes del estado metabólico del paciente.

Los tratamientos tradicionales para la diabetes tipo II incluyen terapias con compuestos tales como las sulfonilureas y las biguanidas.

El efecto de las sulfonilureas es estimular la síntesis de insulina en las células β pancreáticas. Por otra parte, el efecto de las biguanidas es suprimir la liberación de glucosa hepática, logrando de esta forma el descenso en los niveles de glucosa.

Como alternativa a estos tratamientos tradicionales, surgieron recientemente las tiazolidinedionas (TZD). A diferencia de lo descripto para las drogas anteriores, el efecto de las TZD es neutralizar la resistencia periférica a la insulina, estimulando el metabolismo de la glucosa. Estas drogas no solo corrigen la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, sino que además, disminuyen los niveles plasmáticos de triacilglicéridos. Los efectos hipoglucemiantes de las TZD, se lograrían a consecuencia de una mayor captación y utilización de la glucosa por los órganos periféricos, mediada por insulina (Kersten y col, 2000).

Diferentes drogas integran la familia de las TZD, entre ellas se encuentran Troglitazona y Rosiglitazona. Una característica especial que poseen estos compuestos, es que son agonistas del receptor nuclear activado por factores de proliferación peroxisomal gamma (PPAR γ) (Lehmann y col, 1995), el cual promueve la transcripción de genes involucrados en la diferenciación del tejido adiposo y en el metabolismo y transporte de ácidos grasos.

Como antes mencionamos, un mecanismo propuesto para la resistencia a la insulina, es a través de alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga. Se postula que las TZD, actuarían sobre el metabolismo de lípidos, especialmente favoreciendo la acumulación de ácidos grasos en el tejido adiposo e impidiendo su liberación, así como disminuyendo la secreción hepática de triacilglicéridos (Oakes y col, 2001). De esta forma, al mejorar el metabolismo de lípidos, se corregiría la falla en el metabolismo hidrocarbonado.

Si bien se considera que estos efectos son ejercidos a través de la activación del receptor nuclear PPAR γ (Lehmann y col, 1995; Satiel y col, 1996), debe tomarse en cuenta que algunos estudios "*in vitro*" mostraron que las TZD poseen efectos no dependientes de PPAR γ , tales como inhibición de la actividad acil-CoA sintetasa en microsomas y la síntesis de colesterol en líneas celulares de diversos orígenes, tales como células de ovario de hamster (CHO), pulmonares (L6) o hepáticas (HepG2) (Kim y col 2001; Wang y col, 1999).

Modelos experimentales de Diabetes

En la rata los modelos más conocidos para el estudio de la patología diabética son la pancreatectomía subtotal y la administración de estreptozotocina.

La estreptozotocina es un antibiótico obtenido de *Streptomyces Acharamogenes*, cuya acción descrita histológicamente (Rakieten y col, 1963) es una degranulación y necrosis específica de las células β pancreáticas, 7 a 10 horas después de su administración. El modelo experimental más utilizado es el que se obtiene por inyección intraperitoneal o intravenosa de estreptozotocina, disuelta en buffer citrato, en un rango de concentración variable (50 a 80 mg/Kg peso animal) (Rodrigues y col, 1999). Las ratas tratadas con estreptozotocina exhiben muchas de las características de los pacientes con diabetes tipo I no controlada, tales como pérdida de peso, cetonuria, polifagia, polipdisia y poliuria (Junod y col, 1967 y 1969). Además, existen anomalías del metabolismo intermedio que se manifiestan a nivel sérico, por ejemplo, con el incremento en los lípidos y cuerpos cetónicos plasmáticos (Rodrigues y col, 1999).

Introducción

Con respecto a la diabetes tipo II, se ha desarrollado un modelo que se obtiene por inyección neonatal de estreptozotocina en dosis de 100 mg/kg (Portha y col, 1979). Las células β pancreáticas se destruyen al día 2 de nacimiento y luego se regeneran espontáneamente en forma parcial originando un animal adulto diabético no insulino dependiente con glucemias ligeramente elevadas, curvas de tolerancia a la glucosa alterada y bajas concentraciones de insulina circulante (Kergoat y col, 1991).

Se debe señalar que el modelo no presenta algunas de las características del síndrome en humanos, tales como la obesidad, hiperinsulinemia y marcada resistencia a la insulina. A pesar de esto el modelo es ampliamente utilizado, puesto que resulta de interés para el estudio de las primeras etapas de la patología, cuando disminuye la secreción insulínica. Además este modelo, sin tratamiento insulínico, se caracteriza por cursar con valores de glucemia semejantes a aquellos observados con frecuencia en el paciente diabético tratado (120-160 mg/dl), y por lo tanto es de gran utilidad para la evaluación del estado diabético con glucemias moderadas.

Preñez y Diabetes

Durante la preñez se producen importantes cambios metabólicos para satisfacer las necesidades alimenticias de la madre y del embrión en formación. La respuesta materna a las necesidades de la gestación podría caracterizarse como exageraciones del patrón normal de anabolismo y catabolismo que ocurre en sujetos no gestantes con alimentación intermitente (Freinkel y col 1965).

Deben considerarse dos situaciones: por una parte los cambios que ocurren en el estado prandial, y por otra parte el estado de ayuno.

En el estado prandial la alteración reside en la resistencia a la insulina por parte de los tejidos maternos. El principal mecanismo que se ve afectado es la captación celular de la glucosa mediada por insulina (Ryan y col, 1988; Andersen y col, 1988; Toyada y col, 1985). Esto sería resultado de la disminución de la capacidad de la insulina para iniciar el proceso de autofosforilación de su receptor y a consecuencia de ello, la fosforilación de otras proteínas (Martínez y col, 1989). Por otra parte, como resultado de este primer evento,

que afectaría el transporte de glucosa hacia la célula o la actividad de algunas enzimas, se inhibe el metabolismo oxidativo de la glucosa y la síntesis de glucógeno.

Los cambios metabólicos inducidos en la madre serían originados por señales hormonales propias de la preñez. Algunos estudios han mostrado que las alteraciones producidas en las células β pancreáticas para compensar la resistencia insulínica ocurren en paralelo con el crecimiento de la unidad fetoplacental y la mayor síntesis de las hormonas lactógeno placentaria y progesterona (Freinkel, 1980). Estas hormonas junto con el cortisol y la prolactina, son capaces de reducir la captación celular de glucosa mediada por insulina. A su vez, la hormona lactógeno placentaria estimula la lipólisis, incrementando los niveles de ácidos grasos libres, que a la vez, afectarán la utilización de glucosa mediada por insulina.

El objeto de la resistencia periférica a la insulina en la preñez es favorecer la disponibilidad de glucosa para el embrión, demorando la captación del metabolito por parte de los tejidos maternos y ocurre mayormente en la segunda mitad de la gestación. Por otro lado en la primera mitad de la gesta se favorecen los procesos anabólicos, incrementándose la síntesis de lípidos que serían acumulados en esta etapa de la preñez y utilizados durante la preñez tardía.

En el estado de ayuno, durante la gestación, es característica una mayor hipoglucemia, que podría ser producto de la inhibición en la producción hepática de glucosa y del incremento en la utilización de glucosa por parte del embrión. Básicamente se minimiza la utilización de precursores proteicos para la gluconeogénesis hepática (Buchanan, 1991) disminuyendo de esta forma el catabolismo proteico materno. Hacia finales de la preñez se estimulará el catabolismo lipídico en la madre, como fuente de energía.

Estos cambios que normalmente se producen en la preñez, impactarán considerablemente en el control metabólico de las pacientes con diabetes pregestacional, tanto insulino-dependiente como no insulino-dependiente. En estos pacientes, deberá incrementarse la dosis de insulina administrada. Otro aspecto a considerar es la cetosis, especialmente hacia el final de la preñez, ya que las hormonas placentarias estimulan la lipólisis y la cetogénesis, y la insulina inhibe estos procesos. Esto genera situaciones clínicas de severidad ante la omisión de la aplicación de la insulina.

Introducción

Otro tipo de diabetes es la gestacional, definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa detectada por primera vez durante el embarazo (Metzger y col, 1998). Esta definición se aplica independientemente de que la anomalía sea corregida por el tratamiento insulínico o dietario. Se estima que un 7% de todos los embarazos están afectados por esta patología, variando su prevalencia en un rango entre el 1 al 14%, dependiendo de la población estudiada y de los test empleados para su detección (American Diabetes Association, 2002).

En la diabetes gestacional se han reportado fallas en la captación y utilización de la glucosa involucrando tanto la acción de la insulina como la función de las células β pancreáticas. Si bien los estudios realizados mostraron características heterogéneas, en muchos casos existe deficiencia por parte de las células β para compensar la resistencia insulínica (Buchanan, 1991). A diferencia de lo observado en los casos de diabetes pregestacional, no se detectan incrementos marcados en la cetosis por el ayuno. Es por esto que una ingesta baja en calorías es beneficiosa para el control glucémico sin causar aumento significativo en la cetosis.

El embrión de madre diabética

En hijos de madres diabéticas es alta la incidencia de malformaciones congénitas. Estas incluyen malformaciones relativas a fallas en el cierre del tubo neural, tales como espina bífida y diferentes grados de anencefalia, o anomalías en el corazón en formación, tales como el aumento en el tamaño y fallas en la tabicación. También se han detectado anomalías en el maxilar y la mandíbula (Eriksson y col, 1982; Small y col, 1986).

Estas alteraciones ocurren en el período de organogénesis temprana previo a la sexta semana de gestación en humanos (Mills y col, 1979). La aparición de malformaciones en el hijo de madre diabética disminuye cuando el tratamiento insulínico es intensivo, aunque sigue siendo mayor que en la población normal (Hawthorne y col, 1994; The diabetics control and complication trial research group, 1996). Los mejores resultados se obtienen cuando el control metabólico es estricto desde el período previo a la concepción, una meta

difícil de lograr ya que por lo general las mujeres se presentan a la consulta médica ya embarazadas.

En modelos de diabetes experimental, se han observado anomalías de desarrollo embrionario similares a las halladas en hijos de mujeres diabéticas (Reece y col, 1985; New, 1987; Eriksson y col, 1991).

De estas evidencias surge que la utilización de modelos experimentales de diabetes permite el avance en el estudio de la etiología de las malformaciones congénitas. Diversos trabajos han demostrado que la causa de estas malformaciones está vinculada con las alteraciones metabólicas en el medio materno al cual está expuesto el embrión durante el desarrollo. El período de organogénesis temprana resulta ser una ventana temporal donde ocurren cambios de importancia morfológica (Reece y col, 1996); de existir anomalías metabólicas maternas, esto hará que se afecte el normal desarrollo del embrión. Se ha establecido el término de “teratogénesis mediada por combustible” (Freinkel y col, 1980), haciendo referencia al efecto dañino de los niveles alterados de glucosa (y la consecuente alteración en todo el metabolismo intermedio en la madre), que llevan al desencadenamiento de estas anomalías.

Estudios realizados *in vitro*, han demostrado que el cultivo de embriones de roedores en presencia de suero diabético durante la organogénesis temprana es capaz de inducir la aparición de anomalías semejantes a aquellas observadas en embriones de madres diabéticas (Goto y col, 1992).

Si bien estas anomalías se atribuyen a los niveles alterados de glucosa, cuerpos cetónicos y triglicéridos en el suero materno (Scow y col, 1964), no se conocen en profundidad los mecanismos subyacentes.

Con el fin de explicar la etiología de la aparición de malformaciones congénitas asociadas con la diabetes, se plantean un grupo de mecanismos, relacionados entre sí, que serían responsables de la aparición de malformaciones embrionarias y que se basan en las anomalías inducidas por el incremento en especies reactivas de oxígeno, y por las alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico.

En efecto, el embrión de rata diabética posee alteraciones en los niveles de enzimas antioxidantes (Forsberg y col, 1996; Cederberg y Eriksson, 1997; Ornoy y col, 1999) e

incremento en las especies reactivas de oxígeno (Yang y col, 1997; Wentzel y col, 1999). La aparición de anomalías inducidas por la hiperglucemia se previene por la adición de antioxidantes al medio de cultivo (Eriksson y col, 1993; Wentzel y col, 1998) y por la administración oral de antioxidantes (Simán, 1997), y se evitan en animales transgénicos para el gen de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (Hagay y col, 1995).

En cuanto al metabolismo del ácido araquidónico, la disponibilidad de este ácido graso poliinsaturado está disminuida en el embrión de rata diabética (Goldman y col, 1985; Reece y col, 1996), encontrándose también disminuidos los niveles intraembrionarios de Prostaglandina E₂ (PGE₂) (Piddington y col, 1996; Wentzel y col, 1999), prostaglandina derivada del ácido araquidónico. Tanto la administración de ácido araquidónico *in vivo* como de PGE₂ *in vitro* evitan la aparición de malformaciones inducidas por la diabetes (Pinter y col, 1986; Baker y col, 1990; Goto y col, 1992; Reece y col, 1996).

Se postula a su vez, que la deficiencia de ácido araquidónico, estaría relacionada con la disminución de fosfatidilinositol (Strieleman y Metzger, 1993) producto a su vez de la depleción de mioinositol por la glucemia elevada (Sussman y col, 1988).

Una hipótesis planteada recientemente, postula que la hiperglicemia dispara un programa exagerado de muerte celular programada en embriones de roedores. De esta forma, elevados niveles de glucosa alterarían la expresión de genes reguladores del desarrollo embrionario y del ciclo celular; esto llevaría a la muerte prematura de células madres y como consecuencia, a la dismorfogénesis (Moley, 2001).

❖ Endotelinas

Síntesis y funciones de las Endotelinas

Las endotelinas (ETs) son agentes vasoactivos que fueron descubiertos en células endoteliales (Yanagisawa y col, 1988), sin embargo su presencia no se limita al endotelio. Estos compuestos son hormonas peptídicas que constituyen una familia de tres miembros, ET-1, ET-2 y ET-3 (Inoue y col, 1989). Se sintetizan como un precursor

(preproendotelina), de aproximadamente 200 residuos aminoácidos, que debe sufrir dos eventos sucesivos de clivaje para llegar a su forma activa. El primer paso es realizado por una proteasa procesadora tipo furina que da origen a la forma denominada “endotelina grande o proendotelina” inactiva desde el punto de vista biológico. Finalmente por acción de las enzimas convertidoras de endotelinas, (ECE1 y ECE2) la proendotelina es clivada hasta llegar a su forma activa. En el caso de la endotelina 1 (ET-1) la forma activa posee 21 aminoácidos.

La función de las endotelinas está asociada principalmente con la acción constrictora, siendo la ET-1 el miembro de la familia con mayor capacidad vasoconstrictora. Además de esta función, también median la broncoconstricción, la liberación del péptido factor natriurético, la inhibición de la renina, la contracción del músculo liso uterino, la modulación de la liberación de neurotransmisores y la secreción de hormonas neuroendócrinas (Sakurai y col, 1992). Además, “in vitro” las endotelinas poseen efecto proliferativo sobre melanocitos (Yada y col, 1991), células mesangiales (Simonson y col, 1989) y músculo vascular liso (Nakaki y col, 1989). La insulina promueve la expresión del gen de la ET-1 y la liberación de dicho agente de células endoteliales, así como el incremento de los niveles plasmáticos de ET-1 en humanos (Oliver y col, 1991; Hattori y col, 1991; Piatti y col 1996). En pacientes que padecen hipertensión, aterosclerosis o isquemia miocárdica aguda se han hallado niveles elevados de ET-1 en plasma y en tejido vascular muscular liso (Saito y col, 1990; Lerman y col, 1991; Naruse y col, 1991). Niveles incrementados de este agente vasoconstrictor estarían relacionados con las enfermedades vasculares características de la diabetes (Hopfner y col, 1998).

La acción de las endotelinas es mediada a través de tres receptores: para ET-1 y ET-2, ETB con igual afinidad para los tres tipos de endotelinas; y ETC, receptor específico para ET-3. En todos estos casos se trata de receptores acoplados a proteína G. ETA se expresa en células de músculo liso vascular y es el responsable de la acción vasoconstrictora de las ETs a través de la activación de la fosfolipasa C generando un aumento en las concentraciones intracelulares de inositol trifosfato (IP_3) y Ca^{2+} (Highsmith

y col, 1992). Por el contrario ETB se expresa en todos los tejidos y en células endoteliales media la vasodilatación a través de incrementos en la síntesis de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (Inoue et al, 1989; Warner et al, 1989). ETC se expresa en las células endoteliales y lactotrofos de la pituitaria anterior bovina. La activación de ETC en células endoteliales, mediaría una acción vasodilatadora a través de NO (Emori y col, 1991), mientras que la activación de dicho receptor en lactotrofos, inhibe la liberación de prolactina (Samson y col 1990 y 1991).

Endotelinas durante el desarrollo embrionario

Diferentes estudios demostraron que las endotelinas se expresan en diversos tipos celulares durante la organogénesis (Chan y col, 1995). Estos tejidos son sitio de migración de las células de cresta neural, tales como los arcos branquiales. En ratones mutantes dobles recesivos para el gen de ET-1 (Kurihara y col, 1994, 1995 a y b), o para el gen del receptor ETA (Clouthier et al, 1998) y en estudios de inhibición farmacológica con antagonistas para los receptores de endotelinas realizados en ratas y conejos (Treinen y col, 1999), se ha observado la aparición de anomalías en órganos derivados de los arcos branquiales tales como la mandíbula, el oído, la lengua, el timo, la tiroides y los grandes vasos. Trabajos realizados en el embrión de pollo inactivando el receptor ETA, mostraron iguales resultados (Kempf y col, 1998). El fenotipo es similar cuando falla la actividad de las diversas enzimas convertidoras de endotelinas (Yanagisawa y col 1988).

Cuando se anula la expresión de los genes que codifican para el receptor de ETB y de ET-3, se obtiene un fenotipo similar al síndrome de Hirschprung, caracterizado por la agangliogénesis del colon distal (Baynash y col, 1994; Hosada y col, 1994).

En todos estos casos, las células blanco son derivadas de la cresta neural, esenciales para el desarrollo del sistema cardiovascular y la arquitectura craneofacial, y del desarrollo del sistema nervioso entérico.

Las células de cresta neural cefálica expresan los genes de los receptores de endotelinas ETA y ETB en el momento en que estas emergen del tubo neural, sin embargo ETB sufre una disminución en su expresión cuando las células se acercan a su destino, los arcos

branquiales. En forma correspondiente, las células del parénquima situadas en el arco branquial expresan ET-1.

Como se mencionó previamente, las células de cresta neural cefálica de mamíferos comienzan la migración a su destino durante el periodo en el cual los pliegues neurales están elevándose (Gilbert, 1997). Varios factores se encuentran involucrados en su migración entre ellos moléculas de adhesión como las integrinas, que permitirán la interacción con la matriz extracelular, y las caderinas, que favorecerán la comunicación entre las células migrantes (Maschhoff y Baldwin, 2000).

Una vez que las células de cresta neural alcanzan su destino, éstas deben madurar. La ET-1 modula la expresión de los factores de transcripción *dHAND* y *eHAND* implicados en la supervivencia de las células derivadas de cresta neural de los arcos branquiales. Esta modulación parece no ser directa sino a través de otros factores de transcripción, que serían los responsables de la activación de la transcripción de los genes *dHAND*, tal es el caso del factor *Dlx6*, dependiente de la cascada de señalización de ET-1 a través del receptor ETA (Charité y col, 2001). La actividad de dicho factor de transcripción estaría circunscripta a los arcos mandibulares e hioides.

En el embrión de madre diabética se han reportado anomalías en el hueso mandibular y en el cartilago de Meckel, estructuras derivadas de cresta neural, que dan origen a una malformación conocida como micrognatia (Eriksson y col, 1982 y 1988). Dicha lesión sería inducida durante el periodo de formación y cierre del tubo neural. La micrognatia parece ser la principal alteración en el desarrollo de las células de cresta neural cefálica, como producto de la reducida capacidad migratoria y proliferativa a consecuencia de los niveles incrementados de glucosa y especies reactivas del oxígeno (Suzuki y col, 1996; Styrd y Eriksson 1990; Simán y col, 2000). En los embriones de ratas diabéticas también se han reportado, malformaciones cardíacas tales como defectos de tabicación ventricular y marcado desplazamiento de la aorta, resultando en una doble salida del ventrículo derecho (Simán y col, 2000). Dichas anomalías también estarían relacionadas con alteraciones en las células de cresta neural (Ferencz y col, 1990; Simán y col, 2000).

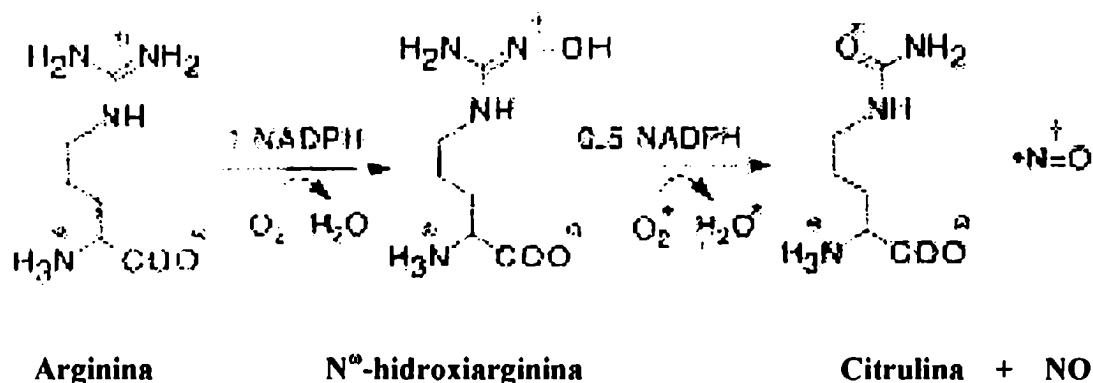
No habiendo antecedentes previos que reporten si dichas anomalías se asocian a niveles alterados de endotelinas, en el presente trabajo se estudiaron los niveles de ET-1 en embriones de rata diabética.

❖ Óxido nítrico

Síntesis de óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un agente vasoactivo, con efecto vasodilatador y miorelajante. Este compuesto es sintetizado por deaminación oxidativa NADPH dependiente de L-arginina (Palmer y col, 1987) (Esquema N° 4). La reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Esta enzima posee tres isoformas diferentes: dos de ellas, la neuronal y la endotelial se expresan constitutivamente (Bredt y col, 1990), y la expresión de la tercera isoforma presente en macrófagos, es inducida por citoquinas o lipopolisacáridos (Lyons y col, 1992).

Esquema N° 4 "Síntesis de óxido nítrico"



El NO tiene una vida media corta, ya que es rápidamente metabolizado por oxidación para dar nitritos y nitratos.

Introducción

El NO, puede además combinarse con especies reactivas del oxígeno, tales como el anión superóxido (O_2^-), y generar otro tipo de compuestos: los peroxinitritos, de alta toxicidad para la célula por su capacidad de nitrosilar proteínas (Miller y col, 1996; Ischiropoulos y col, 1998) generando daño en la estructura y función proteica. En condiciones fisiológicas, cuando el estado redox celular se encuentra equilibrado, esta reacción se vería impedida por la presencia de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, que secuestra al superóxido manteniéndolo en concentraciones bajas (Fridovich, 1976)

Debido a las potentes acciones biológicas del NO, su síntesis debe estar estrictamente controlada. De hecho, las distintas isoformas de la NOS son reguladas a través de mecanismos transcripcionales y traduccionales. El Ca^{2+} , la calmodulina, el monóxido de carbono y las citoquinas son algunos de los factores involucrados en este tipo de regulaciones.

Además de agentes fisiológicos, existen compuestos farmacológicos que pueden donar NO o antagonizar su producción.

Los dadores, incluyen a nitratos orgánicos como la nitroglicerina, el nitroprusiato de sodio, los nitrosotioles como el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) y los complejos de NO con nucleófilos conocidos como NONOates (Butler y col, 1995, Maragos y col, 1991).

La inhibición de la actividad NOS es mediada por análogos de la L-arginina, tales como N^G -monometil-L-Arginina (L-NMMA) o N^G -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) que inhiben la actividad de sus tres isoformas.

Funciones Biológicas

Las funciones fisiológicas del NO fueron descriptas originalmente en tres sistemas: vascular, nervioso e inmune.

El NO, generado en el endotelio vascular como respuesta al stress, a diferentes agonistas y a la hipoxia, regula el tono muscular y el flujo sanguíneo (Moncada y col, 1991). En el sistema nervioso participa de la plasticidad neuronal y regulación de algunos procesos neurofisiológicos relacionados con la memoria, además actuaría como neurotransmisor en

el sistema nervioso periférico y central (Nathan, 1992). Además el NO actuaría durante el desarrollo del sistema nervioso, favoreciendo el refinamiento de la inervación neuronal de los músculos (Dan y Poo, 1992; Wang y col, 1995).

En el sistema inmune, se ha estudiado que el NO media la actividad bactericida y tumoricida en los macrófagos (Hibbs y col 1990).

El NO participa también en la regulación de las funciones de otros sistemas como el respiratorio, excretor, cardiovascular, endócrino y reproductor.

Como ejemplo de ello puede mencionarse su participación en la regulación del flujo renal (Wilcox y col, 1992), en la regulación de la presión vascular durante la hipoxia (Persson y col, 1990). En hepatocitos, posee efectos citostáticos en el curso de la infección bacteriana. En las células β pancreáticas modula la liberación de insulina en respuesta a los niveles de L-arginina plasmática (Laychock y col, 1991).

Es también mediador de la apoptosis o muerte celular programada en diversos tipos celulares y tejidos tales como macrófagos, células tumorales y epiteliales, y participa en desórdenes autoinmunes (Albina y col, 1993; Cui y col, 1994; Sandoval y col, 1995; Connor y col, 1995).

En el sistema reproductor regula diferentes procesos como el comportamiento de apareo (Rettori y col, 1993) y la regulación de la función ovárica (Rosselli y col, 1994; Shukovski y Tsafirri, 1994).

Durante la preñez es responsable del mantenimiento de la circulación útero placentaria, generando un estado de vasodilatación que asegura la adecuada liberación de oxígeno y nutrientes al embrión en crecimiento y la remoción de los desechos metabólicos. Además, sería el responsable de la quiescencia y relajación del músculo liso uterino, efecto que decae al comienzo del parto. En el tejido placentario a término el incremento de NO contribuye al desencadenamiento del trabajo de parto (González y col, 1998).

El NO, además, participaría en el proceso de implantación embrionaria (Novaro y col, 1997).

La acción de NO es mediada a través de la producción de GMPc. Este último compuesto actúa sobre diferentes tipos de proteínas entre ellas la proteína quinasa G, canales iónicos

dependientes de nucleótidos cíclicos y fosfodiesterasa. Se postula que este mecanismo de acción del NO mediado por aumento de los niveles de GMPc, sería responsable del mantenimiento de la quiescencia uterina durante la preñez (Norman y Cameron, 1996).

Además de esta vía clásica, algunos estudios han determinado que el NO puede actuar directamente modificando proteínas a través de reacciones sin intervención de enzimas. Una de estas modificaciones es la S-nitrosilación en los residuos cisteínas, mecanismo por el cual el NO regularía la excitabilidad neuronal en el sistema nervioso (Ahem y col, 2002). Otra vía de acción del NO es a través del estímulo de la cicloxigenasa, incrementando la producción de prostaglandinas. Estudios realizados en diversos laboratorios y en el nuestro, han demostrado el estímulo de NO sobre la síntesis de prostaglandinas en hipotálamo, tejido uterino, ovocitos y placenta a término (Rettori y col, 1992; Franchi y col, 1994; Jawerbaum y col, 1997; González y col, 1998).

Nuestros estudios previos han determinado que NO estimula la síntesis de PGE₂ en embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II durante la organogénesis temprana (Jawerbaum y col, 1998).

En exceso, el NO resulta ser tóxico y dañino para los tejidos. La expresión sostenida de la isoforma inducible está asociada al daño y a la muerte celular en las patologías autoinmunes e inflamatorias (McCartney-Francis y col, 1993; Miller y col, 1993). Estudios realizados por nuestro grupo y en otros laboratorios han demostrado que el NO, producido en exceso, es uno de los agentes implicados en la destrucción de los islotes (Kroncke y col, 1991) y el daño pancreático producido por el tratamiento con estreptozotocina (González y col, 2001).

Oxido nítrico y Organogénesis

Durante la organogénesis, el NO está involucrado en los procesos morfogénicos característicos de esta etapa de desarrollo embrionario. Uno de esos procesos es la neurulación, en la cual el NO determinaría la apoptosis, en forma selectiva, de algunas células en las regiones cefálicas del tubo neural (Lee y Juchau, 1994). De esta forma estaría

actuando en el refinamiento tisular del sistema nervioso en formación. Por otra parte, la inhibición de la actividad NOS, genera la aparición de malformaciones a nivel del segundo arco branquial y de la copa óptica (Lee y Juchau, 1994). La deficiencia en la expresión de la NOS, está asociada con la aparición de malformaciones a nivel cardíaco, tales como falta de desarrollo del corazón, fallas en la tabicación atrial y ventricular, así como incrementos en la apoptosis de cardiomiocitos (Feng y col, 2002).

En una etapa posterior al cierre del tubo neural, se ha establecido que la inhibición de la actividad NOS es responsable de la falta de desarrollo de los miembros (Pierce y col, 1995). De esta forma se establece que tanto el exceso como la falta de óxido nítrico resultan ser perjudiciales para el desarrollo del embrión, por lo tanto sus niveles y la expresión de la enzima NOS deberán estar finamente regulados durante el desarrollo embrionario

Algunos estudios identificaron la presencia de las isoformas constitutivas de NOS como las responsables de la síntesis de NO embrionario durante la organogénesis temprana y en periodos posteriores a la misma (Pierce y col, 1995; Lee y Juchau 1994; Feng y col, 2002). Estudios inmunocitoquímicos detectaron la localización de la isoforma nNOS durante la organogénesis en la región anterior del cerebro en formación (Black y col, 1995). Si bien se ha establecido la presencia de la isoforma inducible en la unidad fetoplacentaria (Miller y col, 1996), el mutante doble recesivo para dicha isoforma presenta desarrollo normal hasta mediados de la gestación, periodo en el cual se produce la muerte de algunos embriones. Aquellos embriones que nacen presentan pesos disminuidos con respecto a los animales control (Burnett y col, 2002).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han determinado que el estado diabético induce incrementos en los niveles de óxido nítrico en diversos tejidos tales como placenta a término, páncreas, y ovocitos (Pustovrh y col, 2000; González y col, 1999; Jawerbaum y col, 1999). En el mismo sentido, estudios realizados en embriones en organogénesis provenientes de ratas diabéticas tipo II, determinaron actividad incrementada de la NOS, así como aumento en los niveles de nitratos/nitritos (Jawerbaum y col, 1998).

Puesto que se desconocía la existencia de alteraciones en la producción de NO en el embrión de rata diabética tipo I, en este trabajo se evaluaron los niveles de dicho agente

vasoactivo y además se analizó la capacidad moduladora de NO sobre la síntesis de otros compuestos vasoactivos presentes en el embrión, tal como las endotelinas y las prostaglandinas.

❖ Prostaglandinas

Síntesis y funciones de las prostaglandinas

Las prostaglandinas son ácidos grasos de veinte carbonos que contienen un anillo de cinco carbonos. Fueron descubiertas por primera vez por Goldblatt y Von Euler en las secreciones prostáticas (Goldblatt, 1933; Von Euler, 1935), describiéndose un efecto vasodepresor y estimulante del músculo liso.

Las prostaglandinas son sintetizadas a partir de ácidos grasos poliinsaturados: linolénico, araquidónico y eicosapentenoico. Cada uno de ellos da origen a una serie diferente de prostaglandinas, respectivamente serie 1, serie 2 y serie 3. Esta clasificación toma en cuenta los dobles enlaces presentes en las cadenas laterales.

El araquidónico resulta ser el ácido graso más abundante en los fosfolípidos de membrana y puede ser obtenido directamente desde la dieta o por desaturación y elongación a partir del linoleico. Este ácido graso dará origen a las prostaglandinas de la serie 2, las cuales son de gran importancia desde el punto de vista biológico.

El araquidónico debe ser liberado de los fosfolípidos de la membrana celular a partir de la acción de la fosfolipasa A₂.

En un paso posterior a su desacilación, el araquidónico puede ser metabolizado por dos tipos de enzimas. 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 prostaglandina H sintetasa, también llamada COX por su actividad ciclooxigenasa, (Esquema N° 5) presente en todas las células de mamíferos, excepto en glóbulos rojos. Esta enzima cataliza dos pasos iniciales en la síntesis de prostaglandinas a partir de la conversión del ácido araquidónico a PGG₂, y luego a PGH₂.

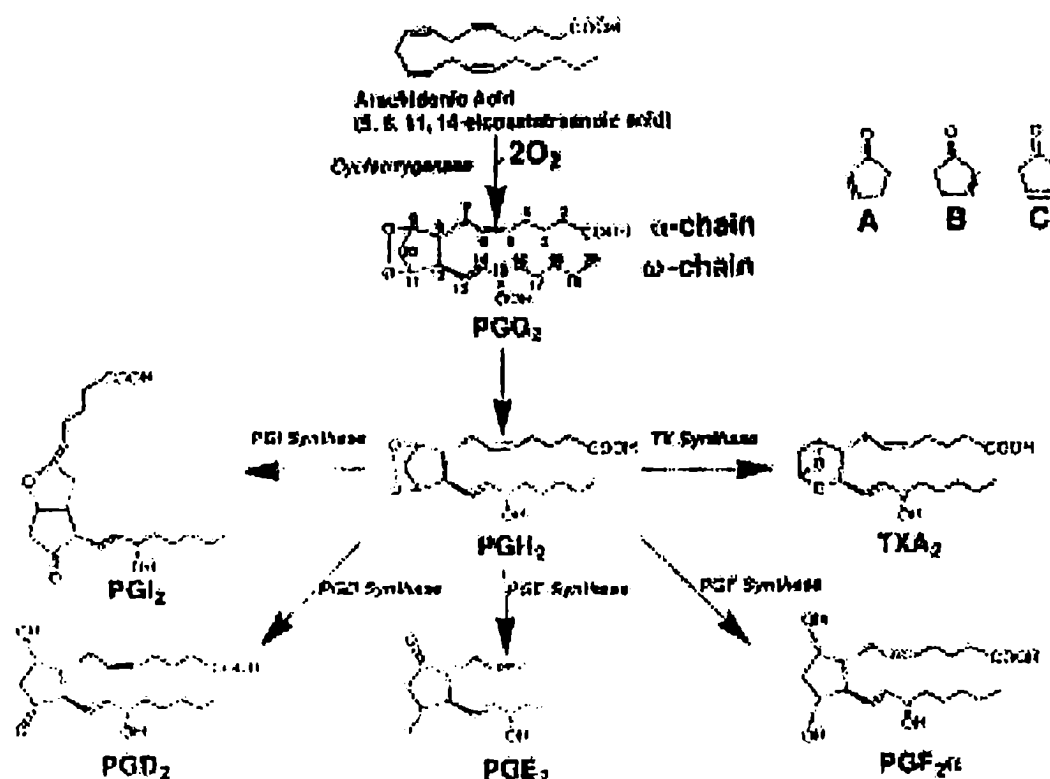
Introducción

Estos dos pasos se conocen como ciclooxygenación y peroxidación. Si bien ambas etapas son catalizadas por la misma enzima, cada una de las reacciones tiene lugar en dos sitios activos diferentes. Una vez formado, el intermediario PGH_2 es convertido enzimáticamente a otros compuestos estables como la PGE_2 y PGD_2 vía isomerasas, o $\text{PGF}_{2\alpha}$ vía reductasa. La PGE_2 puede ser convertida a $\text{PGF}_{2\alpha}$ por medio de la enzima 9-ceto reductasa.

La enzima ciclooxygenasa es una glicoproteína que contiene un grupo hemo y se halla unida a la membrana del retículo endoplasmático. Su peso molecular es aproximadamente 71 KDa. Se conocen al menos dos isoformas diferentes de la enzima ciclooxygenasa presente en mamíferos, una de ellas de expresión constitutiva (COX I), y otra de expresión inducible (COX II) (Smith y col, 1994; Munroe y col 1995). Esta última es inducida por citoquinas proinflamatorias entre otros compuestos. La actividad ciclooxygenasa es inhibida por drogas conocidas como antiinflamatorios no esteroideos que incluye agentes tales como aspirina, indometacina, ibuprofeno y naproxeno (Loll y col, 1994). En general estos compuestos inhiben ambas isoformas con poca selectividad.

La COX I es expresada constitutivamente y por lo tanto cumpliría el rol de catalizar la síntesis de prostaglandinas necesarias para la actividad celular normal. En general la concentración de esta enzima se mantiene estable, pero pueden ocurrir aumentos de dos a cuatro veces en su expresión, en respuesta a la estimulación hormonal o a factores de transcripción (DeWitt y col, 1991; Wu y col, 1991).

Esquema N°5 "Síntesis de Prostaglandinas a partir del ácido araquidónico"



La COX II, como se mencionó previamente sólo se expresa en respuesta a la inducción por factores de crecimiento, ésteres de forbol, citoquinas o lipopolisacáridos. Es la enzima involucrada en la respuesta inflamatoria a corto plazo (Vane, 1994). Desde el punto de vista catalítico es prácticamente indistinguible de la isoforma I, ambas poseen valores similares de K_m y V_{max} para el metabolismo del ácido araquidónico. El peso molecular para ambas isoformas es el mismo (70 KDa) (Vane y Botting, 1995). Existen estudios que indican diferencias en la ubicación intracelular de ambas isoformas. La constitutiva se ubicaría a lo largo de toda la membrana del retículo endoplásmico y en parte de la membrana nuclear, mientras que la inducible se hallaría principalmente asociada a la membrana nuclear. A consecuencia de la diferente ubicación de ambas isoformas, se postula que representan dos

sistemas biosintéticos independientes, que regulan funciones extracelulares (COX I) y eventos de diferenciación intranucleares (COX II) (Morita y col, 1995).

Funciones Biológicas de las Prostaglandinas

Las prostaglandinas son sintetizadas por la mayoría de las células en nuestro organismo, y actúan como mediadores lipídicos en forma autócrina o parácrina. Son sintetizadas *de novo* en respuesta a señales tales como citoquinas o factores de crecimiento, y luego liberadas mediante transporte facilitado a través del transportador de prostaglandinas PGT, cotransportador que modula la liberación y/o la captación de prostaglandinas y que pertenece a la familia de los transportadores de aniones orgánicos polipeptídicos (Funk, 2001).

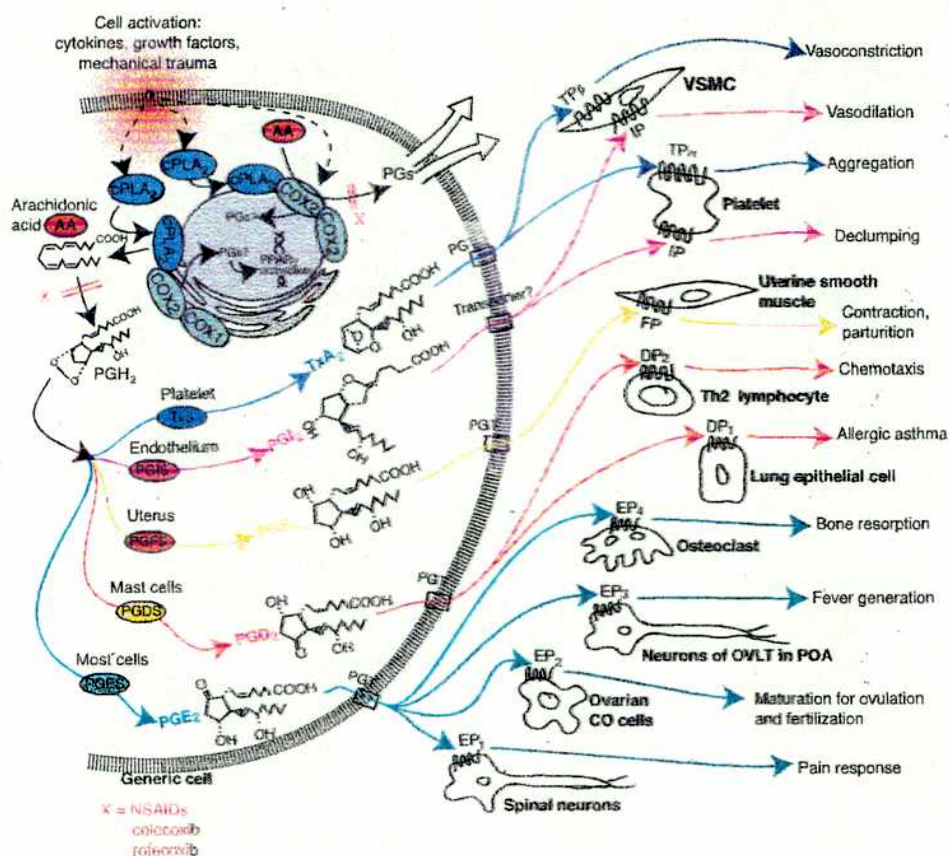
Las acciones fisiológicas de las prostaglandinas son mediadas por la unión a receptores específicos, principalmente acoplados a proteínas G. Por ejemplo, para la prostaglandina E_2 se conocen 4 receptores distintos, de los cuales dependerá la respuesta biológica: incremento en los niveles de AMPcíclico, disminución de los niveles de AMPcíclico, o una respuesta mediada por fosfoinosítidos (Narumiya, 1995).

Para algunos prostanoides, la acción sería mediada directamente por la unión de la prostaglandina a receptores nucleares, regulando de esta forma la expresión génica (Kliwer y col 1995; Forman y col 1995).

Las prostaglandinas presentan una variedad de funciones, puesto que actúan sobre la presión arterial y la agregación plaquetaria, provocan contracción o relajación del músculo liso, quimiotaxis y quimioquinas de células sanguíneas (Berhman y col, 1992); participan en diferentes eventos reproductivos tales como ovulación, luteólisis (Carteen y col, 1990), y desencadenamiento del trabajo de parto (Esquema N°6).

Altos niveles de prostaglandinas pueden ser responsables de desórdenes diversos tales como los procesos inflamatorios y alérgicos, alteraciones del ciclo sexual y abortos (Ferreira, 1972; Saxena, 1978; Funk, 2001); su deficiencia puede conducir a trastornos como la infertilidad, hipertensión arterial y úlceras gástricas (Mitchell y col, 1993; Funk, 2001).

Esquema N°6 "Funciones Biológicas de las Prostaglandinas"



Tomado de "Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology" Collin Funk (2001) Science 294

Prostaglandinas en la Diabetes Mellitus

Numerosos estudios describen alteraciones en la síntesis de prostanoïdes en diversos tejidos de animales y pacientes diabéticos. Las alteraciones en el lecho vascular, debido a incrementos en la producción de tromboxanos, PGE₂, PGF₂α y defectos en la producción

de prostaciclina, ocasionan daño microvascular. Esta es una complicación severa y muy frecuente de la patología, conocida como vasculopatía diabética (Schonfelder y col, 1996; Williamson, 1993; Garis y col, 1986).

En los tejidos reproductivos, alteraciones en el desbalance en la producción de prostanoïdes generan anomalías en la motilidad uterina (Jawerbaum y col, 1994) y en el flujo útero-placentario (Wentzel y col, 1995), retraso de crecimiento fetal (Wentzel y col, 1995; Vercheval y col, 1990; Pampfer y col, 1990) e insuficiencia placentaria, entre otras.

*Prostaglandinas durante el desarrollo embrionario en la organogénesis temprana**

Como ya se indicó previamente la síntesis de prostaglandinas es llevada a cabo por las dos isoformas de la COX. La COX I se expresa en el embrión desde la ovulación hasta la implantación (Marshburn, 1990), y también se ha detectado durante la organogénesis (Wim y col, 1997). En el embrión preimplantatorio se expresan ambas isoformas de la enzima COX siendo COX II la isoforma predominante desde el estadio de ocho células hasta blastocisto, donde promovería la diferenciación y la implantación (Wang y col, 2002). Recientes trabajos han demostrado la presencia de la proteína COX II durante la organogénesis del ratón (Parman y Wells, 2002), sin variación en los niveles de la proteína durante dicho período del desarrollo embrionario y por lo tanto postulan que la expresión de dicha isoforma en el embrión es de tipo constitutiva. Sin embargo, estudios farmacológicos realizados *in vivo* en ratas y conejos, en presencia de inhibidores de diferente selectividad para las dos isoformas de la COX, han demostrado que la aparición de anomalías congénitas sólo se verifica con el agregado de inhibidores de mayor especificidad para COX I (Davenport y col, 2002).

La importancia de las prostaglandinas durante la organogénesis temprana, y específicamente durante la neurulación, fue descubierta a través de estudios realizados en modelos experimentales de diabetes. En esta patología, las fallas de cierre de tubo neural representan una de las anomalías más frecuentes ocasionadas por el entorno diabético.

Estudios realizados en el modelo de diabetes tipo I, demostraron que la deficiencia de ácido araquidónico y de prostaglandina E_2 estaba relacionada con la aparición de anomalías congénitas en los embriones provenientes de ratas y ratones diabéticos tipo I (Piddington y col, 1996; Wentzel y col, 1999). En estos embriones el contenido de PGE_2 está sensiblemente disminuido en comparación a los embriones control, y la incidencia de malformaciones congénitas es alta. Básicamente estas anomalías consisten en defectos de tubo neural, hipertrofia de corazón, defectos en la rotación axial y anomalías histológicas en el saco vitelino.

El tratamiento con ácido araquidónico o PGE_2 tanto en experimentos *in vitro*, como *in vivo*, es capaz de revertir o impedir la aparición de estas anomalías (Goldman y col, 1985; Pinter y col, 1986; Baker y col, 1990).

El proceso de formación y cierre del tubo neural implica la acción de diferentes agentes, así como la activación de genes específicos. Uno de los agentes implicados en el proceso del cierre del tubo neural es la PGE_2 . Se ha estudiado que durante la formación del tubo neural, se produce un incremento en el contenido de PGE_2 la cual retorna a sus niveles basales una vez que se produce la fusión de los pliegues neurales (Piddington y col, 1996).

No se ha establecido claramente cuál es la isoforma de la COX responsable de este aumento de PGE_2 . Algunos estudios proponen que el incremento de esta prostaglandina es mediado a través de la isoforma inducible, y que una menor expresión de esta enzima en los embriones de ratas diabéticas lleva al menor contenido de PGE_2 y a la aparición de las malformaciones congénitas, mientras que la expresión de la COX I es similar en embriones de ratas sanas y diabéticas (Wentzel y col, 1999).

Nuestros estudios demuestran que, a diferencia de lo reportado en el modelo de diabetes tipo I, el contenido de PGE_2 de embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II está incrementado, al igual que su producción y liberación (Jawerbaum y col, 1998).

Hemos demostrado además que, durante la organogénesis, la síntesis de PGE_2 es modulada en forma positiva por óxido nítrico, cuyos niveles, al igual que en otros tejidos diabéticos, se encuentran incrementados (Jawerbaum y col, 1998). Según lo mencionado previamente, esta modulación positiva de la síntesis de PGE_2 es de absoluta importancia para el embrión durante el cierre del tubo neural.

Si bien en la literatura se ha citado disminución en el contenido embrionario de la PGE₂ en el modelo de diabetes tipo I, se desconoce si dicha disminución obedece a alteraciones en la síntesis y/o liberación del prostanoide al medio extracelular.

En el presente trabajo se estudió la producción de PGE₂, su transporte y su regulación por NO en el embrión rata diabética tipo I.

Otra prostaglandina que ha sido objeto de estudio en los últimos años es la 15- deoxi delta ^{12,14} prostaglandina J₂ (15dPGJ₂). Este compuesto es un metabolito estable de la prostaglandina D₂ producto de sucesivas reacciones de deshidratación e isomerización. Debido a su estructura química, pertenece al grupo de las prostaglandinas denominadas como ciclopentenonas, puesto que contienen una estructura en anillo, la cual se caracteriza por la presencia de un grupo carbonilo α , β insaturado, reactivo desde el punto de vista químico. A diferencia de otras prostaglandinas, las ciclopentenonas interactúan con moléculas-señal y factores de transcripción (Strauss y Glass, 2001).

Varios estudios indican que 15dPGJ₂ es capaz de regular los niveles de NO, inhibiendo la expresión de la enzima inducible NOS en células de músculo liso vasculares (Shirahase y col, 2000), macrófagos (Maggi y col, 2000) y células granulosas de cerebelo (Heneka y col, 1999). En neuronas corticales tratadas con LPS, el tratamiento con 15dPGJ₂ inhibe la expresión de COX II y la correspondiente a la isoforma inducible NOS, así como la activación del factor nuclear kappa B. De esta forma, 15dPGJ₂ ejerce efectos neuroprotectores y antiinflamatorios (Kim y col, 2002). Estudios realizados en nuestro laboratorio, demostraron el efecto inhibitorio de 15dPGJ₂ sobre la síntesis de NO en islotes pancreáticos aislados de ratas sanas y diabéticas tipo I (González y col, 2002).

En cuanto a su mecanismo de acción, el interés está centrado en el hecho de que este compuesto es el ligando natural de mayor afinidad que se conoce para el receptor nuclear PPAR γ (Forman y col, 1995). Este receptor nuclear es responsable de la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y en la diferenciación del tejido adiposo (Rosen y col, 2000). Durante el desarrollo embrionario se lo ha vinculado con la formación de la placenta ya que ratones mutantes doble recesivos para dicho gen mueren a mediados de gestación, cuando se inicia el proceso de placentación (Barak y col, 1999).

En diversos tejidos se ha establecido que los mecanismos de acción de $15dPGJ_2$ pueden ser dependientes o independientes de $PPAR\gamma$.

Respecto de la función antiinflamatoria, se postulan mecanismos mediados por el receptor nuclear $PPAR\gamma$ (Ricote y col, 1998) y otros independientes del mismo (Petrova y col, 1999). Al respecto de esta acción, se sugiere que la $15dPGJ_2$ actúa como un regulador fisiológico negativo de la síntesis de óxido nítrico, de prostaglandinas y de la respuesta inmune (Gilroy y col 1999; Strauss y col, 2000).

Dada su capacidad moduladora sobre los niveles de óxido nítrico, se consideró de interés el estudio de la síntesis, función y mecanismo de acción de $15dPGJ_2$ durante la organogénesis temprana en el embrión sano y diabético, donde los niveles endógenos de óxido nítrico se encuentran elevados.

❖ Lípidos

Clasificación

Se define a los lípidos como moléculas diversas que se caracterizan por su solubilidad en solventes orgánicos. Estas moléculas incluyen ácidos grasos y sus derivados, terpenos, esteroides, carotenoides y ácidos biliares. Una definición actual más estricta, limita dicha definición a los ácidos grasos y sus derivados o metabolitos.

En general, los lípidos están constituidos por ácidos grasos unidos por uniones ésteres a un alcohol, principalmente glicerol, o por uniones amidas a bases de cadenas largas. En algunos casos también podrían contener ácido fosfórico, bases orgánicas, azúcares y otros compuestos que pueden ser liberados por proceso de hidrólisis. Tomando en cuenta este aspecto los lípidos pueden clasificarse en simples o complejos. Los simples son aquellos que contienen uno o dos productos de hidrólisis por mol. Los complejos son aquellos que contienen tres o más tipos de productos de hidrólisis por mol. Es común definir como neutros a los lípidos simples, y polares a los complejos. Sin embargo esta definición es un

Introducción

tanto ambigua desde el punto de vista químico, ya que los ácidos grasos libres son clasificados como neutros, a pesar de la presencia del grupo carboxilo.

A continuación se mencionan algunos lípidos que fueron objeto de estudio en este trabajo, y sus principales características:

Lípidos neutros:

Los *ácidos grasos* contienen números pares de átomos de carbono en cadenas lineales con un grupo carboxilo terminal. Pueden ser saturados (ejemplo: ácido palmítico) o insaturados por contener dobles enlaces que generalmente poseen configuración *cis*. Entre estos últimos se encuentra el ácido oleico y el ácido araquidónico. Existe una nomenclatura especial que permite establecer la posición del último doble enlace, contando a partir del carbono metílico asignado como omega, el número 1. Podemos hablar así, por ejemplo, de la familia de los ácidos grasos omega-3 u omega-6, donde respectivamente el último enlace se encuentra entre el carbono 3 y 4, o entre el carbono 6 y 7 respecto del carbono omega. En particular estas dos familias de ácidos grasos han sido relacionadas con la prevención de las enfermedades cardíacas debido a su capacidad para modificar niveles de lipoproteínas y colesterol plasmáticos (Champe y Harvey, 1994).

Es importante señalar que algunos de los ácidos grasos son esenciales, esto significa que no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser adquiridos desde la dieta. Se trata de ácidos grasos poliinsaturados, precursores de otros ácidos grasos, y que cumplen roles de importancia en el crecimiento, en la reproducción y en otros aspectos de la salud (Christie, 1973). Cabe mencionar que los ácidos grasos linoleico y araquidónico, pertenecen a esta categoría y además forman parte de la familia de los ácidos grasos omega-6.

Los *triacylglicéridos* se caracterizan por poseer un ácido graso esterificado a cada grupo hidroxilo del glicerol. Los ácidos grasos esterificados pueden ser diferentes entre sí.

El *colesterol* es miembro del grupo de esteroides que posee un sistema de anillos tetracíclicos. Puede hallárselo libre, en asociación con otros lípidos, en la membrana celular o en lipoproteínas. También puede hallárselo esterificado con un ácido graso y esta especie es conocida como éster de colesterol.

Lípidos complejos:

Los *fosfoglicéridos* o fosfolípidos son compuestos que por hidrólisis liberan glicerol, ácidos grasos, fosfato inorgánico y una base orgánica o un polihidroxi compuesto. En este grupo encontramos entre otros a la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina.

Los esfingolípidos se caracterizan por tener como estructura central a la esfingosina, en reemplazo del glicerol, presente en los fosfoglicéridos. El grupo amino está acilado, mientras que el grupo hidroxilo terminal se encuentra sustituido. En el caso de la esfingomielina, ese sustituyente es la fosforilcolina.

Funciones Biológicas

Los lípidos han sido considerados clásicamente como elementos estructurales formando parte fundamental de todas las membranas biológicas o bien como metabolitos de reserva energética. Sin embargo, desde el conocimiento de su acción como moléculas señalizadoras, comenzaron a realizarse estudios tendientes a determinar sus nuevos roles.

Más allá de su clásico papel como segundos mensajeros a partir del fosfatidil inositol, existen otros casos donde los lípidos no sólo actúan a nivel estructural y energético.

Un ejemplo es el sistema inmune. Algunos estudios señalan que el tejido adiposo alrededor de los nódulos linfáticos interactúa con las células linfoides mediando procesos de inhibición de proliferación celular. Esta acción sería dirigida por ácidos grasos poliinsaturados omega 3 que actuarían directamente a nivel génico (Pond y col, 1996) e inhibirían la producción de citoquinas, así como proliferación de linfocitos (Pompéia y col, 2000).

Se debe tomar en cuenta que los ácidos grasos son capaces de unirse a factores de transcripción y de esta forma estimular la expresión de genes (Chawla y col, 2001).

Por otra parte es bien conocida la acción del colesterol como sustrato para la síntesis de hormonas esteroideas. Además de esto, en los últimos años se ha descrito la participación del colesterol en el sistema nervioso central, promoviendo la sinaptogénesis (Match y col, 2001) y el desarrollo dendrítico (Fan y col, 2002).

Introducción

Prostaglandinas y lípidos:

Las prostaglandinas son capaces de regular el metabolismo lipídico en diversas células y órganos. En preadipocitos la PGI₂ (prostaciclina), posee actividad adipogénica. En los adipocitos la PGE₂ posee actividad antilipolítica (Vassaux y col, 1992 a y b). Por otra parte esta misma prostaglandina es capaz de alterar la síntesis de colesterol y la acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos (Morisaki y col 1986).

Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado efectos de diversos prostanoides sobre el metabolismo lipídico en tejidos reproductivos. En útero de rata ovariectomizada se ha observado un estímulo de la lipólisis mediado por las prostaglandinas E₁ y F₂ α (González y col, 1986). Otros estudios realizados también en tejido uterino mostraron el efecto antilipolítico de la PGE₂ (Sterin y col, 1984).

Se ha señalado asimismo que PGE₂ es capaz de inhibir la expresión de genes lipogénicos hepáticos. De esta forma, dicha prostaglandina participaría en el mecanismo inhibitorio de la síntesis hepática de lípidos mediada por ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega-6 (Mater y col, 1999).

Lípidos y diabetes:

En la patología diabética se presentan alteraciones en todo el metabolismo intermedio. La imposibilidad de utilizar glucosa como “combustible” por parte de los tejidos periféricos, hace que los ácidos grasos se conviertan en prioritarios como fuente energética, generando un aumento de cuerpos cetónicos. Por otra parte la falta de insulina favorece los procesos catabólicos sobre los anabólicos.

El estudio del perfil de lípidos en plasma de pacientes diabéticos muestra niveles incrementados de ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol libre.

Además, en estos pacientes se observan alteraciones en los niveles de lipoproteínas transportadoras de lípidos, en particular en la diabetes tipo II.

En estos pacientes, es característica la alteración en los niveles de proteínas séricas transportadoras de lípidos. Si bien los estudios son contradictorios, se postula que estas

alteraciones en los niveles de lipoproteínas se correlacionarían con las obstrucciones coronarias y las enfermedades cardíacas (Haffner, 1988).

Por otra parte se observan alteraciones en la actividad de las enzimas delta 5 y delta 6 desaturasas, con lo cual se hallan disminuidos los niveles de algunos ácidos grasos (Horrobin, 1989), entre ellos el araquidónico, el cual, según se mencionó previamente, es el principal sustrato para la síntesis de prostaglandinas.

El síndrome de distrés respiratorio es una complicación fetal frecuente en la gestación diabética, consecuencia de la inmadurez pulmonar inducida por disminución en los niveles de lípidos complejos conocidos como surfactantes: lecitina (fosfatidilcolina), esfingomielina, y apoproteínas relacionadas con estos compuestos (Snyder y col, 1988). Dichas anomalías también se observan en modelos experimentales de diabetes (Rayani y col, 1995), en los cuales existirían, además, alteraciones en la incorporación de la colina a fosfatidilcolina (Marwah y col, 1999).

La transferencia de nutrientes desde la madre permite la nutrición fetal. En relación a la transferencia lipídica, los ácidos grasos no esterificados son transferidos al embrión de acuerdo con un gradiente transplacentario que depende de la circulación placentar y umbilical, así como de la captación embrionaria a través del hígado en formación y de la lipólisis intraplacentaria de triacilglicéridos maternos. En la diabetes, se ha descrito una mayor transferencia lipídica hacia el feto en desarrollo provocada por la hipertrigliceridemia y una alta actividad de lipasas maternas (Thomas, 1987).

Lípidos en el desarrollo embrionario

La participación de los lípidos a lo largo del desarrollo embrionario ha sido determinada por diferentes estudios que demuestran que estas moléculas no sólo cumplen con funciones de almacenamiento energético, sino que además son esenciales para procesos de señalización celular y para la formación de estructuras.

Estudios realizados en ovocitos han determinado la importancia metabólica de los triacilglicéridos favoreciendo su maduración (Kruip y col, 1983) y los primeros eventos posteriores a la fertilización (Fleming y Saacke, 1972), contribuyendo a los requerimientos

energéticos de ambos procesos. También en el desarrollo embrionario preimplantatorio los triglicéridos serían utilizados para satisfacer las necesidades energéticas durante los primeros estadios del desarrollo embrionario (Ferguson y Leese, 1999).

En embriones de postimplantación, se ha estudiado que perturbaciones en la síntesis de colesterol, utilizando diversos inhibidores de enzimas involucradas en este proceso, dan lugar a anomalías morfológicas tales como ciclópea, agénesis de la pituitaria y holoprosencefalia. De hecho el defecto en el último paso de la síntesis de colesterol (falta de actividad de la enzima 7-dehydrocolesterol- Δ^7 -reductasa) es responsable del síndrome de Smith-Lemli-Optiz. Éste se caracteriza por malformaciones asociadas con la holoprosencefalia que incluyen microcefalia, y además trae aparejados defectos en el corazón, en riñones, páncreas y miembros (Salen y col, 1996).

Otros estudios determinaron que la proteína hedgehog (Hh), necesaria para el normal establecimiento de patrones de diversas estructuras durante el desarrollo, debe sufrir una reacción de autoclivaje para su funcionalidad. Este proceso es mediado por su dominio carboxi-terminal (con actividad colesterol transferasa) que produce un fragmento amino terminal, al cual se transfiere una molécula de colesterol. Este fragmento así modificado es el responsable de la actividad de señalización característica de Hh (Porter y col, 1996). Sin embargo, trabajos posteriores señalan que la modificación por colesterol de la proteína Hh no sería necesaria para la transducción de su señal, pero sí para el tráfico apropiado de la molécula y para la delimitación espacial de su acción (Lewis y col, 2001; Ingham, 2001). Por otra parte los triglicéridos, además de constituir una fuente energética, resultan ser una reserva de ácidos grasos poliinsaturados de entre 20 y 22 átomos de carbono. Estos son preferencialmente movilizados desde el tejido adiposo hacia el sistema nervioso en formación, básicamente hacia el cerebro, para integrarse a los fosfolípidos de membrana de éste órgano (Speake y col, 1997). Otros estudios han determinado que la actividad ácido graso sintetasa, resulta ser fundamental para el desarrollo axonal durante la diferenciación del sistema nervioso embrionario. Esta enzima además de sintetizar ácidos grasos, modificaría covalentemente proteínas necesarias para el desarrollo neuronal por esterificación con ácidos grasos (Ueno, 2000).

Se ha asignado un papel de importancia al saco vitelino, como órgano de síntesis y secreción de lipoproteínas que transportan al embrión nutrientes lipídicos provenientes de la madre. De hecho, embriones de roedores, dobles mutantes recesivos para apolipoproteína B (Farese y col, 1996), y proteína microsomal transportadora de triglicéridos (Raabe y col, 1998), mueren durante el período de organogénesis. En estos embriones se observan anomalías en tubo neural, tales como la falta de cierre del neuroporo anterior o exencefalia. Si bien, no se define precisamente la causa de estas anomalías se postula que éstas aparecen a consecuencia de la falla en el transporte de lípidos al embrión, necesarios tanto para la formación de membranas celulares del cerebro como para las necesidades energéticas de las neuronas en desarrollo.

Trabajos realizados sobre la síntesis de fosfolípidos, en particular fosfatidilcolina, han demostrado la importancia de la síntesis endógena de estos lípidos por parte del embrión y del saco vitelino. Además el tratamiento con inhibidores de la captación de colina, o de su metabolismo genera anomalías en el tubo neural en formación, indicando la importancia de la síntesis de fosfatidilcolina durante la organogénesis temprana (Fisher y col, 2001 y 2002).

A pesar de la importancia del metabolismo lipídico durante el desarrollo embrionario y del conocimiento de las anomalías del metabolismo lipídico asociadas a la patología diabética, no se conocen estudios previos que evalúen la existencia de alteraciones del metabolismo de lípidos en el embrión de madre diabética, y forma parte del presente trabajo la evaluación del metabolismo lipídico y su modulación en embriones de rata sana y diabética durante la organogénesis.

Factores de transcripción relacionados con el metabolismo de lípidos.

Los receptores nucleares actúan como factores de transcripción activados por ligandos, y regulan la expresión de genes blanco afectando procesos diversos tales como la reproducción, el desarrollo y el metabolismo general (Chawla y col, 2001). Estas proteínas pertenecen a una superfamilia (Maglich y col, 2001) que incluye a los clásicos receptores

endócrinos que median la acción de hormonas esteroideas y vitaminas liposolubles, entre otros, y un gran número de receptores nucleares que se denominaron receptores nucleares huérfanos, puesto que sus ligandos, genes blanco y función fisiológica era desconocida hasta hace poco tiempo (Giguere, 1999). Algunos de estos receptores, ahora son conocidos como “huérfanos adoptados”, ya que se han identificado sus ligandos fisiológicos. Estos receptores actúan como heterodímeros relacionándose con el receptor 9 *cis* ácido retinoico. A diferencia de los receptores de hormonas esteroideas, éstos responden a lípidos obtenidos de la dieta. Se postula que actuarían como sensores y activarían cascadas metabólicas, con el fin de mantener la homeostasis lipídica mediante la activación de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y en los procesos de reserva, transporte y eliminación de dichos metabolitos. Los miembros de este grupo incluyen a los receptores para oxiesteroles (LXRs), ácidos biliares (FXR), xenobióticos (SXR, PXR, CAR) y ácidos grasos, conocidos como PPARs o “receptores activados por factores de proliferación peroxisomal” (Chawla y col, 2001). Su nombre se debe a que estos han sido identificados debido a la capacidad, en particular de la isoforma PPAR α , de inducir la proliferación de peroxisomas.

Se han identificado tres subtipos diferentes de PPARs, estos son alfa, beta o delta y gamma. Cada uno de ellos posee un patrón propio de expresión tisular. PPAR α es expresado en grasa parda, hígado, riñón, corazón y músculo esquelético. PPAR γ se expresa en tejido adiposo pardo y blanco, así como en el colon, por el contrario la expresión de PPAR β es ubicua (Braissant y col, 1996).

En cuanto a sus ligandos, los ácidos grasos poliinsaturados activan las tres isoformas de PPARs, aunque con diferente afinidad. Diversos eicosanoides son agonistas naturales de PPAR γ (15dPGJ₂), PPAR β/δ (PGI₂ y PGA₁) y PPAR α (LTB₄). Entre los ligandos sintéticos, las drogas antidiabéticas tiazolidinedionas son agonistas farmacológicos de PPARgamma y los fibratos, drogas hipolipemiantes, lo son de PPARalfa (Forman y col, 1997; Kersten y Wahli, 2000).

Los genes blanco de estos PPARs están involucrados en diferentes aspectos del metabolismo lipídico y la homeostasis (Kliwer y col, 2001). Cada uno de estos factores de transcripción posee roles bien definidos, excepto PPAR β/δ . El receptor PPAR α está asociado a la eliminación del exceso de ácidos grasos por vía del catabolismo, incluyendo

la estimulación de los peroxisomas hepáticos y oxidasas de ácidos grasos (Pineda y col, 1999). PPAR γ está implicado en la regulación de la adipogénesis así como en algunos aspectos del transporte de lípidos en adipocitos y macrófagos (Tontonoz y col, 1994; Barak y col, 1999; Chawla y col, 2001).

Ha sido difícil establecer la función del factor de transcripción PPAR β/δ , debido a su distribución ubicua en los diversos tejidos y a la dificultad para obtener mutantes recesivos para este gen. Sin embargo, existen estudios que señalan que la activación de PPAR β/δ parece modular la diferenciación de adipocitos a través de la inducción del PPAR γ (Bastie y col, 1999), la actividad acil-CoA sintetasa en agregados celulares cerebrales (Basu-Modak y col, 1999), la diferenciación de la epidermis (Mansura y col, 1999), la implantación embrionaria (Lim y col, 1999), la placentación y el desarrollo de cáncer de colon. (Barak y col, 2001).

Estudios realizados en ratón (Kliwer y col, 1994), rata (Braissant y col, 1998) y humanos (Huin y col, 2000) han demostrado la presencia de PPARs a lo largo del desarrollo embrionario, en un patrón espacio temporal propio para cada receptor nuclear. Según estos estudios, PPAR β/δ es el primero en expresarse durante la organogénesis temprana, en los primeros estadios de la neurulación. La expresión de PPAR α y PPAR γ comienza en un estadio posterior al cierre del tubo neural (entre los días 13 y 14 de gestación). En todos los casos se detectó la presencia de estos receptores en sistema nervioso, siendo PPAR β/δ la isoforma más abundante en este sistema. A medida que progresa el desarrollo embrionario las distintas isoformas son circunscriptas a áreas más definidas como el tracto digestivo (PPAR α) y el tejido adiposo pardo (PPAR γ). En contraposición PPAR β/δ se expresa en casi todos los tejidos, manteniendo alta su expresión en el tejido nervioso. Estudios realizados en el tracto digestivo de embriones humanos determinaron la expresión de las tres isoformas de los receptores a partir de la séptima semana de gestación.

La obtención de dobles mutantes recesivos para las tres isoformas ha mostrado diferentes fenotipos. El ratón doble mutante recesivo para PPAR α se desarrolla normalmente, es fértil y el fenotipo adulto no parece diferir del tipo salvaje, aunque poseen alteraciones en el metabolismo lipídico, particularmente en la oxidación de los ácidos grasos. Por otra parte, los resultados obtenidos con los ratones doble mutantes recesivos para PPAR β/δ muestran

que la falta de dicho gen es letal, postulando que este factor de transcripción es necesario para la implantación del embrión (Lim y col, 1999; Barak y col, 2002). Cuando el gen se anula parcialmente se obtiene un mutante que se caracteriza por su bajo peso, disminución de masa de tejido adiposo, y alteraciones en la mielinización del cuerpo calloso (Peters y col, 2000). Estudios realizados con ratones deficientes en PPAR β/δ muestran letalidad, producto de alteraciones durante la placentación en la interfase placento-decidual (Barak y col, 2002).

En cuanto a los mutantes recesivos para el gen de PPAR γ , estos manifiestan un claro retraso en el crecimiento y mueren a mediados de gestación, por fallas en la placentación. A diferencia de los mutantes de PPAR β/δ , la falla se produce en la diferenciación del laberinto trofoblástico. La red de capilares embriónicos en esta zona de la placenta se desarrolla en forma incompleta, observándose conglomerados de células anormales y presencia de exudados fibrinoides. Otra anomalía morfológica que se presenta es a nivel del corazón, donde se produce adelgazamiento de la pared miocárdica y falta de trabeculación. Por otra parte la diferenciación de los fibroblastos embrionarios a adipocitos se halla sensiblemente disminuida (Kubota y col, 1999).

Dado que se estudian en este trabajo de tesis las anomalías de desarrollo y metabolismo lipídico en el embrión diabético durante la organogénesis, se consideró de interés iniciar el análisis de la expresión de estos factores de transcripción nuclear, y el estudio de la participación de sus agonistas en la modulación del metabolismo lipídico del embrión de rata sana y diabética.

Sobre la base de los antecedentes mencionados previamente se plantean las siguientes hipótesis y objetivos de trabajo:



Hipótesis y Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Dilucidar mecanismos involucrados en la aparición de malformaciones congénitas inducidas por la patología diabética, estableciendo dentro de esos mecanismos la función moduladora de endotelina-1, óxido nítrico, prostaglandinas E_2 y $15dPGJ_2$ en el desarrollo, crecimiento y metabolismo del embrión de rata diabética durante la organogénesis temprana.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- ❖ El entorno diabético altera parámetros morfológicos y fisiológicos del embrión durante la organogénesis temprana en forma dependiente de la severidad de la patología
- ❖ En el embrión de rata diabética existen alteraciones en los niveles de endotelina-1, NO y PGE_2 . Los niveles de estos agentes vasoactivos se modulan entre sí condicionando el normal desarrollo embrionario. En el embrión de rata diabética existen alteraciones en estos mecanismos regulatorios, que dan lugar a anomalías en los niveles de estos agentes y consecuentemente afectan el desarrollo y crecimiento embrionario en esta patología.
- ❖ Existen anomalías en el metabolismo lipídico del embrión de rata diabética. Los prostanoides PGE_2 y $15dPGJ_2$ modulan el metabolismo lipídico embrionario, y sus niveles alterados afectan el metabolismo de los lípidos en el embrión de rata diabética, afectando en consecuencia su desarrollo y crecimiento.
- ❖ Existen anomalías en la expresión de los factores de transcripción PPARs que inducen alteraciones en el metabolismo lipídico embrionario y consecuentemente afectan el desarrollo y crecimiento del embrión diabético.

Con el objeto de evaluar estas hipótesis de trabajo se proponen los siguientes:

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar en embriones de rata sana, diabética tipo I y diabética tipo II durante la organogénesis temprana:

- ❖ El desarrollo y crecimiento del embrión sano y diabético y el efecto directo de un entorno anómalo en el desarrollo del embrión de rata sana
- ❖ Los niveles, la producción, la liberación y el transporte de PGE_2 en embriones de ratas sanas y diabéticas.
- ❖ La expresión embrionaria de las proteínas COX I y COX II
- ❖ La producción de NO y su capacidad moduladora sobre la síntesis de PGE_2 embrionaria
- ❖ Los niveles de endotelinas y su capacidad moduladora sobre la producción de NO y la producción de PGE_2 embrionaria
- ❖ la síntesis y niveles de $15dPGJ_2$ en el embrión de rata sana y diabética
- ❖ el perfil y los niveles de diferentes especies de lípidos en el embrión de rata sana y diabética
- ❖ los efectos de PGE_2 y $15dPGJ_2$ sobre la masa y la síntesis *de novo* de lípidos polares y neutros embrionarios a partir de diferentes sustratos.
- ❖ la expresión embrionaria de los factores de transcripción PPAR γ y PPAR β/δ

Materiales y Métodos

MATERIALES Y METODOS

❖ MATERIALES:

Drogas: Estreptozotocina (Sigma); PGE₂ (Sigma); Bosentan (Donación Dr Martin Clozel, Actelion Ltd, Allachwill, Suiza); N^G-monomethyl-L-arginina (L-NMMA) (Sigma); endotelina-1; 15 deoxy $\Delta^{12,14}$ protaglandina J₂; bisfenol-A-diglicidil-eter (BADGE) (Sigma); espermine NONOato (Cayman); 3-morfolino-sidnomino-hidroclorido (SIN-1) (Cayman); troglitazona (Biomol).

Antibióticos: penicilina, estreptomina (Sigma).

Radioactivos: [1,2-¹⁴C]-ácido acético (sal de sodio), [¹⁴C]-ácido oleico (Amersham). [³H]-PGE₂, [¹⁴C] sacarosa (New England Nuclear Dupont).

Estándares de: fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, esfingomielina, fosfatidil inositol, triacilglicerol, ácidos grasos, ésteres de colesterol y colesterol (Doosan Serdary Research Laboratories).

Solventes: metanol, cloroformo, hexano, éter etílico ácido sulfúrico y ácido acético (Merck).

Equipos: determinación enzimática de triglicéridos en plasma (Wiener Lab); determinación de nitratos/nitritos (Cayman Chemical Co.); determinación de endotelina-1; determinación de 15 deoxy delta ^{12,14} protaglandina J₂ (Assay Designs Inc).

Reactivos para geles: poliacrilamida, bisacrilamida (Biorad), N,N,N',N'-Tetrametiletilidiamina TEMED (Biorad), persulfato de amonio (Biorad), glicerol (Biopack)

Anticuerpos primarios anti PPAR γ , PPAR β , COX I y COX II (Santa Cruz); anticuerpo anti PGE₂ (Sigma). Todos obtenidos de suero de conejo.

Anticuerpos secundarios anti IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante; anti IgG de conejo y biotinilado (Santa Cruz).

Revelado de membranas: solución para revelado por quimioluminiscencia (Pierce), Solución para revelado por la técnica del complejo avidina-biotina (Dako).

Otros:

columnas sep-pack C18;
complejo avidina peroxidasa (Dako);
tetra acetato de etilendiamina (EDTA) (Sigma);
marcadores de peso molecular (Amersham) (Biorad);
inhibidores de proteasas (Sigma);
placas radiográficas X-Omat AR (Kodak);
buffer citrato (Sigma);
buffer Goods (Wiener Lab);
H₂O de cultivo (Sigma);
tiras reactivas Glucostix (Bayer);
placas de sílica gel 60 para cromatografía en capa delgada (Merck);
reactivo de Bradford (Biorad);
ácido trifluoroacético (Baker);
Aquasol ®(Packard);
líquido de centelleo (Wallac Scintillation Products);
membranas de nitrocelulosa (Sigma)

❖ **ANIMALES:**

Ratas albinas de la cepa Wistar, criadas en el bioterio del CEFYBO, alimentadas con purina y agua *ad libitum*. Los animales fueron sometidos a un ritmo de luz oscuridad 12: 12 horas, en ambiente climatizado a temperatura constante de 22 ° C.

❖ **SOLUCIONES:**

Medio KREBS Ringer Bicarbonato (KRB): (en mM) 11 glucosa, 145 Na⁺, 2.2 Ca⁺, 1.2 Mg²⁺, 127 Cl⁻, 25 HCO₃⁻, 1.2 SO₄²⁻, 1.2 PO₄³⁻

TYRODES: (Concentraciones en gramos por litros, salvo expresa aclaración) 8 NaCl, 0.2 KCl, 0.1 MgCl₂·6 H₂O, 0.056 NaH₂PO₄, 0.051 CaCl₂·2 H₂O, 1 Glucosa, 1 NaHCO₃, 10 mg/l Rojo fenol, 100 µg/l Estreptomicina, 64 µg/l Penicilina

PBS: (concentración en g/l) 7.75 NaCl, 1.50 K₂HPO₄, 0.2 KH₂PO₄.

CLORURO FERRICO: 250 mg de Cloruro Férrico, 25 ml de Acido Acético, 25 ml de Acido Sulfúrico, 450 ml de H₂O destilada

TRIS: Trizma base 6.16 g/l pH 7.4.

GEL DE RESOLUCION: 4.2 ml Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8%, 2.5 ml Tris-Cl (pH 8.8) 1.5 M, 3.3 ml agua destilada, 100 µl SDS 10%, 8 µl TEMED, 100 µl Persulfato de Amonio 10%.

GEL DE APILAMIENTO: 0.65 ml Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8%, 1.25 ml Tris-Cl (pH 6.8) 0.5 M, 3 ml agua destilada, 50 µl SDS 10%, 5 µl TEMED, 50 µl Persulfato de Amonio 10%.

BUFFER DE LISIS: (concentraciones finales) Tris-HCl 25 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, SDS 0.1 %, Inhibidores de proteasas 1%

BUFFER MUESTRA: 0.152 g Tris-HCl, 0.4 g SDS, 3 ml Glicerol, 0.2 mg Azul de Bromofenol, 1 ml β-Mercaptoetanol, 16 ml H₂O destilada. (pH 6.8 final)

BUFFER DE CORRIDA: (Concentración en g/l) 3.025 Tris, 14.41 Glicina, 1 SDS

BUFFER DE TRANSFERENCIA: (Concentración en g/l, salvo aclaración) 14.16 glicina, 3.03 Tris, 200 ml Metanol, 800 ml H₂O destilada.

❖ **MÉTODOS:**

Modelos experimentales de Diabetes

⇒ *Diabetes Tipo I*

Hembras adultas con pesos entre 230 y 260 g, fueron inyectadas con 60 mg/kg de estreptozotocina i.p.. El estado diabético fue confirmado por la determinación de los niveles de glucosa en sangre mediante la utilización de tiras reactivas. Estos valores resultaron ser superiores a 300 mg/dl tres días después de la inyección. Animales con valores de glucemia menores, no fueron incluidos en los estudios posteriores.

⇒ *Diabetes Tipo II*

Neonatos de dos días de edad fueron inyectados en forma subcutánea con 100 mg/kg de estreptozotocina, según la técnica descrita por Portha y colaboradores (Portha y col, 1979). El estado diabético se confirmó en los animales adultos mediante curvas de tolerancia a la glucosa (Maloff y Boyd, 1986). Sólo se utilizaron aquellos animales cuyos valores de glucemia fueron superiores a 180 mg/dl 120 minutos después de la administración de 1.5 g/kg de glucosa i.p. Más del 90% de los animales tratados al nacer presentaron intolerancia a la glucosa. Es de destacar que en animales sanos (no diabéticos) los niveles de glucemia a los 120 minutos posteriores a la administración de glucosa fueron similares a los basales (inferiores a 90 mg/dl).

Hembras sanas y diabéticas tipo I y tipo II fueron apareadas con machos sanos. El apareo fue confirmado por la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal a la mañana del día siguiente, designado como día 0.5 de preñez.

Determinaciones séricas

⇒ Determinación de niveles de glucosa sanguínea

Para evaluar los niveles de glucemias maternas se utilizaron tiras reactivas comerciales. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena central ubicada en la cola de los animales. Con el fin de obtener un valor preciso de la glucemia se utilizó un lector adaptado especialmente a dichas tiras reactivas.

⇒ Obtención de sueros

Animales preñados fueron adormecidos con éter. Luego de realizar una laparatomía se penetró en la cavidad abdominal y se localizó la vena abdominal, de la cual se extrajo sangre. Inmediatamente ésta fue centrifugada dos veces a 3000 rpm con el objeto de precipitar eritrocitos y otros elementos figurados, tales como plaquetas y leucocitos. Una vez obtenido el suero, éste fue almacenado a -70°C hasta el momento de uso. Puesto que este suero sería utilizado para el cultivo de embriones, la centrifugación fue realizada rápidamente con el fin de evitar la formación de sustancias embriotóxicas (Cockroft, 1990). En aquellos casos donde el suero fue utilizado sólo para determinaciones séricas, después de obtener la sangre se permitió la coagulación espontánea, a 37°C y posteriormente se procedió a la centrifugación.

⇒ Determinación de Triacilglicéridos.

Los niveles de triacilglicéridos maternos fueron determinados en suero utilizando un equipo comercial. A la muestra se le agregó reactivo de trabajo, consistente en una mezcla de buffer Goods con las enzimas lipoproteína lipasa, glicerol quinasa, glicerol fosfato oxidasa, peroxidasa y los compuestos adenosina trifosfato y 4-aminofenazona. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, y como resultado de una serie de reacciones que involucran la liberación del glicerol presente en los triacilglicéridos, su fosforilación y la formación de H_2O_2 , se obtuvo un producto coloreado (quinonimina), en forma proporcional al contenido de triacilgliceridos presentes en la muestra. La densidad óptica del producto coloreado fue cuantificada a 505 nm en espectrofotómetro. La concentración de triacilglicéridos fue determinada por comparación con un estándar de concentración conocida, evaluado en el mismo ensayo.

Determinaciones embrionarias:

⇒ Incubaciones embrionarias

En el día 10.5 de preñez, los animales fueron sacrificados por adormecimiento con éter y posterior dislocación cervical. El útero completo fue removido y colocado en placa de Petri, con solución KRB. Bajo lupa y con ayuda de pinzas apropiadas, se separó la decidua materna y cuidadosamente se liberó de la misma al embrión rodeado por las membranas de Reichert, el saco vitelino y el amnios. Los embriones fueron separados de dichas membranas y evaluados morfológicamente en los siguientes aspectos: latido cardíaco, número de somitas, estado de rotación axial y presencia de anomalías morfológicas. Embriones en estadios de reabsorción fueron considerados como reabsorbidos, y no se incluyeron en posteriores análisis. Los embriones fueron sometidos a diferentes

tratamientos, y procesados para realizar las determinaciones que se describen a continuación.

⇒ *Determinación de Proteínas embrionarias*

La determinación de proteínas fue realizada según la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976). Una alícuota de homogenato embrionario, obtenido por sonicación durante 10", fue diluida en solución salina, a la cual se le agregó reactivo de trabajo. Luego de agitar cada tubo y esperar 5 minutos, se determinó la densidad óptica en cada muestra a 595 nm en espectrofotómetro. En paralelo se realizó una curva estándar de seroalbúmina bovina con objeto de determinar la concentración de proteínas en cada muestra.

Cabe aclarar que desde el punto de vista del análisis morfológico, el contenido proteico fue considerado como índice de crecimiento embrionario. Los resultados se expresaron en µg de proteína/embrión.

⇒ *Determinación del contenido embrionario de ET-1*

Cuatro embriones por muestra fueron incubados en tubos conteniendo 2 ml de medio KRB durante 60 minutos, bajo atmósfera de carbógeno (5% de CO₂ en 95 % de O₂) a 37° C con agitación. Según correspondiera se agregó L-NMMA (300, 600 y 1000 µM), inhibidor de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, o spermine NONOate (300 µM), dador de óxido nítrico. Finalizada la incubación los embriones fueron homogeneizados con sonicador en 250 µl de ácido acético 6%. La extracción de endotelinas presentes en las muestras se realizó en columnas Sep-Pack C18, pretratadas con metanol y agua acidificada a pH 3. Luego de ser sometidas a un lavado con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%, las columnas fueron tratadas con una mezcla de solventes consistente en metanol/agua/TFA (90:10:0.1), que eluyó su contenido de endotelinas. Posteriormente los eluidos fueron evaporados en atmósfera de nitrógeno y conservados a -70° C hasta la realización del enzimoimmunoensayo para la cuantificación de ET-1. Para esto se utilizó un equipo comercial. El principio aplicado en esta determinación es la técnica del sandwich de

doble anticuerpo. Cada pozo está recubierto por anticuerpo anti endotelina 1 y proteínas bloqueantes. Este anticuerpo fija ET-1 de las muestras y estándares. Un segundo anticuerpo se une a otro epítopo de la molécula de endotelina. Este segundo anticuerpo está conjugado con acetilcolinesterasa Fab. La concentración de ET-1 es equivalente a la actividad de la acetilcolinesterasa, que por adición del reactivo de Ellman, que contiene acetil colina (sustrato de la enzima) y 5,5'-ditio-bis-(2-acido nitrobenzoico), produce un producto coloreado que puede ser medido por espectrofotometría. La intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de conjugado unido y este a su vez es proporcional a la concentración de ET-1.

La especificidad para la forma procesada de la ET-1 es del 100%, mientras que la afinidad por los precursores preproendotelina y proendotelina es menor al 0.01%. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron menores al 10%. Los porcentajes de afinidad por ET2 y ET3, fueron menores al 3%.

Los resultados se expresaron en pg/mg de proteína.

⇒ Determinación de PGE₂ embrionaria

Para evaluar la liberación de PGE₂ al medio de incubación, cuatro embriones fueron incubados en tubos conteniendo 2 ml de medio KRB durante 60 minutos, bajo atmósfera de carbógeno a 37 °C con agitación. Se agregó según correspondiera ET-1 (10⁻⁷ M), Bosentán (antagonista de los receptores ETA y ETB, 10⁻⁷ M), L-NMMA (inhibidor de la óxido nítrico sintasa, 300 µM), SIN-1 (dador de óxido nítrico, 300 µM) o SOD (enzima removedora de radicales libres, 1000 U/ml). Finalizada la incubación, el medio fue acidificado a pH 3.5 con ácido clorhídrico 1N y las prostaglandinas fueron extraídas tres veces con acetato de etilo. Posteriormente el extracto fue evaporado bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente y conservado a -70°C hasta la cuantificación del prostanoide por radioinmunoensayo (RIA).

Para la determinación del contenido de PGE₂ embrionaria, los embriones fueron homogeneizados con sonicador en solución PBS, durante 10 segundos. Una alícuota del homogenato fue destinada a la determinación de proteínas por el método de Bradford. Las prostaglandinas fueron extraídas con 1 ml de etanol absoluto. El extracto fue evaporado bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, y conservado a -70 ° C hasta la realización del radioinmunoensayo

Radioinmunoensayo para determinación de PGE₂

El RIA fue realizado por desplazamiento de unión de la prostaglandina presente en la muestra con ¹⁴C-prostaglandina E₂ exógena, reconocida mediante anti PGE-BSA como agente inmunogénico, en condiciones previamente establecidas (Faletti y col, 1995). La dilución final del anticuerpo fue de 1:70. Los residuos extraídos y los reactivos se reconstituyeron en solución PBS 0.01 M (pH 7.4), adicionada con 0.15 % de NaCl, 0.1 % de BSA y 0.1 % de azida sódica.

La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg por tubo. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 8.2 y 12 % respectivamente. Las curvas de desplazamiento de unión dieron un coeficiente de entre 0.995 y 0.999. Los resultados se expresaron en pg de PGE₂/ µg de proteína.

⇒ *Evaluación del transporte de ³H-PGE₂.*

Incorporación de ³H- PGE₂:

Seis embriones fueron incubados en presencia de 1.5 nM de ³H-PGE₂ (actividad específica: 3.7 TBq nM) en 2 ml de KRB a 37° C, con agitación y bajo atmósfera de carbógeno. Estas incubaciones se realizaron durante diferentes periodos de tiempo (5 a 100 minutos). Finalizada la incubación los embriones fueron lavados con solución KRB con el objeto de eliminar la radioactividad no incorporada. Los embriones fueron luego disueltos en Aquasol, y la radioactividad contenida en el solvente fue posteriormente cuantificada en

contador de centelleo líquido. Los resultados fueron referidos a la radioactividad presente en el medio de incubación. Similares experimentos utilizando ^{14}C sacarosa (marcador extracelular de peso molecular comparable a las prostaglandinas), fueron realizados como control. Los resultados se expresaron como fmoles de $^3\text{H-PGE}_2$ /mg de proteína.

Liberación de $^3\text{H-PGE}_2$:

Seis embriones fueron incubados en presencia de 1.5 nM de $^3\text{H-PGE}_2$ (actividad específica: 3.7 TBq nM) en 2 ml de KRB durante 60 minutos a 37° C, con agitación y bajo atmósfera de carbógeno. Luego de este período los embriones fueron rápidamente lavados en KRB, transferidos a tubos conteniendo 2 ml de medio fresco, e incubados por períodos de 0, 5, 10, 15, 20, y 30 minutos respectivamente. Al final de la incubación los embriones fueron transferidos a viales conteniendo Aquasol. La radioactividad fue cuantificada mediante un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresaron como % de $^3\text{H-PGE}_2$ remanente/mg de proteína.

⇒ Determinación de nitratos/nitritos embrionarios

Se evaluaron los niveles de nitratos/nitritos, índice de la producción de óxido nítrico. Con dicho fin, cuatro embriones fueron incubados en tubos conteniendo 2 ml de medio KRB durante 60 minutos, bajo atmósfera de carbógeno a 37 °C con agitación. Se agregó según correspondiera ET-1 (10^{-7} M) o Bosentan (10^{-7} M). Luego de la incubación los embriones fueron homogeneizados con sonicador en 250 μl de solución Tris 100 mM pH 7.4. Una alícuota fue separada para la determinación de proteínas por el método de Bradford, y el resto del homogenato fue utilizado para la determinación de la concentración de nitratos/nitritos mediante un equipo comercial que permite la cuantificación de estos compuestos, productos estables de metabolización del NO. Esta determinación implica la previa reducción enzimática de los nitratos presentes en la muestra por acción de la enzima nitrato reductasa, y la posterior cuantificación de los nitritos como azo-compuestos coloreados, mediante el reactivo de Griess (Green y col, 1982). Este producto cromogénico

fue determinado por densidad óptica a 540 nm en un lector de placas, utilizando curvas de NaNO_3 y NaNO_2 como estándares.

El coeficiente de variación intraensayo e interensayo fue del 7 y el 5% respectivamente.

Los resultados se expresaron como nmoles de nitratos/nitritos/ mg de proteínas.

⇒ Análisis de masa y síntesis de lípidos

Determinación de la masa lipídica embrionaria

Cuatro embriones fueron incubados durante tres horas bajo atmósfera de carbógeno a 37 °C con agitación, en 0.5 ml de KRB, con o sin agregado de PGE_2 (10^{-7} M) o 15dPGJ_2 ($2 \cdot 10^{-6}$ M) según correspondiera. Luego de la incubación, los embriones fueron conservados a -70°C hasta la extracción de lípidos.

Extracción de lípidos y cromatografía en capa delgada.

El total de lípidos fue extraído según el método descrito por Blight y Dyer (Blight y Dyer, 1959). Las muestras fueron sonicadas en 250 μl de PBS; una alícuota fue separada para la determinación de proteínas. El resto fue extraído dos veces con 3.5 ml de metanol: cloroformo 2: 1. El volumen total del extracto fue particionado con el agregado de 1 ml de H_2O y 1 ml de cloroformo. Obtenidas dos fases se procedió a eliminar la fase acuosa. La fase clorofórmica fue evaporada a sequedad en equipo concentrador. Una vez evaporadas las muestras fueron reconstituidas en metanol:cloroformo 2:1 v/v.

La resolución de las diferentes especies lipídicas se realizó mediante cromatografía en capa delgada. Antes de proceder a la siembra de las muestras, las placas fueron lavadas con acetona y activadas durante una hora a 100 °C.

Para el desarrollo de las placas se utilizaron diferentes sistemas de solventes, según la polaridad de los lípidos a resolver. Para la resolución de los lípidos neutros el sistema

Materiales y Métodos

utilizado fue hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:2 v/v/v). En el caso de los lípidos polares el sistema utilizado fue cloroformo: metanol: ácido acético: agua (50:37.5:3.5:1.5 v/v/v/v). Las placas fueron desarrolladas en oscuridad debido al método utilizado para el revelado de las mismas.

Revelado de las placas

Una vez desarrolladas las placas, se las secó bajo atmósfera de nitrógeno. La detección de los lípidos se realizó cuantificando su emisión fluorescente, para lo cual se agregó previamente 200 μ M de DPH (1,6 difenil hexatrieno) al sistema de solventes de corrida (Igal y col, 1993). Este fluorocromo insoluble en agua particiona en medio hidrofóbico uniéndose a las diferentes especies lipídicas. Las manchas fluorescentes fueron detectadas con luz UV y fotografiadas con una cámara acoplada a un sistema analizador de imágenes (Kodak DS120). En forma paralela, las placas fueron reveladas con *vapores de yodo*. Las placas fueron colocadas en cubas conteniendo yodo sólido, durante una hora. El yodo interacciona con los compuestos hidrofóbicos, lo cual se manifiesta por la aparición de manchas marrones en aquellos sitios de la placa donde se encuentran los lípidos. En el caso de las especies colesterol y ésteres de colesterol, se realizó además de lo descrito previamente, otro tipo de revelado a través de una tinción específica con solución de *cloruro férrico*. Para esto las placas fueron sumergidas en la solución y rápidamente retiradas de la misma. Eliminado el exceso de líquido las placas fueron colocadas en estufa a temperatura de 100°C. La aparición de manchas violáceas indicó la presencia de especies lipídicas con contenido de colesterol.

A continuación del revelado con vapores de yodo o con cloruro férrico, se realizó el registro digital de las placas a través de un escáner. Las imágenes así obtenidas fueron utilizadas posteriormente para el análisis de la masa de lípidos.

Cuantificación de la masa de lípidos

Las especies lipídicas fueron cuantificadas mediante el análisis de la intensidad y el área de las bandas por parte del programa KDS120. Estos datos fueron comparados con los

obtenidos a partir de los estándares de contenido y concentración conocida, sembrados en paralelo en la misma placa. Los resultados se expresaron como μg de lípidos/mg de proteína.

Síntesis de lípidos a partir de trazadores radioactivos

A fin de evaluar la síntesis de lípidos a partir de ácidos grasos sintetizados *de novo* o de precursores de la síntesis de colesterol, muestras constituidas por cuatro embriones, fueron incubadas durante tres horas bajo atmósfera de carbógeno a 37°C con agitación, en 0.5 ml de KRB, con el agregado de ^{14}C acetato de sodio ($1.2 \mu\text{Ci/ml}$) como trazador. Además, en las muestras que correspondiera se adicionó: PGE_2 (10^{-7} M), 15dPGJ_2 ($2 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-7}$, $2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$), BADGE (10^{-6} M) o troglitazona ($45 \mu\text{M}$). Finalizado el período de incubación los embriones fueron lavados con KRB para eliminar la radioactividad remanente y fueron conservados a -70°C , hasta la extracción de lípidos. Como control de la radioactividad agregada se tomó una alícuota del medio al inicio y finalización del período de incubación. Algunas muestras fueron incubadas en presencia de ^{14}C -oleato ($0.5 \mu\text{Ci/ml}$), con el fin de evaluar la incorporación del ácido graso a glicerolípidos. Si bien el procedimiento fue similar al descripto previamente, se utilizó como medio de incubación PBS adicionado con albúmina al 0.05% con el objeto de solubilizar al ácido graso y facilitar su incorporación al tejido embrionario.

Previamente a la separación de las distintas especies lipídicas, se determinó en contador de centelleo líquido la actividad presente en el extracto, índice de síntesis de lípidos totales.

Los lípidos fueron extraídos y resueltos por cromatografía en capa delgada tal como se detallara previamente. Todas las placas se corrieron en presencia de estándares.

Posteriormente, las placas fueron reveladas en presencia de vapores de yodo, con el objeto de delimitar las áreas correspondientes a las diferentes especies lipídicas a evaluar.

Finalmente las zonas radioactivas fueron recuperadas de las placas por raspado y colocadas en viales. El producto de raspado fue resuspendido en una mezcla de metanol: H_2O , 1:1 v/v y se le adicionó líquido de centelleo para cuantificación de la radioactividad en contador de centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como $\text{dpm}/\mu\text{g}$ de proteína.

⇒ Determinación de niveles y producción embrionaria de 15dPGJ₂

Cuatro embriones fueron incubados en medio KRB bajo atmósfera de carbógeno a 37°C con agitación durante sesenta minutos. Finalizada la incubación se procedió a la extracción de prostaglandinas del embrión y del medio de incubación embrionario, según se explicó en forma previa.

Para la determinación de los niveles de 15dPGJ₂ se utilizó un equipo comercial. El análisis fue realizado por inmunoensayo competitivo. El equipo utiliza un anticuerpo policlonal que se une en forma competitiva a la 15dPGJ₂ presente en la muestra y en los estándares, o a una molécula de fosfatasa alcalina que posee unida covalentemente una molécula de 15dPGJ₂. Luego de los tiempos requeridos de incubación con los reactivos y sustrato, se detiene la reacción enzimática. Como resultado de la reacción, se genera un producto coloreado cuya intensidad es determinada en lector de placa a 405 nm. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de 15dPGJ₂ presente en la muestra y estándares. Los resultados fueron expresados como pg de 15dPGJ₂/μg de proteína.

⇒ Cultivo de embriones

Con el objeto de evaluar los efectos directos del entorno diabético sobre el desarrollo de embriones sanos en período de organogénesis, se procedió a realizar cultivo de embriones de ratas sanas durante 24hs en presencia de suero de animales sanos y diabéticos según el método descrito por New (New, 1978).

Para estos experimentos, los animales fueron sacrificados en el día 9.5 de preñez. En forma similar a lo descrito previamente, se liberó el embrión, rodeado por el saco vitelino visceral, saco amniótico y cono ectoplacentario, de la decidua uterina. Se tomaron todos los recaudos necesarios para evitar dañar el saco vitelino, y se procedió a rasgar la membrana de Reichert. Tres embriones rodeados por las membranas indicadas, fueron incubados en tubos de polipropileno conteniendo 3 ml de solución Tyrodes, adicionada con suero de rata control (glucemia 108 ± 13 mg /dl) o diabética tipo I (glucemia: 400 ± 44 mg/dl). El suero fue previamente incubado durante una hora a 56°C, con objeto de inactivar el complemento

presente en el mismo. Finalizada la inactivación se adicionó al suero penicilina (1000 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Al inicio del cultivo los embriones fueron gaseados con una mezcla de O₂: CO₂: N₂ 5:5:90 e incubados en estufa a 37°C en aparato rotador operando a 30 r.p.m. Luego de 16 hs. de cultivo los tubos fueron gaseados con la misma mezcla de gases O₂: CO₂: N₂ en proporciones 15:5:80. A las 24 hs se dio por finalizado el cultivo. Los embriones fueron separados de sus membranas, saco vitelino y amnios, y fueron evaluados morfológicamente. Posteriormente los embriones fueron lavados con PBS y homogeneizados en esta solución para la determinación de niveles de contenido proteico y de PGE₂, tal como se explicó previamente.

⇒ *Expresión de PPARγ, PPARβ/δ y de las enzimas Cicloxigenasa I y II.*

Procesamiento de las muestras

Seis a ocho embriones fueron homogeneizados con sonicador en buffer de lisis. De este homogenato se tomó un volumen equivalente a 100 µg de proteína embrionaria el cual se diluyó con buffer de siembra. Previamente a la siembra, las muestras fueron hervidas durante 5 minutos con el objeto de desnaturalizar las proteínas, y luego sometidas a separación electroforética.

Electroforesis

Las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida-bisacrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes. El gel utilizado estaba constituido por dos regiones diferenciadas, una región apiladora donde se sembraron las muestras, y una región de resolución, en la cual se produjo la separación de las proteínas presentes en las muestras.

Una vez sembradas las muestras, se procedió a la electroforesis, en presencia de buffer de corrida. El voltaje aplicado a la cuba electroforética fue de 30 V durante 30 minutos, tiempo en el cual las muestras penetraron en la región de resolución. A partir de ese

momento se aumentó el voltaje a 100 V hasta finalizar la corrida, la cual duró aproximadamente 90 minutos.

Finalizada la electroforesis, los geles fueron lavados durante una hora con buffer de transferencia, con el objeto de eliminar SDS remanente.

Western Blot

Transferencia

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm . Para esto se utilizó el sistema húmedo, en el cual todo el sistema (filtros, geles y membranas) se sumergen en el buffer de transferencia durante el proceso de la electrotransferencia. Previamente membranas y papeles de filtro fueron equilibrados con buffer de transferencia. Este proceso se realizó durante dos horas a 100 V, manteniendo el equipo de transferencia refrigerado con hielo.

Finalizada la transferencia, las membranas fueron incubadas durante 16 hs. en solución de bloqueo a temperatura de 4°C.

Posteriormente fueron incubadas con anticuerpos primarios durante dos horas con agitación y a temperatura ambiente. En la puesta a punto del ensayo se determinaron las diluciones óptimas de los diferentes anticuerpos utilizados en estos experimentos. En el caso de los factores de transcripción PPAR β/δ y PPAR γ la dilución utilizada fue 1:500, en el caso de las dos isoformas de la enzima COX la dilución fue de 1:300. A modo de control negativo, en algunas calles se omitió la incubación con el primer anticuerpo.

Todos los anticuerpos utilizados son comerciales. Los anticuerpos primarios anti PPAR β/δ , anti PPAR γ , anti COX I y anti COX II fueron producidos en conejo.

Finalizada esta incubación las membranas fueron lavadas seis veces durante 5 minutos con solución de PBS adicionada con tween 20 al 0.05% (PBS-T).

Luego se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo. Los anticuerpos secundarios utilizados para unirse a los primarios anti PPAR β/δ y anti PPAR γ reconocieron IgG de conejo, fueron producidos en cabra y fueron conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante. Los anticuerpos secundarios utilizados anti COX I y anti COX II

reconocieron IgG de conejo y fueron producidos en cabra y unidos a la molécula de biotina. El período de incubación con los anticuerpos secundarios fue de dos horas, en el caso de los PPARs y una hora para las COX, en condiciones de agitación y temperatura ambiente. En el caso de los PPARs la dilución utilizada fue 1:10.000, mientras que la dilución para la detección de las dos isoformas de COX fue de 1:3.000. Finalizada esta incubación se procedió, nuevamente a lavar las membranas seis veces durante 5 minutos con PBS-T.

Detección por Quimioluminiscencia

Para la detección de las bandas correspondientes a los factores de transcripción PPAR γ y PPAR β/δ se procedió al revelado por quimioluminiscencia. Las membranas fueron incubadas con una solución reveladora durante 5 minutos. Esta solución está compuesta por luminol y peróxido de hidrógeno. La reacción de la enzima peroxidasa con su sustrato, peróxido de hidrógeno, genera la oxidación del luminol el cual a su vez produce luz.

Finalizada la incubación con el reactivo se procedió a realizar una auto radiografía para lo cual la membrana, cubierta con un film plástico, fue puesta en contacto con una placa radiográfica durante 30 minutos, en oscuridad. Finalizado dicho período la placa radiográfica fue revelada, sumergiéndola secuencialmente en solución reveladora, solución fijadora y agua. Finalizado este proceso, se detectaron los sitios correspondientes a las bandas donde se unió el segundo anticuerpo. El peso molecular de las bandas fue determinado por comparación con el estándar de peso molecular.

Detección por la técnica del Complejo Avidina-Biotina

Se utilizó un sistema de visualización a partir de una reacción que da como resultado un producto cromogénico. Las membranas fueron incubadas en presencia del complejo avidina-peroxidasa durante 60 minutos, con agitación constante. Finalizada la incubación, se lavó la membrana cinco veces durante 5 minutos con PBS-T. Culminados los lavados se procedió al revelado en presencia del sustrato diaminobenzidina preparado según las

indicaciones del fabricante, durante un tiempo aproximado de 5 minutos. Se esperó la aparición de bandas color marrón, indicando los sitios donde hubo unión del anticuerpo primario a su antígeno. El peso molecular de las bandas fue determinado por comparación con un estándar de peso molecular.

Luego del revelado, las membranas de nitrocelulosa y las placas radiográficas, según correspondiera, fueron digitalizadas utilizando para ello un escáner acoplado a un procesador de imágenes (Adobe Photoshop)

Estadística

Todos los resultados se expresaron como medias con su correspondiente error estándar medio (SEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, en conjunción con el test de Tuckey. Para los casos que correspondía se realizó el test de Student, χ^2 o test exacto de Fisher. Las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas cuando $p = 0.05$ o menor.



Resultados

❖ RESULTADOS

Capítulo I

⇒ CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS MODELOS DE DIABETES TIPO I Y TIPO II.

El modelo de Diabetes tipo I, obtenido por inyección i.p. de estreptozotocina se caracteriza por cursar con elevadas glucemias, destrucción casi total de las células β pancreáticas y reducción en la masa del páncreas así como niveles circulantes de insulina marcadamente disminuidos (Rodrigues et al, 1999). En nuestro grupo experimental, los animales diabéticos tipo I presentaron glucemias mayores a 350 mg/dl, $p < 0.001$ (Tabla N° 1). Se observan además, niveles incrementados en triacilglicéridos circulantes ($p < 0.001$). A diferencia de lo que ocurre en la rata sana, no se verifica aumento de peso desde el inicio de la preñez hasta el día 10.5 de gestación. En estas condiciones, sólo el 56% de los animales con apareo positivo identificado, conserva su preñez en día 10.5 de gestación, mientras que en los animales sanos, el 96% mantiene la preñez. En el animal diabético tipo I la preñez no llega a término, y esto se produce por muerte materna o por pérdida fetal a mediados de gestación.

Por otra parte, el modelo de Diabetes tipo II, obtenido por inyección neonatal de estreptozotocina, muestra glucemias basales elevadas respecto del control ($p < 0.001$), siendo dichos valores menores que en la rata diabética tipo I. A diferencia del modelo de Diabetes tipo I, no son insulino dependientes, aunque los niveles circulantes son menores a los controles (Blondel y col, 1989; Weir y col, 1981). Dado que en este modelo el daño producido en el tejido pancreático es temprano (Portha y col, 1978) este tejido se regenera parcialmente, con lo cual si bien la masa disminuye respecto al control, esta disminución no es tan marcada como en el modelo de Diabetes tipo I (Wang y col, 1996; Rodrigues y col, 1999). No se observan en este modelo anomalías en los niveles de triglicéridos séricos, ni diferencia en la ganancia de peso durante la gesta (Tabla N°1). Tampoco se observa pérdida de la gestación al comparar el número de animales con apareo identificado y el número de

Resultados

animales con embriones al día 10.5 de gesta. Se detecta en los animales diabéticos tipo II un retraso de 24 hs en la fecha de parto (Tabla N°1).

Tabla N° 1

“Características generales de las hembras sanas, diabéticas tipo I y tipo II”

Características	CONTROLES	DIABETICAS I	DIABETICAS II
Glucemias basales	100 ± 10 mg/dl (n=20)	350 ± 20 mg/dl (n=25) p< 0.001 vs C ANOVA	215 ± 21 mg/dl (n=20) p< 0.001vs C
Aumento de peso desde inicio de la preñez hasta día 10.5 de gestación (g)	29.3 ± 4 (n=10)	-6.22 ± 4.66 (n=15) p< 0.001 vs C ANOVA	26 ± 6.26 (n=7)
Triglicéridos en suero (g/l)	0.77 ±0.09 (n=8)	2.05 ±0.20 (n=5) p<0.001 vs C ANOVA	0.98 ± 0.10 (n=5)
Animales preñados al día 10.5 post apareo	48/50 (hembras con apareo positivo)	27/50 p<0.0001 vs C test exacto de Fischer	46/50
Preñez a término	SI	NO	SI
Duración de la preñez	22 días	Mediados de gesta por pérdida fetal o muerte materna	23 días

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS EMBRIONES PROVENIENTES DE RATAS SANAS, DIABETICAS TIPO I Y TIPO II

El desarrollo embrionario se ve afectado por la Diabetes materna, especialmente en el modelo tipo I, el cual según se ha señalado es una patología más severa comparada con el modelo tipo II.

En el día en que se sacrifica a las hembras para obtener los embriones se verificó que el útero, a diferencia de las ratas sanas, está muy irrigado y con presencia de coágulos sanguíneos. En los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I se observó incremento en el número de reabsorciones ($p < 0.001$) y disminución en el contenido proteico ($p < 0.001$), parámetro que posee una estrecha correlación con el crecimiento embrionario (Tabla N° 2). Al analizar otros aspectos morfológicos, se encontró un número disminuido de somitas ($p < 0.05$) e incremento en las anomalías morfológicas, las cuales en su mayoría correspondían a defectos severos de la región cefálica del tubo neural ($p < 0.001$). Al comparar el estado de rotación axial, se observó que un alto porcentaje de los embriones de ratas diabéticas tipo I se encontraban en estadio no rotado ($p < 0.001$); este es otro indicador de retraso en el desarrollo embrionario (Tabla N° 2). Según puede observarse en la Tabla N° 3, la incidencia de reabsorciones ($p < 0.001$) y de anomalías morfológicas ($p < 0.001$) se encuentra incrementada en los embriones de ratas diabéticas tipo II. Al igual que en los embriones de ratas diabéticas tipo I, la mayoría de las malformaciones se localizan en el tubo neural. También es importante mencionar lo concerniente al contenido proteico: en los embriones de ratas diabéticas tipo II este contenido es menor respecto del embrión sano ($p < 0.05$). Esto indica que los embriones diabéticos tienen un crecimiento retardado respecto del embrión sano. En cuanto al estado de rotación axial y el número de somitas, no se observaron diferencias entre embriones de ratas sanas y diabéticas tipo II.

Resultados

Tabla N° 2

“Características de los embriones de ratas sanas y de embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I”

	CONTROL	DIABETICO tipo I
Reabsorciones	3 % (4/132 sitios de implantación)	14 % (28/202) ^a
Sin rotación s/eje	23 % (29/128 embriones)	60 % (99/174) ^a
En rotación	64 % (82/128)	33 % (53/174) ^a
Rotados	13 % (17/128)	7 % (11/174) ^b
Anomalías morfológicas	2 % (3/128)	29 % (52/174) ^a
Número de Somitas	14 ± 0.23 (19)	12 ± 0.63 (21) ^b
Contenido proteico	66 ± 4 µg (21)	test t de Student 41.5 ± 4.5 µg (20) ^a test t de Student

^a $p < 0.001$ vs control; ^b $p < 0.05$ vs control; Análisis estadístico: χ^2 excepto lo aclarado en tabla

Tabla N° 3

“Características de los embriones de ratas sanas y de los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II”

	CONTROL	DIABETICO tipo II
Reabsorciones	3 % (4/132 sitios de implantación)	13 % (22/186 deciduas) ^b
Sin rotación axial	23 % (29/128 embriones)	21 % (34/146)
En rotación	64 % (82/128)	64 % (94/146)
Rotados axialmente	13 % (17/128)	12 % (18/146)
Anomalías Morfológicas	2 % (3/128)	18 % (25/146) ^a
Número de Somitas	14 ± 1 (19)	12 ± 1 (15)
Contenido proteico	66 ± 4 µg (21)	50 ± 2 µg (21) ^b test t de Student

^a $p < 0.001$ vs control; ^b $p < 0.05$ vs control; Análisis estadístico: χ^2 , excepto aclaración en tabla

Resultados

Se presentan a continuación algunas fotografías de embriones observados bajo lupa, donde pueden verificarse algunas características morfológicas del desarrollo normal y anomalías morfológicas en embriones provenientes de ratas diabéticas.

Fotografía N° 1



Embrión de rata sana rotado. Puede apreciarse el corazón, el primer arco branquial, las cápsulas óptica y ótica, así como las somitas. (Aumento: 50X)

Fotografía N° 2



Embrión de rata diabética tipo I con severas anomalías de tubo neural. El embrión no ha rotado y manifiesta retraso en el crecimiento (Aumento 50X)

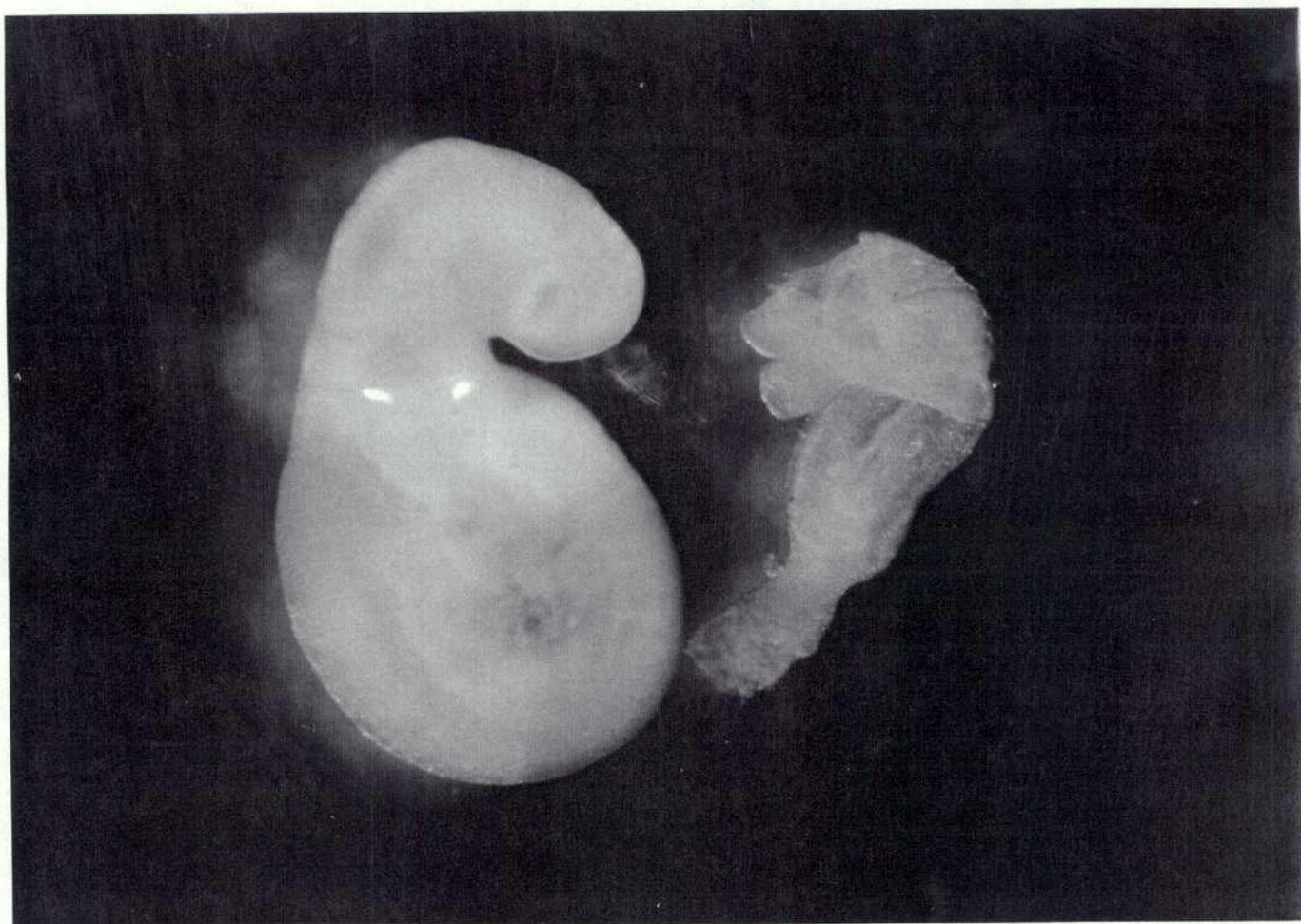
Resultados

Fotografía N° 3



Embrión de rata diabética tipo II. Vista dorsal del neuroporo anterior abierto (Aumento 32 X)

Fotografía N° 4



Embrión de rata diabética tipo II rotado (izquierda) y embrión de rata diabética tipo I, no rotado (derecha), con defectos de tubo neural y severo retraso en el crecimiento. Ambos embriones obtenidos en el mismo día gestacional (10.5). (Aumento: 32 X)

Resultados

Fotografía N° 5



Dos embriones provenientes de ratas diabética tipo II. El embrión de la izquierda no ha rotado y presenta anomalías en el tubo neural. A la derecha embrión en rotación (Aumento 20 X).

Capítulo II

⇒ **ENDOTELINAS EN LA ORGANOGENESIS TEMPRANA DEL EMBRION DE RATA SANA Y DIABETICA**

Niveles de endotelinas en embriones de ratas sanas y de ratas diabéticas tipo II

Las endotelinas, como ya se ha mencionado, son agentes vasoactivos, con funciones especiales durante el desarrollo embrionario, puesto que están involucradas en la formación de estructuras derivadas de las células de cresta neural. La endotelina-1 está particularmente involucrada en la formación de estructuras, tales como la mandíbula, el maxilar, timo, tiroides y los grandes vasos sanguíneos entre otros (Kurihara y col, 1994 y 1995).

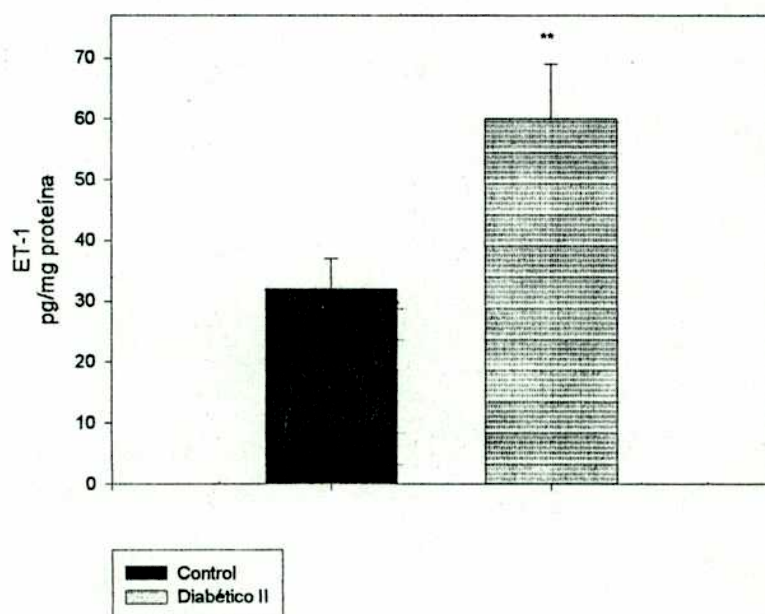
Como primer paso en este estudio se determinaron los niveles de endotelina-1 en embriones de rata sana y diabética tipo II en el día 10.5 de preñez, correspondiente al período de organogénesis temprana. En la evaluación presente y en posteriores determinaciones, cada muestra incluyó cuatro embriones, que suministraron la masa óptima para estos estudios.

En el Gráfico N° 1, se observa que los niveles de endotelina-1 están incrementados en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II ($p < 0.01$).

Resultados

Gráfico N° 1.

"Niveles de Endotelina -1 en embriones sanos y diabéticos"



***** $p < 0.01$ vs control Los valores representan medias $\pm$ SEM; $n=7$ (28 embriones) para cada grupo. Análisis estadístico: test t de Student***

Efecto de óxido nítrico sobre los niveles de ET-1

Una vez conocidos los niveles de ET-1, se decidió estudiar la regulación de este agente a través del óxido nítrico (NO). El NO, es un agente vasoactivo con efecto antagónico al de las endotelinas, y al igual que la ET-1 con funciones morfogénicas durante la organogénesis temprana.

Resultados

Con este fin, se evaluó el efecto de dadores de NO y de inhibidores de la óxido nítrico sintetasa (NOS) luego de una incubación de una hora en baño termostatzado a 37°C, gaseado con carbógeno, sobre los niveles de ET-1, en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo II.

En el Gráfico N° 2 se observa que en embriones de ratas sanas la adición de L-NMMA, inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa, provocó un descenso en los niveles de ET-1 ($p<0.05$) tanto a concentración 600µM como 1000µM.

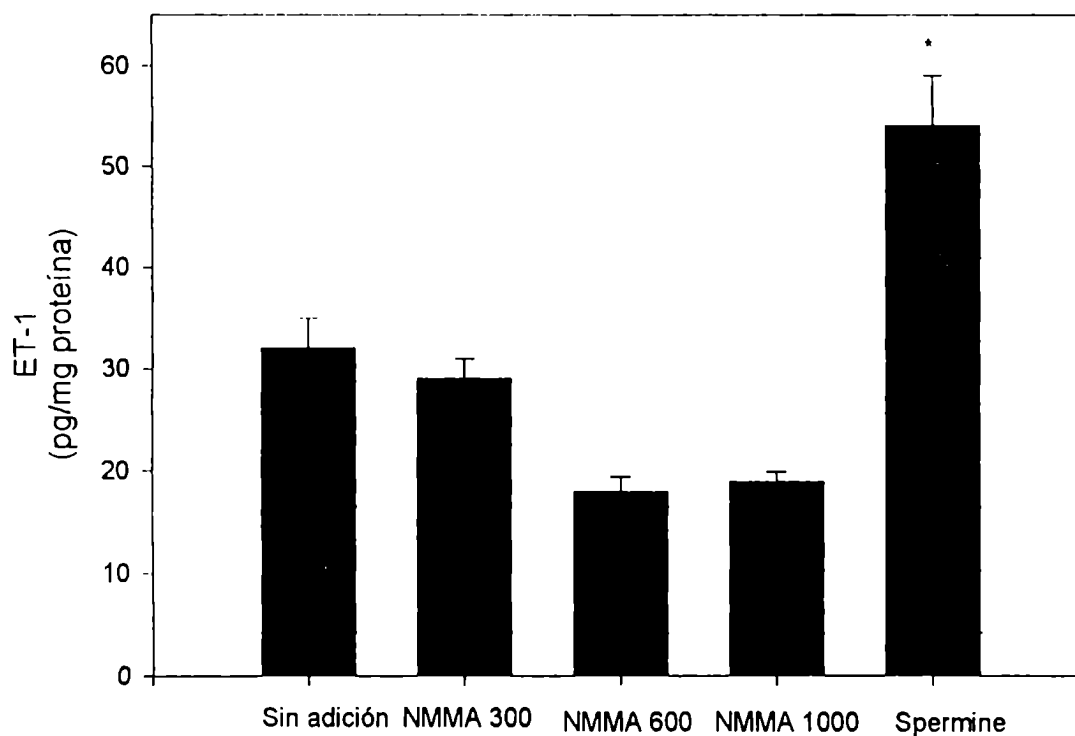
La adición de una concentración menor de L-NMMA (300 µM) no tuvo efecto alguno sobre los niveles de ET-1. Por otra parte, la incubación en presencia de un dador de óxido nítrico, spermineNONOato (300µM), provocó aumento en los niveles de ET-1 ($p<0.05$).

En los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, los cuales poseen niveles mayores de ET-1, pudo observarse un patrón similar a lo descripto en los embriones sanos. Se detectó disminución en los niveles de ET-1 por efecto de L-NMMA, tanto a concentración 600µM como 1000µM, ($p<0.05$ vs diabético sin adición) e incremento en presencia de spermineNONOato (300µM) ($p<0.05$ vs diabético sin adición) (Gráfico N°3).

Resultados

Gráfico N° 2

"Efecto de óxido nítrico sobre los niveles de ET-1 en embriones de ratas sanas"

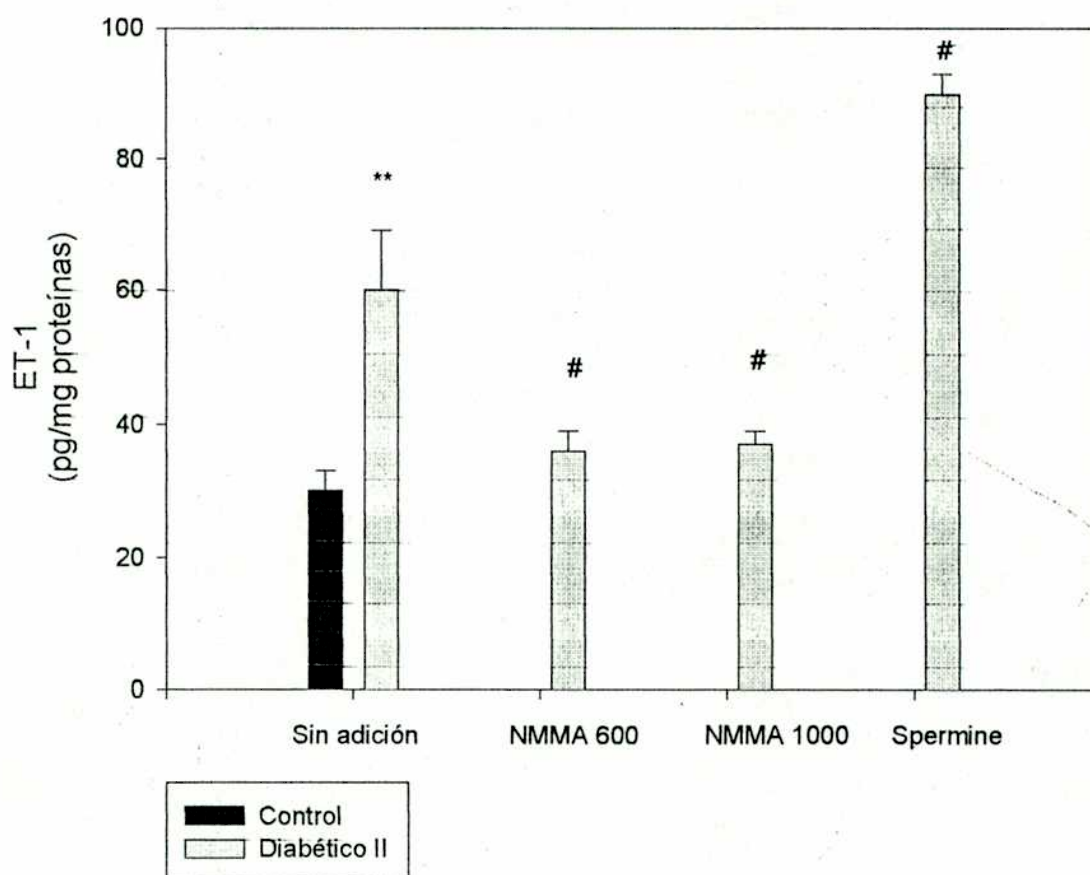


** $p < 0.05$ vs control sin adiciones*

Los valores representan medias $\pm$ SEM; $n=7$ (28 embriones), para cada grupo experimental. Análisis estadístico: Análisis de varianza (ANOVA), y test de Tukey de comparaciones múltiples.

Gráfico N° 3

“Efecto de óxido nítrico sobre los niveles de ET-1 en embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II”



$p < 0.05$ vs diabético sin adición

** $p < 0.02$ vs control sin adición

Los valores representan medias $\pm$ SEM; $n=7$ (28 embriones) para cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

Influencia de ET-1 sobre la generación de óxido nítrico

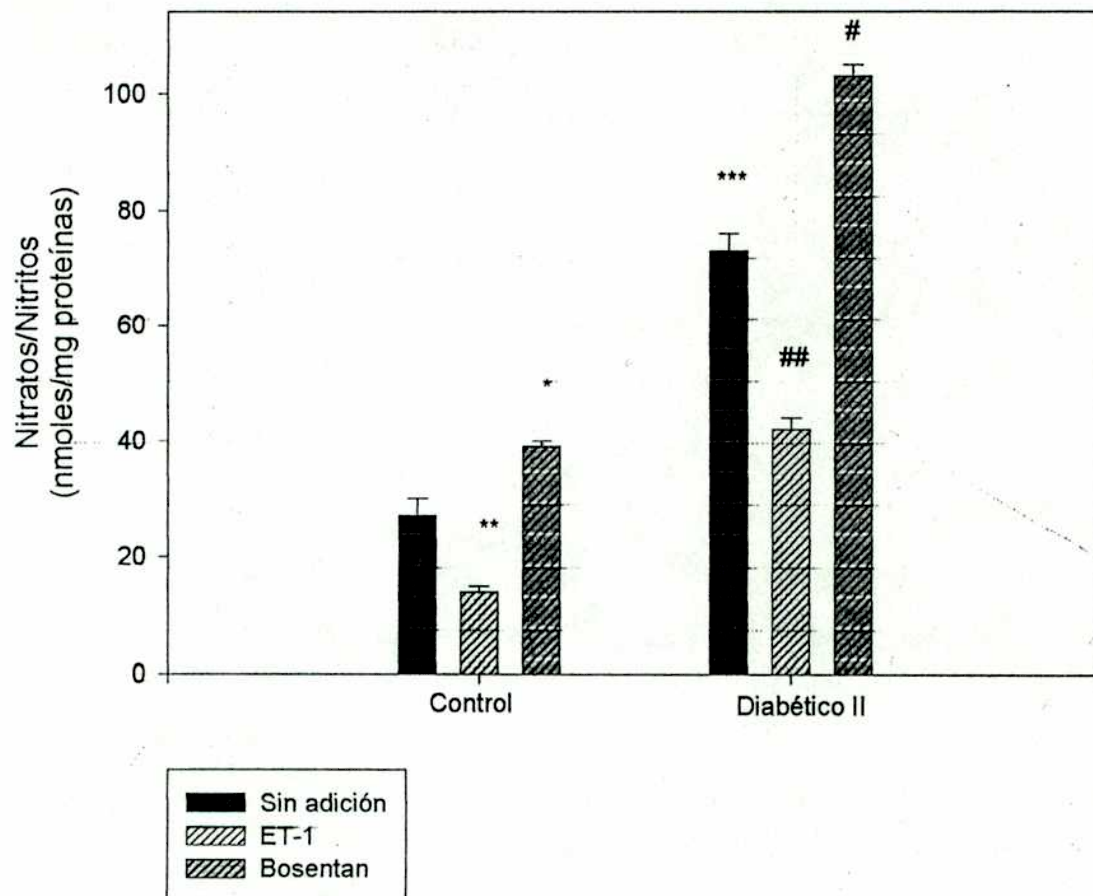
Puesto que los niveles de NO deben estar finamente regulados durante la organogénesis y conociendo que existen influencias interactivas entre ambos compuestos, se estudió el efecto de ET-1 sobre la producción de óxido nítrico. La producción de NO fue evaluada mediante el dosaje de nitratos/nitritos, sus metabolitos estables, después de una hora de incubación, en condiciones de temperatura y gaseado controladas (baño termostatzado a 37° C con agitación, bajo atmósfera de carbógeno). En embriones de ratas sanas de 10.5 días de gesta la incubación en presencia de ET-1 (10^{-7} M) disminuyó los niveles de nitratos/nitritos ($p<0.02$). Por otra parte la inhibición de la acción de ET-1 mediante la adición de Bosentán (10^{-7} M), antagonista de los receptores de endotelina ETA y ETB, generó aumento en los niveles de nitratos/nitritos ($p<0.05$) (Gráfico N° 4).

En los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, tal como se señalara previamente, los niveles de nitratos/nitritos se hallaron incrementados con respecto al embrión sano ($p<0.001$). Al igual que lo descripto para embriones de ratas sanas, la adición de ET-1 (10^{-7} M) disminuyó los niveles de nitratos/nitritos ($p<0.02$ vs diabético sin adición) mientras que la adición de Bosentán (10^{-7} M) incrementó dichos niveles ($p<0.05$ vs diabético sin adición).

Resultados

Gráfico N°4

"Efecto de ET-1 sobre los niveles de nitratos/nitritos"



* $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.001$ vs control sin adición

$p < 0.05$, ## $p < 0.02$ vs diabético sin adición.

Los valores representan medias $\pm$ SEM; $n=7$ (28 embriones) para cada grupo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Efecto de ET-1 sobre la síntesis de PGE₂

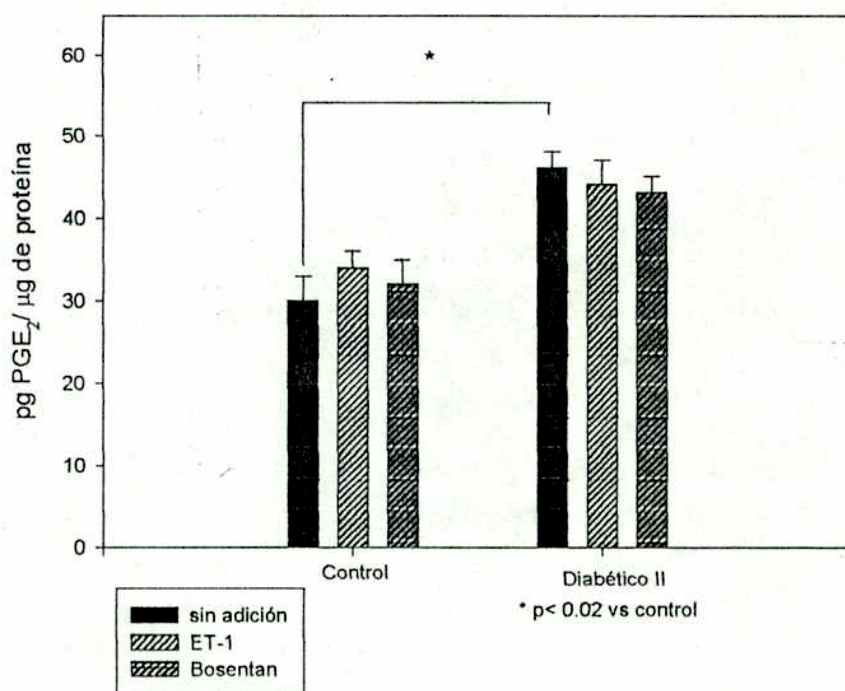
Nuestros trabajos previos, indicaban la existencia de un mecanismo de modulación sobre la síntesis de PGE₂, mediado por el NO (Jawerbaum y col, 1998). Este agente vasoactivo estimula la síntesis de PGE₂ en el embrión de rata diabética tipo II (Jawerbaum y col, 1998). Puesto que nuestros resultados mostraron que ET-1 fue capaz de modular los niveles de NO, se decidió estudiar la capacidad moduladora de ET-1 sobre la síntesis de PGE₂.

Se estudió el efecto de ET-1 (10^{-7} M) sobre la síntesis de PGE₂ (Gráfico N° 5). Tal como se observó en previos experimentos realizados en nuestro laboratorio (Jawerbaum y col, 1998) los niveles de PGE₂ liberados al medio de incubación se hallaron incrementados en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II con relación a los embriones sanos ($p<0.02$). Sin embargo, la adición de ET-1 (10^{-7} M) no modificó la síntesis y liberación de PGE₂ en embriones de ratas sanas y ratas diabéticas tipo II. En el mismo sentido, tampoco se observaron modificaciones en la síntesis y liberación de PGE₂ por la adición de Bosentán (10^{-7} M) (antagonista de receptores tipo ETA y ETB) en los dos grupos analizados.

Resultados

Gráfico N° 5

"Efectos de ET-1 sobre la síntesis de PGE₂ en embriones de ratas sanas y de ratas diabéticas tipo II"



Los valores representan medias $\pm$ SEM; n=7 muestras para cada grupo experimental

Test estadístico: ANOVA de una vía y Tukey para comparaciones entre grupos

Niveles de Endotelinas y su modulación en el embrión proveniente de rata diabética tipo I

El modelo de diabetes tipo I, como ya se mencionó previamente, se caracteriza por una mayor frecuencia de anomalías morfológicas en sus embriones.

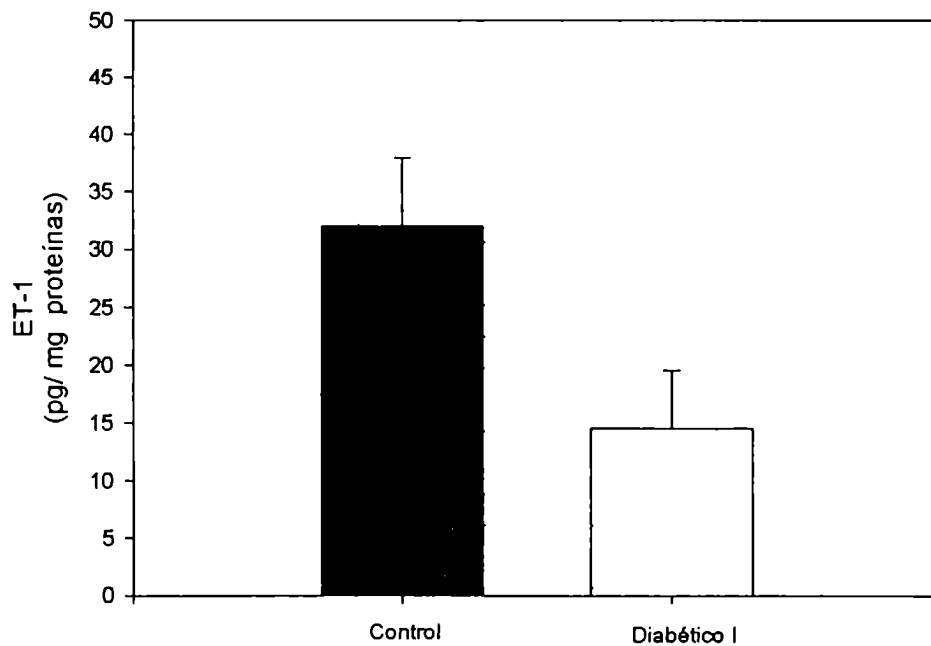
Resultados

Como continuación del estudio, se decidió evaluar los niveles de ET-1 y su modulación en el embrión proveniente de ratas diabéticas tipo I.

Contrariamente a lo visto en embriones de ratas diabéticas tipo II, el contenido embrionario de ET-1 es menor que en los embriones sanos sanos ($p < 0.05$) (Gráfico N°6).

Gráfico N° 6:

"Niveles de ET-1 en embriones de ratas DI"



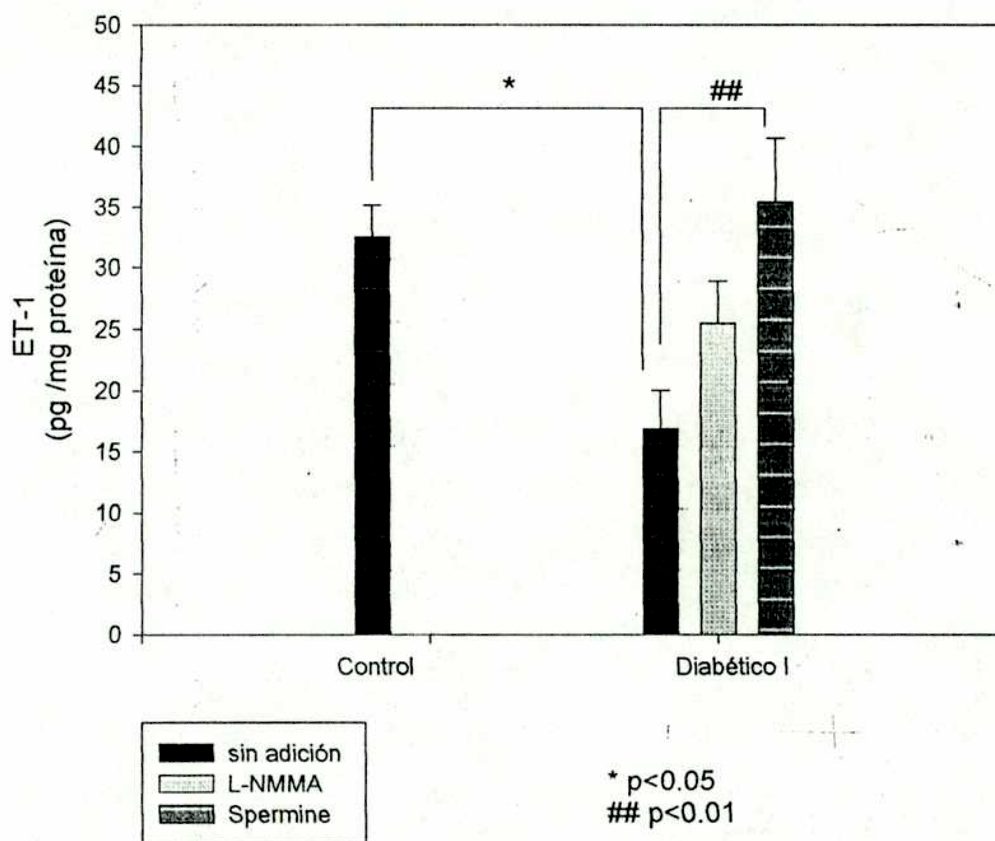
* $p < 0.05$ vs control

Los valores representan las medias $\pm$ SEM; $n=8$ (32 embriones) para cada grupo experimental. Análisis estadístico: test t de Student

Resultados

El agregado de un dador exógeno de NO al medio de incubación (Spermine NONOato 300 μ M) produjo un incremento en los niveles embrionarios de ET-1 ($p < 0.01$). Sin embargo, la inhibición de la actividad NOS por L-NMMA (600 μ M) no tuvo efecto sobre dichos niveles (Gráfico N°7).

Gráfico N° 7 "Efecto de NO sobre los niveles de ET-1 en embriones de ratas DI"



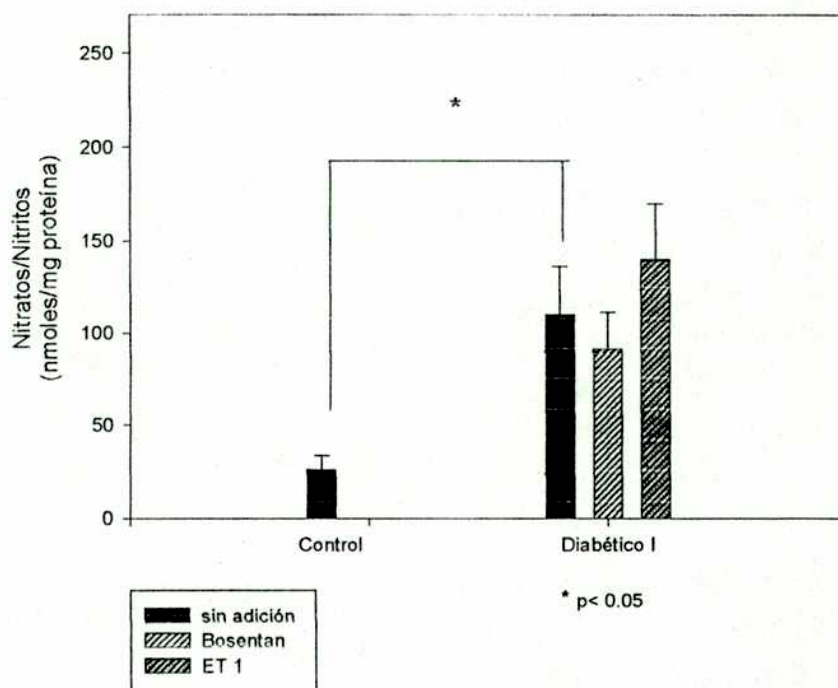
Los valores representan las medias $\pm$ SEM; $n=8$ (32 embriones) para cada grupo experimental. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

A continuación se evaluaron los niveles endógenos de nitratos/nitritos, metabolitos estables del NO. Los resultados mostraron incremento en el contenido de nitratos/nitritos en embriones de ratas diabéticas tipo I ($p < 0.05$) con respecto a los embriones de ratas sanas (Gráfico N°8). La adición al medio de incubación de ET-1 (10^{-7} M) no indujo cambios en los niveles de nitratos/nitritos de los embriones de ratas diabéticas tipo I. De igual forma la incubación de dichos embriones en presencia de Bosentan (10^{-7} M) no modificó los valores de nitratos/nitritos.

Gráfico N°8:

"Efectos de ET-1 sobre los niveles de NO en embriones de ratas DI"



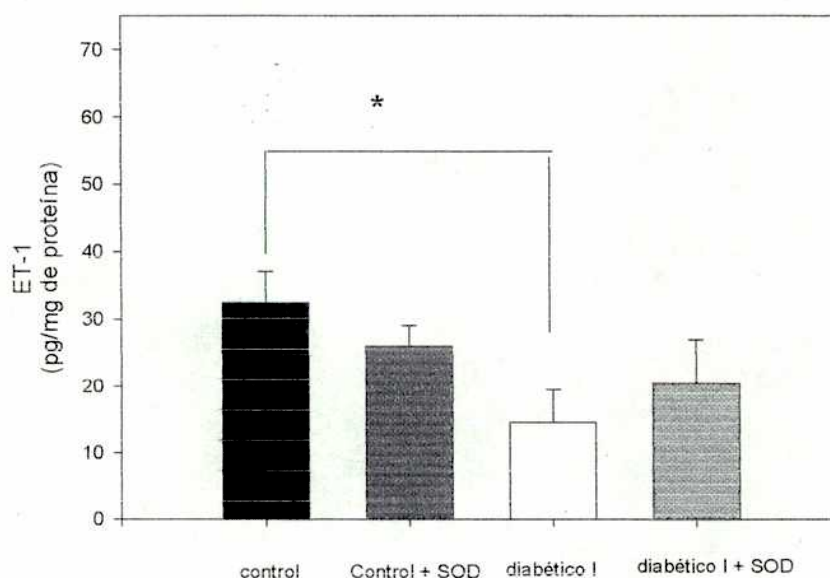
Los valores representan las medias $\pm$ SEM, $n=8$ (32 embriones) para cada grupo experimental. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

Los niveles endógenos de nitratos/nitritos se encuentran elevados en los embriones de ratas diabéticas tipo I, sin embargo el NO endógeno no parece modular los niveles de ET-1. Puesto que elevados niveles de especies reactivas del oxígeno, característicos de un estado diabético severo, podrían inactivar al NO, haciendo que éste se oxide y dé lugar a la formación de peroxinitritos, se evaluaron los efectos de la enzima superóxido dismutasa (SOD, 1000 U/ml), removedora de aniones superóxido, sobre los niveles de ET-1. Nuestros resultados indican que este tratamiento no tuvo efecto sobre los niveles endógenos de ET-1 (Gráfico N°9).

Gráfico N° 9

"Superóxido dismutasa y niveles de ET-1"



* C vs DI $p < 0.05$

Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=8$ (32 embriones) para cada grupo experimental. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

=> Conclusiones del capítulo II

El análisis de los niveles de endotelinas muestra alteraciones en los embriones de ratas diabéticas.

En embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II durante el período de organogénesis temprana: existe un incremento en los niveles de ET-1. El óxido nítrico modula en forma positiva dichos niveles. Como contrapartida, ET-1 a su vez regula en forma negativa la producción de óxido nítrico. De esta manera, ambos compuestos se hallan interrelacionados, estableciéndose una retroalimentación negativa entre ambos. Este mecanismo de control parece evitar el incremento excesivo de ambos compuestos dentro del embrión. Este tipo de modulación se observa asimismo en los embriones provenientes de animales sanos.

Si bien ET-1 modula los niveles NO, no se observa efecto sobre la síntesis y liberación de PGE₂ ni en los embriones sanos ni en los embriones de ratas diabéticas tipo II.

En embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I durante el período de organogénesis temprana: a diferencia de lo observado en el modelo de diabetes tipo II, los niveles de ET-1 resultan menores que el control, y se observan alteraciones en el mecanismo modulador con respecto a los animales sanos. En efecto, a pesar de que el óxido nítrico exógeno incrementa los niveles embrionarios de ET-1, el alto contenido de NO endógeno no es capaz de modular dichos niveles. Por otra parte, el agregado exógeno de ET-1 no modifica el contenido embrionario de óxido nítrico.

Si bien este modelo se caracteriza por la presencia de elevadas concentraciones de especies reactivas de oxígeno capaces de inactivar el NO, el tratamiento con la enzima SOD, removedora de aniones superóxido, no tiene efecto alguno sobre los niveles de ET-1.

Resultados

Capítulo III

⇒ “PROSTAGLANDINA E₂ DURANTE LA ORGANOGÉNESIS DE LOS EMBRIONES DE RATAS SANAS Y DE RATAS DIABÉTICAS: NIVELES Y MECANISMOS DE MODULACIÓN”

Sección III a

PGE₂: SÍNTESIS Y TRANSPORTE EN EL EMBRION DE RATA DIABÉTICA TIPO I.

Estudios “in vitro” durante la organogénesis temprana

Características morfológicas de embriones sanos cultivados durante 24 horas en presencia de suero de rata sana y diabética tipo I.

Con el fin de estudiar la influencia del entorno diabético sobre el desarrollo morfológico y fisiológico del embrión, se ha recurrido al cultivo “*in vitro*” de embriones durante el periodo de organogénesis temprana. Como ya se ha mencionado, este es un periodo donde se producen grandes cambios, iniciándose la formación de los órganos.

Con este objetivo se realizaron cultivos “*in vitro*” de embriones durante 24 horas en el periodo de organogénesis temprana.

Embriones de ratas sanas fueron explantados en el día 9.5 de preñez, e incubados en presencia de suero de rata preñada control o diabética tipo I. Los resultados indicaron que los embriones sanos incubados en presencia de suero diabético presentaron mayor incidencia de malformaciones ($p < 0.05$) y menor contenido proteico ($p < 0.01$) (tabla N° 4) que aquellos incubados en suero proveniente de ratas sanas. Estas anomalías coinciden con las previamente descriptas para los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I.

Resultados

Tabla N° 4

“Características morfológicas de los embriones sanos después de 24 horas de cultivo “in vitro” en presencia de suero sano o diabético tipo I”

	Suero control	Suero diabético
Malformaciones	4 % (3/75 embriones)	16 % (13/79) ^a
Número de somitas	12 ± 0.7 (75)	9 ± 0.7 (79) ^b
Contenido proteico (µg)	63 ± 4 (19)	41 ± 5 (19) ^b

a = $p < 0.05$ vs control, χ^2

b = $p < 0.01$ vs control Test *t* de Student

Niveles de PGE₂ en embriones de ratas diabéticas y en embriones de ratas sanas incubados en presencia de suero diabético.

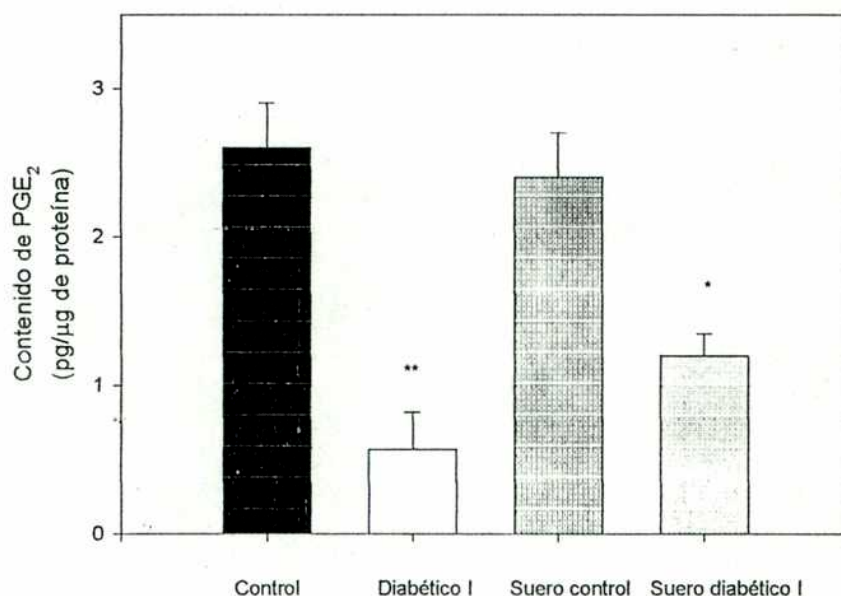
Estudios realizados previamente por otros autores (Piddington et al, 1996) señalaron la importancia de la PGE₂ para la formación y cierre del tubo neural, e indicaron que los niveles disminuidos de dicho prostanoide en embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I correlacionaron con la presencia de anomalías de cierre de tubo neural.

Tomando en cuenta estos antecedentes, se decidió evaluar la influencia del entorno diabético sobre el contenido de PGE₂ en embriones en cultivo. Cuando embriones sanos explantados en día 9.5 de gesta, fueron incubados durante 24 horas en presencia de suero de rata diabética tipo I, el contenido de PGE₂ fue menor respecto de los embriones cultivados en presencia de suero de rata sana ($p < 0.05$) (Gráfico N° 10). Esto es similar a lo observado en embriones diabéticos tipo I, de día 10.5 de gesta, donde el contenido de PGE₂ es menor al hallado en los embriones sanos ($p < 0.01$).

Resultados

Gráfico N° 10

"Contenido de PGE₂ en embriones cultivados en suero control y diabético tipo I"



* $p < 0.05$ vs control

** $p < 0.01$ vs control

Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=8$ (24 embriones) para cada grupo

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples.

Síntesis, contenido y liberación de PGE₂ en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I.

Las prostaglandinas son sintetizadas y liberadas por el embrión al medio de incubación. Debido a que dichos compuestos poseen funciones parácrinas y autócrinas, es importante evaluar la producción, contenido y liberación de PGE₂ en el embrión en etapa de organogénesis temprana. Dichos parámetros fueron evaluados en embriones de 10.5 días de gesta, provenientes de ratas sanas y diabéticas tipo I.

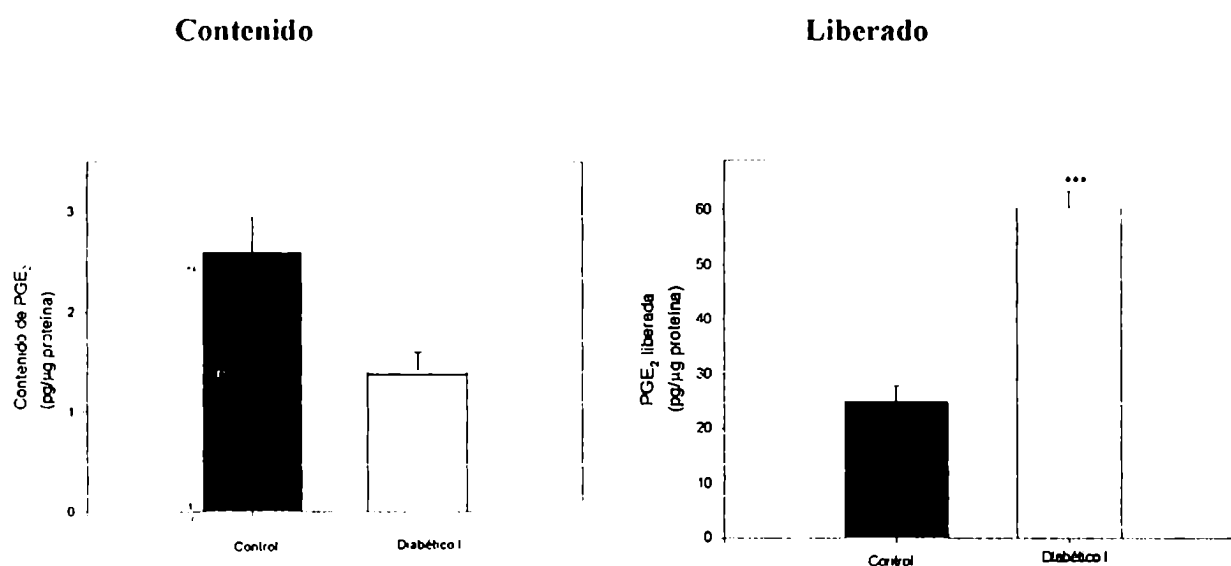
Pudo observarse que los embriones de rata diabética tipo I liberan al medio una mayor cantidad de PGE₂ que los embriones sanos ($p < 0.001$). Sin embargo, como ya se mencionó antes, el contenido de dicha prostaglandina en el embrión diabético tipo I es menor que en

Resultados

el embrión sano ($p < 0.001$) (Gráfico N° 11). Si se toman en cuenta los valores totales en pmoles, vemos que la producción de PGE_2 es 100 veces mayor que la inicial en el embrión diabético ($p < 0.02$), mientras que en los embriones sanos esta producción es de 10 veces mayor que la inicial (Tabla N° 5).

Gráfico N° 11

"Contenido y liberado de PGE_2 en embriones controles y diabéticos I"



*** $p < 0.001$ vs control

Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=7$ (21 embriones) para cada grupo experimental

Análisis estadístico: test t de Student

Resultados

Tabla N° 5

“Producción embrionaria de PGE₂”

	Control	Diabético
Contenido inicial de PGE₂ (pmoles totales)	175 ± 13	19.9 ± 0.5 ^a
Contenido de PGE₂ a los 60 min de incubación (pmoles totales)	1573 ± 140	2282 ± 230 ^b
PGE₂ generada por el embrión	10 X del valor inicial	100 X del valor inicial

^a *p*<0.001 vs control; ^b *p*<0.02 vs control

Los valores representan la media ± SEM n= 7

Análisis estadístico: test t de Student

Captación y liberación de ³H-PGE₂

Puesto que la síntesis de PGE₂ es un proceso activo y origina un gran desbalance entre el compuesto liberado al medio y aquél retenido en el interior del embrión de rata diabética tipo I, se decidió estudiar una posible alteración en el transporte de dicha prostaglandina.

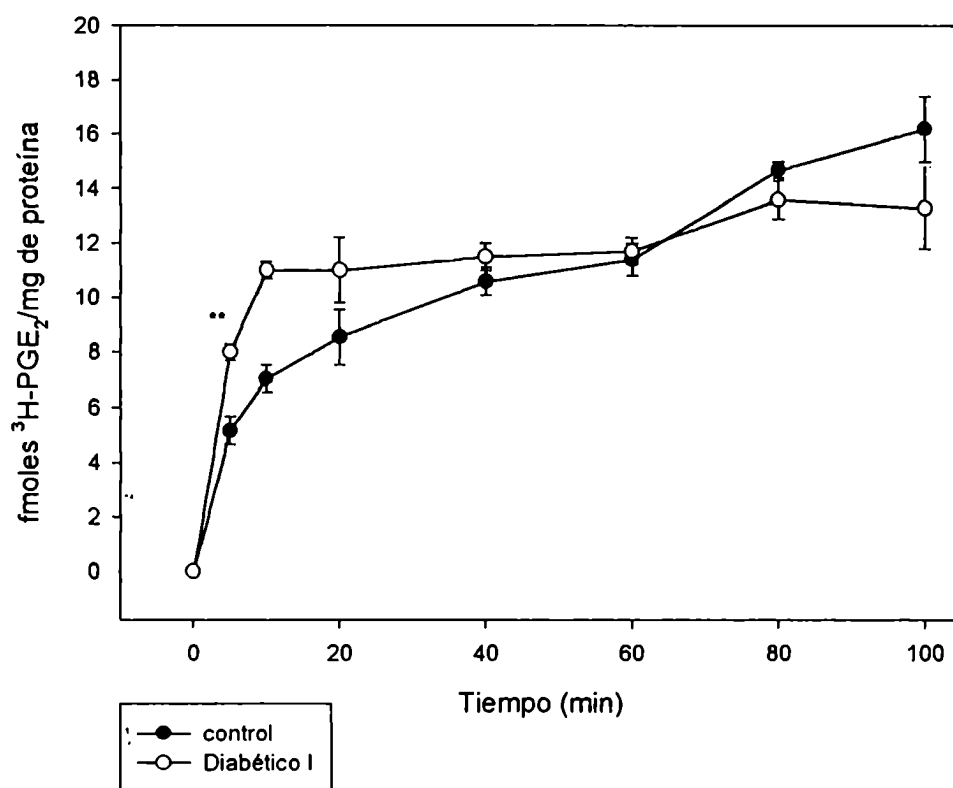
A tal fin, se evaluó a diferentes tiempos de incubación, la incorporación y liberación de ³H-PGE₂ por parte de embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I obtenidos en día 10.5 de gesta. En cuanto a la incorporación, se observó que a tiempos cortos (5 y 10'), ésta fue mayor en los embriones de ratas diabéticas (*p*<0.01). A partir de los 20 minutos la captación fue similar en ambos grupos de embriones (Gráfico N° 12). Al evaluar la liberación de ³H-PGE₂ previamente incorporada a los embriones en estudio, se observó que el porcentaje remanente de prostaglandina tritiada fue menor en aquellos provenientes de ratas diabéticas, tanto a los 20 como a los 30 minutos de incubación (*p*<0.05) (Gráfico N° 13).

Resultados

Con el mismo objetivo, se realizaron experimentos similares con embriones sanos obtenidos en el día 9.5 de gesta y cultivados *in vitro* durante 24 hs en presencia de suero de rata sana y suero diabético tipo I. Este último grupo mostró anomalías en la retención de ^3H -PGE₂, similares a las encontradas en los embriones provenientes de ratas diabéticas ($p < 0.02$) (Tabla N° 6).

Gráfico N° 12

"Captación de ^3H -PGE₂"



**** $p < 0.01$ vs embriones de rata control .**

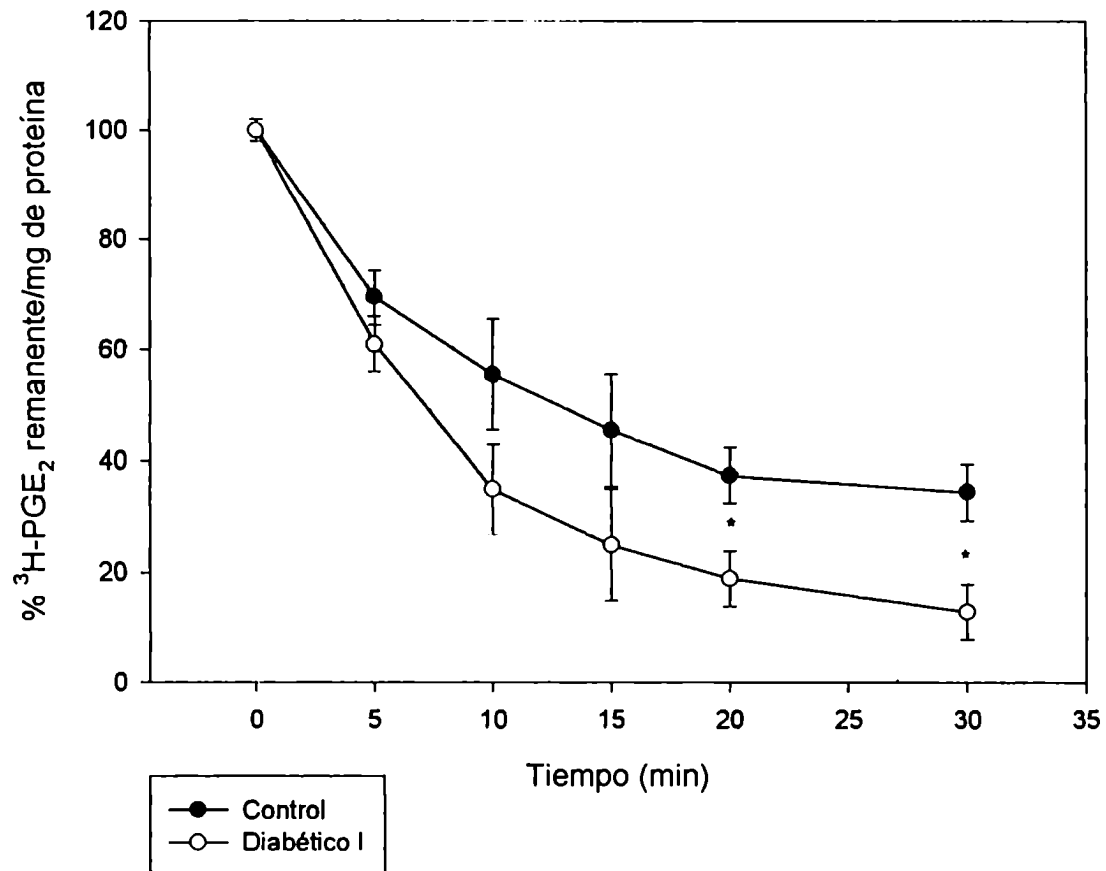
Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n = 7$ (28 embriones) para cada grupo.

Análisis estadístico: test t de Student

Resultados

Gráfico N° 13

"Liberación de $^3\text{H-PGE}_2$ después de 60 minutos de preincubación"



* $p < 0.05$ vs embriones de ratas control

Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=7$ (28 embriones) para cada grupo

Análisis estadístico: test t de Student

Resultados

Tabla N° 6

“Captación y liberación de ^3H -PGE₂ en embriones controles cultivados durante 24 horas en suero diabético”

	Suero control	Suero diabético
Incorporación de ^3H -PGE ₂ (fmol ^3H -PGE ₂ /mg proteína) (60')	11 ± 1	12 ± 2
Liberación (% de ^3H -PGE ₂ remanente en el embrión/mg proteína) (30')	49 ± 5	29 ± 5 ^a

^a $p < 0.02$ vs control

Los valores representan la media ± SEM; n=8 para cada grupo experimental

Análisis estadístico: test t de Student

Sección III b

EFFECTO DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINA E₂ EMBRIONARIA

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostraron que el NO modula positivamente la síntesis de PGE₂ en embriones de ratas diabéticas tipo II (Jawerbaum y col, 1998). Como se mostró en este estudio, los niveles de NO están incrementados en los embriones de rata diabética tipo I. Con el objeto de analizar si NO modula la síntesis de PGE₂ en embriones de ratas diabéticas tipo I se realizaron los siguientes experimentos:

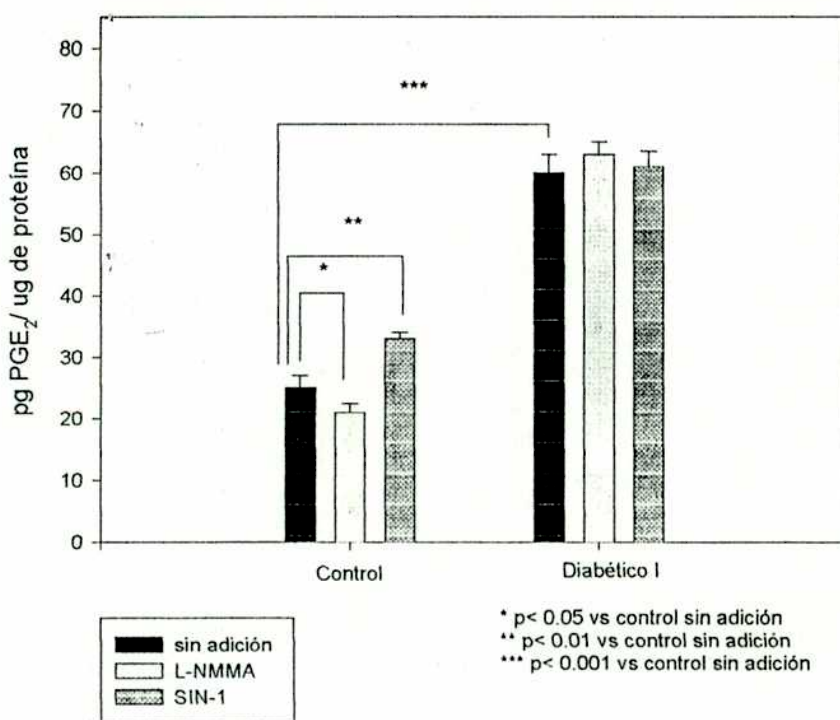
Embriones de 10.5 días de gesta, provenientes de ratas sanas o diabéticas tipo I fueron incubados durante una hora, a 37°C en atmósfera de carbógeno y agitación, en presencia de inhibidores de la actividad óxido nítrico sintasa o con el agregado de dadores de NO. Tal como se describió previamente, observamos que los niveles de PGE₂ liberados al medio de incubación están incrementados en el grupo diabético ($p < 0.001$). En embriones de ratas

Resultados

sanas, la adición al medio de incubación de un inhibidor de la actividad óxido nítrico sintasa (L-NMMA, 300 μ M) o de un dador de óxido nítrico (SIN-1, 300 μ M), resultó en disminución ($p < 0.05$) y en un aumento ($p < 0.01$), respectivamente, de los niveles de PGE_2 liberados al medio. Por el contrario, en embriones de ratas diabéticas tipo I no se observó efecto alguno, ni por el agregado del inhibidor de NOS ni en presencia del dador de NO (Gráfico N° 14).

Gráfico N° 14

"Efecto de óxido nítrico sobre los niveles de PGE_2 liberada por embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I"



Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=8$ (24 embriones) para cada grupo

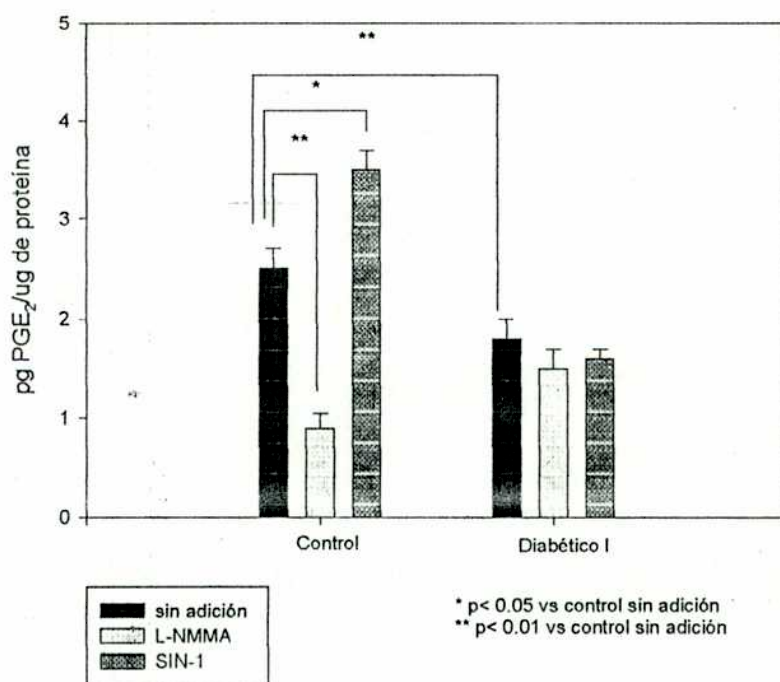
Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

El contenido de PGE_2 , mostró un patrón similar al observado cuando se analizó la liberación de dicha prostaglandina al medio de incubación, ya que existe una disminución en los niveles embrionarios de PGE_2 producida por la adición de L-NMMA (300 μM), y un aumento en presencia del dador de óxido nítrico SIN-1 (300 μM) en los embriones provenientes de ratas sanas (Gráfico N° 15). Al analizar los efectos de óxido nítrico en los embriones provenientes de ratas diabéticas, el agregado de ambos compuestos fue incapaz de producir cambios en el contenido embrionario de la prostaglandina. En estos embriones el contenido de PGE_2 fue menor que en los provenientes de ratas sanas ($p < 0.01$), tal como se describió en forma previa (Gráfico N° 15).

Gráfico N° 15

"Contenido de PGE_2 , Efectos de NO"



Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=8$ (24 embriones) para cada grupo

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Sección III c

EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS CONSTITUTIVA E INDUCIBLE DE LA ENZIMA COX EN EL EMBRIÓN DE RATA SANA Y DIABÉTICA DURANTE LA ORGANOGENESIS

Con el objeto de determinar la presencia de la enzima COX en el embrión durante la organogénesis y las isoformas de dicha enzima presentes durante este período de desarrollo embrionario, se estudió la expresión de COX I (Figura N°1) y COX II (Figura N° 2).

Si bien la marca es tenue, pudo detectarse la banda correspondiente a la enzima COX I, por debajo de la banda del marcador de peso molecular correspondiente a 80 KD, tanto en embriones provenientes de ratas sanas y ratas diabéticas tipo I y tipo II en el día 10.5 de gestación y en el día 13.5 de gestación. Por el contrario, no pudo detectarse por este método la presencia de COX II tanto en embriones de ratas sanas como en embriones de ratas diabéticas tipo I y tipo II en el día 10.5 de gestación.

En ambos análisis, COX I y COX II, se realizaron controles negativos, omitiendo el primer anticuerpo correspondiente. En ninguno de los dos casos se observó señal.

Figura N° 1

"Expresión de la enzima COX I"



Referencias: PM peso molecular; C embriones provenientes de ratas sanas; DI embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I; DII embriones de ratas diabéticas tipo II; C 13 embriones de ratas sanas de 13.5 días de gesta; CP control positivo: páncreas. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Figura N° 2

"Expresión de la enzima COX II"



Referencias: Embrión proveniente de rata sana (C 10.5), de rata diabética tipo I (DI 10.5) y de rata diabética tipo II (DII 10.5) CP: control positivo, páncreas de rata diabética. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

⇒ Conclusiones del capítulo III

El cultivo de embriones de ratas sanas, durante 24 horas en presencia de suero diabético provoca la aparición de anomalías morfológicas, de crecimiento y alteraciones en el contenido y transporte de PGE_2 , alteraciones similares a las observadas en los embriones de ratas diabéticas tipo I.

En estos embriones, el contenido de PGE_2 se halla sensiblemente disminuido, aunque los niveles liberados al medio son mayores que en embriones controles. Esto se explicaría por la presencia de una alteración en el transporte de PGE_2 , que impediría retener la prostaglandina en el interior del embrión.

El óxido nítrico no modula los niveles de PGE_2 en el embrión de rata diabética tipo I. Esto se manifiesta tanto en los niveles de prostaglandina contenida como liberada por estos embriones. El patrón es el opuesto al observado en aquellos embriones provenientes de ratas sanas o de ratas diabéticas tipo II, donde, según previamente se señaló, los niveles de PGE_2 son regulados por NO (Jawerbaum et al, 1998).

Resultados

Se detecta la presencia de la isoforma constitutiva de la enzima COX en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I y tipo II durante la organogénesis temprana. Sin embargo, no es posible detectar la presencia de la isoforma inducible (COX II) en ninguno de los tres grupos de embriones estudiados en dicho período de gestación.

Capítulo IV

⇒ “Metabolismo lipídico en embriones de ratas sanas y diabéticas durante la organogénesis temprana”

Sección IVa

NIVELES DE LÍPIDOS EN EMBRIONES DE RATAS SANAS Y DIABÉTICAS

A lo largo del desarrollo embrionario, los lípidos cumplen funciones estructurales, energéticas y de señalización, necesarias para el normal desarrollo del embrión. Por esto se analizaron aspectos inherentes al metabolismo de los lípidos en los embriones durante el período de organogénesis.

En primer lugar, se decidió realizar un análisis del perfil lipídico de los embriones de ratas sanas y diabéticas en el día 10.5 de gesta. De esta forma, se estudiaron los niveles de lípidos polares y neutros. Dentro del grupo de los polares, las especies más abundantes resultaron ser fosfatidilcolina (representa un 80% de los lípidos de este grupo) y fosfatidiletanolamina, siendo baja la marca para otros lípidos polares tales como fosfatidilinositol y esfingomielina (Figura N° 3 a). Este perfil coincide con el de la mayoría de los tejidos animales. Respecto a los lípidos neutros los triacilglicéridos resultan ser mayoritarios. Además, se detectaron ésteres de colesterol, colesterol y ácidos grasos libres (Figura N° 3 b).

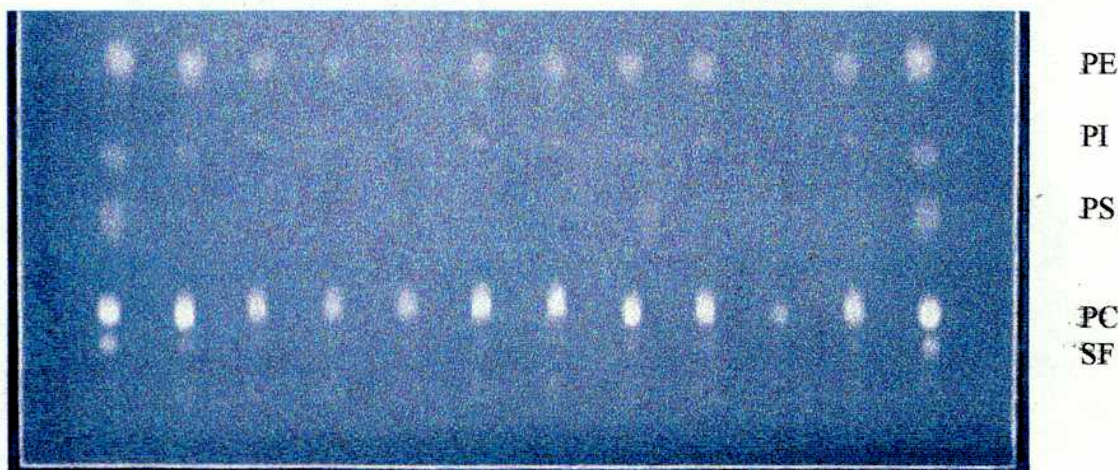
Al comparar los embriones de rata sana con los embriones de ratas diabéticas tipo I, no se hallaron diferencias significativas respecto de los niveles de fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol, mientras que en el caso de triacilglicéridos, los niveles resultaron ser mayores en los embriones de ratas diabéticas ($p < 0.01$) (Gráfico N° 16).

Puesto que las prostaglandinas son capaces de modular el metabolismo de lípidos, y en particular la PGE_2 es necesaria para el normal cierre del tubo neural en los embriones en organogénesis, se decidió estudiar el efecto de esta prostaglandina sobre los niveles de lípidos embrionarios. Embriones de 10.5 días de gestación provenientes de ratas sanas o ratas diabéticas tipo I, fueron incubados en presencia de PGE_2 ($10^{-7}M$) durante 3 horas, en baño termostatzado bajo atmósfera de carbógeno. La adición de dicha prostaglandina en el

Resultados

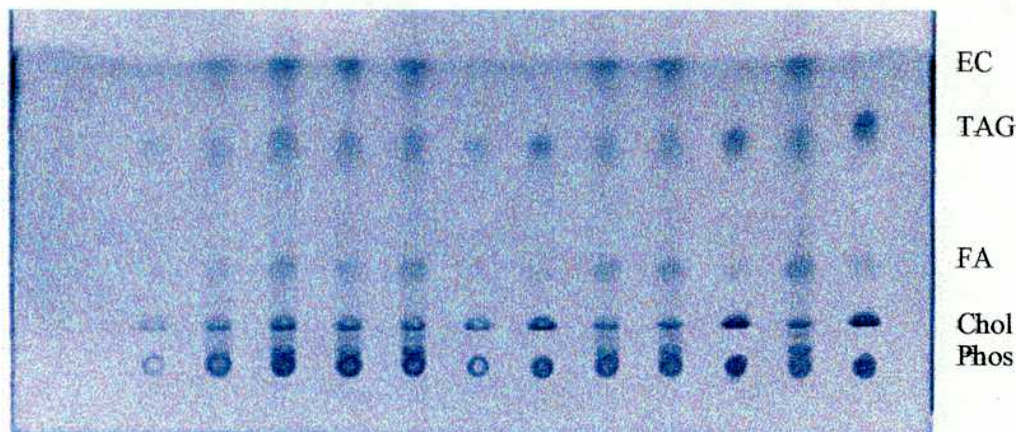
medio de incubación no modificó los niveles de ninguna de las especies lipídicas analizadas ni en embriones de ratas sanas ni en aquellos que provienen de ratas diabéticas tipo I (gráficos N° 17 y 18).

Figura N° 3 a “Lípidos polares”



Cromatografía en capa fina para lípidos polares, revelada con DPH. Referencias: SF esfingomielina; PC fosfatidilcolina; PS fosfatidilserina; PI fosfatidilinositol; PE fosfatidiletanolamina

Figura N° 3 b “Lípidos Neutros”

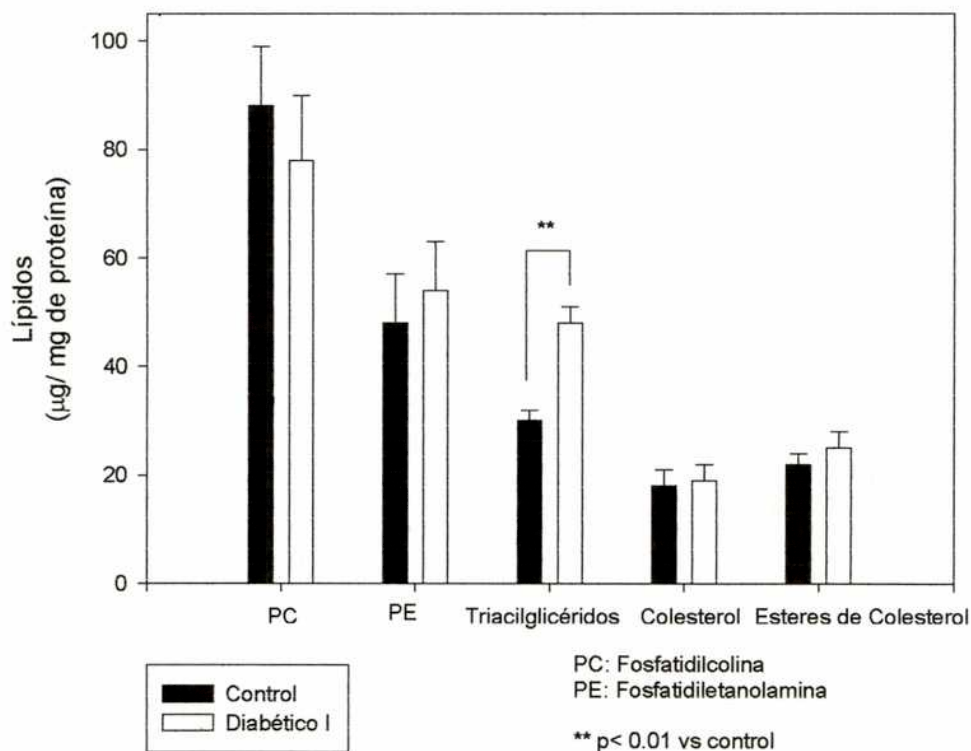


Cromatografía en capa fina para lípidos neutros, revelada con yodo. Referencias: Phos: fosfolípidos, Chol: colesterol, FA: ácidos grasos, TAG: triacilglicéridos, EC: ésteres de colesterol.

Resultados

Gráfico N° 16

"Niveles de lípidos polares y neutros en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I"

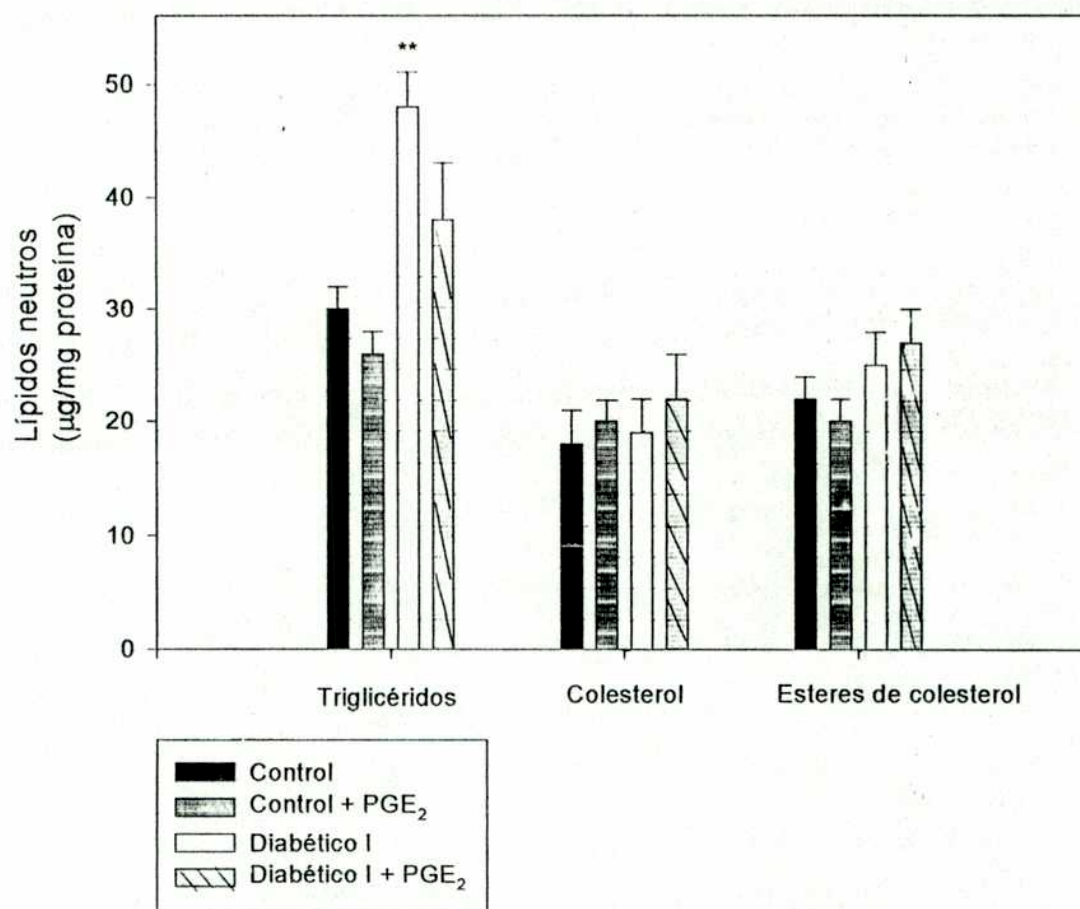


Los valores representan la media $\pm$ SEM; n=10 (40 embriones) para cada grupo.
Análisis estadístico: ANOVA y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

Gráfico N° 17

"Niveles de lípidos neutros en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I. Efecto de PGE_2 "



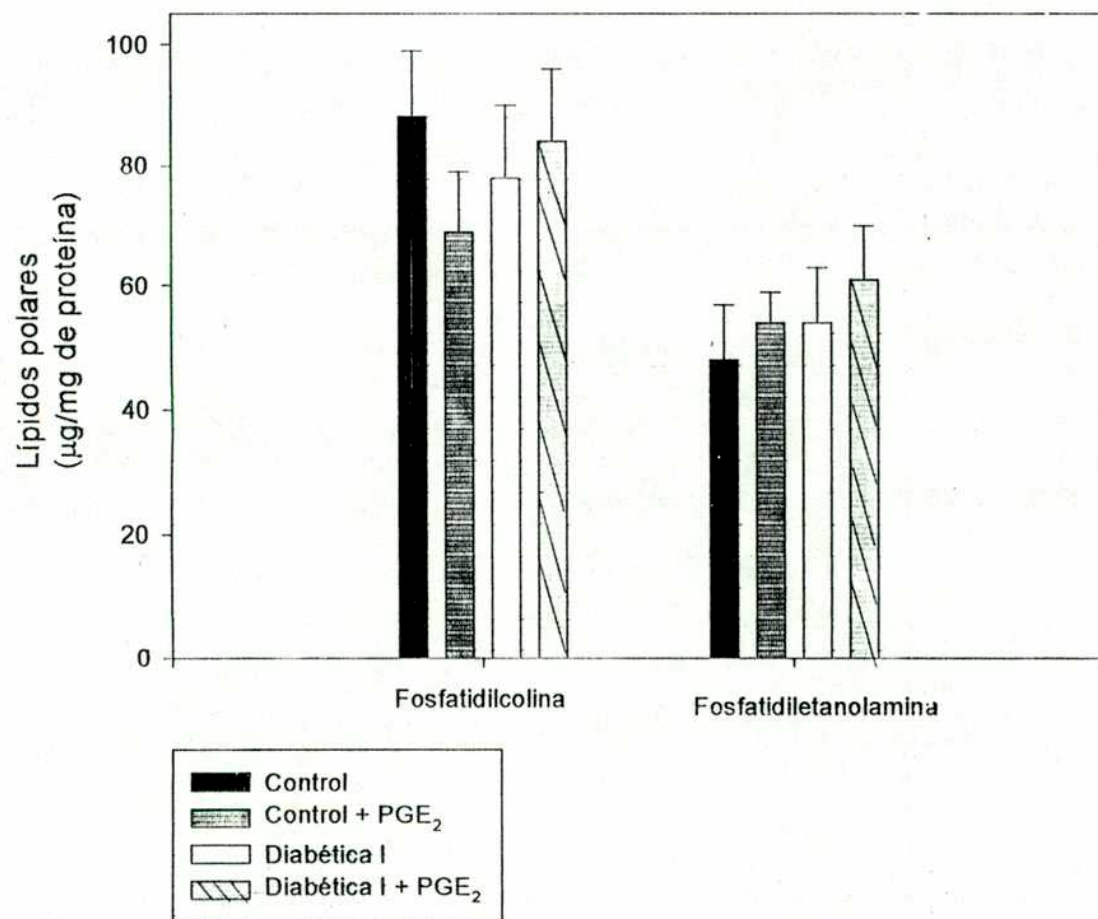
**** $p < 0.01$ vs control**

Los valores representan la media $\pm$ el SEM. $n=10$ (40 embriones) para cada grupo.

Análisis estadístico: ANOVA y test de Tukey de comparaciones múltiples

Gráfico N° 18

"Niveles de lípidos polares en embriones controles y diabéticos tipo I"



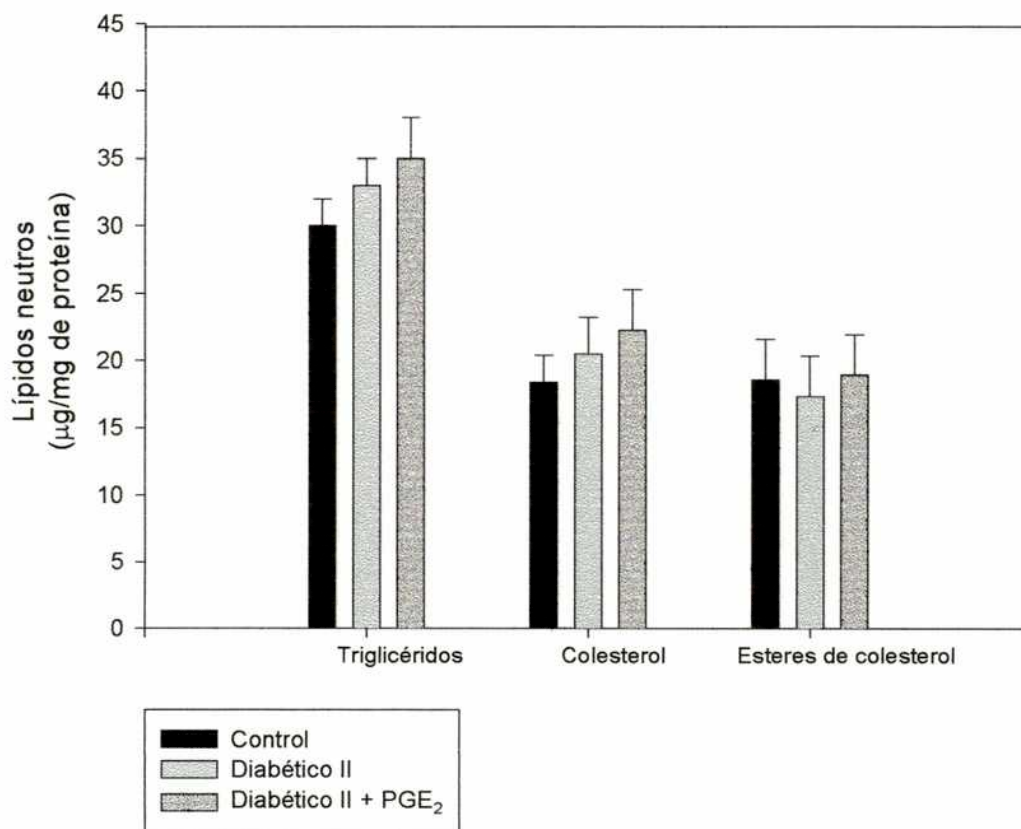
*Los valores representan la media $\pm$ SEM; n= 10 (40 embriones) para cada grupo.
Análisis estadístico: ANOVA de una vía, las diferencias entre los grupos no son significativas*

Resultados

Al analizar los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, no se hallaron diferencias significativas, respecto de los embriones de rata sana, en los niveles de lípidos en ninguna de las especies lipídicas analizadas. Por otra parte la adición de PGE_2 al medio de incubación, en condiciones similares a lo descripto previamente, no modificó los niveles de lípidos evaluados (Gráfico N° 19).

Gráfico N° 19

"Niveles de lípidos neutros en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo II"



** $p < 0.05$ vs control*

Los valores representan la media $\pm$ el SEM; $n=10$ (40 embriones) por grupo. Análisis estadístico: ANOVA, las diferencias entre grupos no son significativas.

Sección IVb

SÍNTESIS DE LÍPIDOS A PARTIR DE PRECURSORES RADIATIVOS

¹⁴C-Acetato de sodio

Durante su desarrollo, el embrión utiliza lípidos para diferentes funciones. El origen de estos lípidos, según se describió previamente, puede ser materno o endógeno, por síntesis propia del embrión.

Con el objeto de estudiar la síntesis de lípidos en el embrión de rata sana y diabética durante la organogénesis temprana, se utilizó como marcador al ¹⁴C-Acetato de sodio (1.2 µCi/ml). Dicho marcador se incorpora a los glicerolípidos en los ácidos grasos sintetizados *de novo*, o a través de la vía de síntesis de colesterol. (Figura N° 4). Luego de tres horas de incubación en condiciones de temperatura y gaseado controlado previamente indicadas, la incorporación de marca, indicador de síntesis *de novo*, se encontró disminuida en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I en relación a los embriones de rata sana. Dicha característica se observó en todas las especies lipídicas analizadas: fosfatidilcolina (p<0.001), fosfatidiletanolamina (p<0.01), colesterol (p<0.05), triacilglicéridos (p<0.001) y ésteres de colesterol (p<0.05) (Gráficos 20 y 21).

Estudios realizados por distintos autores, demostraron la capacidad de PGE₂ de revertir anomalías morfológicas inducidas en el embrión por el entorno diabético. Los resultados previos, mostraron un menor contenido embrionario de esta prostaglandina en los embriones de rata diabética tipo I.

Habiendo observado que en estos embriones existen anomalías en la síntesis de lípidos, y conociendo que las prostaglandinas poseen efectos moduladores sobre el metabolismo lipídico, se estudió el efecto de PGE₂ sobre la síntesis de lípidos. De esta forma se ha procurado analizar el mecanismo de acción de esta prostaglandina sobre compuestos de importancia para el desarrollo y crecimiento del embrión.

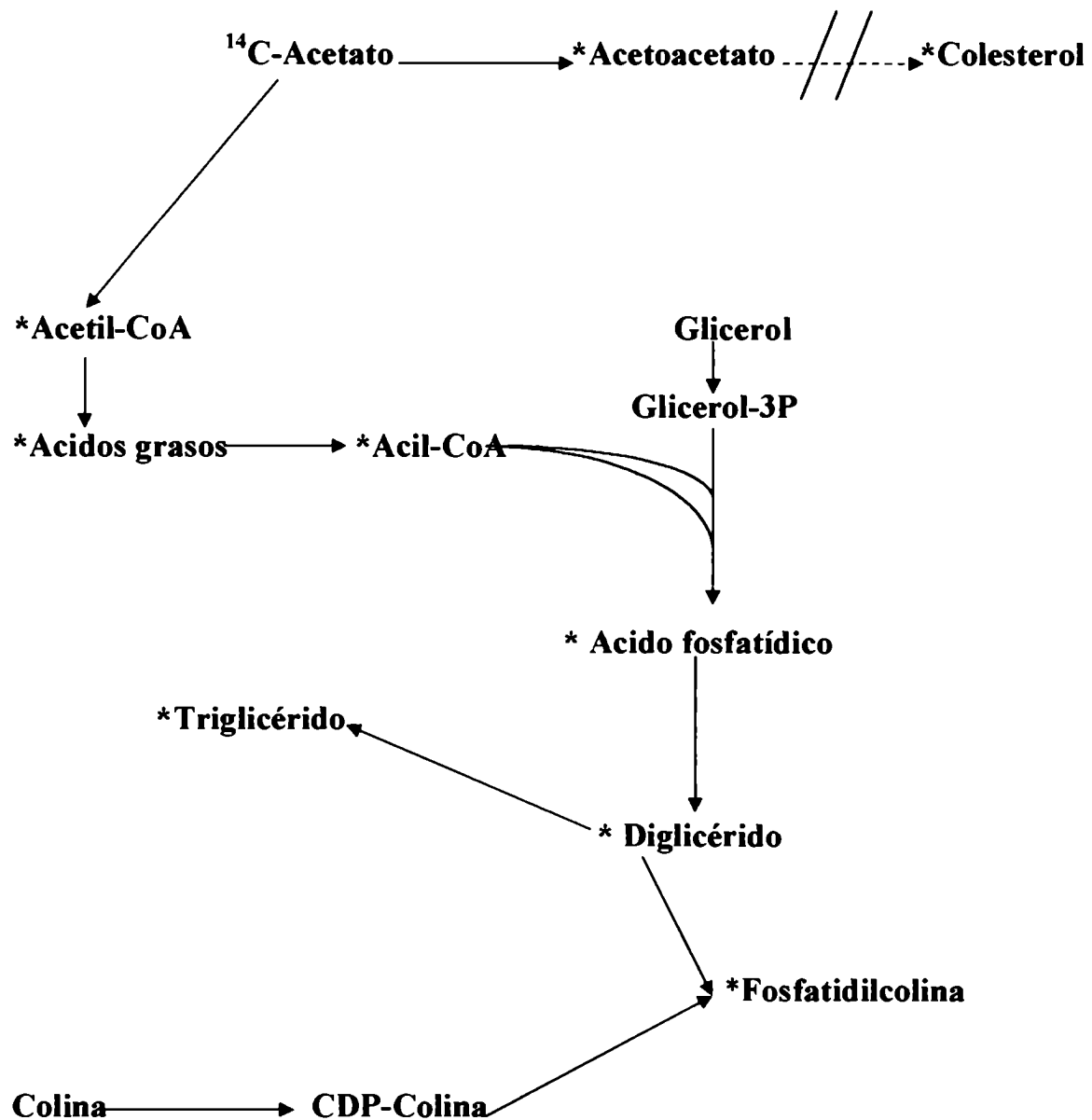
La adición de PGE₂ en el medio de incubación, no modificó los valores de incorporación del trazador sobre los lípidos sintetizados en los embriones de rata sana. Sin embargo, se observó que la adición de dicha prostaglandina logró revertir las anomalías en la síntesis de lípidos, observadas en el embrión de rata diabética tipo I. Efectivamente, se observaron

Resultados

incrementos en la incorporación de la marca en fosfatidilcolina ($p < 0.01$), fosfatidiletanolamina ($p < 0.001$), triacilglicéridos ($p < 0.001$) y ésteres de colesterol ($p < 0.05$). La síntesis de colesterol no resultó modificada por la adición de PGE_2 (Gráficos N° 20 y 21)

Figura N° 4

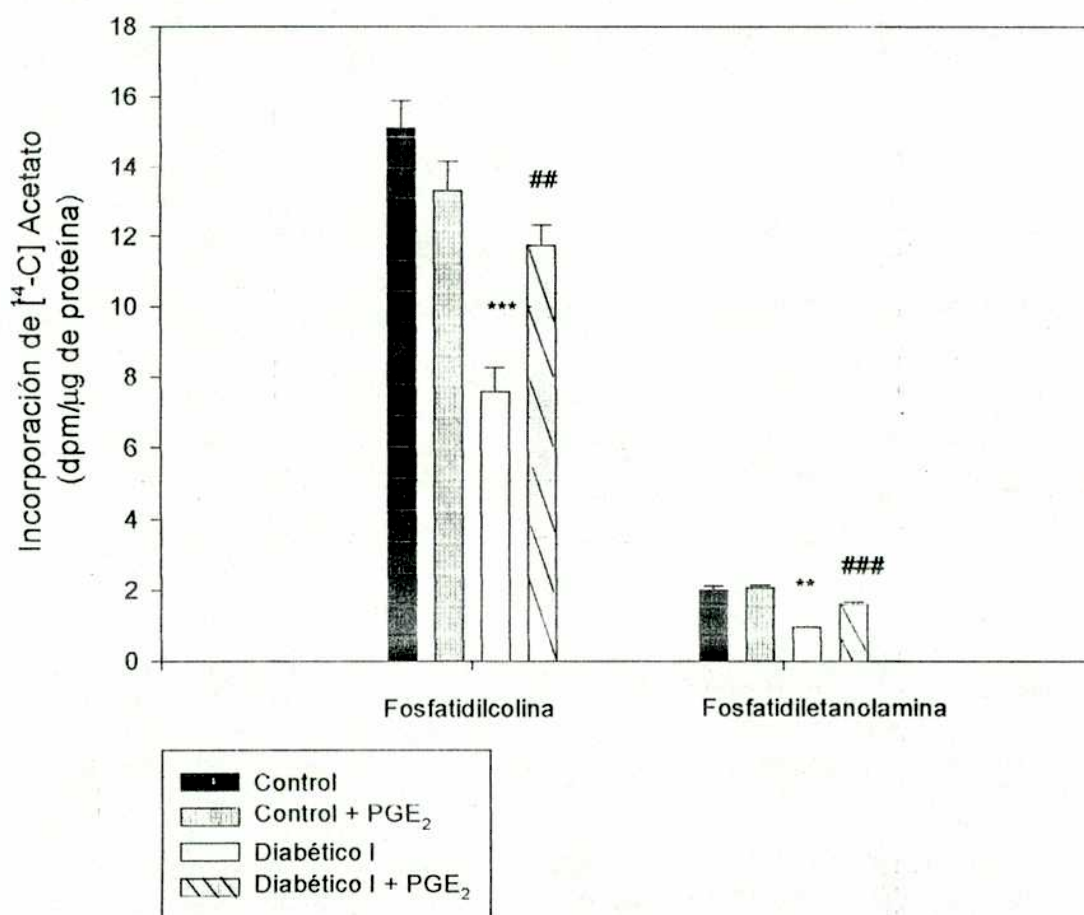
"Vía de incorporación del ^{14}C -Acetato de sodio a glicerolípidos y colesterol"



Resultados

Gráfico N° 20

"Incorporación de ^{14}C -Acetato de sodio a lípidos polares en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I"



**** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control;**

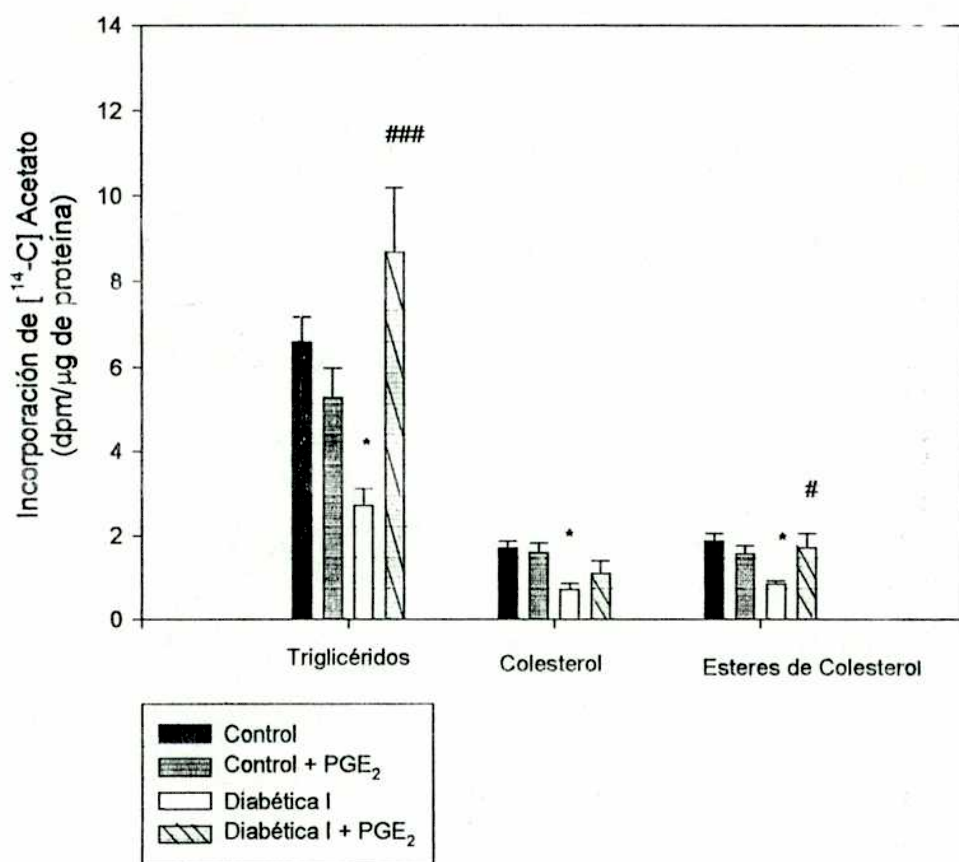
$p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs diabético

Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=12$ (48 embriones) para cada grupo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

Gráfico N° 21

"Incorporación de ^{14}C -Acetato de sodio a lípidos neutros en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I"



* $p < 0.05$ vs control,

$p < 0.05$ vs diabético, ### $p < 0.001$ vs diabético

Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=12$ (48 embriones) para cada grupo.

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

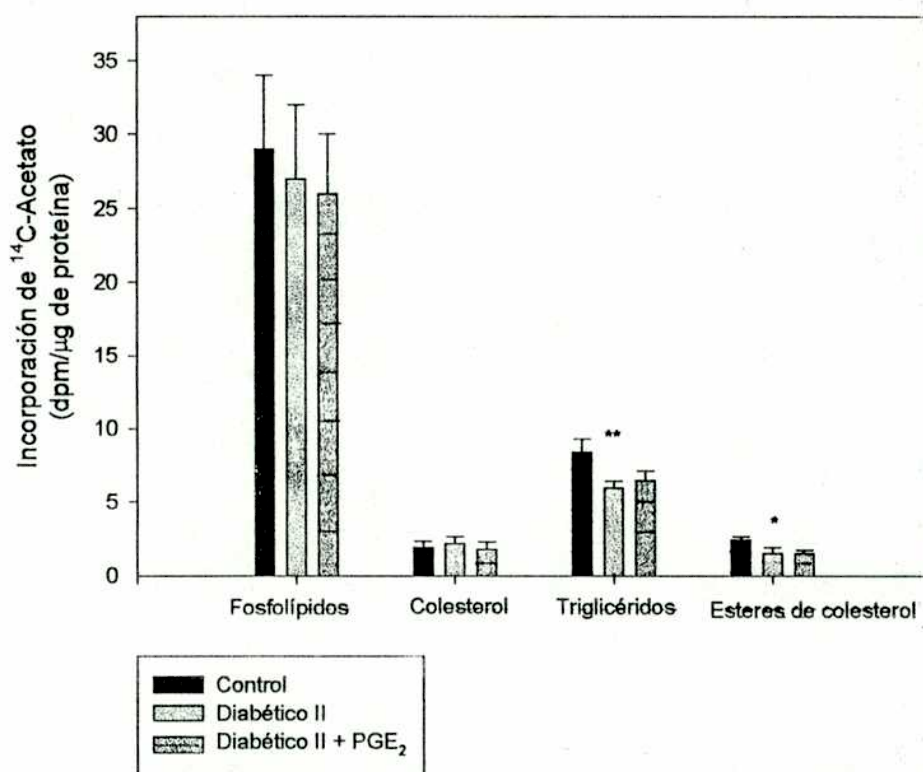
Se estudió la síntesis de lípidos polares y neutros en embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II. La incubación en presencia del trazador ^{14}C -Acetato de sodio indicó

Resultados

disminución en la incorporación de triacilglicéridos ($p < 0.01$) y ésteres de colesterol ($p < 0.05$) respecto de los embriones sanos. No se hallaron diferencias en la incorporación de marca en colesterol y fosfolípidos. Por otra parte, la adición de PGE_2 en el medio de incubación de los embriones de rata diabética tipo II, no modificó la incorporación de marca en las especies lipídicas analizadas (Gráfico N° 22).

Gráfico N° 22

"Incorporación de ^{14}C -Acetato de sodio a lípidos polares y neutros en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo II"



**** $p < 0.01$ vs control; * $p < 0.05$ vs control**

Los valores representan la media $\pm$ SEM; $n=12$ (48 embriones) para cada grupo.

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

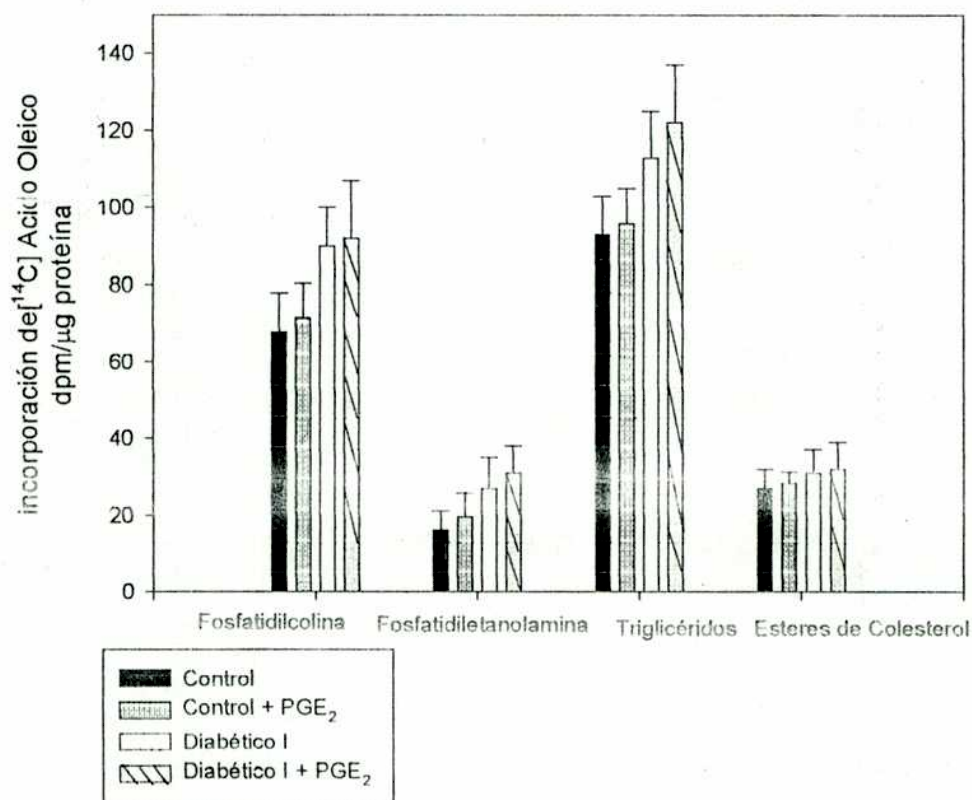
¹⁴C-Acido Oleico

Con el objeto de identificar el nivel donde se originan las alteraciones descritas en la vía de síntesis lipídica, se estudió la síntesis de lípidos a partir de otro trazador radioactivo [¹⁴C]-Acido Oleico. Este trazador se incorpora a los glicerolípidos y ésteres de colesterol por medio de esterificación a glicerol 3-P o colesterol, respectivamente. Embriones de rata sana y de rata diabética tipo I de día 10.5 de gesta fueron incubados durante tres horas en presencia de [¹⁴C]-Acido Oleico (0.5 µCi/ml), en condiciones de temperatura y gaseado controlado. No se evidenciaron diferencias significativas en la incorporación del ácido graso marcado a lípidos embrionarios de animales diabéticos con respecto a los sanos en ninguno de los lípidos analizados en este experimento (Gráfico N° 23). En el mismo sentido, la presencia de PGE₂ en el medio de incubación no modificó la incorporación del ácido graso marcado, ni en embriones de ratas sanas ni en los provenientes de ratas diabéticas tipo I.

Resultados

Gráfico N° 23

"Incorporación de [14 C]-Acido oleico en lípidos polares y neutros"



Los valores representan la media $\pm$ SEM; n= 6 (24 embriones) para cada grupo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, las diferencias entre grupos no son significativas

$\Rightarrow$ Conclusiones del capítulo IV

La patología diabética durante la preñez induce anomalías sobre el metabolismo de lípidos del embrión. En los embriones de rata diabética tipo I, los niveles de triacilglicéridos se encuentran incrementados, no evidenciándose diferencias para el resto de las especies lipídicas evaluadas. En los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II no se observan diferencias significativas en los niveles de lípidos estudiados.

Resultados

La síntesis *de novo* de lípidos a partir de ^{14}C -Acetato de sodio, se encuentra alterada en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I, en los cuales la incorporación de marca resultó disminuida en todas las especies lipídicas analizadas. El agregado de PGE_2 revierte esta anomalía, logrando que los niveles de lípidos sintetizados a partir del acetato marcado sean semejantes a los valores en el grupo control.

En los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II las alteraciones en la síntesis de lípidos a partir de ^{14}C -Acetato de sodio, sólo se observan en dos especies lipídicas: triacilglicéridos y esteres de colesterol. En ellas la incorporación de marca fue menor. Estas anomalías no se modifican por agregado de PGE_2 .

La alteración en la síntesis de lípidos tendría lugar en los pasos previos a la esterificación de los ácidos grasos, puesto que la síntesis de lípidos complejos, a partir del ^{14}C -ácido oleico no resulta afectada por el estado diabético.

Resultados

Capítulo V

⇒ Influencia de la 15dPGJ₂ sobre el metabolismo de lípidos embrionarios

Efectos de 15dPGJ₂ sobre la masa de lípidos embrionaria

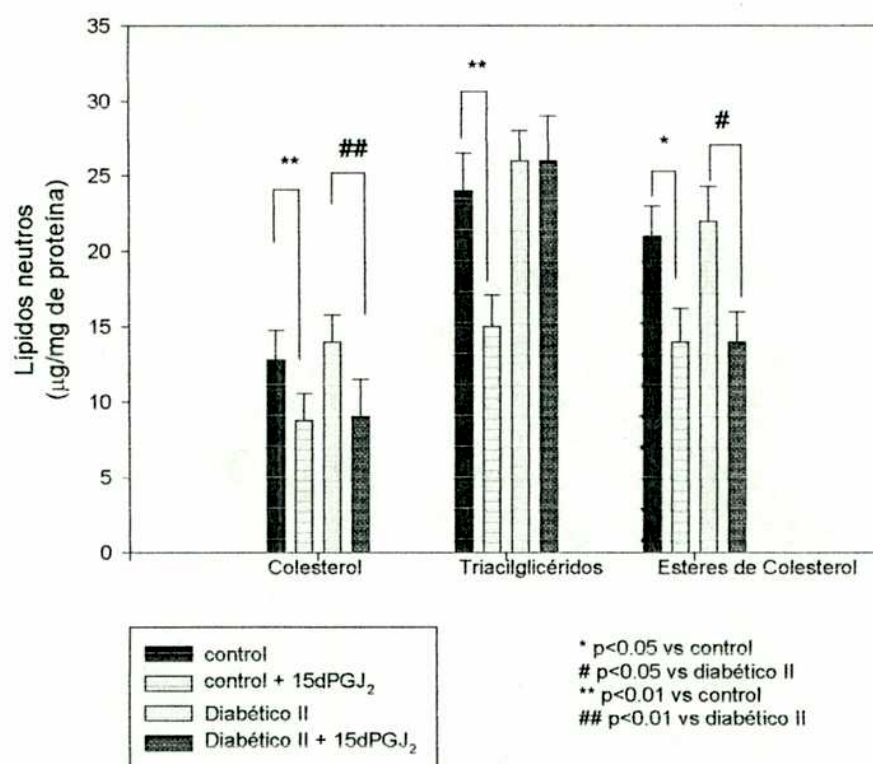
La 15dPGJ₂ es una prostaglandina con efecto regulatorio sobre la síntesis y degradación lipídica, puesto que es el ligando natural del receptor nuclear PPAR γ , el cual promueve la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos en distintos tipos celulares (Forman y col, 1995; Rosen y col, 2000).

Se evaluó el efecto de 15dPGJ₂ sobre los niveles y la síntesis *de novo* de lípidos en embriones provenientes de ratas sanas, ratas diabéticas tipo I y tipo II. Los embriones fueron incubados durante tres horas en condiciones controladas de temperatura y gaseado (37° C y atmósfera de carbógeno, con agitación) en presencia de 15dPGJ₂ (10⁻⁶ M).

En primera instancia, se estudiaron los efectos de 15dPGJ₂ sobre la masa de lípidos neutros. Los resultados demostraron una disminución de la masa lipídica en los embriones de rata sana que fueron incubados con 15dPGJ₂. Esta disminución fue del 30% en colesterol (p<0.01) y ésteres de colesterol (p<0.05), y del 40% (p<0.01) en los triacilglicéridos, respecto del control sin adiciones. Por otra parte, en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, se observó una disminución en los niveles de masa de las especies colesterol (p< 0.01) y ésteres de colesterol (p< 0.05) en presencia de 15dPGJ₂. Sin embargo, a diferencia de lo observado en embriones de ratas sanas, no se modificaron los niveles de triacilglicéridos por adición de dicha prostaglandina. (Gráfico N° 24).

Gráfico N° 24

"Masa de lípidos neutros en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo II. Efectos de 15dPGJ₂"



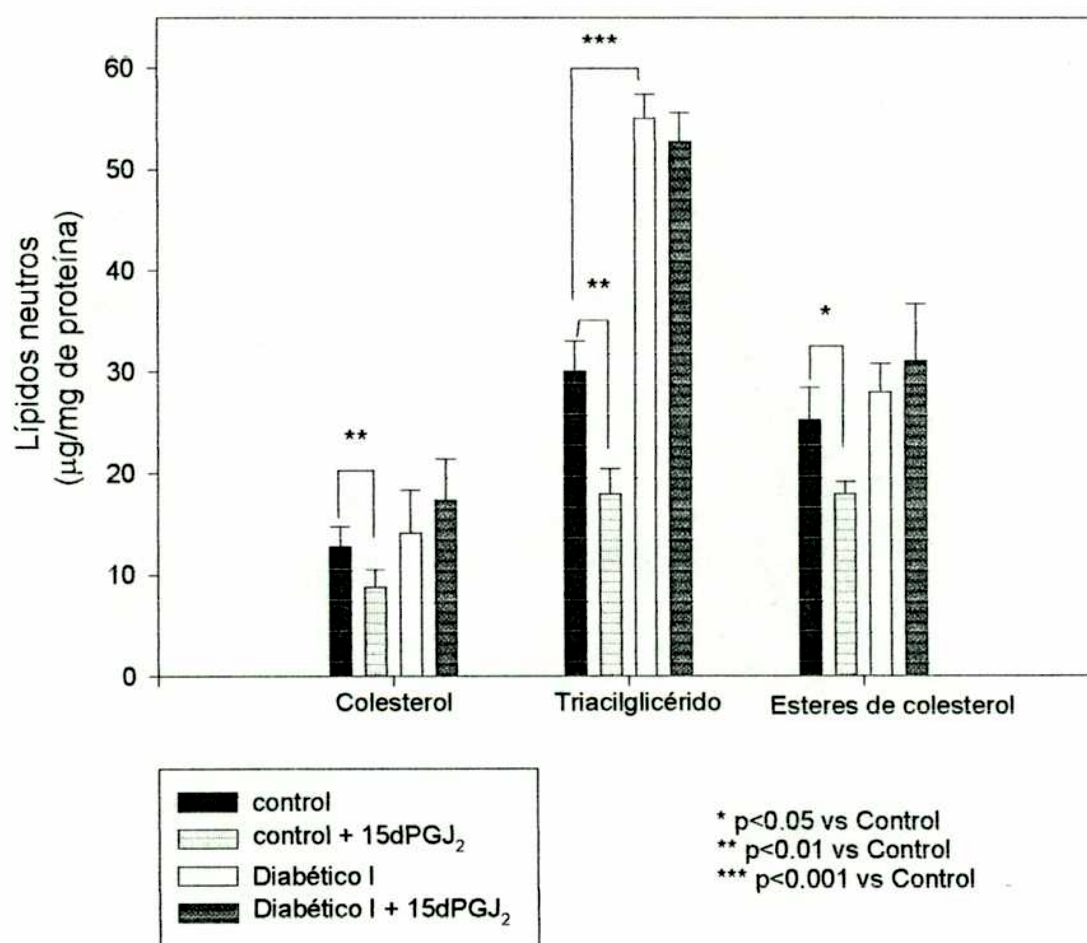
Los valores representan la media $\pm$ SEM; n=7 (28 embriones) para cada grupo

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

A diferencia de lo observado en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, los embriones de ratas diabéticas tipo I no registraron cambios en los niveles de masa por la adición de 15dPGJ₂. La masa de triacilglicéridos en los embriones de ratas diabéticas tipo I, fue mayor que en los controles, tal como se describió previamente (p<0.01) (Gráfico N°25)

Gráfico N° 25

"Masa de lípidos neutros en embriones de ratas sanas y diabéticas tipo I. Efectos de 15dPGJ₂"



Los valores representan la media $\pm$ SEM; n=7 (28 embriones) para cada grupo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

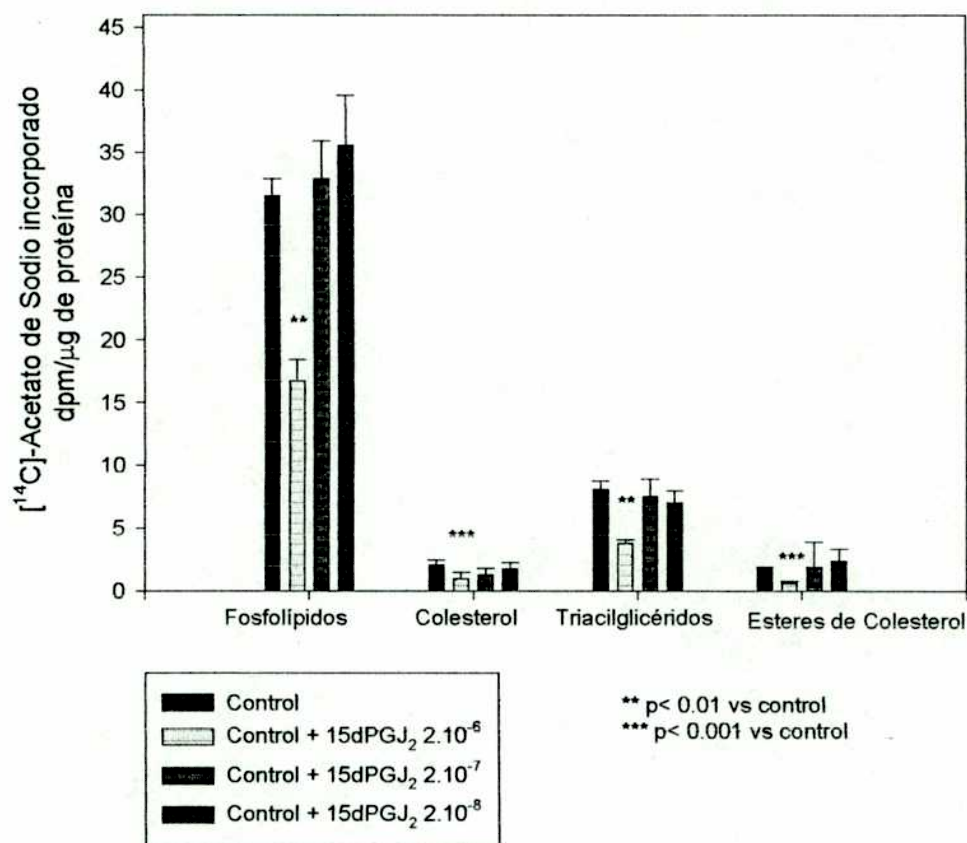
Resultados

Síntesis de lípidos a partir de ^{14}C -Acetato de sodio y efectos de 15dPGJ_2

A continuación se decidió determinar si 15dPGJ_2 afectaba la síntesis *de novo* de lípidos a partir del trazador radioactivo [^{14}C]-Acetato de sodio ($1.2\ \mu\text{Ci/ml}$). Para cumplir con dicho objetivo, los embriones de ratas sanas y de ratas diabéticas tipo I y tipo II fueron incubados durante tres horas en condiciones de temperatura, y gaseado controladas, similares a las indicadas previamente, y en presencia del trazador radioactivo y de 15dPGJ_2 . Se analizó el efecto dosis dependiente de 15dPGJ_2 . Para ello los embriones de ratas sanas fueron incubados en presencia del trazador radioactivo y tres concentraciones diferentes de la prostaglandina ($2 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-7}$ y $2 \cdot 10^{-8}\text{M}$). Sólo la mayor concentración utilizada ($2 \cdot 10^{-6}$) produjo cambios sobre la incorporación del trazador. A dicha concentración, el agregado de 15dPGJ_2 provocó la disminución en la incorporación de la marca en todas las especies lipídicas analizadas respecto del control sin adición: fosfolípidos ($p < 0.01$), colesterol ($p < 0.001$), triacilglicéridos ($p < 0.01$) y ésteres de colesterol ($p < 0.001$) (Gráfico N° 26).

Gráfico N° 26

"Efecto dosis dependiente de 15dPGJ₂ sobre la síntesis de lípidos embrionarios"



Los valores representan la media ± SEM; n=5 (20 embriones) para cada grupo

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tuckey de comparaciones múltiples

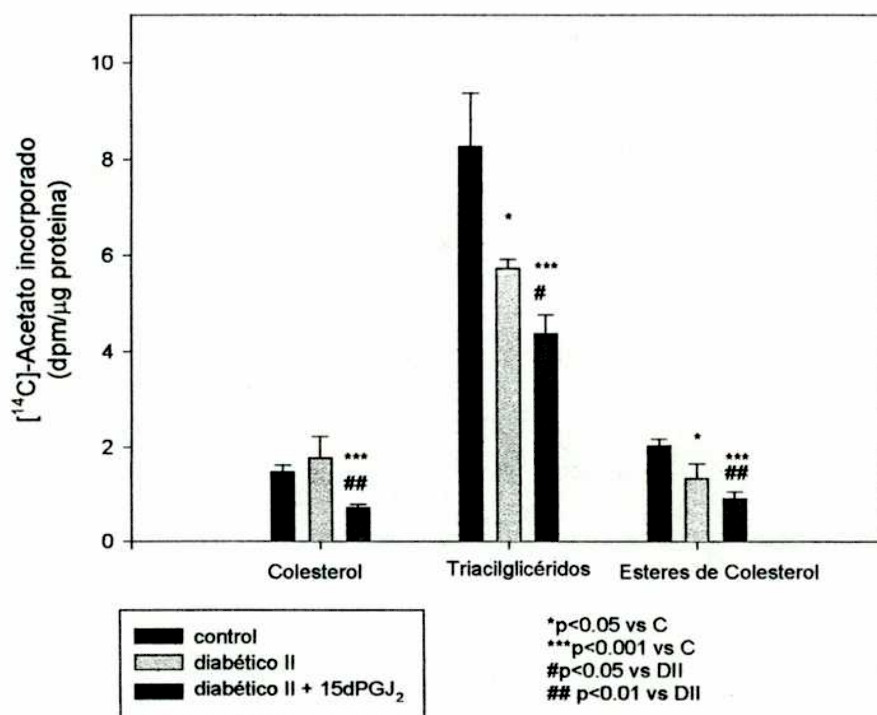
Se evaluaron los efectos de 15dPGJ₂ sobre la síntesis de lípidos en el modelo de diabetes tipo II. Los resultados fueron similares a los observados previamente, mostrando un efecto inhibitorio en la incorporación del acetato marcado a los lípidos sintetizados "de novo",

Resultados

tanto en lípidos polares como en lípidos neutros (Gráficos N° 27 y 28). El porcentaje de disminución de incorporación alcanzó valores que oscilan entre el 30 y el 40 % para los lípidos neutros (colesterol $p < 0.05$, ésteres de colesterol $p < 0.01$, triacilglicéridos $p < 0.05$), mientras que en lípidos polares la disminución en la incorporación de acetato fue del 50% ($p < 0.001$) en relación a los grupos no tratados con la prostaglandina.

Gráfico N°27

"Influencia de 15dPGJ₂ sobre la síntesis de lípidos neutros en embriones de ratas diabéticas tipo II"



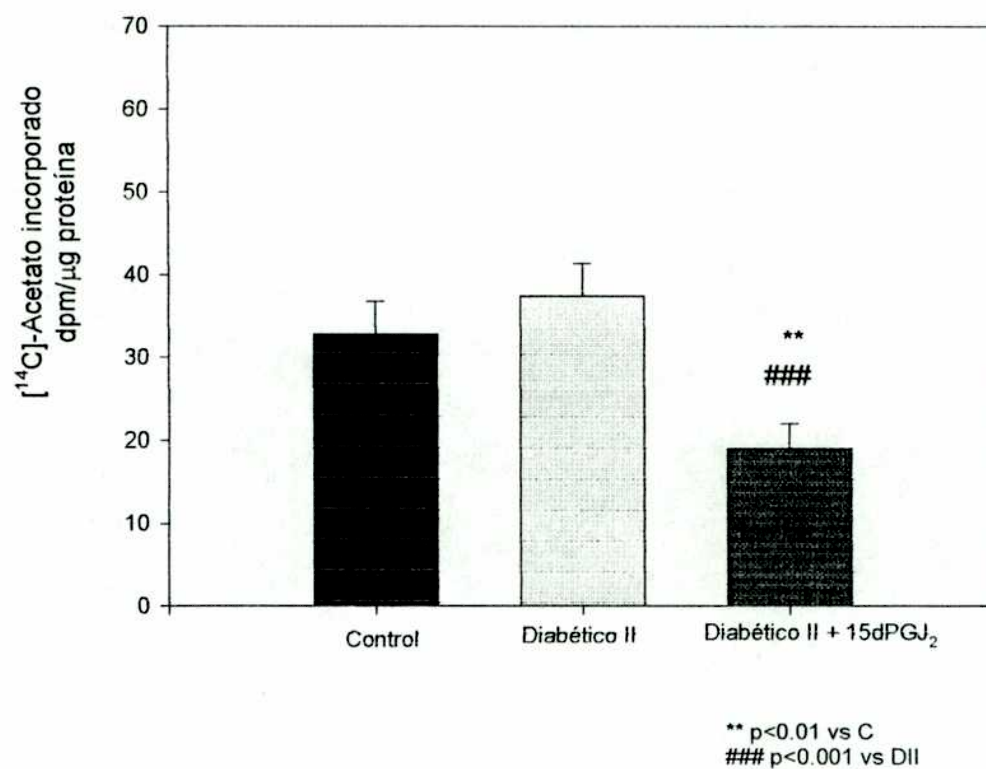
Los valores representan la media $\pm$ el SEM; $n = 8$ (32 embriones) para cada grupo

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

Gráfico N° 28

"Efecto de 15dPGJ₂ sobre la síntesis de lípidos polares en embriones de ratas diabéticas tipo II"



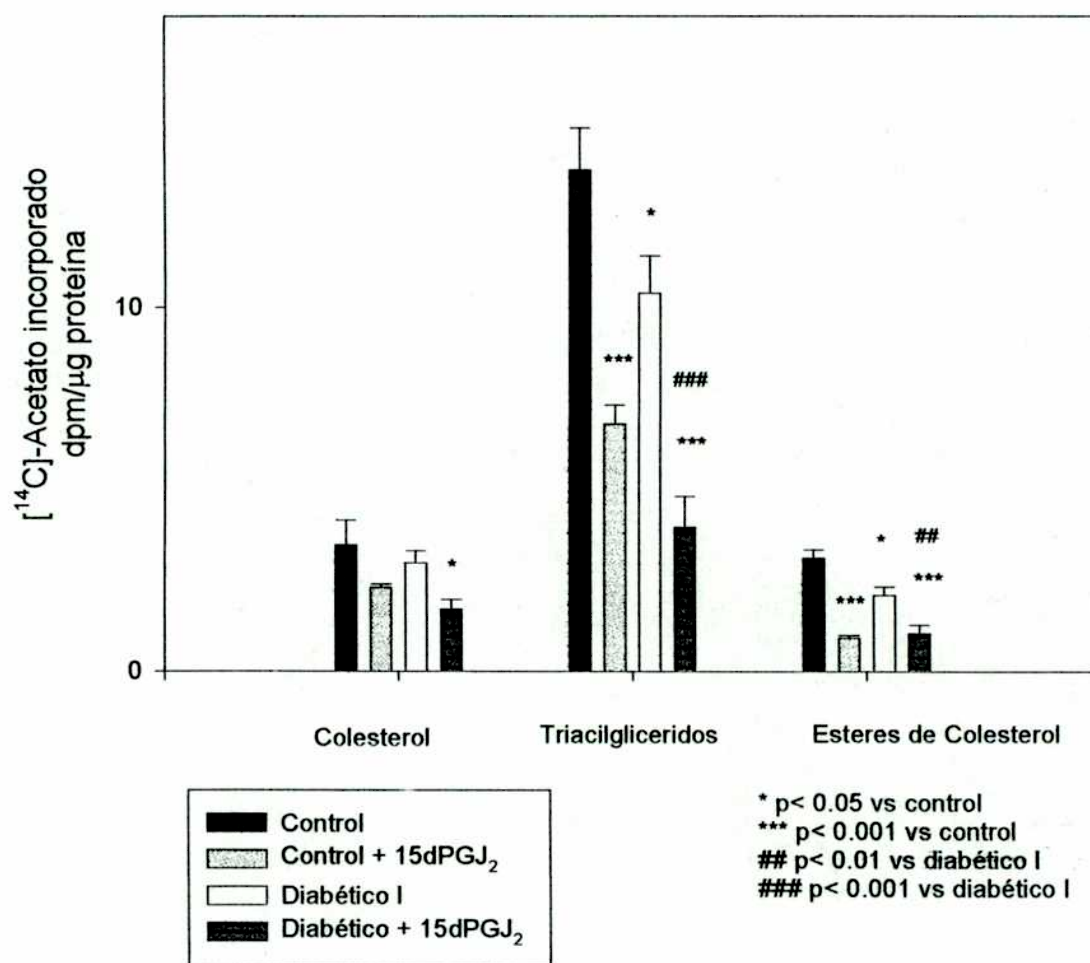
Los valores representan la media ± SEM; n= 8 (32 embriones) para cada grupo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

Se analizó el efecto de la prostaglandina sobre la síntesis de lípidos en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I. Como ya se describió en el capítulo IV, los niveles de incorporación de marca en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I fue menor para todas las especies analizadas (lípidos polares y neutros) respecto de los embriones provenientes de ratas sanas. De igual manera a lo observado en los embriones sanos y de ratas diabéticas tipo II, se observó un efecto inhibitorio de $15dPGJ_2$ sobre la síntesis de lípidos. En los lípidos neutros, la disminución de la marca fue un efecto claro en todas las especies analizadas y osciló entre el 30 y 50%: (colesterol ($p < 0.05$) ésteres de colesterol ($p < 0.01$)), siendo muy importante el efecto sobre los triacilglicéridos, donde la disminución de la marca fue cercana al 50% ($p < 0.001$) (Gráfico N° 29). El mismo patrón se observó en los lípidos polares, para los cuales la disminución fue cercana al 50 % respecto de los embriones de ratas diabéticas sin adición ($p < 0.01$) (Gráfico N° 30)

Gráfico N° 29

"Efecto de 15dPGJ₂ sobre la síntesis de lípidos neutros en embriones de ratas diabéticas tipo I"

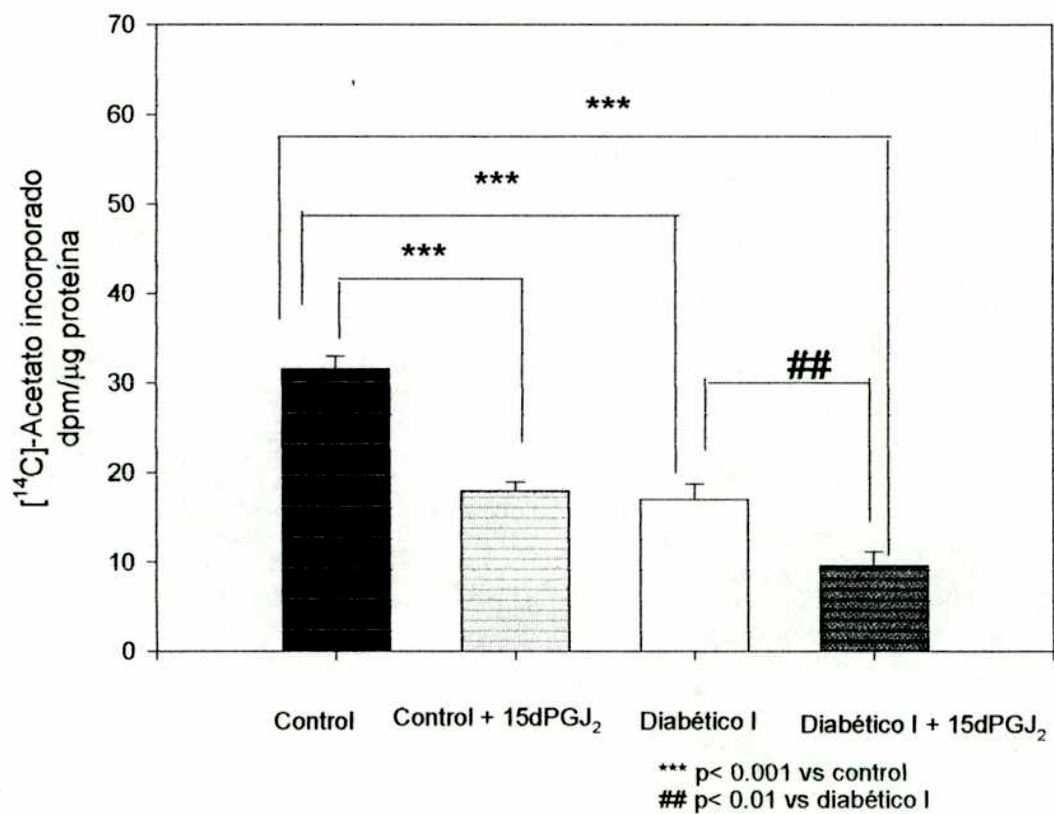


Los valores representan la media $\pm$ SEM; n=8 (32 embriones) para cada grupo

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Gráfico N° 30

"Efecto de 15dPGJ₂ sobre la síntesis de lípidos polares en embriones sanos y de ratas diabéticas tipo I"



Los valores representan la media ± SEM; n=8 (32 embriones) para cada grupo. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

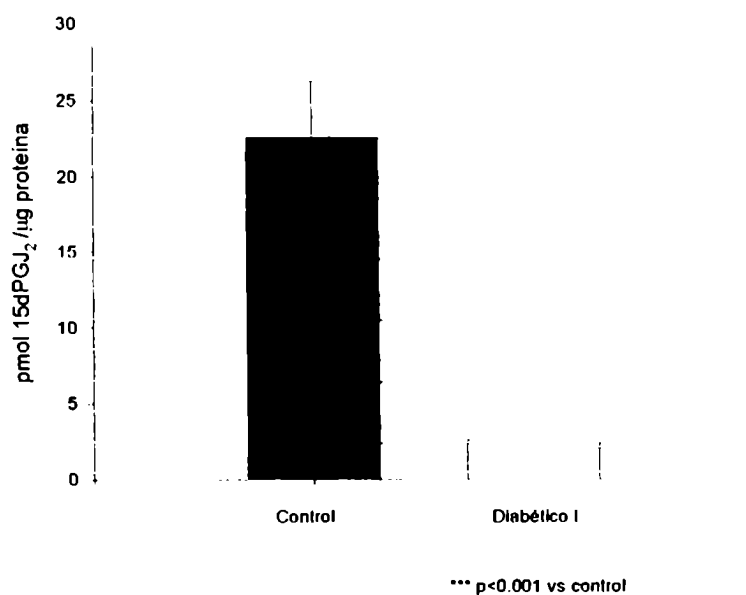
Resultados

Niveles embrionarios de síntesis y liberación de 15dPGJ₂

Puesto que la adición exógena de 15dPGJ₂ media un mecanismo inhibitorio sobre la síntesis de lípidos, y ésta a su vez, se encuentra sensiblemente disminuida en los embriones de rata diabética tipo I, se estudiaron los niveles endógenos de dicha prostaglandina. Se analizó el contenido embrionario así como los niveles de este compuesto liberados al medio luego de una hora de incubación. Los resultados mostraron que 15dPGJ₂ es sintetizada durante la organogénesis temprana y que tanto el contenido embrionario ($p < 0.001$) como los niveles del compuesto liberado al medio de incubación ($p < 0.01$) fueron menores en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I (Gráficos N° 31 a y b) con respecto a los provenientes de animales sanos.

Gráfico 31 A

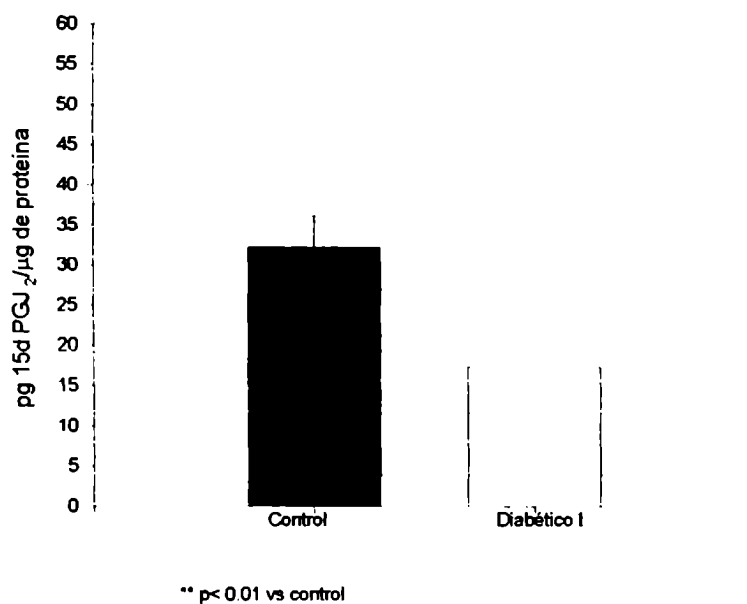
"Contenido de 15dPGJ₂ en embriones de ratas sanas y ratas diabéticas tipo I"



Resultados

Gráfico N° 31 B

"Niveles de 15dPGJ₂ liberados al medio de incubación"



Los valores representan la media ± SEM; n= 8 (32 embriones) para cada grupo.

Análisis estadístico: test t de Student

Efecto de agonistas de PPAR_γ sobre la síntesis de lípidos

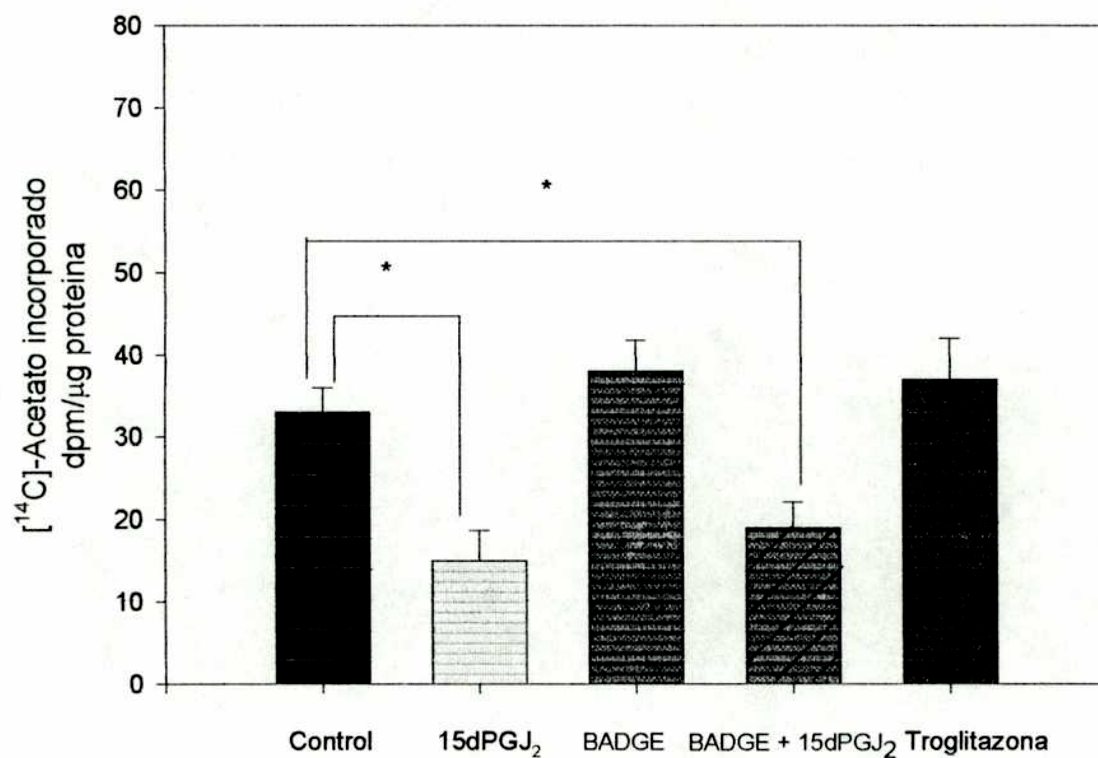
Los efectos biológicos de 15dPGJ₂ pueden ser dependientes o independientes de la activación del receptor nuclear PPAR_γ. Sobre la base de los resultados obtenidos, se decidió estudiar si el efecto inhibitorio de dicha prostaglandina sobre la síntesis de lípidos embrionarios era mediado por la activación del receptor nuclear PPAR_γ. Para ello se evaluaron los efectos de un agonista (troglitazona) y un antagonista (BADGE) del receptor

Resultados

nuclear PPAR γ , ambos sintéticos, sobre la incorporación de ^{14}C -Acetato de sodio a lípidos neutros y polares de embriones provenientes de ratas control. Para cumplir dicho objetivo, embriones de ratas sanas fueron incubados en condiciones controladas de temperatura y gaseado, previamente descritas, durante tres horas en presencia del trazador radioactivo, y de 15dPGJ_2 ($2 \cdot 10^{-6}$), BADGE (10^{-6} M) o troglitazona ($45\mu\text{M}$), según correspondiera. Los resultados indicaron que BADGE no modificó los niveles de incorporación del precursor marcado en ninguna de las especies lipídicas analizadas, excepto colesterol, sobre el cual el efecto fue inhibitorio ($p < 0.001$ vs control sin adición). Tampoco fue capaz de impedir la acción inhibitoria de 15dPGJ_2 sobre la síntesis de lípidos, cuando ambos compuestos fueron agregados simultáneamente al medio de incubación. Por otra parte, troglitazona no tuvo efecto sobre lípidos polares, pero mostró una acción inhibitoria sobre la incorporación del precursor radioactivo a colesterol ($p < 0.001$) y ésteres de colesterol ($p < 0.01$) (Gráficos N° 32 y 33)

Gráfico N° 32

"Agonistas y antagonistas del receptor nuclear PPAR γ y síntesis de lípidos polares"



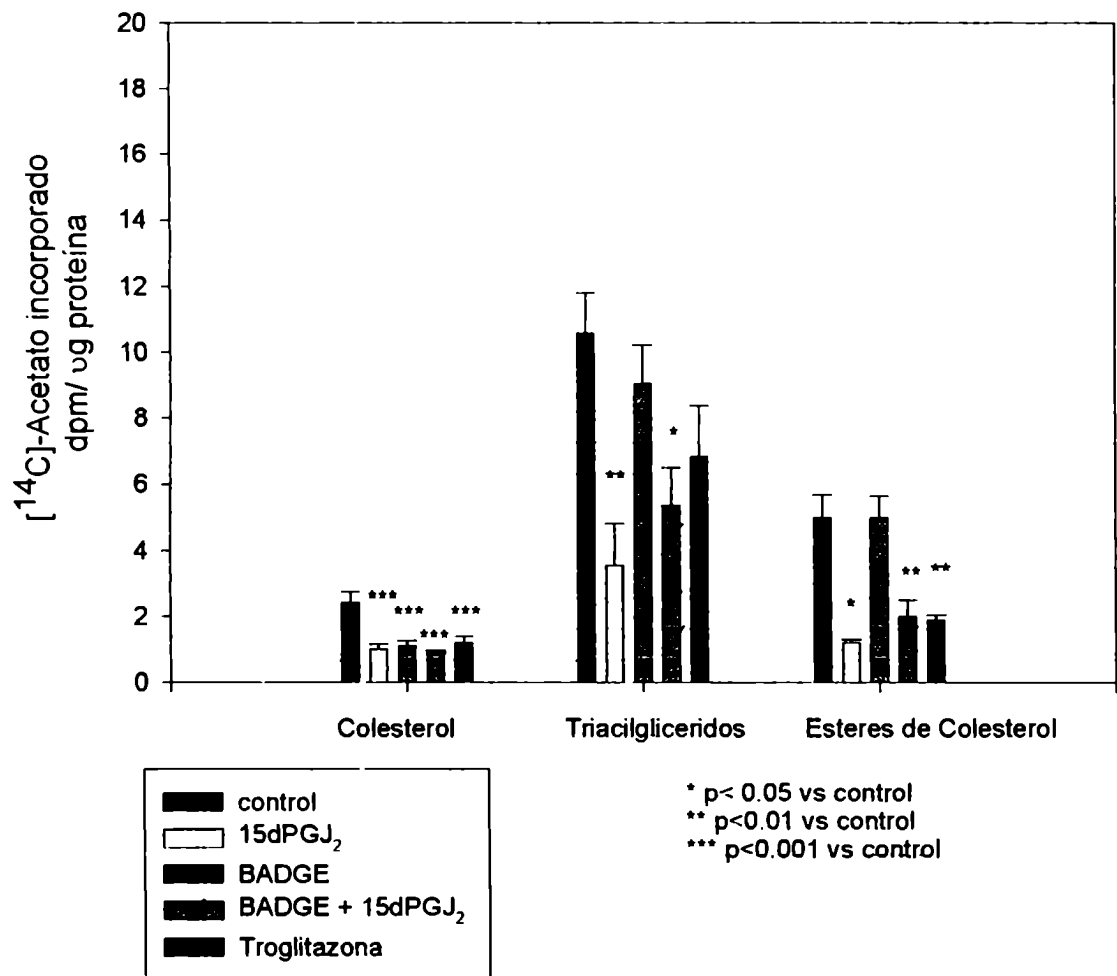
* p<0.05 vs control

Los valores representan la media $\pm$ SEM; n=12 (48 embriones) para cada grupo.
Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

Resultados

Gráfico N° 33

"Agonistas y antagonistas de PPAR γ y síntesis de lípidos neutros"



Los valores representan la media $\pm$ el SEM; n=12 (48 embriones) para cada grupo.

Análisis estadístico: ANOVA de una vía y test de Tukey de comparaciones múltiples

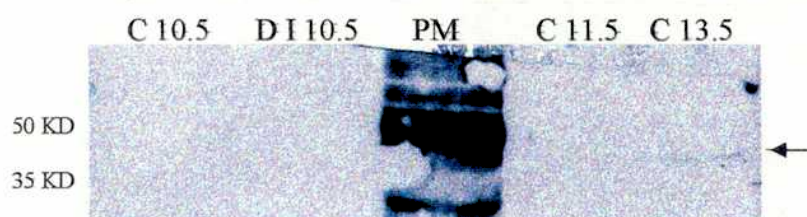
Resultados

Expresión de los factores de transcripción PPAR γ y PPAR β/δ

Se estudió la expresión del factor de transcripción PPAR γ en el período de organogénesis temprana (día de gestación 10.5, 11.5 y 13.5). Se observó, que la expresión de este factor de transcripción no se detecta hasta el día 13.5, en el cual la expresión se evidencia como una banda muy tenue. En el día 10.5, no se observó expresión de PPAR γ en embriones de ratas sanas ni en embriones de ratas diabéticas.

Figura N° 5

"Expresión del factor de transcripción PPAR γ "



Western blot para detección de PPAR γ en embriones de ratas sanas(C) de día 10.5, 11.5, 13.5 de gestación, y embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I (DI 10.5). PM: marcador de peso molecular. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Algunos trabajos postulan que el factor de transcripción PPAR β/δ regularía la expresión de PPAR γ (Bastie y col, 1999), y además modularía la actividad sintética de lípidos en el sistema nervioso en formación (Basu-Modak y col, 1999). Tomando en cuenta estos antecedentes y la expresión ubicua de este factor de transcripción, decidimos analizar su expresión en el embrión de rata sana y rata diabética durante la organogénesis.

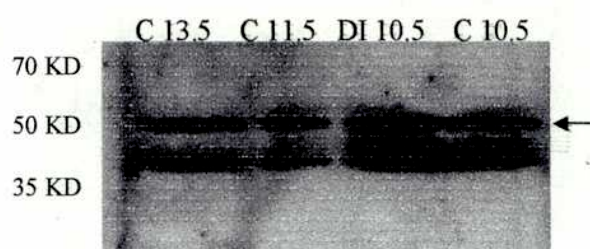
Se detectó que la expresión del receptor PPAR β/δ en el día 10.5 de gestación es importante, representada por una banda aproximadamente de 50 KD cuya intensidad es similar en embriones controles y en aquellos provenientes de ratas diabéticas tipo I. Se

Resultados

observó también la expresión de este factor de transcripción en el día 11.5 y 13.5 de gestación. Se realizó en forma paralela un control negativo omitiendo el primer anticuerpo, no obteniéndose señal.

Figura N° 6

"Expresión del factor de transcripción PPAR β/δ "



Western blot para detección del factor de transcripción PPAR β/δ en embriones de ratas sanas(C)de día 10.5, 11.5, 13.5 de gestación, y embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I (DI 10.5). La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

⇒ Conclusiones del capítulo V

La adición de 15dPGJ₂ al medio de incubación provoca una inhibición en la incorporación del trazador radiactivo en todas las especies lipídicas analizadas. Dicho efecto se manifiesta tanto en embriones de ratas sanas como en aquellos provenientes de ratas diabéticas tipo I y tipo II.

La masa de lípidos neutros resulta modificada por la adición de 15dPGJ₂, tanto en los embriones de ratas sanas como en los provenientes de ratas diabéticas tipo II. Sin embargo, 15dPGJ₂ no modifica la masa en embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I, donde se observan menores niveles endógenos de 15dPGJ₂.

Resultados

El efecto inhibitorio de $15dPGJ_2$, resulta ser independiente del receptor nuclear y factor de transcripción $PPAR\gamma$, puesto que el tratamiento con un antagonista de dicho receptor no es capaz de evitar los efectos de la prostaglandina. Además, no se detectó expresión del factor de transcripción $PPAR\gamma$ en la organogénesis temprana, cuya expresión resulta positiva sólo en un período de desarrollo posterior (día 13.5 de gestación).

La expresión del factor de transcripción $PPAR\beta/\delta$, fue detectada en el día 10.5 de gesta; no se hallaron diferencias entre embriones de animales sanos y diabéticos en cuanto a la magnitud de su expresión.



Discusión y Conclusiones

❖ **DISCUSIÓN**

La preñez diabética ha sido asociada con la aparición de malformaciones congénitas (Kucera y col, 1971; Soler y col, 1976; Mills, 1982). A pesar del tratamiento insulínico y del estricto control metabólico previo a la concepción y durante la gestación, las malformaciones congénitas siguen siendo la mayor causa de morbilidad y mortalidad de los hijos de las pacientes diabéticas (Reece, 1996).

Los mecanismos asociados a la aparición de las malformaciones no han sido totalmente clarificados, si bien el estado metabólico materno sería el responsable de estos problemas (Lucas y col, 1989; Pampfer y col 1994 y 1995).

Varios estudios han demostrado que la alteración del metabolismo del ácido araquidónico es causa de la aparición de malformaciones en la gestación diabética (Goldman y col, 1985; Wentzel y col, 1999; Piddington y col, 1986).

En este estudio se realizó un análisis de diferentes metabolitos involucrados en la aparición de anomalías congénitas durante la preñez diabética, específicamente durante el período de organogénesis temprana. En esta etapa, caracterizada por cambios morfológicos de importancia, comienza la formación de órganos, y es el período de mayor susceptibilidad a la acción de teratógenos (Pierce y col, 1995). En este estudio se analizaron dos modelos experimentales diferentes de diabetes. El modelo de diabetes tipo I, dependiente de insulina y el modelo de diabetes tipo II, no dependiente de insulina.

El entorno diabético afecta la morfología embrionaria

Estudios previos han analizado las características maternas en modelos de diabetes tipo I inducida por estreptozotocina. Dichos trabajos señalan glucemias elevadas, menores niveles circulantes de insulina y reducido aumento del peso corporal durante la gesta (Urie-Hare y col, 1985). Nuestras observaciones en las ratas diabéticas tipo I concuerdan con estos datos, tanto en los parámetros séricos analizados como en las condiciones maternas propias de la preñez. Este tipo de diabetes afecta a la preñez en forma tal que ésta no llega a término, observándose pérdida fetal previa o durante el período de organogénesis temprana.

Discusión

El modelo de diabetes tipo II en la rata, caracterizado por Portha (Portha y col, 1979) es de menor severidad, presentando glucemias elevadas y curvas de tolerancia anómalas en relación al animal sano, pero el alcance de estas alteraciones no es tan alto como en el modelo de diabetes tipo I. En la rata diabética tipo II no se observan alteraciones en la trigliceridemia ni en el aumento de peso durante la gesta en relación al control. Otra diferencia es que en el modelo de diabetes tipo II la preñez llega a término, mientras que en el animal diabético tipo I observamos muerte materna o pérdida fetal a mediados de la gestación.

La patología diabética materna induce la aparición de diferentes alteraciones embrionarias. El análisis morfológico de los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I, muestra un incremento en los índices de reabsorción y de malformaciones congénitas. Estas últimas consisten mayormente en defectos de tubo neural, y en hiperplasia cardíaca. Además, se observaron alteraciones en el proceso de rotación axial embrionario, y una disminución en el número de somitas. El bajo contenido proteico embrionario, considerado un muy buen índice de crecimiento en esta etapa del desarrollo, evidencia el retraso de crecimiento embrionario en este modelo experimental.

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos realizados por otros autores (Pinter y col, 1986; Goldman y col, 1985; Eriksson y col, 1982) donde se observa una alta incidencia de malformaciones y retraso en el crecimiento de embriones de ratas diabéticas tipo I.

En los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, el estudio de las características morfológicas reveló anomalías, que en su mayoría resultaron circunscribirse, al igual que en el modelo de diabetes tipo I, al tubo neural. En este modelo no se observaron alteraciones en el proceso de rotación axial ni en el número de somitas, pero se detectó menor contenido proteico, indicando retraso de crecimiento embrionario, aunque no tan severo como en el modelo de diabetes tipo I. Estudios realizados *in vitro* en presencia de concentraciones crecientes de glucosa, muestran que este incremento se encuentra relacionado con el aumento en la incidencia y la severidad de las malformaciones que se desarrollan (Hod y col, 1986; Engstrom y col, 1991; Reece y col, 1995; Eriksson y col, 1998). *Por lo antedicho pensamos que las diferencias morfológicas que hallamos entre los*

Discusión

dos modelos experimentales de diabetes están relacionadas con el grado de severidad de la patología, y vinculadas directamente con los niveles de glucemia maternos.

Los efectos del entorno diabético materno resultan ser perjudiciales para el embrión en gestación (Kitzmiller y col, 1978; Mills y col, 1982; Soler y col, 1976). Esto se ha comprobado tanto en estudios realizados en modelos experimentales animales como en humanos (Baker y col, 1990; Eriksson y col, 1991; Wentzel y col, 1999 y 2001; Moley, 2001). En estos últimos se ha establecido una clara relación entre el control metabólico de la madre y la incidencia de malformaciones congénitas. Dichas anomalías ocurren en el periodo de organogénesis temprana, en el cual se producen los cambios morfológicos fundamentales para el posterior desarrollo de los órganos embrionarios (Mills y col, 1979; Mills y col, 1988; Greene y col, 1989). La técnica de cultivo de embriones postimplantatorios de roedores y conejos permite estudiar el efecto de diversos teratógenos sobre el desarrollo embrionario durante la organogénesis (New, 1978; Sadler y col, 1982). Nuestros resultados muestran que el cultivo *in vitro* de embriones de rata sana en presencia de suero diabético tipo I durante 24 horas, provocó anomalías morfológicas similares a las observadas en los embriones obtenidos de ratas diabéticas tipo I. Se observó un aumento en las malformaciones que en su mayoría correspondieron a defectos de tubo neural y macrosomía del corazón, observándose asimismo una reducción en el número de somitas y retraso de crecimiento embrionario. Estos resultados concuerdan con trabajos previos realizados en diferentes laboratorios (Eriksson y col, 1984; Piddington y col, 1996; Trocino y col, 1995; Wentzel y col, 1996 y 2001). *Dado que en estas experiencias el embrión cultivado en presencia de un entorno diabético proviene de un animal sano, podemos concluir que durante la etapa de organogénesis temprana el medio diabético induce la aparición de anomalías congénitas y de retraso de crecimiento embrionario.*

Los niveles de ET-1 y su modulación se encuentran alterados en los embriones de ratas diabéticas

La ET-1 es un agente con alta capacidad vasoconstrictora (Masaki y col, 1996). La expresión de su gen en las células endoteliales y su liberación al plasma es promovida por

Discusión

insulina (Oliver y col, 1991; Piatti y col, 1996). La acción de este agente vasoconstrictor es contrabalanceada por el efecto vasodilatador del óxido nítrico (Wood y col, 1996; Higuchi y col, 1997). Además de su localización endotelial, ET-1 se expresa en diversos tejidos, incluyendo el tejido embrionario y placentario.

En el embrión en organogénesis la ET-1 posee una importante función. Durante esta etapa, la ET-1 actúa como un morfógeno, involucrado en la formación de estructuras craneofaciales, cardíacas, del timo y de la paratiroides, todas estas estructuras derivadas en parte de las células de cresta neural. Cuando no se sintetiza ET-1 por disrupción de su gen o de los genes que codifican las enzimas responsables de su activación, se producen anomalías en las estructuras derivadas del “mesoectodermo” (Kurihara y col, 1994 y 1995). Si se bloquea farmacológicamente a los receptores ETA y ETB, se obtiene un patrón similar de anomalías (Kempf y col, 1998; Treinen y col, 1999). Trabajos realizados con embriones diabéticos, señalan la existencia de malformaciones en estructuras derivadas de las células de cresta neural, especialmente la micrognatia (Simán y col, 2000). Sin embargo no se había establecido una relación entre estas anomalías y la ET-1. En este trabajo de tesis, se ha demostrado la existencia de alteraciones en los niveles de ET-1 en los embriones provenientes de ratas diabéticas. Estas alteraciones presentan características distintas en ambos modelos de diabetes.

En el modelo de diabetes tipo II, los niveles de ET-1 se encontraron incrementados respecto a los embriones de ratas sanas. Varios estudios han señalado el aumento en la expresión de ET-1 en la patología diabética tipo II y su participación en desórdenes tales como la vasculopatía (Benigni y col, 1998) y la retinopatía (Park y col, 2000) inducida por la diabetes. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado un incremento de los niveles de ET-1 en el daño pancreático ocasionado por estreptozotocina (González y col, 1999). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el exceso de endotelinas está asociado con el retraso en el crecimiento fetal y placentario, debido a la vasoconstricción generada en los vasos sanguíneos (Harvey-Wilkes y col, 1996; Neerhof y col, 1997; Edwards y col, 1997; Kelatan y col, 2001).

Teniendo en cuenta asimismo, los antecedentes que demuestran la importancia de la ET-1 en el control de la migración de las células de la cresta neural, podemos postular que

Discusión

niveles de ET-1 no controlados durante la organogénesis y la etapa de migración y diferenciación de las células de cresta neural podría llevar a la generación de anomalías congénitas.

En este trabajo, hemos profundizado en los mecanismos de regulación de los niveles de ET-1 embrionarios, y hemos determinado que dichos niveles son regulados por NO. Este agente vasodilatador resultó ser un modulador positivo de la síntesis de ET-1, observándose a su vez que la inhibición de la actividad NOS disminuye los niveles de ET-1 en forma dosis dependiente. Esta regulación se observa tanto en los embriones de rata sana como en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II.

El NO cumple funciones morfogénicas durante la organogénesis. Este agente es necesario para el desarrollo del sistema nervioso, induciendo la muerte celular en regiones específicas del tubo neural. Por otra parte se encuentra involucrado en la formación de la copa óptica y de los arcos branquiales (Lee y Juchau, 1994). Además, la inhibición de la isoforma endotelial de la NOS induce defectos en el desarrollo de las extremidades (Pierce y col, 1995), y anomalías en el desarrollo cardíaco tales como defectos en la formación de los tabiques atrial y ventricular, así como de la válvula aórtica (Feng y col 2002). Todos estos datos señalan que durante el desarrollo embrionario los niveles de NO deben ser estrictamente regulados para evitar la muerte celular innecesaria y la aparición de malformaciones.

Así como el NO es capaz de modular los niveles de ET-1, en distintos sistemas se evidencia que ET-1 es reguladora de la producción de NO. Esta influencia es positiva en el caso de daño pancreático por inflamación (Kakugawa y col, 1996) o destrucción del órgano endocrino por estreptozotocina (González y col, 1999), y en el endotelio vascular en respuesta a la vasoconstricción aguda mediada por ET-1 (Moncada et al, 1991). En forma diferente, en el tejido placentario ET-1 inhibe la actividad de iNOS y la producción de NO *sacrar espacio* (Napolitano y col, 2000; Capobianco y col, 2003).

El análisis realizado en embriones de rata sana y diabética tipo II indica que ET-1 regula en forma negativa la síntesis de NO, observándose a su vez que el bloqueo de los receptores ETA y ETB resulta en un incremento de los niveles de NO. Estas evidencias indican que *en el embrión en etapa de organogénesis existe un mecanismo de interregulación de los*

Discusión

niveles de NO y de ET-1. En el embrión de rata diabética tipo II, los niveles incrementados de óxido nítrico podrían estar induciendo el aumento que hemos observado en los niveles de ET-1, mientras que el mayor contenido de ET-1 podría estar evitando una sobreproducción adicional de óxido nítrico en estos embriones.

Trabajos previos realizados con embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, demostraron la capacidad moduladora positiva del NO sobre la síntesis de prostaglandinas (Jawerbaum y col, 1998). Por otra parte estudios realizados en tejido pancreático durante la inducción de diabetes por estreptozotocina demostraron la capacidad moduladora de ET-1 sobre la producción de prostaglandinas (González y col, 1999). En este estudio se evaluó la existencia de un mecanismo de modulación de la síntesis de prostaglandinas embrionarias por acción de ET-1. Los resultados mostraron que ET-1 no regula la síntesis de PGE₂ en el embrión en etapa de organogénesis temprana, en forma similar a lo observado en estudios realizados en decidua y amnios (Mitchell y col, 1990).

El análisis del sistema ET-1/NO en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I, mostró anomalías en los niveles de ambos compuestos. En primer lugar, los niveles de ET-1 se encontraron disminuidos. *De esta forma, en el modelo severo de diabetes experimental, donde se detectan malformaciones en órganos derivados de la cresta neural, existe una deficiencia en los niveles de ET-1, probablemente vinculados a inducción de malformaciones congénitas.* Por otro lado, los niveles de NO endógenos se encuentran muy elevados en relación al control, más aún que en el modelo de diabetes tipo II. Estos resultados son semejantes a nuestras observaciones en células y otros tejidos diabéticos. En efecto, hemos detectado un incremento en los niveles de NO en ovocitos (Jawerbaum y col 1998), páncreas (González y col, 1999) y placenta a término de rata (White y col, 2002; Capobianco y col, 2003) y pacientes diabéticos (Pustovrh y col, 2000).

Como ya se mencionó, el aumento desmedido de NO, sería perjudicial para el desarrollo embrionario puesto que generaría daño al embrión en desarrollo induciendo muerte celular por apoptosis y/o citotoxicidad al combinarse con otros radicales libres del oxígeno (Miller y col, 1996; Eriksson, 1993).

Al analizar la modulación de NO sobre la producción de ET-1 en el embrión de rata diabética tipo I se observó que la inhibición de la actividad NOS no provocó una

Discusión

correspondiente disminución en los niveles de ET-1, aunque el agregado de NO exógeno moduló positivamente dichos niveles. Resulta paradójico que, si bien la producción de NO está incrementada, este compuesto no es capaz de modular en forma positiva la síntesis de ET-1, a diferencia del efecto observado en los embriones provenientes de ratas sanas y diabéticas tipo II.

El NO pierde rápidamente su actividad biológica por inactivación en presencia de especies reactivas de oxígeno. Existen varios estudios que demuestran que dichas especies están incrementadas en la patología diabética, y que inducen malformaciones congénitas en el embrión de madre diabética (Eriksson y col, 1991 y 1993; Hagay y col, 1995; Wentzel y col, 1997; Yang y col, 1998).

Según dichos antecedentes, evaluamos si la remoción de especies reactivas del oxígeno mediante la adición de una enzima antioxidante, podría modificar los niveles embrionarios de ET-1. Sin embargo, el agregado de SOD al medio de cultivo no fue capaz de alterar el contenido de ET-1 en estos embriones.

Por otra parte, a diferencia de lo observado en los embriones de ratas sanas y diabéticas tipo II, ET-1 es incapaz de modular los niveles de NO en embriones de ratas diabéticas tipo I. *En este modelo severo de diabetes mellitus, los mecanismos moduladores que regulan los niveles de ambos metabolitos parecen estar ausentes. Probablemente esta falta de regulación sea una de las causas de los altos índices de pérdidas fetales y malformación que caracterizan al modelo.*

Los niveles de PGE_2 , su transporte y su modulación se encuentran alterados en los embriones de ratas diabéticas.

Al analizar el contenido embrionario de PGE_2 en embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I encontramos que sus niveles están disminuidos. Este hecho concuerda con trabajos experimentales que demostraron que las anomalías morfológicas y el retraso en el crecimiento observado en los embriones de animales diabéticos es producto de las alteraciones en la cascada del ácido araquidónico (Goldman y col, 1985) y de la deficiencia

Discusión

de PGE_2 (Piddington y col, 1996; Wentzel y col, 1999). Asimismo, nuestros resultados indican que el cultivo de embriones sanos en presencia de suero diabético induce una disminución del contenido embrionario de PGE_2 , indicando que el entorno materno sería el responsable de esta alteración. Si bien estos hallazgos son significativos, nuestros estudios previos muestran que en el modelo experimental de diabetes tipo II la producción de PGE_2 se encuentra incrementada (Jawerbaum y col, 1998). Debe considerarse que las prostaglandinas se sintetizan intracelularmente y se liberan al medio extracelular antes de ser presentadas a sus receptores de membrana (Smith, 1989). Un aspecto interesante de estos resultados es que, en forma semejante a lo observado en los embriones diabéticos tipo II, el embrión de ratas diabéticas tipo I sintetiza y libera al medio de incubación elevadas concentraciones de PGE_2 . De hecho, tomándose en cuenta los valores totales (es decir, la suma de la PGE_2 liberada más su contenido intraembrionario), la producción de esta prostaglandina en el embrión de rata diabética tipo I es de un orden de magnitud mayor que lo producido por el embrión de rata sana. *Nuestros resultados indican que a pesar de la deficiencia de ácido araquidónico y del menor contenido embrionario del prostanoide, la producción de PGE_2 en el embrión de rata diabética tipo I es muy elevada.*

Algunos estudios esbozan la posibilidad de que las prostaglandinas puedan acumularse antes de ser liberadas. Existen evidencias de que la PGE_2 se acumula en el blastocisto antes de la implantación (Jones y Harper, 1984) o en el tejido uterino, en respuesta a una concentración elevada de progesterona (Gimeno y col, 1987; Motta y col, 1995). Dado el requerimiento de la PGE_2 durante el cierre del tubo neural, podría considerarse que para este proceso es necesaria la acumulación de las prostaglandinas embrionarias, proceso que podría encontrarse alterado en el embrión diabético. Se evaluó esta posibilidad mediante el estudio del transporte, incorporación y liberación de $^3\text{H-PGE}_2$, demostrándose que el embrión diabético tipo I libera más prostaglandina al medio que el embrión de rata sana. De igual forma, observamos una mayor liberación de $^3\text{H-PGE}_2$ en el embrión de rata sana cultivado durante 24 horas en presencia de suero diabético. *De esta forma nuestros resultados indican que existe una menor acumulación de PGE_2 en el embrión de rata diabética, que se debería a una alteración en el transporte de la misma y que probablemente afecta al proceso de cierre de tubo neural que se encuentra alterado en esta*

Discusión

patología. A su vez, hemos demostrado que este defecto se acompaña de una mayor síntesis de PGE₂, quizás con el objeto de compensar la pérdida anormal de dicha prostaglandina, alteración que podría llevar a una depleción de su sustrato, el ácido araquidónico, disminución que generaría a su vez daño en la membrana de las células embrionarias, alteraciones probablemente involucradas en la dismorfogénesis inducida por la diabetes.

Puesto que las prostaglandinas son sintetizadas por dos isoformas de la enzima COX (Smith y col, 1994; Llof y col, 1994), se ha considerado que el descenso en el contenido embrionario de la PGE₂ se debe a la disminución en la expresión de la COX II en embriones sanos cultivados en presencia de suero diabético tipo I y en embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I, mientras que la expresión de la isoforma constitutiva COX I no sufriría alteraciones, tanto *in vivo* como en el cultivo *in vitro* (Wentzel y col, 1999). En este trabajo analizamos la expresión de las dos isoformas de la COX. Al igual que otros autores (Win y col, 1997; Wentzel y col, 1999) detectamos en el embrión en etapa de organogénesis temprana la presencia de la isoforma constitutiva COX I. Nosotros, utilizando la técnica de western blot, no hemos detectado la isoforma COX II embrionaria, mientras que otros autores han determinado su presencia mediante estudios de RNA mensajero (Wentzel, y col, 1999). Los niveles de COX II parecerían ser muy bajos durante esta etapa del desarrollo. En efecto, estudios farmacológicos que evalúan la capacidad teratogénica de distintos inhibidores de la COX, demostraron incidencia de malformaciones en ratas y conejos durante la organogénesis sólo cuando los fármacos son más selectivos para COX I, mientras que no se observaron anomalías en el caso de fármacos más selectivos para COX II (Davenport y col, 2002).

Diversos estudios, varios de ellos realizados en nuestro laboratorio, han establecido que el NO puede actuar combinándose al grupo hemo de la enzima COX, estimulando de esta forma la síntesis de prostaglandinas en diferentes tejidos y tipos celulares tales como el hipotálamo (Rettori y col, 1992), espermatozoides (Herrero y col, 1995), complejo oocito-cúmulus (Jawerbaum y col, 1998) y músculo liso de colon equino (Van Hoogmoed y col, 2002) entre otros. Nuestro trabajo previo mostró que, tanto en embriones de rata sana como de rata diabética tipo II la síntesis de PGE₂ es modulada positivamente por acción del NO (Jawerbaum y col, 1998). El presente trabajo, evalúa la capacidad moduladora de NO sobre

Discusión

la síntesis de PGE_2 en el embrión de rata diabética tipo I. Nuestros resultados indican que en este modelo de diabetes, el NO no modula la síntesis de PGE_2 embrionaria, no observándose efecto ni en presencia de NO exógeno, ni al inhibir la síntesis endógena de NO.

De esta forma, al igual que lo observado en el sistema ETI-NO, en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo I no se evidencian mecanismos de regulación de la síntesis de PGE_2 mediados por el NO, compuesto que sí regula dichos niveles en los embriones de ratas sanas y en los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II.

Esta falta de modulación de la síntesis de PGE_2 y el incremento de los niveles de NO, serían doblemente perjudiciales para el embrión de rata diabética tipo I. Por una parte debe considerarse la participación de la PGE_2 en el cierre del tubo neural y las anomalías generadas por bajos niveles de la misma (Piddington y col, 1996). Por otra parte, el exceso de NO generaría muerte celular por apoptosis en forma inespecífica (Lee y Juchau, 1994) y contribuiría además, como radical libre, a la inducción de malformaciones congénitas que en el entorno diabético provocan dichos compuestos (Eriksson y Borg, 1993; Miller y col, 1996; Wentzel y col, 1998 y 2001).

Concluimos que en los embriones de ratas diabéticas tipo I, existen defectos más severos que en el modelo de diabetes tipo II, observándose no sólo alteraciones en metabolitos con actividad biológica de importancia para el desarrollo embrionario como la ET-1, la PGE_2 y el NO, sino también en los mecanismos de regulación que controlan los niveles de dichos metabolitos y su liberación.

El metabolismo lipídico embrionario se encuentra alterado en los embriones de ratas diabéticas

La importancia de los lípidos a lo largo del desarrollo embrionario ha sido determinada por diferentes estudios en diversas etapas de la gestación. En el ovocito y en los primeros eventos posteriores a la fecundación, se postula que los lípidos, básicamente los triacilglicéridos, brindarían soporte energético para los diversos procesos celulares, tales como la transcripción de mensajeros y la síntesis de nuevas proteínas (Kruip y col, 1983).

Discusión

En etapas más tardías, su papel no quedaría solo reducido al abastecimiento de las necesidades energéticas, sino que participarían en eventos de señalización, favoreciendo el procesamiento de proteínas, tal es el caso del colesterol (Porter y col, 1996), estimulando el crecimiento celular, vía fosfoinosítidos y diacilglicerol (Strieleman y Metzger, 1993, Wentzel y col, 2001) y en eventos relacionados con la formación de nuevas estructuras brindando la materia prima para la formación de membranas celulares y en el desarrollo del sistema nervioso (Herz y Farese, 1999; Fisher y col, 2001; Raabe y col, 1998).

En este trabajo hemos determinado el perfil lipídico del embrión y su capacidad sintética endógena durante la organogénesis temprana. El análisis de los diferentes tipos de lípidos señaló que la fracción mayoritaria de éstos corresponde a los fosfolípidos.

Al comparar los perfiles lipídicos de los embriones provenientes de ratas sanas y de ratas diabéticas tipo I, sólo se observaron diferencias en la masa de triacilglicéridos, la cual resultó incrementada en los últimos. Esta característica coincide con otros estudios previos realizados en modelos experimentales de diabetes que indican una mayor acumulación de estos lípidos en el tejido uterino y en la unidad fetoplacentaria (Jawerbaum y col, 1994; Shafrir y col, 1982). El embrión de madre diabética se desarrolla en un entorno anómalo donde los niveles séricos de los distintos metabolitos se encuentran alterados. Entre ellos, se observa un característico aumento de triacilglicéridos, principalmente como consecuencia de la actividad incrementada de la enzima lipasa y de una menor actividad de la enzima lipoproteinlipasa debido a la falta de insulina (Nikkila y col, 1977). Teniendo en cuenta que existe una correlación entre los niveles séricos y el contenido fetal de triacilglicéridos (Szabo y Szabo, 1974; Shafrir y col, 1978; Thomas, 1987), probablemente la mayor acumulación de estos metabolitos en el embrión diabético tipo I durante la organogénesis sea el resultado de un mayor flujo de dichos compuestos desde la madre diabética hacia el embrión. En efecto, los niveles séricos de triacilglicéridos de las ratas diabéticas tipo I se encuentran elevados en relación al animal sano.

A diferencia de lo antedicho, al analizar el perfil lipídico de los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, no se encontraron alteraciones respecto de los embriones de ratas sanas. Por otra parte el análisis de los niveles de triacilglicéridos maternos no mostró ningún tipo de anomalía con respecto a las ratas sanas. *Estos resultados nos muestran*

Discusión

nuevamente la estrecha vinculación entre el estado metabólico materno y la presencia de anomalías embrionarias, en este caso en relación a las alteraciones del perfil lipídico.

Si bien la nutrición embrionaria a lo largo de la gestación depende de la transferencia de nutrientes hacia el embrión, tales como glucosa, aminoácidos (Fawcett y col, 2000), y ácidos grasos poliinsaturados (Edson y Hull, 1975) el embrión posee capacidad intrínseca para la síntesis de biomoléculas (Herz y Farese, 1999; Fisher y col, 2002). En este estudio se determinó que la síntesis embrionaria de lípidos a partir de trazadores radioactivos durante la organogénesis temprana es un proceso activo. Al evaluar dicho proceso en el embrión diabético, observamos importantes alteraciones. Utilizando como trazador el acetato radioactivo, que se incorpora a los ácidos grasos sintetizados *de novo*, observamos una disminución de la síntesis de todas las especies lipídicas evaluadas en relación al control. En forma diferente, cuando la síntesis de lípidos fue estudiada a partir de un ácido graso marcado, no se encontraron diferencias respecto de los embriones de ratas sanas. Esto indicaría que en los embriones diabéticos tipo I la alteración en la síntesis de lípidos complejos se encontraría en un paso previo a la esterificación de los ácidos grasos. Si bien no se ha evaluado previamente el metabolismo lipídico en el embrión diabético en este período de desarrollo, cuando en la gesta a término se administran ácidos grasos radioactivos a la madre, se observa una mayor marcación de ácidos grasos fetales, indicador de una mayor transferencia materno-fetal (Shafrir y col, 1982).

Por otro lado, sí es conocido que los fetos diabéticos a término presentan una menor, síntesis de lípidos neutros y fosfolípidos en la fracción de surfactantes y fracción residual en los pulmones fetales (Moxley y Longmore, 1977), alteración directamente vinculada al síndrome de distrés respiratorio, complicación neonatal de importancia en el hijo de madre diabética.

En cuanto a los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II, si bien se hallaron anomalías en la síntesis de lípidos a partir de acetato, en este caso ésta fue limitada a dos especies lipídicas: triacilglicéridos y ésteres de colesterol. *De esta forma, observamos que durante la organogénesis el embrión de rata diabética posee alteraciones en el proceso de síntesis lipídica de novo, observándose también en este caso que las anomalías en el metabolismo lipídico son menos severas en el modelo experimental de diabetes tipo II.*

Discusión

Diversos estudios han demostrado que si se produce la disrupción del metabolismo lipídico embrionario o se altera la transferencia materno-fetal de lípidos durante la organogénesis, se originan malformaciones congénitas: El síndrome de Smith-Lemli-Optiz, que se caracteriza por anomalías craneofaciales, enfermedades cardíacas congénitas y anomalías en la formación de los miembros, es causado por defectos en la síntesis embrionaria de colesterol (Farese y Hertz, 1998). Anomalías similares se obtienen mediante la inhibición farmacológica de las enzimas implicadas en la síntesis de este lípido (Llirbat y col, 1997). Si se altera el metabolismo de la colina, impidiendo su captación o su metabolización a fosfatidilcolina, se generan anomalías morfológicas en el embrión las cuales consisten básicamente en defectos del tubo neural y retraso en el crecimiento embrionario (Fischer y col, 2001 y 2002). La deficiencia en la captación de mioinositol, provocado por el exceso de glucosa, lleva a una menor síntesis de fosfatidilinositol, y esto a su vez, a la aparición de malformaciones y al retraso en el crecimiento embrionario (Hod y col, 1986; Strielemann y Metzger, 1993; Wentzel y col, 2001).

Como ya se ha mencionado, el embrión de madre diabética se caracteriza por una mayor incidencia de malformaciones congénitas (Eriksson, 1982; Martínez-Frías, 1992), principalmente aquellas relacionadas con alteraciones en la formación del tubo neural y el corazón, fenotipos observados también por anomalías o deficiencias en el metabolismo de lípidos. *De esta forma, consideramos que las anomalías en el metabolismo lipídico de embriones de ratas diabéticas, que hemos descrito, podrían estar involucradas en los procesos de inducción de las malformaciones congénitas en la patología diabética.*

Trabajos previos demostraron la capacidad de las prostaglandinas, en particular PGE₂ y prostaciclina, para modular el metabolismo de lípidos en diversos tipos celulares (leucocitos mononucleares, preadipocitos), tejido adiposo y tejido uterino (Chatzipanteli y col, 1992; Vassaux y col, 1992a; Krone y col, 1998; Sterin y col, 1984; González y col, 1987). En particular se ha demostrado que la PGE₂ posee funciones moduladoras del metabolismo lipídico, y que éstas son diferentes en cada tejido: es antilipolítica en adipocitos (Chatzipanteli y col, 1992; Vassaux y col, 1992b), e inhibe la síntesis de lípidos en leucocitos (Krone y col, 1998) y hepatocitos (Matter y col, 1992). Dichos efectos

Discusión

resultan ser directos o indirectos, y en algunos casos median la acción de otros mensajeros. Dado el efecto benéfico que posee la adición de PGE_2 sobre la morfología del embrión diabético (Goto y col, 1992), y el hallazgo de niveles alterados del prostanoide en dichos embriones, se evaluó el efecto de la adición de PGE_2 sobre el metabolismo lipídico embrionario.

Nuestros resultados muestran que la incubación en presencia de PGE_2 no modificó la masa de ninguna de las especies lipídicas analizadas en embriones de ratas sanas o diabéticas tipo I y tipo II. Tampoco modificó la síntesis lipídica a partir de acetato marcado en embriones de rata sana y diabética tipo II, en los cuales el contenido de dicha prostaglandina no es deficiente. Sin embargo, en los embriones de ratas diabéticas tipo I, donde los niveles endógenos de PGE_2 son bajos, la incubación en presencia del prostanoide produjo un incremento en la síntesis lipídica *de novo* a partir de acetato marcado, llevándolo a valores semejantes al control. De esta forma, observamos que en la rata diabética tipo I existe una deficiencia en la síntesis lipídica *de novo* a partir de acetato, alteración que podría ser el resultado de una regulación ejercida en el embrión para evitar la excesiva acumulación de lípidos, a la cual contribuye la transferencia incrementada de ácidos grasos de la madre diabética al embrión en desarrollo (Thomas, 1987).

El efecto de PGE_2 sobre la síntesis de lípidos a partir de acetato en el embrión diabético podría ser una influencia directa sobre dicho proceso o una acción indirecta, ya que la mejoría en el metabolismo de carbohidratos puede privilegiar el anabolismo lipídico por sobre su catabolismo. En este sentido, estudios realizados en tejido uterino (González y col, 1989) y en adipocitos (Richelsen y col, 1985) demuestran que PGE_2 estimula el metabolismo de la glucosa.

Nuestros resultados indican que el entorno materno diabético provoca alteraciones en el metabolismo lipídico embrionario y afecta la capacidad de síntesis de lípidos endógenos, necesarios como moléculas estructurales del embrión en una etapa de alta proliferación celular y como compuestos que participan en procesos de señalización y por lo tanto deben estar presentes en el espacio y tiempo adecuados para asegurar el normal desarrollo del embrión. En forma interesante, en el embrión diabético tipo I la adición de PGE_2 revierte

Discusión

esta anomalía, mecanismo probablemente involucrado en su capacidad de prevenir la aparición de malformaciones congénitas inducidas por la patología diabética.

La 15dPGJ₂ modula el metabolismo lipídico del embrión en forma independiente del receptor nuclear PPAR γ

La 15dPGJ₂ es una ciclopentenona identificada inicialmente como un producto formado *in vitro* por el metabolismo de la prostaglandina D₂ mediado por albúmina (Fitzpatrick y col, 1988). Posteriormente, esta prostaglandina ha sido identificada *in vivo* en fluidos inflamatorios, con altos niveles de la misma en la fase resolutive de la inflamación (Gilroy y col, 1999). La 15dPGJ₂ presenta un amplio espectro de acción biológica, que incluye la actividad antitumorigénica, la inhibición del ciclo celular, la supresión de la replicación viral (Fukushima, 1992), y los efectos antiinflamatorios (Rossi y col, 2000; Strauss y col, 2000). Sin embargo, no existen estudios claros acerca de una función específica durante el desarrollo embrionario, y en particular en la organogénesis temprana, previa al establecimiento de la placentación corioalantoidea.

En este trabajo de tesis se determinó que el embrión en organogénesis es capaz de sintetizar 15dPGJ₂ y que sus niveles resultan comparables a los de PGE₂, prostaglandina sintetizada por el embrión e involucrada en el cierre del tubo neural. En forma interesante, determinamos que los niveles de 15dPGJ₂ se encuentran disminuidos en el embrión de rata diabética tipo II, y más aún en el embrión de rata diabética tipo I.

Una característica particular de las ciclopentanonas, es que sus receptores son factores de transcripción. En particular, la 15dPGJ₂, es el ligando natural con mayor afinidad para el receptor nuclear PPAR γ (Forman y col, 1995; Kliewer y col, 1995). Este factor de transcripción está involucrado en el metabolismo lipídico, y en especial en la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos (Rosen y col, 2000).

Tomando en cuenta estos antecedentes y conociendo la importancia de los lípidos durante el período de organogénesis temprana, se decidió analizar los efectos de esta prostaglandina sobre el metabolismo lipídico del embrión.

Discusión

En principio, se estudió la influencia de este prostanoide sobre la masa de lípidos neutros. En embriones de ratas sanas la 15dPGJ₂ agregada en forma exógena provocó la disminución de la masa de colesterol, triacilglicéridos y ésteres de colesterol. En forma similar, en los embriones de ratas diabéticas tipo II, se observó la disminución en la masa de colesterol y ésteres de colesterol. Si bien no existen reportes en tejido embrionario, el tratamiento con tiazolidinedionas, ligandos sintéticos de PPAR γ utilizados para el tratamiento de la diabetes tipo II (Lehman et al, 1995), producen una disminución de los niveles de lípidos séricos y tejidos periféricos (Oakes y col, 2001), mientras que los ácidos grasos se redireccionan hacia el tejido adiposo donde se induce un incremento en el número de adipocitos (Walczak y Tontonoz, 2002). En forma diferente, no se observaron efectos de 15dPGJ₂ sobre la masa de lípidos de los embriones de ratas diabéticas tipo I.

De esta forma, observamos nuevamente que mecanismos reguladores presentes en el embrión sano y diabético tipo II, no se detectan en modelos más severos de diabetes.

Al evaluar el efecto de adiciones de 15dPGJ₂ sobre la síntesis *de novo* de lípidos mediante la incorporación de acetato de sodio marcado como trazador, demostramos que esta prostagandina ejerce una clara influencia inhibitoria sobre la síntesis de fosfolípidos, colesterol, triacilglicéridos, y ésteres de colesterol en embriones de rata sana, diabética tipo I y diabética tipo II. En el caso de los embriones de rata sana y diabética tipo II, este efecto explicaría la acción inhibitoria de 15dPGJ₂ sobre la masa lipídica. En cuanto a los embriones de rata diabética tipo I, quizás este efecto no se evidencie porque tal como fue discutido previamente, estos embriones presentan ya en forma basal una disminución en la síntesis de lípidos a partir de acetato marcado, más acentuada que en los embriones de ratas diabéticas tipo II.

De esta forma, podemos concluir que 15dPGJ₂ ejerce efectos inhibitorios sobre los niveles y síntesis lipídica embrionaria. Dado que en los embriones de rata diabética se observan niveles disminuidos de 15dPGJ₂ y una menor síntesis lipídica, ésta última alteración sería independiente de la acción de 15dPGJ₂ sobre el metabolismo embrionario. Probablemente, y tal como ocurre en el feto diabético a término (Moxley y Longmore, 1977; Singh y Feigelson, 1983), la menor síntesis lipídica embrionaria sea el resultado de una mayor

Discusión

transferencia de lípidos, que produce como resultado un freno a los procesos anabólicos del metabolismo lipídico (Herrera y col, 1985).

Se ha descrito que la acción de la 15dPGJ₂ puede ser mediada por el factor de transcripción PPAR γ , función claramente demostrada en el proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos (Forman y col, 1995; Kliewer y col, 1995). Sin embargo se han descrito algunos sistemas en que las acciones de esta prostaglandina son independientes de este factor de transcripción, entre ellos, el efecto apoptótico de 15dPGJ₂ en miofibroblastos (Liyang y col, 2001), y su influencia sobre la proliferación celular en células mesangiales (Rovin y col, 2002).

En este estudio se analizó si el receptor nuclear PPAR γ media los efectos de 15dPGJ₂ sobre el metabolismo embrionario. El tratamiento con BADGE, un antagonista de dicho receptor (Right y col, 1999), no tuvo efecto *per se* sobre la síntesis de la mayoría de los lípidos analizados, excepto sobre colesterol, donde se observó una acción inhibitoria.

La incubación en presencia de 15dPGJ₂ y BADGE, no evitó la inhibición en la síntesis de lípidos provocada por la prostaglandina. Se analizó además el efecto de troglitazona, agonista farmacológico de PPAR γ que pertenece a la familia de las tiazolidinedionas, drogas utilizadas para el tratamiento de la diabetes tipo II (Saltiel y Olefsky, 1996). El tratamiento con este agente no provocó ningún tipo de influencia sobre la síntesis de fosfolípidos y triacilglicéridos, pero al igual que 15dPGJ₂, ejerció un efecto inhibitorio sobre la síntesis de colesterol y ésteres de colesterol. La troglitazona es un agente hipolipemiante (Kersten y col, 2000), existiendo evidencias que indican que esta tiazolidinediona inhibe la síntesis de colesterol en forma independiente del receptor nuclear PPAR γ (Wang y col, 1999) y que ejerce efectos inhibitorios sobre la actividad de la acil-CoA sintetasa 4 afectando la síntesis de triacilglicéridos en forma independiente de PPAR γ (Kim y col, 2001).

Por otra parte, se analizó la expresión de PPAR γ en el embrión durante la organogénesis temprana, observándose su ausencia en embriones sanos y diabéticos en etapa de organogénesis temprana, con expresión a partir del día 13.5 de gestación. Resultados semejantes fueron observados en diferentes estudios al evaluar la presencia del mensajero

Discusión

de este receptor nuclear en embriones de ratón, de rata y de humanos (Kliwer y col, 1994; Braissant y Wahli, 1998; Huin y col, 2000).

De esta forma, nuestros resultados indicarían que la acción inhibitoria de 15dPGJ₂ sobre la síntesis lipídica embrionaria sería un efecto independiente de la activación del factor nuclear PPAR γ .

Si bien este factor es necesario para la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos (Tontonoz y col, 1994), existen evidencias que indican que la actividad del receptor nuclear sería necesaria solamente para los eventos finales en la diferenciación (Vernochet y col, 2002). Se sugiere que otros factores intervienen en los procesos previos al desarrollo de los adipocitos. Algunos estudios han indicado que la expresión de PPAR γ sería modulada por la actividad del receptor nuclear PPAR β/δ (Bastie y col, 1999). La función específica de este último no ha sido totalmente definida, pero debido a su amplia distribución en los tejidos periféricos, se cree que modularía el metabolismo lipídico en dichos tejidos (Oliver y col, 2001; Vosper y col, 2002). Además se ha determinado que su expresión es continua en el desarrollo embrionario a lo largo de la organogénesis, con alta penetración en el sistema nervioso (Braissant y Whali, 1998), en el cual modularía el metabolismo lipídico y sería responsable de una correcta mielinización (Peters y col, 2000; Barak y col, 2002).

Sobre la base de estos antecedentes y considerando las anomalías observadas en el metabolismo de lípidos del embrión de rata diabética, se analizó la expresión del factor de transcripción PPAR β/δ en embriones sanos y de ratas diabéticas. Nuestros resultados indican la presencia de la proteína en embriones sanos y en embriones diabéticos, sin observarse diferencias en la expresión de dicho factor al comparar ambos grupos experimentales. *Estos resultados, nos indicarían que las anomalías en el metabolismo lipídico embrionario en el embrión de madre diabética no parecen deberse a alteraciones en la expresión de los factores de transcripción PPAR β/δ o γ . Probablemente dichas anomalías sean el resultado de una mayor transferencia materna lipídica al embrión como consecuencia del entorno materno anómalo inducido por la diabetes, lo que llevaría, dependiendo del grado de severidad de la enfermedad, a alteraciones en la masa lipídica embrionaria, o que dan como resultado una inhibición de la síntesis endógena de los lípidos del embrión.*

❖ **CONCLUSIONES**

En este estudio hemos evaluado al embrión de rata sana, diabética tipo I y diabética tipo II en aspectos vinculados con su desarrollo durante el período de organogénesis temprana, con el objeto de evidenciar factores involucrados en la aparición de malformaciones inducidas por la patología diabética.

Por una parte se estudiaron agentes vasoactivos, de importancia morfogenética para el embrión: la endotelina-1 y el óxido nítrico, necesarios en concentraciones adecuadas para permitir el normal desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que los niveles de ambos compuestos se hallan incrementados en embriones provenientes de ratas diabéticas tipo II. A su vez, estos compuestos son capaces de regularse entre sí. Endotelina-1 modula en forma negativa la generación de óxido nítrico, este último es un regulador positivo para la síntesis de ET-1. De esta forma observamos que en el embrión sano y en el embrión diabético tipo II, los niveles de estos agentes se controlan durante la organogénesis. Si bien es conocido el efecto deletéreo de una deficiencia de ET-1, no existen evidencias sobre influencias negativas de ET-1 en altas concentraciones sobre el desarrollo del embrión de rata diabética tipo II. Podemos inferir que el control negativo que ejerce este mayor nivel de ET-1 sobre la producción de NO sería beneficioso para evitar un mayor incremento en los niveles de NO, que sería perjudicial para el desarrollo embrionario.

A diferencia de lo observado en el embrión sano y diabético tipo II, el embrión de rata diabética tipo I, presenta niveles disminuidos de ET-1 y un alto contenido de NO. En este modelo, caracterizado por marcadas anomalías del desarrollo embrionario, no se verifica regulación de NO sobre los niveles de ET-1. Puesto que el exceso de NO y la falta de ET-1 son perjudiciales para el embrión, es probable que estas alteraciones formen parte del proceso de inducción de malformaciones embrionarias en este modelo más severo de diabetes.

La PGE₂ es otro agente vasoactivo de importancia para el embrión durante este período, ya que participa en eventos de morfogénesis como el cierre del tubo neural. En este trabajo encontramos un bajo contenido de PGE₂ en el embrión de ratas diabéticas tipo I, mientras

Conclusiones

que la producción de esta prostaglandina y su liberación al medio de incubación están incrementados. El estudio del transporte de ^3H -PGE₂ exógena parece indicar que estos embriones tienen una menor capacidad para retener dicha prostaglandina. De esta forma, el bajo contenido de PGE₂ embrionario, sería debido a un defecto en el mecanismo de transporte del prostanoide. Esta alteración se acompaña por una sobreproducción de PGE₂, quizás inducida inicialmente para compensar los bajos niveles intraembrionarios.

La generación de anomalías morfológicas y de contenido y transporte de PGE₂, también pudo observarse en los cultivos de embriones de rata sana cultivados durante 24 horas en presencia de suero diabético. Estos resultados avalan la importancia del entorno materno diabético como responsable del origen de anomalías embrionarias, tanto morfológicas como metabólicas.

En el embrión de rata diabética tipo I, donde los niveles de NO están elevados, se determinó que este agente no modula la síntesis de PGE₂, a diferencia de lo observado previamente en el embrión de rata sana y diabética tipo II. Nuevamente, observamos que en el embrión de rata diabética tipo I, se pierden mecanismos reguladores que serían de importancia para el normal desarrollo embrionario.

El metabolismo lipídico durante el desarrollo embrionario es fundamental tanto para sostener el proceso de morfogénesis como el de crecimiento. En este estudio observamos que el embrión de rata diabética tipo I presenta niveles elevados de triacilglicéridos, probablemente producto de una mayor transferencia lipídica materna al embrión. En este modelo no se evidenciaron alteraciones en los otros lípidos neutros y polares analizados. No se observó ninguna anomalía en los niveles de lípidos evaluados en el embrión de rata diabética tipo II en relación al control.

Al estudiar la síntesis de lípidos embrionarios a partir de un precursor marcado (^{14}C -acetato de sodio) determinamos que se trata de un proceso activo en esta etapa del desarrollo, y por lo tanto ésta sería una fuente adicional a la transferencia de partículas lipoproteicas de origen materno, conteniendo triacilglicéridos y colesterol a través del saco vitelino. La síntesis lipídica está disminuida en los embriones diabéticos tipo I con respecto a todas las especies de lípidos estudiadas. Esta alteración ocurre en los primeros pasos de la vía sintética de los acilglicéridos, puesto que la esterificación del ácido graso

Conclusiones

exógeno ^{14}C -oleico a lípidos complejos, no se ve afectada en el embrión de rata diabética tipo I. Asimismo, la síntesis de colesterol estaría afectada en sus pasos iniciales.

La adición de PGE_2 , evita la aparición de alteraciones en la síntesis de lípidos embrionarios en este modelo experimental. Este resultado nos acerca aún más al concepto de la vinculación existente entre las alteraciones del metabolismo lipídico embrionario y la aparición de anomalías congénitas

En los embriones de ratas diabéticas tipo II no se observan anomalías en la masa lipídica embrionaria. Existen alteraciones en la síntesis de triacilglicéridos y ésteres de colesterol, aunque éstas no alcanzan al colesterol ni a los fosfolípidos. En este modelo, donde no se observa un menor contenido de PGE_2 embrionario, la adición de esta prostaglandina no modifica, al igual que en los embriones sanos, la síntesis lipídica embrionaria. De esta manera, y en forma similar a los otros parámetros estudiados previamente hemos hallado menores alteraciones del metabolismo lipídico en este modelo de diabetes donde hay menor incidencia de malformaciones embrionarias que en los embriones provenientes de animales diabéticos tipo I.

El estudio realizado con 15dPGJ_2 , prostanoide regulador del metabolismo lipídico, muestra que durante la organogénesis embrionaria, dicho compuesto posee un efecto inhibitorio sobre la síntesis lipídica, tanto en embriones sanos como diabéticos tipo I y tipo II.

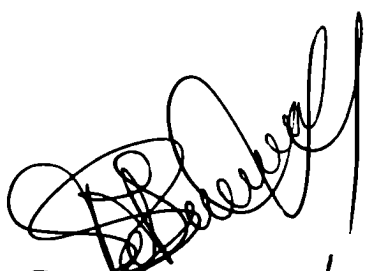
Por otra parte, determinamos que 15dPGJ_2 es sintetizada por el embrión durante la organogénesis, aunque el prostanoide no parece ser responsable de la disminución de la síntesis endógena de lípidos en los embriones de rata diabética tipo I, puesto que sus niveles se encuentran disminuidos en dichos embriones.

Ensayos con antagonistas y agonistas de $\text{PPAR}\gamma$ muestran que el mecanismo de acción de 15dPGJ_2 sería independiente de su receptor nuclear, cuya expresión no fue detectada en esta etapa del desarrollo embrionario. En este período se detectó la presencia de $\text{PPAR}\beta/\delta$, cuya expresión no parece alterarse por el entorno diabético, pero deja una puerta abierta al estudio de sus agonistas como moduladores del metabolismo lipídico embrionario durante la organogénesis.

En base a lo expuesto en este trabajo de tesis, podemos decir que, en respuesta al grado de severidad del entorno materno diabético, se afecta la síntesis, producción y regulación de

Conclusiones

agentes vasoactivos que alteran en forma directa el normal desarrollo del embrión. Asimismo, el entorno materno anómalo produce cambios en el metabolismo lipídico del embrión diabético, cuya vinculación con la aparición de malformaciones congénita es un aporte al entendimiento del origen de la dismorfogénesis en el hijo de madre diabética.



Saborá Inés
SINNER.



DRA. EUDÁ GONZÁLEZ
DIRECTOR



DRA ALICIA JAWERBAUM
DIRECTOR ASISTENTE

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

1. Ahem G, Klyachko VA, Jackson MB (2002) "cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO" *TRENDS in Neur.* 25: 510-517
2. Ahmad N, Chen LC, Gordon MA, Laskin JD, Laskin DL (2002) "Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia" *J. Leukoc. Biol.* 71:1005-11
3. Albina JE, Cui S, Matco RB, Reichner JS (1993) "Nitric oxide mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages" *J. Immunol.* 150: 5080-5085
4. American Diabetes Association (2002) "Clinical practice recommendations 2002" *Diabetes Care* 25: (S1) 1-147
5. Andersen O, Kuhl K (1988) "Adipocyte insulin receptor binding and lipogenesis at term in normal pregnancy" *Eur. J. Clin. Invest.* 18: 575-581
6. Baker K, Piddington R, Goldman A, Egler J, Mochring J (1990) "Myoinositol and prostaglandins reverse the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos" *Diabetologia* 33: 593-596
7. Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM (2002) "Effects of peroxisome proliferator activated receptor delta on placentation, adiposity and colorectal cancer" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 303-308
8. Barak Y, Nielson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) "PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development" *Mol. Cell* 4: 585-595
9. Bastie C, Holst D, Gaillard D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA (1999) "Peroxisome proliferator activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts" *J. Biol. Chem.* 274 21920-21925
10. Basu-Modak Sh, Braissant O, Escher P, Desvergne P, Honegger P, Wahli W (1999) "Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-coasynthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures" *J Biol Chem.* 274: 35881-35888
11. Baynash AG, Hosada K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M (1994) "Interaction of endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons" *Cell* 79: 1277-1285
12. Behrman HR, Romero RJ (1992) "Prostaglandins and prostaglandin-like products in reproduction: eicosanoids, peroxides and oxygen radicals" *en Reproductive Endocrinology* 238-272

Bibliografia

13. Benigni A, Colosio V, Brena C, Bruzzi I, Bertani T, Remuzzi G (1998) "Unselective inhibition of endothelin receptors reduces renal dysfunction in experimental diabetes" *Diabetes* 47: 450-6
14. Black SM, Bedolli MA, Martincz S, Bristow JD, Ferricco 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: 145-155
15. Blight EG, Dyer WJ (1959) "A rapid method of total lipid extraction and purification" *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917
16. Blonde O, Baibel D, Portha B (1989) "Relation of insulin deficiency to impaired insulin action in NIDDM adult rats given streptozotocin as neonates" *Diabetes* 38: 610
17. Bradford, MM (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
18. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996) "Differential expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPARs): tissue distribution of PPAR alpha, beta and gamma in the adult rat" *Endocrinology* 137: 354-366
19. Braissant O, Wahli W (1998) "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta and -gamma during rat embryonic development" *Endocrinology* 139: 2748-2754
20. Bredt D.S., Snyder S.H. (1990) "Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-required enzyme" *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682
21. Buchanan TA (1991) "Glucose Metabolism during pregnancy: Normal physiology and implications for diabetes mellitus" *Israel J. Medical Sc* 27: 432-441
22. Burnett TG, Tash JS, Hunt JS (2002) "Investigation of the role of nitric oxide synthase 2 in pregnancy using mutant mice" *Reproduction*: 124: 49-57
23. Butler A, Flitney F, Williams D (1995) "NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron nitrosyls in biology: a chemist's perspective" *TIPS* 16: 18
24. Capobianco E, Jawerbaum A, White V, Pustovrh C, Sinner D, Gonzalez ET, (2003) "Elevated levels of endothelin-1 and prostaglandin E₂ and their effect over nitric oxide generation in placental tissue from neonatal streptozotocin induced diabetic rats" *Prost Leuk and Essential Fatty Acids* 68 : 225-231
25. Cederberg J, Eriksson UJ (1997) "Decreased catalase activity in malformations-prone embryos of diabetic rats" *Teratology* 1997 56: 350-357
26. Champe PG y Harvey R (1994) "Nutrition" en Lippiacell's Illustrated Reviews Biochemistry, Second edition JB Lippiacell Company

Bibliografia

27. Chan TSK, Feng CX, Chan WY, Chung SSM, Chung SK. (1995) "Mouse preproendothelin-I gene cDNA cloning sequence analysis and determination of sites of expression during embryonic development" *Eur J Biochem* 234:819-826
28. Charite' J, McFadden DG, Merlo G, Levi G, Clouthier DE, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN (2001) "Role of *Dlx6* in regulation of an endothelin-I-dependent *dHAND* branchial arch enhancer" *Genes and development* 15: 3039-3049
29. Chatzipanteli K, Rudolph S, Axelrod L (1992) "Coordinate control of lipolysis by prostaglandin E2 and prostacyclin in rat adipose tissue" *Diabetes* 41:927-35
30. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf (2001) "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files" *Science* 294: 1866-1870
31. Christie, WM "Lypid Analysis" (1973) Pergamon Press
32. Clouthier DE, Hosada K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M (1998) "Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A-receptor mice" *Development* 125: 815-824
33. Cockroft DL (1990) "Dissection and culture of postimplantation embryos" en *Postimplantation Mammalian Embryos, a practical approach* Oxford University Press 15-39
34. Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WL, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG (1995) "Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase" *Eur. J. Pharmacol* 273: 15-24
35. Craighead J (1975) "The role of viruses in the pathogenesis of pancreatic disease and diabetes mellitus" *Prog. Med. Virol.* 19:161
36. Cui S, Reichner JS, Romero BM, Albina JE (1994) "Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide dependent or independent mechanism" *Cancer Res.* 54: 2462-2467
37. Dan Y, Poo MM (1992) "Hebbian depression of isolated neuromuscular synapses in vitro" *Science* 256: 1570-1573
38. Davenport SJ, Zauner LR, Cook JC, Hurtt ME, Cappon GD (2002) "Developmental effects of cyclooxygenase inhibitors when administered during the sensitive period of heart development" *Teratology* 2002 65: 6 331
39. DeWitt D (1991) "Prostaglandin endoperoxide synthase: Regulation of enzyme expression" *Biochim. Biophys. Acta* 1083: 121-134
40. Edson JL, Hull D (1975) "Evidence for increased fatty acid transfer across the placenta during a maternal fast in rabbits" *Biol. Neonate* 27: 50-55
41. Edwards DL, Arora CP, Bui DT, Castro LC (1996) "Long-term nitric oxide blockade in the pregnant rat: effects on blood pressure and plasma levels of endothelin-I" *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175:484-488

Bibliografia

42. Efendic S, Luft R, Wajngot A (1984) "Aspects of the pathogenesis of type 2 diabetes" *Endocrinol. Rev.* 5: 395
43. Engstrom E, Haglund A, Eriksson UJ (1991) "Effects of maternal diabetes or in vitro hyperglycemia on uptake of palmitic and arachidonic acid by rats embryos" *Pediatr. Res.* 30: 150-153
44. Epstein JA, Buck CA (2000) "Transcriptional regulation of cardiac development: implications for congenital heart disease and DiGeorge syndrome" *Pediatr. Res.* 48: 717-724
45. Erickson CA, Weston JA (1983) "An SEM analysis of neural crest migration in the mouse" *J. Embryol. Exp. Morphol.* 74: 97-118
46. Eriksson UJ (1984) "Diabetes in pregnancy: Retarded fetal growth, congenital malformations and foeto maternal concentrations of zinc, copper and manganese in the rat" *J. Nutr.* 114: 477-486
47. Eriksson UJ (1988) "Importance of genetic predisposition and maternal environment for the occurrence of congenital malformations in offspring of diabetic rats" *Teratology* 37: 365-374
48. Eriksson UJ, Borg LAH (1993) "Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate induced free oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos" *Diabetes* 42: 411-419
49. Eriksson UJ, Dahlstrom E, Larsson KS, Hellerstrom C. (1982) "Increased incidence of congenital malformations in the offspring of diabetic rat and their preventions by maternal insulin therapy" *Diabetes* 31:1-6
50. Eriksson UJ, Hakan Borg LA, Forsberg H, Styrd J. (1991) "Diabetic embryopathy. Studies with animal and in vitro models" *Diabetes* 40: S2 94-98
51. Eriksson UJ, Karlsson MG, Styrd J (1987) "Mechanisms of congenital malformations in diabetic pregnancy" *Biol. Neonate* 51:113-118
52. Eriksson UJ, Wentzel P, Minhas HS, Thomalley PJ (1998) "Teratogenicity of 3-deoxyglucosone and diabetic embryopathy" *Diabetes* 47: 1960-1966
53. Faletti A, Viggiano JM, Gimeno MAF (1995) "Beta-endorphin inhibits prostaglandin synthesis in rat ovaries and blocks induced ovulation" *Prostaglandins* 49:93-103
54. Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M. (2002) "Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons" *J Neurochem* 80:178-190
55. Farese R, Herz J (1998) "Cholesterol metabolism and embryogenesis" *TIG.* 14: 115-120
56. Farese RV, Cases S, Ruland SL, Kayden HJ, Wong JS, Young SG, Hamilton RL (1996) "A novel function for apolipoprotein B: lipoprotein synthesis in the yolk sac is critical for maternal-fetal lipid transport in mice" *J. Lipid Res.* 37: 347-360

Bibliografia

57. Fawcett LB, Pugarelli JE, Brent RL (2000) "Effects of supplemental methionine on antiserum induced dysmorphology in rat embryos cultured in vitro" *Teratology* 61: 332-341
58. Feng Q, Song W, Lu X, Hamilton JA, Lei M, Peng T, Yee SP (2002) "Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase" *Circulation* 106: 873-879
59. Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, Clark EB (1990) "Maternal diabetes and cardiovascular malformations: predominance of double outlet right ventricle and truncus arteriosus" *Teratology* 41: 319-326
60. Ferguson EM, Leese HJ (1999) "Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos" *J Rep Fert* 116:373-378
61. Ferreira SH (1972) "Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia" *Nature* 240: 200-203
62. Fisher M, Zeisel S, Mar MH, Sadler TW (2001) "Inhibitors of choline uptake and metabolism cause developmental abnormalities in neurulating mouse embryos" *Teratology* 64: 114-122
63. Fisher M, Zeisel S, Mar MH, Sadler TW (2002) "Perturbations in choline metabolism cause neural tube defects in mouse embryos in vitro" *FASEB J* 16: 619-621
64. Fitzpatrick FA, Wynalda MA, (1983) "Albumin-catalized metabolism of prostaglandin D₂. Identification of product formed in vitro" *J. Biol. Chem.* 258: 11713-11718
65. Fleming WN, Saacke RG (1972) "Fine structure of the bovine oocyte from the mature Graafian follicle" *J Rep Fert* 29: 203-213
66. Forman BM, Chen J, Evans RM (1997) "Hypolipodemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ " *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 4312-4317
67. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brum RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995) "15-deoxy- δ 12,14 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ " *Cell* 83 803-812
68. Forsberg H, Borg LA, Cagliero E, Eriksson UJ (1996) "Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment" *Free Radic. Res.* 24: 451-459
69. Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, McCann S M, Gimeno MAF (1994) "Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen treated rat uteri" *Proc Natl. Acad Sci USA* 91: 539-543
70. Freeman SJ, Beck F, Lloyd JB (1981) "The role of visceral yolk sac in mediating protein utilization by rats embryos cultured in vitro" *J. Embryol. Exp. Morphol.* 66: 223-344
71. Freinkel N (1965) "Effects of the conceptus on maternal metabolism during pregnancy" en *On the nature and treatment of diabetes Amsterdam Excerpta Medica* 679-691
72. Freinkel N (1980) "The Banting lecture 1980. Of pregnancy and progeny" *Diabetes* 29: 1023-1035

Bibliografia

73. Fridovich I (1976) "Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity" en Pryor WA ed Free radicals in biology Academic Press 239-277
74. Fukushima M (1990) "Prostaglandin J₂ anti-tumor and anti-viral activities and mechanisms involved" Eicosanoids 3: 189-199
75. Funk CD (2001) "Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology" Science 294: 1871-1875
76. Garris DR, West RL, Pekala PH (1986) "Ultrastructural and metabolic changes associated with reproductive tract atrophy and adiposity in diabetic female mice" Anat. Rec. 216: 359-366
77. Gavin JR (2002) "Report of the expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus" Diabetes Care 25: 5-24
78. Giguere V (1999) "Orphan nuclear receptors: from gene to function" Endocr Rev 20: 689-725
79. Gilbert SF "Developmental Biology" Fifth edition (1997) Sinauer Associates, Inc Publishers
80. Gilrow DW, Colville Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul Clark MJ, Willoughby DA (1999) "Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties" Nature Med. 5: 698-701
81. Gimeno MAF, Franchi AM, Gonzalez ET, Gimeno AL (1987) "Uptake and release of 3H-prostaglandins E₂ and F_{2α} in uterine strips isolated from ovariectomized rats: influence of in vitro progesterone" Prostaglandins 33: 51-61
82. Goldblatt MW (1933) "A depressor substance in seminal fluid" J. Soc. Chem. Ind. (London) 52: 1056-1057
83. Golden JA, Chernoff GF (1993) "Intermittent pattern of neural tube closure in two strain of mice" Teratology 47: 73-80
84. Goldman AS, 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. 82: 8227-8231
85. Gonzalez E, Jawerbaum A, Novaro V, Sinner D, Gimeno MAF (1998) "Nitric oxide modulates placental prostanoid production from late pregnant non-insulin-dependent rat" Prost Leuk & fatty acids 59: 299-304
86. González E, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, White V, Capobianco E, Xaus C, Peralta C, Roselló-Catafau J (2001) "Streptozotocin-pancreatic damage in the rat: modulatory effects of 15-deoxy delta 12,14- prostaglandin J₂ on nitridergic and prostanoid pathway" Nitric Oxide 6: 214-220
87. Gonzalez E, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Xaus C, Peralta C, Gomez G, Roselló-Catafau J, Gelpi E, Gimeno MAF (1999) "Evolution of streptozotocin-pancreatic damage in the rat: effect of endothelins on the nitridergic and prostanoid pathway" Nitric Oxide 3: No 6 459-466

Bibliografia

88. Gonzalez E.T, Gimeno M.A.F. and Gimeno A.L. (1989). Prostaglandin E₂ alters the metabolism of labeled glucose in uteri isolated from ovariectomized rats. Effects of 17-beta estradiol and indomethacin. *Prost. Leuk and Essential Fatty Acids*. 35, 31-38
89. Gonzalez ET, Franchi AM, Goldraij A, Gimeno MF, Gimeno AL. (1987) "Triglycerides in isolated rat uterine strips. Influences of glucose deprivation or endogenous prostaglandins E₁ E₂ and F₂_{alpha}" *Prost Leuk and Med* 26: 47-58
90. Goto MP, Goldman AS, Uhing MR (1992) "PGE₂ prevents anomalies induced by hyperglycemia or diabetic serum in mouse embryos" *Diabetes* 41: 1644-50
91. Green LC, Wagner DA, Glowoski J (1982) "Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids" *Anal Biochem* 126:131-138
92. Greene MF, Hare JW, Cloherty JP, Benacerraf BR, Soeldner JS (1989) "First trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy" *Teratology* 39: 225-232
93. Haffner SM (1998) "Management of dyslipidemia in adults with diabetes" *Diabetes Care* 21: 160-178
94. Hagay Z, Weiss Y, Zusman I, Peled-Kamar M, Recce EA, Eriksson UJ, Groner Y (1995) "Prevention of diabetes associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos" *Am. J. Obstet. Gynecol* 173: 1036-41
95. Harvey-Wilkes KB, Nielsen HC, Alton ME (1996) "Elevated endothelin levels are associated with increased placental resistance" *Am. J. Obstet. Gynecol* 174: 1599-1604
96. Hawthorne G, Snodgrass A, Tunbridge M (1994) "Outcome of diabetic pregnancy and glucose intolerance in pregnancy: an audit of fetal loss in Newcastle General Hospital 1977-1990" *Diabetes Res Clin Pract* 25: 183-90.
97. Heneka MT, Feinstein DL, Galca E, Gleichmann M, Wullner U, Klockgether T (1999) "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase" *J. Neuroimmunol* 100: 156-168
98. Herrera E, Palacin M, Martin A, Lasunción M (1985) "Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity" *Diabetes* 34 : 42-46
99. Herrero MB, Franchi AM, Gimeno MAF (1995) "Mouse spermatozoa can synthesize PGE and 5HETE in vitro: stimulatory action of nitric oxide" *Prost. Leuk. Essent. Fatty. Acids* 56: 347-350
100. Herz J, Farese R (1999). The LDL receptor gene family, apolipoprotein B and cholesterol in embryonic development. *J. Nutr.* 129, 473-475.

Bibliografia

101. Hibbs JB, Tainor RR, Vavrin Z (1987) "Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite" *Science* 235: 473-476
102. Highsmith RF, Balckburn K, Schmidt DJ (1992) "Endothelin and calcium dynamics in vascular smooth muscle". *Annu. Rev. Physiol.* 54:257-277
103. Higuchi H, Satoh T (1997) "Endothelin-1 induces vasoconstriction and nitric oxide release via endothelin ET(B) receptors in isolated perfused rat liver" *Eur J Pharmacol* 328:175-82
104. Hod M, Star S, Passonneau JV, Unterman TG, Freinkel N (1986) "Effect of hyperglucemia on sorbitol and myoinositol content of cultured rat conceptus: failure of aldose reductase inhibitors to modify myoinositol depletion and dysmorphogenesis" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140: 974-980
105. Hopfner RL, Raghuram V, Hasnadka V, Wilson TW, McNiell RJ, Gopalakrishnan V (1998) "Insulin increases Endothelin-1 evoked intracellular free calcium responses by increased ETa receptor expression in rat aortic smooth muscle cells" *Diabetes* 47: 937-944
106. Horrobin DF (1989) "Essential fatty acids and the complications of diabetes mellitus" *Wien. Klin. Wochenschr.* 101:289-293
107. Hosada K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M (1994) "Targeted and natural (piebald lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice" *Cell* 79: 1267-1276
108. Huin C, Coriveau L, Bianchi A, Keller JM, Collet P, Kremarik-Boullaud P, Domenjoud L, Becuwe P, Schohn H, Menard D, Dauca M (2000) "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract" *J Histochem. Cytochem.* 48: 603-611
109. Igal A, Pallanza de Stringa MC, Tacconi de Gomez Dumm (1994) "Simple method for quantification of neutral and polar lipids by TLC and fluorescence emission" *IJBC* 1: 137-142
110. Ignarro LH (1990) "Biosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 535
111. Ingham PW (2001) "Hedgehog signaling: a tale of two lipids" *Science* 294: 1879-1881
112. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989) "The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2863-2867
113. Jacobson AG, Sater AK (1988) "Features of embryonic induction" *Development* 104: 341-359
114. Jawerbaum A, Gonzalez E, Novaro V, Faletti A, Gimeno MAF (1998) "Nitric oxide mediates increased prostaglandin E production by oocyte-cumulus complexes in the non-insulin-dependent diabetic rat" *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 185-190

Bibliografia

115. Jawerbaum A, Gonzalez E, Novaro V, Faletti A, Sinner D, Gimeno MAF (1998) "Increased prostaglandin E generation and enhanced nitric oxide synthase activity in the non-insulin-dependent diabetic embryo during organogenesis" *Reprod Fert Dev* 10: 191-196
116. Jawerbaum A, Gonzalez E, Pustovrh C, Sinner D, Perotti C, Gimeno MAF. (1999) "Diminished levels of prostaglandin E in type I diabetic oocyte-cumulus complexes. Influence of nitric oxide and superoxide dismutase" *Reprod Fert Dev* 11:105-110
117. Jawerbaum A, Rosello Catafau J, Gonzalez ET, Novaro V, Gomez G, Gelpi E, Gimeno AL, Gimeno MAF (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
118. Jollie WP (1990) "Development, morphology and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents" *Teratology* 41: 361-381
119. Jones M, Harper M (1984) "Rabbit blastocysts accumulate 3H prostaglandins in vitro" *Endocrinology* 115: 817-823
120. 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
121. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE (1969) "Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response" *J. Clin. Invest.* 48: 2129
122. Kakugawa Y, Giaid A, Yanagisawa M, Baynash AG, Melnyk P, Rosenberg L, Duguid WP (1996) "Expression of endothelin-1 in pancreatic tissue of patients with chronic pancreatitis" *J. Pathol.* 178, 78-83
123. Kaufman, MH y Bard JBL (1999) "The anatomical basis of mouse development" Academic Press Harcourt Brace and Company, Publishers
124. Kempf H, Linares Ch, Corvol P, Gasc JM (1998) "Pharmacological inactivation of the endothelin type A receptor in the early chick embryo: a model of mispatterning of the branchial arch derivatives" *Development* 125: 4931-4941
125. 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
126. Kersten S, Wahli W (2000) "Peroxisome proliferator activated receptor agonists" *EXS* 89:141-151
127. Kim EJ, Kwon KJ, Park JY, Lee SH, Moon CH, Baik EJ (2002) "Effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on LPS-induced neuronal death in mixed cortical neurons: associated with iNOS and COX-2" *Brain Research* 941:1-10
128. Kim JH, Lewin TM, Coleman RA (2001) "Expression and characterization of recombinant rat acyl-coa synthetases 1, 4, and 5 selective inhibition by triacsin c and thiazolidinediones" *J. Biol. Chem.* 276: 24667-24673

Bibliografia

129. Kitzmiller, J.L. and Cloherty, J.P., Younger M.D., Tabatabaai A., Rothchild S.B., Sosenko I., Epstein M.F., Singh S. and Neff R.K. (1978) "Diabetic pregnancy and perinatal morbidity" *Am. J. Obstet. Gynecol.* 131, 560-580.
130. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer DJ, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator activated receptors" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7355-7359
131. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JA (1995) "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation" *Cell* 83: 813-819
132. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM (2001) "Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology" *Recent. Prog. Horm. Res.* 56:239-263
133. Kroncke KD, Kolb-Bachofen V, Berschick B, Burkart V, Kolb H (1991) "Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175:752-758
134. Krone W, Lass A, Nagele H, Behnke B, Greten H (1998) "Effects of prostaglandins on LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes" *J Lipid Res* 29, 1663-1669
135. Kruip TAM, Cran DG, Van Beneden, Dielman SJ (1983) "Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo" *Gamete Research* 8: 29-47
136. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T (1999) "PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance" *Molecular Cell* 4: 597-609.
137. Kucera J (1971) "Rate and type of congenital anomalies among offspring of diabetic women" *J. Reprod. Med.* 7: 61-70
138. Kurihara Y, Kurihara H, Macmura K, Kuwaki T, Kumada M, Yazaki Y (1995b) "Impaired development of the thyroid and thymus in endothelin-1 knockout mice" *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26 (S3): 13-16
139. Kurihara Y, Kurihara H, Oda H, Macmura K, Hagai R, Ishikawa T, Yazaki Y (1995). "Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1" *J. Clin. Invest.* 96: 293-300
140. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Macmura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Wei-Hua C, Kamada N, Jishige K, Ouchi Y, Azuma S, Toyoda Y, Ishikawa T, Kumada M, Yazaki Y (1994) "Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1" *Nature* 368: 703-710

Bibliografia

141. Laychock SG, Modica ME, Cavanaugh CT (1991) "L-arginine stimulates cyclic guanosine 3'5'-monophosphate formation in rat islets of Langerhans and RINm5F insulinoma cells: evidence for L-arginine nitric oxide synthase" *Endocrinology* 129: 3043
142. Le Douarin N (1982) "The neural crest" Cambridge: Cambridge University Press 259
143. Lee QP, Juchau MR (1994) "Dysmorphogenic effects of nitric oxide (NO) synthase inhibition: studies with intra-amniotic injections of sodium nitroprusside and N^G-monomethyl - L-arginine" *Teratology* 49: 452-464
144. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) "An antidiabetic thiazolidenedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma)" *J.Biol.Chem* 270: 12953-96
145. Lerman A, Edwards BS, Hallet JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC (1991) "Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis" *N. Engl. J. Med.* 325: 997-1001
146. Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP (2001) "Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1" *Cell* 105:599-612
147. Lim H, Gupta R, Ma W, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, Dubois RN, Trzaskos JM, Dey SK (1999) "Cyclooxygenase 2 derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta" *Genes and Dev.* 13: 1561-1574
148. Liying L, Taol J, Davaille J, Féraŕ-Ch, Mallat A, Ricusset J, Vidal H, Lotersztajn S (2001) "15-deoxy-.12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis of human hepatic myofibroblasts. a pathway involving oxidative stress independently of peroxisome-proliferator-activated receptors" *J. Biol. Chem* 276: 38152-38158
149. Llirbat B, Wolf C, Chevy F, Citadelle D, Bereziat G, Roux Ch (1997). "Normal and inhibited cholesterol synthesis in the cultured rat embryo" *J. Lipid. Res* 38: 22-34.
150. Loll PJ, Garavito RM (1994) "The isoforms of cyclooxygenase: structure and function" *Exp. Opin. Invest. Drugs* 3: 1171-1180
151. Lucas MJ, Leveno KJ, Williams ML, Raskin P, Whalley PJ (1989) "Early pregnancy glucosylated hemoglobin, severity of diabetes and fetal malformations" *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161: 426-431
152. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM (1992) "Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line" *J. Biol. Chem.* 267: 6370-6374
153. Maggi LB, Sadeghi H, Weigand C, Scarim AL, Heitmeier MR, Corbett JA (2000) "Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-delta prostaglandin J2 and troglitazone: Evidence for heat shock-dependent and independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression" *Diabetes* 49: 346-355

Bibliografia

154. Maglich JM, Sluder A, Guan X, Shi Y, McKee DD, Carrick K, Kamdar K, Willson TM, Moore JT (2001) "Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes" *Genome Biol* 2:1-7
155. Malof BL, Boyd BK (1986) "Physiological and cellular insulin action in a glucose intolerant model of type 2 (non insulin dependent) diabetes in rats" *Diabetologia* 29: 295-300
156. Maragos C, Morley D, Wink D, Dunams TM, Saavedra JE, Hoffman A, Bove AA, Isaac L, Hrabie JA, Keefer L (1991) "Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled release of nitric oxide Vasorelaxant effects" *J. Med. Chem.* 34: 3242
157. Marshburn PB, Shbanowitz R B, Clark MR (1990) "Immunohistochemical localization of prostaglandin H synthase in the embryo and uterus of the mouse from ovulation through implantation" *Mol. Reprod. Dev.* 25, 309-316
158. Martinez C, Ruiz P, Andres A, Satrustegui J, Carrascosa JM (1989) "Tyrosine kinase activity of liver insulin receptor is inhibited in rats at term gestation" *Biochem. J.* 263: 267-272
159. Marwah GS, O'Brien J, Gewolb IH (1999) "Effect of acute glucose depletion following glucose excess on surfactant phospholipid synthesis in developing fetal lung" *Exp Lung Res* 25:291-302
160. Marx J (2002) "Unraveling the causes of diabetes" *Science* 296: 685-689
161. Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K "Molecular and cellular mechanisms of endothelin regulation: implications for vascular function" *Circulation* 84: 1457-1468
162. Maschhoff KL, Baldwin HS (2000) "Molecular Determinants of Neural Crest Migration" *Am. J. Med. Genet.* 97: 280-288
163. Mater MK, Thelen AP, Jump DB (1999) "Arachidonic acid and PGE2 regulation of hepatic lipogenic gene expression" *J. Lipid. Research* 40: 1045-1052
164. Matsuura H, Adachi H, Smart RC, Xu X, Arata J, Jetten AM (1999) "Correlation between expression of peroxisome proliferator activated receptor beta and squamous differentiation in epidermal and trachobronquial epithelial cells" *Mol. Cell Endocrinol.* 147: 85-92
165. Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001) "CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol" *Science* 294:1354-1357
166. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie Q, Nathan CF, Wahl SM (1993) "Suppression of arthritis by an inhibitor of NOS" *J. Med* 178: 749-754
167. McGarry JD (2002) "Banting Lecture 2001. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 Diabetes" *Diabetes* 51: 7-18
168. Metzger BE, Coustan DR (eds) (1998) "Proceedings of the fourth International Workshop Conference on Gestational Diabetes Mellitus" *Diabetes Care* 21 (S2) 1-167

Bibliografia

169. Metzger BE, Phelps RL, Freinkel N (1991) "Biphasic effects of maternal metabolism on fetal growth. Essential expression of fuel mediated teratogenesis" *Diabetes* 40 suppl 2 99-105
170. Miller MJS, Sadowska-Mowicka H, Chotinaruemol S, Kakkis JL, Clarck DA (1993) "Amelioration of chronics ileitis by NOS inhibition" *J. Pharmacol. Exp. Ther* 264: 11-16
171. Miller MJS, Voelker CA, Ollster S, Thompson JH, Zhang XJ, Rivera D, Eloby-Childress S, Lllu X, Clark DA, Pierce MR (1996) " Fetal growth retardation in rats may result from apoptosis: role of perxynitrite." *Free Radical Biology & Medicine* 21: 619-629
172. Mills JL (1982) "Malformations in infants of diabetic mothers" *Teratology* 25: 385-394
173. Mills JL, Baker L, Goldman AS (1979) "Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week: implications for treatment" *Diabetes* 28: 292-293
174. Mills JL, Knopp RH, Simpson JL, Jovanovic-Peterson L, Metzger BE, Holmes LB, Aarons JH, Brown Z, Reed GF, Bieber FR, Van Allen M, Holzman I, Ober C, Peterson CM, Whitiam MJ, Ouckles A, Mueller-Heubach c, Polk BF, National Institutes of Child Helth and Human development (1988) "Diabetes in early pregnancy study. Lack of relation of incresed malformation rates in infants of diabetic mothers to glycemic control during organogenesis" *N. Engl. J. Med.* 318: 671-676
175. Mitchell JA, Akaraserecnont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR (1993) "Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase" *proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11693-11697
176. Mitchell, MD, Romero RJ , Leparo R, Rittenhouse L, Edwin SS (1990) "Actions of endothelin-1 on prostaglandin production by gestational tissues" *Prostaglandins* 40: 627-635
177. Moley KH (2001) "Hyperglycemia and apoptosis: Mechanism for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women" *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12 (2) 78-82
178. Moncada S, Palmer RJ, Higg EA (1991) "Nitric oxide physiology pathophysiology and pharmacology" *Pharmacol Rev* 43: 109-142
179. Moore KL (1982) "The developing human. Clinically oriented embryology" Philadelphia WB Saunders 88: 9
180. Morisaki N, Kanzaki T, Kitahara M, Saito Y, Yoshida S. (1986) "Inhibitory effect of prostaglandin E2 on cholesterol ester accumulation in macrophages" *Biochem Biophys Res Commun* 29: 461-7
181. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL (1995) "Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2" *J. Biol. Chem.* 270, 10902-10908
182. Motta A, Faletti A, Gimeno MAF (1995) "Influence of progesterone levels on prostaglandin concentrations in isolated uterine tissue and incubation medium from pseudopregnant rats" *Prostaglandins* 50: 213-223

Bibliografia

183. Moxley MA, Longmore WJ (1977) "Effect of experimental diabetes and insulin on lipid metabolism in the isolated perfused rat lung" *Biochim Biophys Acta* 488: 218-224
184. Munroe D, Lau C (1995) "Turning down the heat: new routes to inhibition of inflammatory signaling by prostaglandin H2 synthases" *Chem. Biol.* 2: 343-350
185. Nakaki T, Nakayama M, Yamamoto S, Kato R (1989) "Endothelin-mediated stimulation of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells" *Biochem Biophys. Res. Commun* 158: 880-883
186. Napolitano M, Miceli F, Calce A, Vacca A, Gulino A, Apa R, Lanzone A (2000) "Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preclampsic placentas" *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 2318-2323
187. Naruse M, Kanawa M, Hifumi S, Naruse K, Yoshihara I, Oka T, Kato Y, Kurimoto F, Ohsumi K (1991) "Plasma immunoreactive endothelin, but not thrombomodulin, is increased in patients with essential hypertension and ischemic heart disease" *J. Cardiovasc. Pharmacol* 17 (7): 471-474
188. Nathan C (1992) "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells" *FASEB J.* 6: 3051
189. National diabetes data group (1979) "Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance" *Diabetes* 28: 1979
190. Neerhof MG, Silver RK, Caplan MS, Thacker LG (1997) "Endothelin-1-induced placental and fetal growth restriction in the rat" *J. Matern. Fetal. Med.* 6: 125-128
191. New DAT (1978) "Whole embryo culture and the study with mammalian embryos during organogenesis" *Biol Rep* 53: 81-122
192. Nichols DH (1981) "Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique" *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64: 105-120
193. Nicolson RAJ, Hartwig NG, Vermeij-Keers C, Valk J (1993) "Embryonic development of the mammalian caudal neural tube" *Teratology* 48: 21-31
194. Nikkila EA, Huttunen JK, Ehnholm C (1977) "Postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase in diabetes mellitus. Relationship to plasma triglyceride metabolism" *Diabetes* 6: 11-21
195. Norman JE, Cameron IT (1996) "Nitric oxide in the human uterus" *Reviews of Reproduction* 1: 61-68
196. Novaro V, Gonzalez E, Jawerbaum A, Faletti A, Gimeno MAF (1997) "Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation" *Reprod. Fert. Dev.* 9: 557
197. Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B (2001) "Thiazolidinediones increase plasma adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability" *Diabetes* 50: 1158-1165

Bibliografia

198. Oliver FJ, de la Rubia G, Feener EP, Lee M-E, Locken MR, Shiba T, Quettermous T, King GL (1991) "Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells" *J. Biol. Chem.* 266: 23251-23256
199. Oliver FJ, De la Rubia G, Feener EP, Lee M-E, Locken MR, Shiba T, Quettermous T, King GL (1991) "Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells" *J. Biol. Chem.* 266: 23251-23256
200. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Klier SA, Hansen BC, Willson TM (2001) "A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:5306-5311
201. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxation factor" *Nature* 327: 524
202. Pampfer S, Vanderheyden I, Wu YD, Baufays L, Maillet O, De Hertogh R (1995) "Possible role for TNF-alpha in early embryopathy associated with maternal diabetes in the rat" *Diabetes* 44: 531-536
203. Pampfer S, Wu YD, Vanderheyden I, De Hertogh R (1994) "In vitro study of the carry-over effect associated with early diabetic embryopathy in the rat" *Diabetologia* 37: 855-862
204. Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ, King GL (2000) "Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation" *Diabetes* 49:1239-1248
205. Parman T, Wells PG (2002) "Embryonic prostaglandin H synthase-2 (PHS-2) expression and benzo[a]pyrene teratogenicity in PHS-2 knockout mice" *FASEB J.* 16: 1001-1009
206. Payne GS, Deuchar EM (1972) "An in vitro study of functions of embryonic membranes in the rat" *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27: 533-542
207. Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist M (1990) "Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo" *Acta Physiol. Scand.* 140: 449
208. Peters JM, Lee ST, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ (2000) "Growth, adipose, brain and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator activated receptor beta (delta)" *Mol Cell Biol* 20: 5119-5128
209. Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ (1999) "Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 4668-4673
210. Piatti PM, Monti LD, Conti M, Baruffaldi L, Galli L, Phan CV, Guazzini B, Pontiroli AE, Pozza G (1996) "Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans" *Diabetes* 45: 316-321

Bibliografia

211. Piddington R, Joyce J, Dhanasekaran P, Baker L (1996) "Diabetes Mellitus affects prostaglandin E2 levels in mouse embryos during neurulation" *Diabetologia* 39: 915-920
212. Pierce RL, Pierce MR, Haiyan L, Kadowiz PL, Miller MJS (1995) "Limb reduction defects after prenatal inhibition of nitric oxide synthase in rats" *Ped. Res.* 38: 905-911
213. Pineda Torra I, Gervois P, Staels B (1999) "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging" *Curr. Opin. Lipidol.* 10:151-159
214. Pinter E, Reece A, Leranth C, Garcia Segura M, Hobbins JC, Mahoney J, Naftolin F (1986) "Arachidonic acid prevents hyperglycemia associated yolk sac damage and embryopathy" *Am. J. Obs Gynecol.* 155:4, 691-702
215. Pompeia C, Lopes RJ, Miyasaka CK, Procópio J, Sannomiya P, Curi R (2000) "Effect of fatty acids on leukocyte function" *Braz J. Med. Biol. Res.* 33: 1255-1268
216. Pond M (1996) "Adipose tissue differentiation and development" *Biochem. Soc. Trans.* 24: 393-400
217. Porter JA, Young KE, Beachy PA (1996) "Cholesterol modification of Hedgehog signaling proteins in animal development" *Science* 274: 255-259
218. Portha B, Picon L, Rosselin G (1979) "Chemical Diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes" *Diabetologia* 17: 371-377
219. Pustovrh C, Jawerbaum A, Sinner D, Pesaresi M, Baier M, Micone P, Gimeno M, Gonzalez ET (2000) "Membrane-type metalloproteinase-9 activity in placental tissue from patients with pre-existing and gestational diabetes mellitus" *Rep Fert Dev* 12: 1-8
220. Raabe M, Flynn L, Zlot C, Wong J, Véniant M, Hamilton R, Young S (1998) "Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: Reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes" *Proc Natl Acad Sci* 95: 8686-8691
221. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV (1963) "Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37919)" *Cancer Chemother. Rep.* 29: 91
222. Rayani HH, Warshaw JB, Floros J (1995) "Dexamethasone enhances surfactant protein gene expression in streptozotocin-induced immature rat lungs" *Pediatr. Res.* 38:870-877
223. Reece EA, Hagay Z, Roberts AB, DeGennaro N, Homko CJ, Connolly-Diamond M, Shervin R, Tamborlane WV, Diamond MP (1995) "Fetal Doppler and behavioral responses during hypoglycemia induced with the insulin clamp technique in pregnant diabetic women" *Am J Obstet Gynecol* 172: 151-155
224. Reece EA, Hobbins JC (1986) "Diabetic embryopathy: pathogenesis, prenatal diagnosis and prevention" *Obstet. Gynecol. Surv.* 41:325-335

Bibliografia

225. Reece EA, Pinter E, Lcranth CZ, Garcia-Segura M, Sanyal MK, Hobbins JC, Mahoney MJ, Naftolin F (1985) "Ultrastructural analysis of malformations of the embryonic neural axis induced by in vitro hyperglycemic conditions" *Teratology* 32: 363-73
226. Reece EA, Witznizer A, Homko CJ, Hagay Z, Wu YK (1996) "Synchronization of the factors critical for diabetic teratogenesis: An in vitro model" *Am. J. Obstet Gynecol* 174: 1284-8
227. Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno MAF, McCann MS (1993) "Role of nitric oxide on the control of luteinizing hormone releasing hormone release of in vivo and in vitro" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10130
228. Rettori V, Gimeno MAF, Lyson K, McCann SM. (1992) "Nitric oxide mediates norepinephrine induced prostaglandin E₂ release from the hypothalamus" *Proc Natl Acad. Sci* 89: 11543-11544
229. Richelsen B, Hjollund E, Pedersen O, Sorensen NS (1985) "Effects of prostaglandin E₂, indomethacin and adenosine deaminase on basal and insulin-stimulated glucose metabolism in human adipocytes" *Biochim Biophys Acta* 844: 359-66.
230. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK (1998) "The peroxisome proliferator-activated-receptor γ is a negative regulator of macrophage activation" *Nature* 391: 79-82
231. Rodrigues B, Pouchet P, Batell ML, McNeill JH (1999) "Streptozotocin-induced diabetes: induction, mechanism(s), and dose dependency" en *Experimental Models of Diabetes* Ed JH McNeill CRC Press LLC 3-17
232. Roselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK (1994) "Circulating nitrite/nitrate increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated release" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1543
233. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM (2000) "Transcriptional regulation of adipogenesis" *Genes and Dev.* 14: 1293-1307
234. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG (2000) "Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase" *Nature* 403: 103-108
235. Rovin BH, Wilmer WA, Lu L, Doseff AI, Dixon C, Kotur m, Hilbelink T (2002) "15deoxy-delta-12,14- prostaglandin J2 regulates mesangial cell proliferation and death" *Kid. Internat.* 61: 1293-1302
236. Ryan EA, Enns L (1988) "Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance" *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 341-347
237. Sadler TW, Horton WE, Warner CW (1982) Whole embryo culture: a screening technique for teratogens? *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* 2: 243-253
238. Saito Y, Nakao K, Mukoyama M, Imura H (1990) "Increased plasma endothelin levels in patients with essential hypertension" *N. Engl. J. Med.* 322: 205

Bibliografia

239. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T (1992) Molecular characterization of endothelin receptors *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 103-108
240. Salen G, Shefer S, Batta AK, Tint GS, Xu G, Honda A, Iron M, Elias ER (1996) "Abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome" *J Lipid Res* 37: 1169-1180
241. Saltiel AR, Olefsky JM (1996) "Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes" *Diabetes* 45: 1661-1669
242. Samson WK, Skala KD, Alexander BD, Huang FLS (1991) "Possible neuroendocrine actions of endothelin-3" *Endocrinology* 128: 1465-1473
243. Samson WK, Skala KD, Alexander BD, Huang FLS (1990) "Pituitary site of action of endothelin: selective inhibition of prolactin release in vitro" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 737-743
244. Sandoval M, Liu X, Oliver PC, Zhang XJ, Clark DA, Miller MJS "Nitric oxide induces apoptosis in a human colonic epithelial cell line, T84" *Mediat. Inflamm.* 4: 248-250
245. Saxena PN, Begg MMA, Singhal KC, Ahmad M (1979) "Prostaglandin like activity in the cerebrospinal fluid of febrile patients" *Indian J. Med. Res.* 79: 495-498
246. Schoenwolf GC (1991) "Cells movements in the epiblastic during gastrulation and neurulation in avian embryos" *en Gastrulation*. Plenum, New York 1-28
247. Schoenwolf GC, Desmond NE (1984) "Descriptive studies of the occlusion and reopening of the spinal canal of early chick embryo" *Anat. Rec.* 209: 251-263
248. Schonfelder G, John M, Hopp H, Furr N, Van der Giet M, Paul M (1996) "Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes" *FASEB J.* 10: 777-784
249. Schuster VL (1998) "Molecular mechanisms of prostaglandin transport" *Annu. Rev. Physiol.* 60: 221-242
250. Scow RO, Chemick SS, Brinley MS (1964) "Hyperlipemia and ketosis in the pregnant rat" *Am. J. Physiol* 206: 798-804
251. Shafir E, Barash V (1978) "Placental function in maternal-fetal fat transport in diabetes" *Biol. Neonate* 51: 101-112.
252. Shafir, E. and Khassis S. (1982) "Maternal-fetal fat transport versus new fat synthesis in the pregnant diabetic rat" *Diabetologia* 22, 111-117.
253. Shirahase H, Kanda M, Nakamura S, Tarumi T, Uehara Y, Ichikawa A (2000) "Inhibitory effects of PGD₂, PGJ₂ and 15deoxy-delta-12-14-prostaglandin J₂ on iNOS induction in rat mesenteric artery" *Life Sci.* 22: 2173-2182
254. Shukovsky L y Tsafiri A (1994) "The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat" *Endocrinol* 135: 2287

Bibliografía

255. Simán CM, Gittenberger-de Groot AC, Wisse B, Eriksson UJ (2000) "Malformations in offspring of diabetic rats: morphometric analysis of neural crest-derived organs and effects of maternal vitamin E treatment" *Teratology* 61: 355-367
256. Simán M (1997) "Congenital malformations in experimental diabetic pregnancy: aetiology and antioxidative treatment. Minireview based on a doctoral thesis" *Ups. J. Med. Sci.* 102: 61-98
257. Simonson MS, Wann S, Mene P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Seddr JR, Dunn MJ "Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells" (1989) *J. Clin. Invest.* 83: 708-712
258. Singh HJ, Rahman A, Larmie ET, Nila A (2001) "Endothelin-I in feto-placental tissues from normotensive pregnant women and women with pre-eclampsia" *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 80:99-103
259. Singh M, Feigelson M (1983) "Effects of maternal diabetes on the levels, synthetic rates and activities of synthetic enzymes of surface-active phospholipids in perinatal rat lung" *Biochim. Biophys. Acta* 753: 53-59
260. Small L, Cassidy L, Leiper JM, Paterson KR, Lunan CB, MacCuish AC, (1986) "Outcome of pregnancy in insulin-dependent (Type I) diabetic women between 1971 and 1984" *Q.J.Med* 61: 1159-1169
261. Smith WL (1989) "The eicosanoids and their biochemical mechanisms of actions" *Biochem. J.* 259: 315-324
262. Smith WL, Marnett LJ, (1994) "Prostaglandin endoperoxide synthases" en *Metal Ions in biological systems* NY 163-199
263. Snyder JM, Kwun JE, O'Brien JA, Rosenfeld CR, Odom MJ (1988) "The concentration of the 35-kDa surfactant apoprotein in amniotic fluid from normal and diabetic pregnancies" *Pediatr. Res.* 24 : 728-734
264. Soler NG, Walsh CH, Malins JM (1976) "Congenital malformations in infants of diabetic mothers" *Q. J. Med.* 45: 303-313
265. Speake B, Cerolini S, Maldjian A, Noble R (1997) "The preferential mobilisation of C₂₀ and C₂₂ polyunsaturated fatty acids from the adipose tissue of the chick embryo: potential implications regarding the provision of essential fatty acids for neural development" *Biochim et Biophys Acta* 1345: 317-326
266. Sterin AB, Linares JA, Goldraj A, Gimeno MAF, Gimeno AL (1984) Prostaglandin E2 and prostaglandin F2 regulation of triglyceride levels in uterine smooth muscle from restricted-diet estrous and diestrous rats. *Prostaglandins Leukot. Med.* 14: 391-401
267. Straus DS, Glass CK (2001) "Cyclopentenone Prostaglandins: New Insights on biological activities and cellular targets" *Med. Res. Rev.* 21: 185-210

Bibliografia

268. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000) "15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 4844-4849
269. Strickman PJ, Metzger BE (1993) "Glucose and Scyllo-Inositol impair phosphoinositide hydrolysis in the 10.5 day cultured rat conceptus: A role in dysmorphogenesis?" *Teratology* 48: 267-278
270. Styrd J, Eriksson UJ (1990) "Effects of D-glucose and beta hydroxy butyric acid on the in vitro development of (pre)chondrocytes from embryos of normal and diabetic rats" *Acta Endocrinol (Copenh)* 122: 487-498
271. Sussman I, Matschinsky FM (1988) "Diabetes affects sorbitol and myo-inositol levels of neuroectodermal tissue during embryogenesis in rat" *Diabetes* 37: 974-981
272. Suzuki N, Svensson K, Eriksson UJ (1996) "High glucose concentration inhibits migration of rat cranial neural crest cells in vitro" *Diabetologia* 39: 401-411
273. Szabo AJ, Szabo O (1974) "Placental free fatty acid transfer and fetal adipose tissue development: An explanation of fetal adiposity in infants of diabetic mothers" *Lancet* 2: 498-499
274. Terasawa Y, Cases SJ, Wong JS, Jamil H, Jothi S, Traber MG, Packer L, Gordon DA, Hamilton RL, Farese R (1999) "Apolipoprotein B-related gene expression and ultrastructural characteristics of lipoprotein secretion in mouse yolk sac during embryonic development" *J. Lipid Res.* 40: 1967-77
275. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus (2002) "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus" *Diabetes Care* 25: 5-20
276. Thomas CR (1987) "Placental transfer of non-esterified fatty acids in normal and diabetic pregnancy" *Biol Neonate* 51: 94-101
277. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994) "Stimulation of adipogenesis in fibroblast by PPARgamma 2, a lipid-activated transcription factor" *Cell* 79: 1147-1156
278. Toyada N, Murata K, Sugiyama Y (1985) "Insulin binding, glucose oxidation and methylglucose transport in isolated adipocytes from pregnant rats near term" *Endocrinology* 116: 998-1002
279. Treinen KA, Loudon C, Dennis MJ, Wier PJ. (1999) "Developmental toxicity and toxicokinetics of two endothelin receptor antagonists in rats and rabbits" *Teratology* 59: 51-59
280. Trocino RA, Akazawa S, Ishibashi M, Matsumoto K, Matsuo H, Yamamoto H, Goto S, Urata Y, Kondo T, Nagataki S (1995) "Significance of glutathione depletion and oxidative stress in early embryogenesis in glucose-induced rat embryo culture" *Diabetes* 44: 992-998
281. Ueno K (2000) "Involvement of fatty acid synthase in axonal development in mouse embryos" *Genes to Cells* 5: 859-869

Bibliografia

282. Uriu-Hare JY, Stern JS, Reaven JM, Keen CL (1985) "The effect of maternal diabetes on trace element status and fetal development in the rat" *Diabetes* 34: 1031-1040
283. Van Hoogmoed LM, Harmon FA, Stanley S, White J, Snyder J (2002) "In vitro investigation of the interaction between nitric oxide and cyclo-oxygenase activity in equine ventral colon smooth muscle" *Equine Vet J* 34:510-515
284. Vane J (1994) "Towards a better aspirin" *Nature* 367: 215-216
285. Vane JR, Botting RM (1996) "Overview mechanisms of action of anti-inflammatory drugs" *On Improved non-steroid anti-inflammatory drugs* Kluwer Academic Publishers 1-27
286. Vassaux G, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R (1992) "Prostacyclin Is A Specific Effector Of Adipose Cell Differentiation Its Dual Role As A Camp- And Ca²⁺-Elevating Agent" *J. Biol. Chem.* 267: 11092- 11097
287. Vassaux G, Gaillard D, Darimont C, Ailhaud G, Négrel R (1992) "Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E₂: physiological implications" *Endocrinology* 131: 2393-2398
288. Vercheval M, De hertogh R, Pampfer S, Vyerheyden I, Michiels B, De Bernardi, De Meyer R (1990) "Experimental Diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period " *Diabetologia* 33 : 187-191
289. Vernochet C, Milstone DS, Iehle C, Belmonte N, Phillips B, Wdziekonski B, Villageois P, Amri EZ, O'Donnell PE, Mortensen RM, . Ailhaud G, Dani C (2002) "PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent effects on the development of adipose cells from embryonic stem cells" *FEBS Letters* 510 : 94-98
290. Von Euler US (1935) " Uberdie spezifische blutdrucksenkende substanz des menschlichen prostata und samen blasensekretes" *Klin. Wochenschr* 14: 1182-1183
291. Vosper H, Khoudoli GA, Graham TL, Palmer CN (2002) "Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis" *Pharmacol Ther* 95: 47-62
292. Walczak, R., and P. Tontonoz (2002) "PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism" *J. Lipid. Res.* 43:177–186.
293. Wang H, Wen Y, Mooney S, Behr B, Polan ML (2002) "Phospholipase A₂ and Cyclooxygenase Gene Expression in Human Preimplantation Embryos" *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2629–2634
294. Wang M, Wise SC, Leff T, Su T (1999) "Troglitazone, an antidiabetic agent, inhibits cholesterol biosynthesis through a mechanism independent of peroxisome proliferator activated receptor gamma" *Diabetes* 48: 254-260
295. Wang RN, Bouwens L, Kloppel G (1996) "Beta cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period" *Diabetologia* 39: 548
- 296.

Bibliografia

297. Wang T, Xie Z, Lu B (1995) "Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses" *Nature* 374: 262-266
298. Warner TD, de Nucci G, Vane JR (1989) "Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat." *Eur. J. Pharmacol.* 159: 325-326
299. Weir GC, Clore ET, Zmachinski CJ, Bonner-Wier S (1981) "Islet secretion in a new experimental model for non insulin dependent-diabetes" *Diabetes* 30: 590
300. Wentzel P, Eriksson UJ (1996) "Insulin treatment fails to abolish the teratogenic potential of serum from diabetic rats" *Eur J Endocrinol* 134: 459-446
301. Wentzel P, Jansson L, Eriksson UJ (1995) "Diabetes in pregnancy: uterine blood flow and embryonic development in the rat" *Ped. Res.* 38: 598-606
302. Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ (1999) "Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression and lowered PGE₂ levels in rat embryos exposed to a diabetic environment" *Diabetes* 48: 1122-1129
303. Wentzel P, Wentzel C, Gareskog M, Eriksson UJ (2001) "Induction of Embryonic dismorphogenesis by high glucose concentration, disturbed inositol metabolism and inhibited protein kinasa C activity" *Teratology* 63: 193-201
304. White V, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Capobianco E, González E (2002) "Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of non-insulin-dependent diabetic rats" *Reprod. Fertil. Development.* 14:117-123.
305. Wilcox CS, Schimdt HH, Murad F, Gross SS, Taylor PL, Levi R y Welch WJ (1992) "Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure" *Proc. Natl. Acad. Sci* 89: 11993
306. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, Van den Enden M, Kilo C, Tilton RG (1993) "Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications" *Diabetes* 42: 801-813
307. Win, L. M., and Wells, P. G. (1997) Evidence for embryonic prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation and reactive oxygen species-mediated oxidation of cellular macromolecules in phenytoin and benzo[a]pyrene teratogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 607-621
308. Wood JG, Zhang Q, Yan ZY, Cheung LY (1996) "Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction in canine stomach" *Am J Physiol* 271: 27-35
309. Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM (2000) "A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation" *J. Biol. Chem.* 275: 1873-1877
310. Wu KK, Sanduja R, Tsai A-L, Ferhanoglu B, Loose-Mitchell DS (1991) Aspirin inhibits interleukin-1 induced prostaglandin H synthase expression in cultured endothelial cells" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 2384-2387

Bibliografia

311. Yada Y, Higuchi K, Imokawa G (1991) "Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes" *J. Biol. Chem.* 266: 18352-18357
312. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y., Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, and Masaki T (1988) "A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells" *Nature* 332, 411-415.
313. Yang X, Borg LAH, Eriksson UJ (1997) "Altered metabolism and superoxide generation in neural tissue of rat embryos exposed to high glucose" *Am. J. Physiol.* 272: 173-180
314. Zonana J, Rimoin DN (1976) "Inheritance of diabetes mellitus" *Engl. J. Med.* 295: 603